



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TİCARİ ARI EKMEĞİ ÖRNEKLERİNDEKİ LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN TANIMLANMASI**

Nermin ÇELİK

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA

Temmuz, 2023

Bu çalışma, 11.07.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Murat PEKMEZ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Mine ANĞ KÜÇÜKER
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Tıp Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2021-37196 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla destek olan ve yol gösteren, yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağım kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı Arda'ya teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Yardımlarını hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili arkadaşlarım İ.Ü. Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü doktora öğrencileri Yunus AKSÜT'e ve Aurèle Assou KOFFİ'ye; kritik anlardaki unutulmaz destekleri için Dr. Gizem SÖNMEZ OSKAY'a ve Dr. Aslıhan ŞENGELEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çanakkale Arı Yetiştiricileri Birliği Başkanı Sayın Cahit İLERİ'ye, Kırklareli Kıyıköy beldesi arıcılarından Sayın Cemal SATKIN'a, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü öğretim üyelerinden Dr. Öğr. Üyesi Devrim OSKAY'a gösterdikleri cömertlik için minnettarlık duymaktayım.

Son olarak çalışmamda desteğini ve bana olan güvenini esirgemeyen ve beni bu günlere sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştirerek getiren ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım olan aileme sonsuz teşekkürler.

Temmuz 2023

Nermin ÇELİK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	ix
ÖZET.....	x
SUMMARY.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	5
2.1. ARI EKMEĞİ.....	5
2.1.1. Arı Ekmeğinin Biyolojik Üretim Süreci.....	5
2.1.2. Arı Ekmeğinin Sağlığa Faydaları.....	8
2.1.3. Ticari Arı Ekmeği Üretimi.....	10
2.1.4. Arı Ekmeğinin Kimyasal Özellikleri.....	11
2.1.5. Arı Ekmeğinin Sahip Olduğu Aktiviteler	14
2.1.6. Arı Ekmeğinde Bulunan Mikroorganizmalar	16
2.2. LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ	17
2.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Özellikleri ve Sınıflandırılması	17
2.2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Arı Ekmeği Üretimindeki Rolü	19
2.2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Olarak Kullanımı.....	20
2.2.4. Starter Kültür Olarak Laktik Asit Bakterilerinin Kullanımı	22
2.2.5. Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmasında Kullanılan Klasik ve Moleküler Yöntemler	23
2.3. LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN FİLOGENETİK ANALİZİ.....	26
2.3.1. 16S rRNA Geni Dizi Analizi	26
2.3.2. NGS (Yeni Nesil Dizileme) Yöntemleri.....	26
2.3.3. Illumina (Solexa) Dizileme	27
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	29
3.1. KULLANILAN KİMYASALLAR, SARF MALZEMELER VE ALETLER	29
3.2. BİYOLOJİK MATERYALLER.....	31

3.2.1. Arı Ekmeği Örneklerinin Temini	31
3.2.2. Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Elde Edilmesi.....	31
3.2.3 Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi	31
3.2.4. DNA İzolasyonu.....	32
3.2.5. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	32
4. BULGULAR.....	34
4.1. ARI EKMEĞİ ÖRNEKLERİNİN DNA KALİTESİ.....	34
4.2. ARI EKMEĞİ ÖRNEKLERİNİN YENİ NESİL DİZİLEME ANALİZİ	35
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	39
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	58

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: Arı ekmeğinin kovandaki (solda) ve peteklerden çıkarılmış hali (sağda).	6
Şekil 2.2: Arıların doğal olarak arı ekmeği üretme süreci (Barta ve diğ., 2022).	6
Şekil 2.3: Arı ekmeğinin biyoteknolojik üretim süreci (Barta ve diğ., 2022).	10
Şekil 2.4: LAB tiplendirmesinde kullanılan fenotipik ve moleküler yöntemlerin taksonomik olarak derecelendirilmesi (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011).	25
Şekil 2.5: Illumina NGS dört adımdan oluşur: (A) Kütüphane hazırlanması, (B) Küme oluşturma, (C) Dizileme, (D) Hizalama ve veri analizi.	28
Şekil 4.1: DNA örneklerinin elektroforezden sonra agaroz jeldeki görüntüsü (A) DNA izolasyonu sonrası, (B) PCR sonrası.	34

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1: Arı ekmeğinin biyokimyasal içeriği (Bakour ve diğ., 2019).	14
Tablo 2.2: Arı midesinde, balda, arı poleninde, arı ekmeğinde ve arı sütünde dizileme ile belirlenmiş bakteriler (Asama ve diğ., 2015).	17
Tablo 4.1: Çanakkale ve Kıyıköy DNA örneklerinin NanoDrop ile ölçüm sonucu.	34
Tablo 4.2: Çanakkale ilinden toplanan arı ekmeği örneğinde bulunan laktik asit bakterilerinin % oranları.	36
Tablo 4.3: Kıyıköy yöresinden toplanan arı ekmeği örneğinde bulunan laktik asit bakterilerinin % oranları.	38
Tablo 5.1: Sarmaşık çiçeklerinde, arı poleninde, 15 gün kovanda depolanan arı ekmeğinde ve 30 gün kovanda depolanan arı ekmeğinde tanımlanan laktik asit bakteri türleri (Di Cagno ve diğ., 2019).	40

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler Açıklama

°C	: Derece santigrat
%	: Yüzde
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
g	: Gram
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
Mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
V	: Volt

Kısaltmalar Açıklama

EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (“Food and Agriculture Organization of the United Nations”)
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (“Low Density Lipoprotein”)
NGS	: Yeni Nesil Dizileme (“Next Generation Sequencing”)
OTU	: Operasyonel Takson Birimi (“Operational Taxon Unit”)
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (“Polymerase Chain Reaction”)
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı (“Revolutions per Minute”)
TAE	: Tris asetat EDTA tamponu
TL	: Türk Lirası
ve diğ.	: ve diğerleri
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (“World Health Organization”)

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TİCARİ ARI EKMEĞİ ÖRNEKLERİNDEKİ LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN TANIMLANMASI

Nermin ÇELİK

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA

Bal arıları polenleri ham şekliyle tüketmez. İşçi arılar tarafından toplanan polen taneleri nektar ve arının sindirim sıvıları ile karıştırılarak özümser, kuluçka peteği içerisinde biriktirilip bal ve balmumu ile sıvanarak daha sonra kullanılmak üzere depolanır. Arı ekmeği (perga) olarak bilinen bu son ürün, kolonideki erişkin arıların ve larvaların temel gıda kaynağıdır. Arı ekmeği başlangıçta polen, nektar ve arının çeşitli salgılarını içerir. Bu karışımın kimyasal içeriği bir süre sonra, ortamdaki çeşitli mikroorganizmaların (çoğunlukla laktik asit bakterileri ve bazı mayaların) etkisiyle gerçekleşen doğal bir fermantasyon sürecine bağlı olarak değişime uğrar. Arı ekmeğinin içeriği ve kalitesi, arının genetik özellikleri, polen ve nektar tipleri, ortamdaki mikroorganizmalar ve kimyasallar gibi fermantasyon süreciyle ilişkili çeşitli faktörlere bağlıdır. Arılar tarafından toplanan polen ve nektarın tipi floradaki bitki türlerine ve çevresel şartlara göre değişir, ayrıca fermantasyonda rol oynayan laktik asit bakterilerini etkiler. Laktik asit bakterileri sadece fermantatif etkileriyle değil, ürettikleri antimikrobiyal metabolitlerle de sürece katkıda bulunurlar. Arı ekmeğindeki antimikrobiyal metabolitlerin koloni üyelerini patojen mikroorganizmalara karşı koruduğu ileri sürülmektedir.

Bu çalışma, Türkiye'nin farklı bölgelerinden temin edilen ticari arı ekmeği örneklerindeki laktik asit bakterilerini, mikrobiyolojik ve moleküler yöntemler kullanarak tanımlamak, kültüre almak ve gelecekte arı ekmeğine benzer yeni bir yapay ürünün geliştirilmesine katkıda bulunmak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada, Çanakkale ve Kızılköy bölgelerine ait iki arı ekmeği örneğinde bulunan laktik asit bakterileri 16S rRNA geni dizileme yöntemi (Illumina) kullanılarak tanımlanmıştır. Elde edilen

verilere göre, bu bölgelere ait arı ekmeği örneklerinde farklı laktik asit bakteri türlerinin varlığı tespit edilmiştir.

Her iki örnekte de *Lactobacillus* cinsi en yüksek oranda bulunmuştur. Operasyonel bir takson birimi (OTU) olan "*Bifidobacterium* sp.", Çanakkale örneğinde tespit edilmezken, Kıyıköy örneğinde düşük oranda saptanmıştır. Ayrıca *Bacillus* cinsi bakteriler ve *Bacillus coagulans* türü Çanakkale örneğinde bulunmasına rağmen Kıyıköy örneğinde tespit edilmemiştir. Her iki örnekte de *Actinobacteria* sınıfından *Bifidobacterium asteroides* ve *Schaalia odontolytica* türleri ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilere rastlanmıştır. Farklı bölgelerdeki bal arısı ürünleri farklı mikroorganizma profillerine sahip olabilir. Ayrıca diğer çevresel faktörler de kovandaki mikrobiyal toplulukların farklılaşmasına neden olabilir.

Bu çalışma, arı ekmeği örneklerinde laktik asit bakterilerinin genetik çeşitliliğinin ve dağılımının belirlenmesinde önemli bir adımdır. Laktik asit bakterileri, arı ekmeğinde bulunan ve sağlık açısından potansiyel faydaları olan önemli mikroorganizmalardır. Bu tezin arı ekmeği ve içerdiği laktik asit bakterilerinin daha iyi anlaşılmasına ve gıda takviyesi olarak kullanımının yaygınlaştırılması için yapay arı ekmeği gibi yeni endüstriyel fermente ürünlerin geliştirilmesine katkı sağlaması beklenmektedir.

Temmuz 2023, 71 sayfa.

Anahtar kelimeler: Arı ekmeği, perga, laktik asit bakterileri, polen fermantasyonu, metagenomik.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA IN COMMERCIAL BEE BREAD SAMPLES

Nermin ÇELİK

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA

Honey bees do not consume pollen in its raw form. The pollen grains collected by worker bees are digested by mixing them with nectar and bee digestive fluids, collected in the brood cells, then sealed with honey and beeswax for later consumption. This end product known as bee bread (perga) is the main food source for adult bees and larvae in the colony. Bee bread initially contains pollen, nectar and various bee secretions. The chemical composition of this mixture changes after a while, due to a natural fermentation process that occurs by the effects of various microorganisms (mainly lactic acid bacteria and some yeasts) in the environment. The content and quality of bee bread depend on various factors associated with the fermentation process, such as bee genetics, pollen and nectar types, microorganisms and chemicals in the environment. The type of pollen and nectar collected by bees varies due to the plant species in the flora and environmental conditions and also affects the lactic acid bacteria that play a role in fermentation. Lactic acid bacteria contribute to the process not only with their fermentative effects but also with the antimicrobial metabolites they produce. It is suggested that antimicrobial metabolites in bee bread protect colony members against pathogenic microorganisms.

This study was conducted with the aim of contributing to the development of a novel artificial product similar to bee bread, by identifying and culturing the lactic acid bacteria in commercially available samples of bee bread from different regions of Turkey using microbiological and molecular methods.

In the study, lactic acid bacteria present in two samples of bee bread from the Çanakkale and K1yık1y regions were identified using the 16S rRNA gene sequencing method (Illumina). According to the obtained data, the presence of different species of lactic acid bacteria was detected in the samples of bee bread from these regions.

In both samples, the genus *Lactobacillus* was found to be the most abundant. While "*Bifidobacterium* sp.", an operational taxon unit (OTU), was not detected in Çanakkale sample, it was detected in low rate in K1yık1y sample. In addition, bacteria belonging to the genus *Bacillus*, such as *Bacillus coagulans* were found in the Çanakkale sample but not detected in the K1yık1y sample. *Bifidobacterium asteroides* and *Schaalia odontolytica* from the class *Actinobacteria*, as well as bacteria from the genus *Bifidobacterium*, were encountered in both samples. Honeybee products from different regions may have different microorganism profiles. In addition, other environmental factors may also cause diversification in microbial communities in the hive.

This study is an important step in determining the genetic diversity and distribution of lactic acid bacteria in bee bread samples. Lactic acid bacteria are significant microorganism found in bee bread and have potential health benefits. It is expected that this thesis will contribute to a better understanding of bee bread and the lactic acid bacteria it contains, and the development of new industrial fermented products such as artificial bee bread in order to extend its use as a food supplement.

July 2023, 71 pages.

Keywords: Bee bread, perga, lactic acid bacteria, pollen fermentation, metagenomics.

1. GİRİŞ

Arı ekmeği (diğer adıyla perga), bal arılarının (*Apis mellifera* L.) ürettiği ve larvaların yanı sıra kraliçe arı dahil erişkin arıların da tükettiği besleyici bir gıdadır. Bir arı kovanının içinde sıcaklık yaklaşık 35°C'dir ve bu sıcaklıkta besinler hızlı bir şekilde bozulur. Ayrıca uzun kış ayları boyunca tüketilecek yeterli besin maddesinin kovanda bulunması gerekir. Bu nedenle arıların kovana taşıdıkları besinleri güvenli şekilde depolamaları gerekir (Olofsson ve Vásquez, 2018).

Arı ekmeği, arı poleni, çiçek nektarı ve bal arısının tükürük bezlerinden salgıladıkları salgılarla üretilir. İşçi arılar tarafından toplanan polenler, bal ile sabitlenip kovandaki petek hücrelerinde paketlenir. Bu ham madde ortamdaki mikroorganizmaların da etkisiyle, iki haftalık doğal bir laktik asit fermantasyonu sürecinden sonra arı ekmeğine dönüşür ve aylarca korunur (Barene ve diğer., 2015; Olofsson ve Vásquez, 2018).

Arı ekmeği, polenden farklı olarak daha düşük pH (3.8-4.3) değerine sahiptir. Arı ekmeğinin biyoyararlanımı daha iyidir çünkü gastrointestinal sıvılar tarafından tahrip edilemeyen polen duvarları, fermantasyonla kısmen tahrip edilir ve polenin işlevsel ve enerji açısından zengin içeriği daha kolay sindirilebilir ve kullanılabilir hale gelir (Barene ve diğer., 2015).

Bal arılarının besin kaynakları ve ürettikleri gıdalar bazı mikroorganizmalar için de uygun bir yaşam alanı oluşturur. Nektar ve polen yoluyla kovana, bakteri, maya ve küf gibi çeşitli mikroorganizmalar taşınabilir. Arı ekmeğinde patojenik mikroorganizmaların bulunmamasının nedeni, laktik asit bakterilerinin gerçekleştirdiği fermantasyon sürecinde ortaya çıkan metabolitlerin ortamın pH'sını düşürmesi olabilir (Vásquez ve Olofsson, 2009).

Arı ekmeği, karbonhidrat, protein, lipid ve vitaminler açısından oldukça zengin bir içeriğe sahiptir. Yüksek miktarda karbonhidrat, protein, lipid ve lif içerir. C, K, E vitaminleri ve K, P, Mg ve Ca gibi mineraller açısından oldukça zengindir. Fenolik asitler, flavonoidler ve fenilamidler gibi biyoaktif bileşikleri içerir (Aylanc ve diğer., 2021). Arı ekmeği sahip olduğu biyokimyasal ve biyoaktif içerik nedeniyle sağlık üzerine oldukça faydalı etkiye sahiptir. Arı

ekmeğinin içeriği, arı türüne, bitki florasına ve çevresel koşullara göre değişiklik göstermektedir (Aylanc ve diğ., 2023).

Zengin içeriği nedeniyle arı ekmeği, insanlarda vitamin ve besin eksikliğini giderebilecek mükemmel bir gıda ürünüdür. Tüm esansiyel amino asitlerin varlığı nedeniyle arı ekmeği, hayvansal ürünlerden elde edilen proteinlere göre daha iyi bir bileşime sahiptir. Arı ekmeği ayrıca içerdiği bileşenler nedeniyle çeşitli toksinlerin atılmasına yardımcı olur (Nagai ve diğ., 2005; Habryka ve diğ., 2016).

Arı ekmeği, taze polende bulunmayan K vitamininin yanı sıra B vitaminleri açısından da zengindir (Gilliam, 1979). Arı ekmeği, zihinsel olarak çalışan insanlar için faydalı bir gıda ürünü olabilir (Nagai ve diğ., 2004).

Arı ekmeği içerdiği fenolik bileşikler nedeniyle antimikrobiyal özellik gösterir (Didaras ve diğ., 2020). Bazı çalışmalar arı ekmeğinin inflamasyonu azalttığını göstermiştir (Kosedag ve Gulaboglu, 2023). Yapılan bir çalışmada arı ekmeği örneklerinin insan kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği gösterilmiştir (Loukas ve Maria, 2023). Arı ekmeğinin bu etkileri insan sağlığına faydalı olabileceğine işaret etmektedir.

Arı ekmeğinde bulunan laktik asit bakterileri (LAB), probiyotik özelliklere sahip mikroorganizmalardır ve insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olduğu bilinmektedir. Arı poleni ve arı ekmeğinin yapısında bulunan laktik asit bakterileri, ortamın pH'sını düşürerek zararlı mikroorganizmaların gelişmesini engeller. Polenlerin arı ekmeğine dönüştürülmesi sırasında pH değerinin düşmesi, arıların gastrointestinal sisteminden polenlere aktarılan laktik asit bakterilerinin aktivitesine bağlıdır (DeGrandi-Hoffman ve diğ., 2013). Bal arılarının (*A. mellifera*) sindirim sisteminden izole edilen laktik asit bakterileri, arı kolonisindeki bireylerin yaşamını tehdit eden ve son derece bulaşıcı olan Amerikan yavru çürüklüğü enfeksiyonuna yol açan patojenin (*Paenibacillus larvae* ssp. *larvae*) büyümesini inhibe eder (Vásquez ve diğ., 2012).

Birçok çalışmada laktik asit bakterilerinin insan ve hayvan sağlığı üzerindeki yararlarının yanı sıra gıda endüstrisi ve tarım alanındaki olumlu etkileri de gösterilmiştir. Gıdalarda LAB koruyucu olarak kullanılır. İnsanlarda, LAB içeren fermente gıdaların ve gıda takviyelerinin

günlük tüketimi, insan sağlığı üzerine çoklu yararları nedeniyle küresel bir artış eğilimi göstermiştir. LAB'nin insan sağlığı üzerine etkileri temel olarak, kronik bağırsak hastalıklarının ve kolon kanserinin önlenmesi, immünomodülasyon, cilt sağlığının teşvik edilmesi, alerjik durumların hafifletilmesi, laktoz intoleransının giderilmesi, gastroenterit ve peptik ülserle karşı koruyucu etki, üropatojenlerin inhibisyonu, plazma kolesterol seviyelerinin kontrolü ve nörotransmitterlerin (örneğin, gama-aminobütirik asit) üretimi olarak sıralanabilir (Miranda ve diğ., 2021).

LAB hayvan sağlığı üzerinde de olumlu etkilere sahiptir. Hayvanların bağırsak mikrobiyotasının düzenlenmesinde kullanılır. Probiyotik olarak laktik asit bakterileri, sığırlarda ve geviş getiren hayvanlarda, domuzlarda, kümes hayvanlarında ve arıcılıkta hayvan sağlığını korumak ve büyümeyi teşvik etmek, üreme performansını ve hastalık direncini arttırmak için kullanılır (Ramos ve diğ., 2020).

Her bir arı ürününün kendine özgü bir kimyasal içeriği vardır ve bu bileşim üreticiden üreticiye farklılık gösterir (Vásquez ve Olofsson, 2009). Arı ürünlerinin bazıları geleneksel tıpta yüzyıllardır kullanılmaktadır, ancak bugüne kadar yapılan araştırmalar, bu ürünlerin bilinmeyen birçok tıbbi özelliğini ortaya çıkarmıştır. Yapılan bilimsel araştırmalar, arı ürünlerinin detoksifikasyon sürecinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Organizmada biriken zararlı maddeleri, suda çözünen bileşiklere dönüştürerek kolayca atılmasını sağlarlar (Almeida-Muradian ve diğ., 2005; Estevinho ve diğ., 2008). Arı ürünlerinin terapötik özellikleri, hatta bazı kanser tiplerine karşı koruyucu etkileri keşfedilmiştir ve bilim insanları, arı ürünlerinin terapötik özelliklerinin ardındaki diğer sırları keşfetmek için araştırmalarını sürdürmektedir (Hellner ve diğ., 2008; Grassberger ve diğ., 2013; Kieliszek ve diğ., 2018).

Arı ekmeği, kimyasal içeriği ve probiyotik olarak kabul edilen laktik asit bakterilerini içermesi nedeniyle kıymetli bir üründür. Ancak, arılar ve larvalar tarafından tüketildiğinden arı ekmeğinin fazla miktarda toplanması arıları kışın besin sıkıntısına düşürebilir, bu nedenle arı ekmeği ancak belli dönemlerde ve belli miktarlarda toplanabilir ve ticari olarak polenden daha değerlidir.

Arı ekmeğini büyük miktarlarda doğal yollardan elde etmek zordur, çünkü arılar tarafından sıkı bir şekilde peteklerde paketlenmiştir, kuru ve sert bir kıvama sahiptir. Arı ekmeğinin

toplanmasını hızlandıran farklı yöntemler bulunmaktadır. Arı ekmeği, insanlar için tıbbi, kozmetik ve besleyici bir ürün olarak kullanılacaksa, en yüksek mikrobiyolojik saflığı sağlamak için elle toplanması gerekmektedir ve bu da zahmetli bir yöntemdir (Fuenmayor ve diğ., 2014). Bu nedenle, gıda endüstrinde laktik asit fermentasyonu ile yapay arı ekmeği üretilerek farklı besin formülleri oluşturma arayışları sürmektedir.

İ.Ü. Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde yapılan bir yüksek lisans çalışmasında, arı polenlerinin *Lactobacillus plantarum* veya *Lactobacillus fermentum* starter kültürleri kullanılarak fermente edilmesiyle üretilen yapay arı ekmeği örneklerinin antioksidan kapasite, total fenolik ve total flavonoid içerik gibi özellikleri doğal arı ekmeği ile karşılaştırılmıştır (Örsel, 2022). Sonuçlar, bazı örneklerin doğal arı ekmeğine göre daha üstün antioksidan kapasite ve fenolik/flavonoid içeriğe sahip olduğunu göstermiştir. Laktik asit bakterileri, fermentasyon süreci sırasında biyoaktif bileşiklerin üretimini teşvik ederek, ürünlerin antioksidan kapasitesini arttırabilir. Ayrıca, laktik asit bakterilerinin metabolik faaliyetleri sonucu oluşan organik asitler ve diğer bileşikler de antioksidan etkiye sahip olabilir.

Bu tez kapsamında, doğal arı ekmeğine benzer bir ürün elde etmek için gelecekte yapılması planlanan polen fermentasyonu çalışmalarına katkı sağlamak amacıyla, Kıyıköy (Kırklareli) ve Çanakkale'deki yerel arıcılardan temin edilen arı ekmeği örneklerindeki laktik asit bakterileri moleküler yöntemlerle tanımlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ARI EKMEĞİ

2.1.1. Arı Ekmeğinin Biyolojik Üretim Süreci

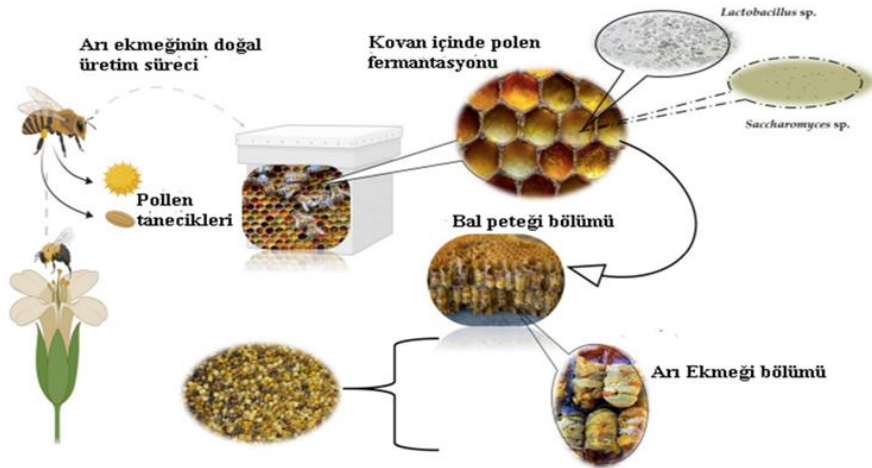
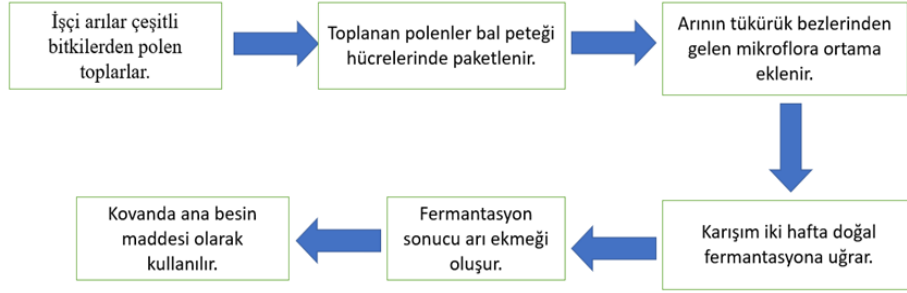
Bal arıları, poleni vitaminler, proteinler, yağ asitleri, lipitler, steroller, mineraller ve karbonhidratlar açısından zengin bir kaynak olarak kullanır (Loper ve diğ., 1980). Polenı toplan ve kovan içinde arı ekmeği olarak depolar, ardından bu ürün arılar ve larvalar tarafından tüketilir. Arı ekmeği, bakteri ve mayalar tarafından gerçekleştirilen laktik asit fermantasyonuyla üretilir, ancak üretim sürecinin mikrobiyal mekanizması oldukça karmaşıktır (Chevtchik, 1950; Foote, 1957; Haydak, 1958; Pain ve Maugenet, 1966; Egorova, 1971; Gilliam, 1979; Gilliam ve diğ., 1989). Başlangıçta arı ekmeği, arı poleni, nektar ve arının tükürük bezlerinin salgılarını içeren polenden oluşur. Arı poleni, işçi arılar tarafından toplanır ve arka bacaklarındaki özel bir polen sepetine yerleştirilerek kovana taşınır (Michener, 1974). Arıların tükürüğündeki enzimler aracılığıyla, polenin dış tabakasının kırılması için gerekli biyokimyasal dönüşümler başlatılır (Atkin ve diğ., 2011). Kovadaki bal peteği hücrelerine yerleştirilen polen bal ile kapatılır. İki hafta sonra, farklı mikroorganizmaların müdahalesiyle doğal bir fermantasyon sonucu kimyasal olarak değişime uğrar (Chevtchik, 1950; Pain ve Maugenet, 1966). Bu iki haftalık fermantasyon sürecinin ardından (Pain ve Maugenet, 1966), arı ekmeği aylarca bozulmadan kalabilir. Süreç tamamlandığında, yüksek miktarda laktik asit ve diğer metabolitler, arı ekmeğini bozulmaya karşı korur. Arı ekmeğinin kimyasal bileşimi, arı poleninden farklılık gösterir; örneğin, arı ekmeği laktik asit nedeniyle daha yüksek asiditeye sahiptir ve K vitamini açısından zengindir (Haydak ve Palmer, 1942).

Bal arıları topladıkları polenleri kovana getirerek petek hücrelerine yerleştirirler (Fuenmayor ve diğ., 2014) (Şekil 2.1). Hücrelere yerleştirilirken, polen arılar tarafından bal, sindirim enzimleri ve organik asitler bakımından zenginleştirilir (Deveza ve diğ., 2015). *Lactobacillus* cinsi bakterilerin neden olduğu laktik fermantasyon süreci, bal peteklerinde, oksijensiz koşullar altında spontane olarak gerçekleşir (Barta ve diğ., 2022) (Şekil 2.2). Polen zarları, polenin arı ekmeği haline dönüşüm sürecinde tamamen çözünür ve bu şekilde daha kolay bir şekilde emilebilir hale gelir. Fermantasyonla arı ekmeği formuna dönüşen polen, sadece polenin

özelliklerinin kaybına karşı koruma sağlamakla kalmaz, aynı zamanda enzimatik dönüşümler sonucunda yeni biyoaktif bileşenlerin ortaya çıkmasına da neden olur (Kieliszek ve diğ., 2018).



Şekil 2.1: Arı ekmeğinin kovandaki (solda) ve peteklerden çıkarılmış hali (sağda).



Şekil 2.2: Arıların doğal olarak arı ekmeği üretme süreci (Barta ve diğ., 2022).

Avustralya'da en yaygın olarak bulunan iğnesiz arı türü olan *Tetragonula carbonaria*'nın yuva aralığını tahmin etmek için yapılan bir çalışmada; yuva aralığı, yiyecek arama uçuş aralığı için bir ölçüt olarak kullanılmaktadır. *T. carbonaria*'nın tipik ve maksimum yuva aralıkları sırasıyla 333 ve 712 metre olarak bulunmuştur. Bu aralık, en yaygın olarak kullanılan ticari tozlayıcı olan Avrupa bal arısı *Apis mellifera* Linnaeus'un uçuş mesafesinden daha kısadır ve *T. carbonaria* için alternatif bir ürün tozlayıcısı olarak hem avantajlar hem de dezavantajlar sağlayabilir. Bal arılarının tozlaşma süreçlerini optimize etmek ve tüketici taleplerini değerlendirmek amacıyla bu alanda daha fazla araştırmanın yapılması gerekmektedir (Smith ve diğ., 2017).

Heterotrigona itama gibi bazı iğnesiz arı türleri, özellikle beyaz ve krem renkli çiçeklere, yüksek şeker konsantrasyonu ve nektar içeren bitkilere giderler ve yuvalarına en yakın olanları tercih ederler (Mohammed ve diğ., 2020).

Bal arıları (*Apis mellifera* L.), diğer böcek türlerine göre 10 ila 1000 kat daha fazla polen toplar. Tek bir yiyecek arama gezisi sırasında, arılar yeterli miktarda polen toplamak için 1 ila 500 çiçeği ziyaret eder ve günlük olarak ortalama 10 ila 15 ziyaret gerçekleştirirler. Pakistan'da yapılan bir çalışmada, bal arılarının polen kaynağı olarak mısır, ayçiçeği ve hardal bitkilerini daha çok tercih ettiği görülmüştür (Begum ve diğ., 2021).

Arı ekmeğinin arı polenine göre daha yüksek şeker ve serbest amino asit içeriğine sahip olması ve fermantasyon süreci sonrasında arı polenlerinin dış zarlarının yıkılması sayesinde sindirim sistemi tarafından daha kolay sindirilebilmesi gibi özellikleri, arı ekmeğini arı poleninden daha önemli kılmaktadır (Aylanc ve diğ., 2023).

Arı ekmeğinin zengin içeriği, üretildiği polenle benzerlik gösterir ve mikroflora bakımından da arı poleni ile benzer özelliklere sahiptir. *Lactobacillus* ve özellikle *L. kunkeei* türüne ait bakteriler, arı ekmeğinde, balda, arının sindirim sisteminde, arı poleninde ve arı sütünde belirlenmiştir (Asama ve diğ., 2015).

2.1.2. Arı Ekmeğinin Sağlığa Faydaları

Arı ekmeğinin sağlığa faydaları da araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Özellikle arı ekmeğinde bulunan laktik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri nedeniyle sindirim sistemine olumlu katkıları olabileceği düşünülmektedir (Kieliszek ve diğ., 2018).

Arı ekmeği, yaklaşık olarak %20 protein, %3 lipid, %24-35 karbonhidrat, %3 mineral ve vitamin içeren dengeli bir bileşime sahiptir. Ayrıca, vücudun sentezleyemediği temel amino asitleri içeren geniş bir protein yelpazesine sahiptir. İçeriğinde C, B1, B2, E, H, P, niasin, folik asit ve pantotenik asit gibi geniş bir vitamin spektrumu; sakkaraz, amilaz, fosfataz gibi biyolojik olarak aktif enzimler; flavonoidler, karotenoidler ve hormonlar gibi diğer biyolojik olarak aktif bileşikler bulunur (Haydak ve Vivino, 1950). Arı ekmeğinde bulunan B grubu vitaminler, genel olarak metabolizmanın düzenlenmesi, sinir sisteminin işleyişi ve hematopoezin uyarılması için önemlidir. Arı ekmeği, demir, kalsiyum, fosfor, potasyum, bakır, çinko, selenyum, magnezyum gibi 25'ten fazla farklı mikro ve makro element ve ayrıca antibakteriyel etkisi olan aktif maddeler içerir. Arı ekmeğinde daha az karbonhidrat ve kolay sindirilen proteinler bulunur. Bu özelliği nedeniyle, yoğun zihinsel faaliyetlerde bulunanlar için özellikle uygun bir üründür. Ayrıca, stres, depresyon, hafıza kaybı ve dikkat eksikliği durumlarında çok faydalıdır. Daha düşük kolesterol seviyesi ve daha yüksek miktarda magnezyum ve kalsiyum içeriğiyle, kalp hastalıklarında olumlu etkileri olabilir. Arı ekmeği ayrıca tip II diyabet hastalarının bağışıklık sistemine ve kronik eklem ve kardiyovasküler hastalıklara sahip hastaların lipid metabolizmasını düzenlemeye olumlu etki yapar (Nagai ve diğ., 2004).

Son yıllarda, serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) yaşlanma süreçlerine ve diyabet, obezite ve hipertansiyon gibi yaşam tarzıyla ilişkili hastalıkların ortaya çıkmasına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (Yang ve Lian, 2020). Yapılan bir çalışmada arı ekmeği özütlerinin yüksek antioksidan etkilere ve süperoksit ve hidroksil radikalleri gibi ROS'ları temizleme yeteneklerine sahip olduğu gösterilmiştir (Bakour ve diğ., 2022). Farklı kanser hücre hatlarıyla yürütülmüş güncel bir çalışmada, arı ekmeği özütünün kanserli hücre hatlarının büyümesini inhibe ettiği ve normal hücrelere toksik etki göstermediği belirlenmiştir (Loukas ve Maria, 2023). Gelecekte, arı ekmeğinin, antioksidan ve ROS temizleme aktiviteleri

gibi fonksiyonel özellikleri nedeniyle sağlık gıdası ve ilaç olarak daha da yaygın olarak kullanılması beklenmektedir (Nagai ve diğ., 2004; Bakour ve diğ., 2022).

Arı ekmeği bal arıları için önemli bir besin kaynağıdır ve yüksek besin değeri nedeniyle insanlar tarafından da tüketilmektedir. Zengin kimyasal içeriği ve yüksek besin değerinin yanı sıra arı polenine göre daha kolay sindirilebilir olması, arı ekmeğini diğer arı ürünleri arasında öne çıkarmaktadır. Ayrıca, arı ekmeğinin sağlık üzerindeki olumlu etkileri de araştırmalar ile desteklenmektedir.

Sporcular için özel olarak geliştirilen bir ürün olan Perga Sport (ham bal, saf perga, polen ve arı sütü) kullanılarak yapılan bir çalışmada, Perga Sport tüketen sporcuların ve sedanterlerin performanslarında tüketmeyenlere göre önemli derecede artış olduğu gösterilmiştir (Zorba ve diğ., 2019).

Fermente polen olan arı ekmeği gıda takviyesi olarak da tüketilmektedir. Yetişkin bir birey için önerilen günlük doz 20-40 g'dır ve arı ekmeği tüketimiyle ilgili doz aşımı bildirilmemiştir. Arı ekmeği ile beslenmenin hayvanlar ve insanlar için faydalı olduğu bilinmektedir. İştahsızlık sorunu olan çocuklar için protein açısından zengin polen ve arı ekmeği içeren bir diyetin uygun olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, bağışıklık sistemini güçlendirmede, cerrahi operasyon sonrası hastalarda ve malnütrisyonun yaygın bir morbidite ve mortalite nedeni olduğu yaşlı hastalarda özellikle faydalıdır (Kieliszek ve diğ., 2018; Di Cagno ve diğ., 2019).

Arı kovanlarında arı ekmeği üretimi çeşitli faktörler nedeniyle düşük seviyelerde kalmıştır. İş gücü maliyetleri, bu arı ürününün hasadını sınırlayabilecek bir faktör olabilir. Bununla birlikte, arı ekmeği ticaretini yaygınlaştırmak iyi bir seçenek olabilir çünkü arı ekmeği, insan bağışıklık sistemi üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir, antibiyotik ve antioksidan özelliklere sahiptir ve çiçek poleniyle karşılaştırıldığında insan vücudu tarafından daha iyi sindirilir. Arı ekmeği üretimi, arıcıların gelirini arttıran arıcılık faaliyetinin çeşitlendirilmesi için alternatif ve etkili bir yöntem olabilir. Üretim tekniğini iyileştirmek, tedarik zincirini daha verimli hale getirmek ve tüketici memnuniyetini değerlendirmek amacıyla daha ileri araştırmalar yapılmalıdır (Semkiw ve Skubida, 2021).

2.1.3. Ticari Arı Ekmeği Üretimi

Arı ekmeği üretimi, öncelikle arı kolonilerinin yönetimi ve sağlıklı tutulması ile başlar. Arıların sağlıklı bir şekilde beslenmeleri, doğal ortamlarında kaliteli polen ve nektar kaynaklarına sahip olmaları, kolonilerin düzenli olarak kontrol edilmesi ve gerekli önlemlerin alınması, kaliteli arı ekmeği üretiminde kritik öneme sahiptir. Arı ekmeği üretiminde en önemli faktörlerden biri, ürünün kalitesidir. Kaliteli arı ekmeği üretmek için, ham maddenin kalitesi, hijyenik koşulların sağlanması, doğru yöntemlerinin kullanılması ve uygun depolama koşullarının sağlanması gerekmektedir. Arı ekmeğinin ham maddesi bitki polenlerinden kaynaklanmaktadır. Küresel polen üretiminin yılda 1.36 milyon kg olduğu tahmin edilmektedir ve en büyük katkıyı Çin, Avustralya ve Arjantin sağlamaktadır (Kieliszek ve diğ., 2018).

Arı ekmeğine benzer biyoteknolojik bir ürün elde etme süreci, özellikle laktik asit bakterileri olmak üzere kolonize olan mikroorganizmaların anaerobik koşullar altında çoğalmasıyla meydana gelen polen fermentasyonuna dayanmaktadır (Zuluaga ve diğ., 2015; Mılek ve diğ., 2023). Mikrobiyal metabolizma ve biyokimyasal değişiklikler sonucunda, arı poleni, özellikle *Pseudomonas* spp., *Lactobacillus* spp. gibi bakteriler ve *Saccharomyces* spp. gibi mayalar tarafından gerçekleştirilen laktik asit fermantasyonu yoluyla arı ekmeğine dönüşür. Bu süreç Şekil 2.3'te özetlenmiştir. (Barta ve diğ., 2022).



Şekil 2.3: Arı ekmeğinin biyoteknolojik üretim süreci (Barta ve diğ., 2022).

Arı ekmeğinin kovanlardan toplanarak tüketicilere sunulması, uzun ve maliyetli bir süreç gerektirir. Bu nedenle, arı ekmeği piyasada oldukça değerlidir ve kilogram birim değeri genellikle 1000-1700 TL arasında değişir. Bu süreci kolaylaştırmak için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında, peteklerin suda bekletilmesi, titreşim yoluyla doğrudan ekstraksiyon, vakumlu kurutma sistemlerinin kullanımı ve dondurma işlemleri bulunmaktadır. Küçük ölçekli işletmelerde, arı ekmeği doğrudan pens kullanılarak çıkarılabilir. Ancak bu yöntemlerin bazı kısıtlamaları ve olumsuz sonuçları vardır. Örneğin, peteklerin suda bekletilmesi sonucu elde edilen arı ekmeğinin besin değeri azalır. Bu nedenle, arı ekmeği üretiminde en iyi yöntemlerin seçilmesi ve kalitenin korunması önemlidir (Khalifa ve diğ., 2020).

2.1.4. Arı Ekmeğinin Kimyasal Özellikleri

Çiçek poleni, arı ekmeği olarak bilinen nihai ürüne dönüşmek için farklı gelişim aşamalarından geçer. Arı poleni ve arı ekmeğinin biyokimyasal profilleri her aşamada biyokimyasal değişiklikler meydana geldiği için farklıdır. Arı ekmeği ve polen, nem, protein, indirgenmiş ve indirgenmemiş şekerler, lipitler, sülfatlı kül, nişasta, pH, pektinler ve ham lif açısından analiz edildiğinde, arı ekmeği örneklerinde herhangi bir nişasta tespit edilemezken, polen örneklerinin hepsinde nişasta bulunmuştur. Ayrıca, arı ekmeğinin, polene göre daha yüksek indirgenmiş şeker ve ham lif düzeylerine sahipken daha düşük kül düzeyine sahip olduğu görülmüştür (Herbert ve Shimanuki, 1978).

Belki de arı poleni ve arı ekmeği arasındaki farkın en belirgin olanı pH'larıdır. Arı ekmeği, arı polenine göre daha asidiktir. Arı poleni ve arı ekmeği pH değişiklikleri konusunda yapılmış çalışmalar yetersizdir. Arı poleni pH'sına bakıldığında, arı ekmeği haline dönüştükten sonra pH'nın 4.7'den 3.97'ye önemli ölçüde düştüğü görülmektedir. Arı ekmeğindeki protein konsantrasyonu, polenden daha düşüktür, ancak genel olarak, amino asit konsantrasyonları arı ekmeğinde polenle karşılaştırıldığında daha yüksektir (DeGrandi-Hoffman ve diğ., 2013).

Arı ekmeğinin değeri, arı polenin botanik kaynağına bağlı olarak protein, amino asitler, yağ asitleri, karbonhidratlar, mineral tuzları, polifenoller ve flavonoidler içermesinden kaynaklanır. Arı ekmeğinin besinsel ve fonksiyonel bileşimi geniş çapta rapor edilmiştir; ancak, bu ürünlerdeki bileşiklerin mevcudiyetini artırmak için polenin dönüşüm süreçleri üzerine yapılan az sayıda

çalışma bulunmaktadır. Genel olarak, arı ekmeği son zamanlarda toplanan ve tüketilen bir arı ürünüdür ve bu aşamada bir besin takviyesi olarak kullanılabilir (Urcan ve diğ., 2017).

Arı ekmeği, yüksek oranda protein, karbonhidrat, B ve K vitaminleri içerir. Yaklaşık olarak %24-35 karbonhidrat, %20-30 protein, %1.6 yağ, %2.43 mineral, %3.5 laktik asit, %35 şeker ve %1.6 yağ içeriğine sahiptir. Ayrıca, arı ekmeği A, B1, B2, B3, B6, B12, C, PP, E, D, K ve H vitaminlerini içerirken, P, S, Cl, K, Ca, Na, Mg, Fe, Cu, Zn, Co, Mo, Se, Cr, Ni ve Si minerallerini içermektedir (Vásquez ve Olofsson, 2009; Barene ve diğ., 2015; DeGrandi-Hoffman ve diğ., 2016; Bakour ve diğ., 2019).

Arı ekmeği tüketimi çok eski bir geleneğe sahip olmasına rağmen, bileşimi ve biyoaktif özellikleri şimdiye kadar yeterince araştırılmamıştır. Yapılan bir araştırmada, farklı polariteli organik çözücülerle ardışık ekstraksiyon yöntemi kullanılarak beş arı ekmeği örneğinden 200'den fazla bileşik tanımlanmıştır. Antioksidan özelliklere sahip bazı fenol bileşikleri (*p*-kumarik asit, kaemferol, isorhamnetin) belirlenmiştir. Arı ekmeği, içerdiği serbest amino asitler nedeniyle besin değerinin zenginleştiği bir arı ürünüdür. İçerisinde fenilalanin, lösin, valin, izölösin, arjinin, histidin, lisin, metionin, treonin ve triptofan gibi temel amino asitler yer almaktadır (Isidorov ve diğ., 2009). Tüm esansiyel amino asitleri içermesi nedeniyle, hayvansal proteine dayalı diğer besinlere kıyasla arı ekmeği daha zengin bir protein kaynağı olarak görülmektedir.

Arı ekmeği, oluşumdaki polenlerin yüksek protein içeriği nedeniyle arıların ana protein kaynağı haline gelmiştir. Arı polenindeki protein seviyesi, kaynak polenlerin toplandığı coğrafi konuma ve üretici arı türüne göre değişmektedir. En yüksek protein içeriğine sahip polenin, yüksek nektarlı bir bitkiden kaynaklandığı bulunmuştur (Vossler, 2015).

Nagai ve diğ. (2004) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, arı ekmeğinin sıcak su, soğuk su ve etanolde çözünen fraksiyonlarında protein miktarlarının sırasıyla 12.29 mg/mL, 9.59 mg/mL ve 1.94 mg/mL olduğu tespit edilmiştir. Aynı araştırmacıların yaptığı başka bir çalışmada, sindirilmiş arı ekmeğinden çeşitli hidrolizatlar elde edilmiş ve enzim içerikleri %10 pepsin, %10 tripsin ve %4 papain olarak belirlenmiştir (Nagai ve diğ., 2005). Arı ekmeğinin enzimatik aktivite açısından zengin olduğunu gösteren diğer çalışmalar da mevcuttur. Fosfataz, lösin aminopeptidaz ve β -glukozidaz gibi enzimlerin yanı sıra karbonhidratları hidrolize eden

sellobiyoz, salisin, amigladin ve gentiobioz gibi enzimlerin varlığı da arı ekmeği içerisinde belirlenmiştir (Gilliam ve diğ., 1989).

Nektar, çeşitli çiçekli bitkilerden toplanır ve balda bulunan özellikle uçucu aroma bileşiklerinin bileşimi, nektar kaynağına bağlı olarak bir dereceye kadar değişebilir. Bu nedenle, bazı uçucu bileşenler bal kökeninin belirleyicisi olabilir. Yapılan bir araştırmada, farklı botanik kökenli 15 bal örneğinin ve bir arı ekmeği örneğinin uçucu yağ profilleri karakterize edilmiştir. Analiz edilen örneklerin 11'i tek çiçekli kanola, 1'i yonca, 1'i çemen ve 2'si çoklu çiçeklidir. Toplamda, balda 93 ve arı ekmeğinde 32 bileşik tanımlanmıştır. Bunlar, alkol, keton, aldehit, asit, terpen, hidrokarbon, benzen ve furan türevleri de dahil olmak üzere farklı kimyasal bileşik sınıflarını içermektedir (Kaškonienė ve diğ., 2008).

Bakour ve diğ. (2019) Fas'a ait bir arı ekmeği örneğinde çalışma yapmıştır. Bu çalışmada, arı ekmeği örneği, besin değeri ve kimyasal bileşim (serbest şekerler, organik asitler, mineral bileşimi, yağ asitleri, tokoferoller ve polifenoller), *in vitro* antioksidan aktivite ve patojenik bakteri ve mantarlara karşı antimikrobiyal aktivite açısından incelenmiştir (Tablo 2.1). Araştırılan arı ekmeği protein, toplam serbest şeker ve makro element içeriği açısından iyi bir kaynak olduğunu göstermiştir.

Arı ekmeği, zengin içeriğine katkı sağlayan bir başka etken olarak laktik asit bakterilerini barındırmaktadır. Huş poleninden elde edilen arı ekmeği, aynı polenden yaklaşık altı kat daha yüksek laktik asit oranına sahiptir. Bu yüksek laktik asit oranının, laktik asit bakterileri tarafından gerçekleştirilen fermantasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir (Anđelković ve diğ., 2012). Yüksek laktik asit oranı, arı ekmeğinin uzun süre korunmasına yardımcı olurken, laktik asit bakterileri ise arı ekmeğinin kolesterol düşürücü etkisinde önemli bir role sahiptir (Vásquez ve Olofsson, 2009; Huang ve diğ., 2013).

Arı ekmeği üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda, su, etanol ve metanol ekstraktları kullanılarak yapılan analizler sonucunda, narinjin, kersetin, p-kumarik asit, kamferol, krisin, apigenin ve antosiyanin gibi flavonoid bileşiklerinin varlığı belirlenmiştir (Sobral ve diğ., 2017; Mayda ve diğ., 2020; Elsayed ve diğ., 2021).

Tablo 2.1: Arı ekmeğinin biyokimyasal içeriği (Bakour ve diğ., 2019).

Bileşen	Miktar	Serbest şekerler	Miktar
Yağ	1.90 ± 0.06 g/100 g	Fruktoz	11.8 ± 0.6 g/100 g
Protein	19.96 ± 0.08 g/100 g	Glukoz	5.7 ± 0.4 g/100 g
Kül	3.32 ± 0.08 g/100 g	Trehaloz	0.92 ± 0.01 g/100 g
Karbonhidrat	74.82 ± 0.04 g/100 g	Toplam şeker	18 ± 1g/100g
Enerji	396.2 ± 0.4 g/100 g		
Organik asit	0.383 ± 0.004 g/100 g		

Makroelementler	Miktar
Ca	198 ± 4 mg/100 g
Fe	27.3 ± 0.3 mg/100 g
K	338 ± 8 mg/100 g
Mg	61 ± 2 mg/100 g
Na	14.2 ± 0.1 mg/100 g
Zn	3.31 ± 0.04 mg/100 g
P	251 ± 4 mg/100 g
Mn	2.6 ± 0.1 mg/100 g

2.1.5. Arı Ekmeğinin Sahip Olduğu Aktiviteler

Arı ekmeği, zengin besin değeriyle birlikte antioksidan etkisi yüksek fenolik ve flavonoid içeriğine de sahiptir. Bu fenolik bileşikler, arı ekmeğinin sadece antioksidan aktivitesini artırmakla kalmaz, aynı zamanda antitümör, antikanser ve anti-inflamatuar özelliklere sahip olmasıyla beraber kolesterol düşürücü etkiler de sergiler. Bu bulgular, arı ekmeğinin sağlık açısından faydalı etkilerinin temelinde yatmaktadır (Lamson ve Brignall, 2000; Badary ve diğ., 2003; Baltrušaitytė ve diğ., 2007; Vauzour ve diğ., 2010; Funakoshi-Tago ve diğ., 2011; Lirdrapamongkol ve diğ., 2013; Borycka ve diğ., 2015).

Çeşitli çalışmalar, arı ekmeğinin antibakteriyel ve antifungal özelliklere sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Abouda ve diğ. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, arı ekmeğinin *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi bakterilere karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Başka çalışmalarda ise arı ekmeğinin *Salmonella enterica*, *Streptococcus spp.* ve *Micrococcus luteus* gibi türlere karşı da

antibakteriyel aktivite sergilediği bulunmuştur. Bu alışmalar ayrıca, arı ekmeğinin Gram (+) bakterilere karşı Gram (-) bakterilere göre daha etkili bir antibakteriyel etkisi olduğunu da ortaya koymaktadır (Baltruřaitytė ve diğ., 2007; Borycka ve diğ., 2015; Ivanişov ve diğ., 2015; Kařkonienė ve diğ., 2020).

Son zamanlarda, arı ekmeğinin antitümör ve antikanser etkilerini araştıran çalışmaların sayısı artmıştır (Elsayed ve diđ., 2021). Markiewicz-Żukowska ve diđ. (2013) tarafından yürütülen bir çalışmada, arı ekmeği ekstrelerinin U87 MG hücre hattı üzerinde 72 saat sonra inhibe edici etkiler gösterdiği rapor edilmiştir. Diđer çalışmalarda ise arı ekmeği ekstrelerinin MCF-7, NCI-H460, HeLa, HepG2, Caco-2 ve PC3 hücre hatları üzerinde büyümeyi inhibe edici aktivite sergilediği ve normal hücreler üzerinde ise 400 µg/mL konsantrasyona kadar toksisite göstermediği gözlemlenmiştir. Bu aktivitelerin arı ekmeği içerisinde bulunan izoramnetin-O-glikozit, kersetin-O-glikozit, herbasetin glikozitleri, kamferol ve mirisetin gibi fenolik ve flavonoid bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Sobral ve diđ., 2017; Mayda ve diđ., 2020; Elsayed ve diđ., 2021).

Son yıllarda, arı ekmeği, sahip olduğu yüksek antibakteriyel ve antifungal aktivite ile birlikte diğer arı ürünlerine göre daha yüksek asitlik seviyesi nedeniyle gıda koruyucusu olarak daha yaygın hale gelmektedir (Anderson ve diğ., 2014). Özellikle, arı ekmeğinin yüksek laktik asit ve fenolik içeriği ile düşük su içeriği, küflerin ve zararlı mikroorganizmaların oluşumunu engellemektedir (Nagai ve diğ., 2004). Bu zellikler, arı ekmeğinin doğal bir gıda koruyucusu olarak tercih edilmesini sağlamaktadır.

Arı ekmeğinin içeriğinde bulunan β-sitosterol ve dominant mikroflorasını oluşturan laktik asit bakterileri, kolesterol düşürücü etkiye sahip iki önemli etmendir. Klinik alışmalar, günlük sterol kullanımının bağırsakta kolesterol emilimini azalttığını göstermektedir (Katan ve diğ., 2003). Fareler üzerinde yapılan çalışmalar ise laktik asit bakterilerinin uygulandığı farelerin karaciğerlerinde total kolesterol, LDL ve trigliserit seviyelerinin düştüğünü göstermektedir (Huang ve diğ., 2013; Yang ve diğ., 2021).

2.1.6. Arı Ekmeğinde Bulunan Mikroorganizmalar

Arı ekmeği, çeşitli faktörlere bağlı olarak kompleks bir mikroorganizma içeriğine sahiptir. Bu mikroorganizma popülasyonu, arılar tarafından toplanan polenlerden gelen mikroorganizmalar, kovanda bulunan ortam mikroorganizmaları ve bal arısının salgı bezlerinden gelen çeşitli mikroorganizmaları içermektedir.

Farklı mikroorganizmaların polenin fermantasyonu öncesinde, fermantasyon sırasında ve sonrasında etkili olduğu bilinmektedir. Pain ve Maugenet (1966) tarafından yapılan bir çalışmada, *Lactobacillus* cinsi bakterilerin polen fermantasyonunu gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Ayrıca, ortamda *Pseudomonas* ve *Saccharomyces* cinslerinin bulunduğu ve *Pseudomonas* cinsinin polen kılıfının yıkılmasında ve laktik asit bakterileri için gerekli anaerobik ortamın oluşumunda etkili olabileceği öne sürülmüştür. Ayrıca, fermantasyon sürecinde ortamdaki mayaların başlangıçta düşük miktarlarda bulunduğu, ancak ilerleyen aşamalarda sayılarının arttığı ve fermantasyon sonrasında diğer birçok organizmadan daha uzun süre ortamda kaldığı gözlemlenmiştir (Pain ve Maugenet, 1966).

Egorova (1971) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, arı ekmeğinden elde edilen bakteri ve maya izolatlarının birlikte kültürlendiği durumda, bakterilerin alt kültürleme yapılmadan yaklaşık altı ay kadar hayatta kaldığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, mayalar ortamdan uzaklaştırıldığında alt kültürleme periyodunun otuz güne düştüğü tespit edilmiştir.

Çeşitli çalışmalar, *Lactobacillus* cinsine ait türlerin dominant mikroflora olarak belirlendiğini göstermektedir. Asama ve diğ. (2015) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, *Lactobacillus* bakterilerinin balda tüm bakteriler arasında %90.9, polende %74.6, arı sütünde %93.3 ve arı ekmeğinde ise %83.9 oranında olduğu belirlenmiştir (Tablo 2.2). Ayrıca, yapılan çalışmalarda *Lactobacillus* cinsi bakterilerle birlikte en sık görülen diğer bir cinsin *Bifidobacterium* olduğu da tespit edilmiştir. Hem arıların sindirim sisteminde, hem arı ekmeğinde hem de arı poleninde, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Pasteurellaceae* cinslerine ait çeşitli filotiplerin dominant olarak bulunduğu gözlenmiştir (Vásquez ve Oloffson, 2009; Oloffson ve Vásquez, 2018).

Tablo 2.2: Arı midesinde, balda, arı poleninde, arı ekmeğinde ve arı sütünde dizileme ile belirlenmiş bakteriler (Asama ve diğ., 2015).

Cins	Filum	Arı midesi%	Bal%	Arı poleni%	Arı ekmeği%	Arı sütü%
<i>Lactobacillus</i>	<i>Firmicutes</i>	22.0	90.9	74.6	83.9	93.3
<i>Acetobacter</i>	<i>Proteobacteria</i>	0.0	0.1	0.0	1.2	0.0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Actinobacteria</i>	4.0	0.0	0.1	0.0	0.1
<i>Burkholderia</i>	<i>Proteobacteria</i>	0.0	0.0	0.7	2.1	0.0
<i>Chryseobacterium</i>	<i>Bacteroidetes</i>	0.0	0.0	1.2	0.0	0.0
<i>Curtobacterium</i>	<i>Actinobacteria</i>	0.0	0.0	1.6	0.0	0.0
<i>Gluconobacter</i>	<i>Proteobacteria</i>	64.7	7.2	3.4	0.0	2.1
<i>Melissococcus</i>	<i>Firmicutes</i>	0.0	0.0	0.0	0.3	3.2
<i>Methylobacterium</i>	<i>Proteobacteria</i>	0.0	0.0	1.6	0.0	0.0
<i>Microbacterium</i>	<i>Actinobacteria</i>	0.0	0.0	1.2	0.0	0.0
<i>Neisseria</i>	<i>Proteobacteria</i>	2.4	0.1	0.2	0.0	0.0
<i>Paenibacillus</i>	<i>Firmicutes</i>	0.0	0.0	2.1	0.0	0.0
<i>Pseudomonas</i>	<i>Proteobacteria</i>	0.0	0.1	1.1	0.0	0.0
<i>Sphingomonas</i>	<i>Proteobacteria</i>	0.1	0.0	1.2	0.9	0.0
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Proteobacteria</i>	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0
Diğer		6.7	1.6	9.4	11.6	1.4

Yapılan bir çalışmada, Türkiye'nin üç farklı bölgesinden elde edilen arı ekmeği örneklerinin bakteriyel ve postbiyotik potansiyeli incelenmiştir. Arı ekmeği örneklerinde en yaygın olarak bulunan familyalar *Lactobacillaceae*, *Oscillospiraceae*, *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae* ve *Lachnospiraceae*'dir. *Lactobacillus delbruckeii* oldukça yaygın bir şekilde bulunurken, aynı zamanda *Prevotella copri*, *Faecalibacterium prausnitzii* ve *Akkermansia muciniphila* gibi gelecek nesil probiyotikler olarak bilinen diğer faydalı bakteriler de arı ekmeğinde tespit edilmiştir. Bunların yanı sıra, arı ekmeği örnekleri *Phocaeicola vulgatus*, *Phocaeicola dorei* ve *Clostridium perfringens* gibi istenmeyen bakterileri de içermektedir (Kahraman-İlkkın, 2023).

2.2. LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ

2.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Özellikleri ve Sınıflandırılması

Laktik asit bakterileri (kısaca LAB, laktobasiller), fermente edilebilir karbonhidratlar, amino asitler, nükleik asitler ve diğer substratları kullanan, karmaşık beslenme gereksinimi olan mikroorganizmalardır ve karbonhidrat fermentasyonundan metabolik enerji elde eder (Hammes ve Hertel, 2006).

Lactobacillus cinsi bakteriler hücre içi ve hücre dışı enzimlerini kullanarak nişastayı metabolize eder. Laktobasiller özellikle oligosakkaritleri metabolize edebilme yetenekleri nedeniyle

probiyotik uygulamalarında önemli bir rol oynar ve gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılır. Probiyotik takviyeler, sağlıklı bağırsak mikrobiyotasının oluşumunu destekleyerek bağırsak sağlığını iyileştirmeye yardımcı olabilir. Özellikle bağırsakta metabolize edilemeyen oligosakkaritler, laktobasillerin büyümesini teşvik ederek bu faydalı bakterilerin bağırsakta daha baskın hale gelmesini sağlar (Gänzle ve Follador, 2012).

Lactobacillus türleri, fareler, sıçanlar, tavuklar ve domuzlar gibi hayvanların proksimal gastrointestinal sistemlerinin yaygın sakinleridir ve epitelyal biyofilm oluştururlar. Biyofilm oluşumunu ve bağırsak kolonizasyonunu kolaylaştıran özellikler hakkında çok az şey bilinmektedir (Walter ve diğ., 2008).

Laktobasil cinslerinin sınıflandırılması, morfoloji, glukoz fermantasyonu şekli, belirli sıcaklıklarda büyüme ve şeker kullanım aralığı gibi özelliklere dayanmaktadır. Orla-Jensen tarafından kullanılan karakterler, taksonominin o zamandan beri revize edilmesine rağmen, günümüzde LAB'nin sınıflandırmasında hala çok önemlidir. Laktik asit bakterileri, morfolojik, metabolik ve fizyolojik benzerliklere sahip olan bir bakteri grubunu oluşturur ve filogenetik olarak da göreceli olarak yakından ilişkilidirler. Grup içindeki bakterilerin genel tanımı gram-pozitif, spor oluşturmeyen, anaerobik kok veya çomak şeklindedir ve karbonhidratların fermantasyonu yoluyla laktik asit üretirler. Genel kabul, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* olmak üzere dört cinsin çekirdek bir grup oluşturduğudur. Son zamanlarda yapılan taksonomik revizyonlar, birkaç yeni cins önermiş olup, geriye kalan grup şunları içermektedir: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Lactobacilli*, *Carnobacteria* ve bazı çomak şeklinde *Weissella* türleri, diğer cinsler ise koktur (Liu ve diğ., 2009; Khalid, 2011).

Lactobacillus cinsi bakterilerin çeşitli koşullar altında sağlığa faydalar sağladığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, bağırsak infeksiyonlarının ve antibiyotik sonrası sendromların tedavisi ve önlenmesi için kullanıldığında olumlu sonuçlar alınmıştır. Birkaç meta-analiz, akut infeksiyöz ishalde ve antibiyotik ilişkili ishalin önlenmesinde bazı laktobasillerin etkililiğini kanıtlamıştır. Probiyotik olarak kullanılan laktik asit bakterileri, bağırsak florasının

düzenlenmesine yardımcı olur ve bağırsakta bulunan zararlı bakterilerin büyümesini engeller (Lebeer ve diğ., 2008).

Sonuç olarak, LAB, gıda endüstrisinde kullanılan, probiyotik takviyelerinde yer alan ve sağlık açısından birçok faydası olan bir grup mikroorganizmadır. Bu bakterilerin tanımı, sınıflandırması ve özellikleri hakkında yapılan araştırmalar, bu alanda ilerlememize ve daha fazla kullanım alanı bulmamıza yardımcı olmaktadır.

LAB'nin ortak özellikleri laktozdan fermentasyon yolu ile laktik asit oluşturmalarıdır. Bu fermentasyon sonucunda tat ve koku gibi duyuşsal özellikleri de geliştirirler. Starter kültür ile yapılan fermentasyonda istenmeyen mikroorganizmaların gelişimi ve biyojen aminlerin oluşumu engellenebilir ve standardize ve kaliteli ürün elde edilir. LAB ortamda oluşturdukları asit nedeniyle diğeri mikroorganizmaların gelişmesini ve gıdaların bozulmasını engeller ve bu özellikleri nedeniyle güvenli bakteriler olarak kabul edilir (Yörük ve Güner, 2011).

Laktobasiller birçok soy ve türe sahiptir, genel özellikleri morfolojik özellik olarak çubuk, kok ve kokobasil şeklinde olabilirler. Gram pozitifler, hareketsiz ve spor oluşturmazlar. Katalaz negatifler, mikroaerofilik veya anaerobik olabilirler, aside dayanıklıdır ve güçlü fermentatiftirler. Nitratları indirgemezler, üremeleri için bazı amino asit ve vitaminlere ihtiyaç duyarlar (Scholz-Ahrens ve diğ., 2007).

Son zamanlarda genetik analizler sonucu belirlenen, gıdalar için önemli LAB soyları *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenecoccus*, *Vagococcus* ve *Weissella* olarak belirlenmiştir (Endo ve Okada, 2005; Yörük ve Güner, 2011).

2.2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Arı Ekmeği Üretimindeki Rolü

Arı ekmeği ve arı ekmeği üretiminde laktik asit bakterilerinin rolü hakkında yapılan araştırmalardan elde edilen bulgular, bu canlıların çeşitliliği ve etkisini açıklayıcı niteliktedir. Laktik asit bakterilerinin arı ekmeği üretimindeki koruyucu etkisine dair yapılan araştırmalar, laktik asit bakterilerinin arı ekmeği üretiminde kullanımının, ürünün raf ömrü açısından da önemli olduğunu göstermektedir. (Vásquez ve Olofsson, 2009).

Yapılan bir çalışmada, arı ekmeğinin olgunlaşma sürecinde çoğu laktik asit bakterisi türü kaybolmuş ve yerini özellikle *Lactobacillus kunkeei* ve *Fructobacillus fructosus* türleri almıştır. *L. kunkeei*'nin bazı suşları tarafından üretilen bakteri metabolitlerinin, arı ekmeğinde diğer mikroorganizma gruplarını rekabetten uzaklaştırmak için laktik asit bakterilerine avantaj sağladığı görülmüştür. Ayrıca, arı ekmeği fermantasyonunu taklit etmek için seçilmiş *L. kunkeei* suşları taze polenin fermantasyonunu gerçekleştirmek için starter kültür olarak kullanılmıştır. Bu seçilmiş starter kültürlerin kullanımı, polende doğal olarak bulunan besin maddeleri ve biyoaktif bileşiklerin sindirilebilirliğini ve biyoyararlılığını artırmıştır (Di Cagno ve diğ., 2019).

Laktik asit bakterileri arı ekmeği üretiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bu bakteriler, arı ekmeğinin fermantasyonu sırasında metabolitler üreterek diğer mikroorganizmalarla rekabet edebilme yeteneğine sahiptir. Seçilmiş starter kültürlerin kullanımı, arı ekmeğinin besin değerini arttırabilir ve mikrobiyolojik olarak stabil ve güvenli bir ürün elde edilmesini sağlayabilir (Di Cagno ve diğ., 2019).

Sonuç olarak, laktik asit bakterilerinin arı ekmeği üretimindeki rolü, ürünün dayanıklılığını ve kalitesini arttırmakla kalmaz, aynı zamanda antioksidan ve probiyotik özellikleri sayesinde insan sağlığı açısından da faydalı bir gıda maddesi haline gelmesini sağlar.

2.2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Olarak Kullanımı

Probiyotikler, insan ve hayvan sağlığı üzerinde olumlu etkileri bilinen mikroorganizmalardır. Bu bakteriler arasında laktik asit bakterileri (LAB) en yaygın kullanılanlardır ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ile Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından da önerilmektedir. Laktik asit bakterileri, konakçının zararlı mikroorganizmalara karşı korunmasını sağlar ve bağışıklık sistemini güçlendirir. Bu bakteri türlerine ait suşlar, sadece süt gibi fermente hayvansal ürünlerden değil, aynı zamanda süt ürünü olmayan fermente ürünlerden de izole edilebilir. Geleneksel fermente ürünler, probiyotik özelliklere sahip zengin bir mikroorganizma kaynağı olarak hizmet eder (Zielińska ve Kolożyn-Krajewska, 2018).

İyi işleyen bir bağırsak ekosistemi olan mikrobiyom, çeşitli mikroorganizmaların niceliksel ve niteliksel bileşimi olarak adlandırılır ve kişinin sağlığını koruma yeteneği üzerinde büyük bir

etkiye sahiptir. Mikrobiyom, bağışıklık sistemi ve zihinsel durum dahil olmak üzere birçok fizyolojik sistemi etkiler. Bağırsak mikroflorasının insan sağlığını korumadaki rolüne artan farkındalık nedeniyle, dünya genelinde 20 yıldan fazla süredir insan mikrobiyomunu olumlu yönde değiştirme veya zenginleştirme amacıyla araştırmalar yürütülmektedir. Bağırsak florasında normalden farklı değişikliklerin nedeni olarak viral ve bakteriyel infeksiyonların yanı sıra gıda maddeleri, steroidler, antibiyotikler vb. düşünülmektedir. Özellikle seçilmiş probiyotik bakteri suşları, beslenmede kullanıldığında bağırsak bakteri florasının faydalı bir şekilde düzenlenmesine katkıda bulunabilir (Kerry ve diğ., 2018).

Probiyotikler, 21. yüzyılda sağlık alanında önemli bir rol oynamaktadır. 2021 yılında küresel probiyotik pazarının büyüklüğü 58.17 milyar ABD doları olarak kaydedilmiştir. Özellikle Asya Pasifik ülkelerinde probiyotikler sağlık gıdaları ve ilaçları olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır ve küresel probiyotik pazarında en büyük ve en hızlı büyüyen pazardır. Etkili probiyotik suşların geliştirilmesi, endüstrinin önemli bir ihtiyacıdır. Probiyotiklerin sağlık üzerindeki faydaları ve tüketiciler arasındaki artan farkındalığın, gelecek birkaç yıl içinde bu endüstrinin büyümesine yol açması beklenmektedir (Market Analysis Report, 2023).

FAO ve WHO uzmanları, 2002 yılında probiyotiklerin "yeterli miktarlarda uygulandığında konakçıya sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar" olduğunu belirleyerek probiyotikler için bir tanım kabul etmişlerdir. Mikroorganizmaların probiyotik olarak sınıflandırılabilmesi için kullanım güvenliği, fonksiyonel ve teknolojik özelliklerine ilişkin uygun kriterlerin kesin olarak belirlenmesi gerekmektedir. "Probiyotik" adayı olarak kabul edilen mikroorganizmalar, üç temel gereksinimi karşılamalıdır (Sanders ve diğ., 2018).

1. Uygulandıklarında canlı mikroorganizmalar olmalıdır.
2. Sağlığı teşvik edici etkiye sahip olmaları için uygun dozlar belirlenmeli ve bu dozlar klinik temellere dayanmalıdır.
3. Uygulanan mikroorganizmalar konakçı üzerinde yararlı etkilere sahip olmalıdır.

Gerçekte, bir mikroorganizmanın kaynağını doğrulamak oldukça zor olabilir. Ancak, iyi yürütülen gözlemsel araştırmalar ve birçok randomize kontrollü çalışma, probiyotiklerin insan sağlığı üzerinde potansiyel etkilerini doğrulamaktadır. "Probiyotik" terimi geleneksel olarak, kendiliğinden fermente edilmiş gıdalardan izole edilen bakterileri içerecek şekilde

geniřletilebilir. Fermente ürünlerden elde edilen mikroorganizmalar, ürünlerin üretildiđi ortamın mikroflorasını oluřtururlar ve bađırsak bakterilerine alternatif oluřturabilecekleri probiyotik özellikleri ve güvenlikleri açısından test edilirler (Zielińska ve Kolożyn-Krajewska 2018).

Fermente gıdalar, uzun bir güvenli kullanım geçmişine sahip olup dünya genelinde diyetlerde yaygın olarak tüketilmektedir. Fermantasyon, gıdaların mikroorganizmalar veya enzimler etkisiyle istenen biyokimyasal değişikliğe uğratıldığı bir süreçtir. Fermantasyon yöntemi binlerce yıl öncesine dayanan bir üretim ve koruma yöntemidir. Hatta günümüzde, toplu üretilen gıdaların yaygın olmadığı bazı ülkelerde ev yapımı gıdaların korunması için fermantasyon hala kullanılmaktadır. Arpanın biraya ve üzümün şaraba alkol fermantasyonu ile dönüşümü, bu sürecin erken örneklerini oluşturur. Geleneksel olarak, fermente gıdaların üretiminde laktik asit bakterileri (LAB) kullanılmaktadır. LAB, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi türleri, aynı zamanda *S. thermophilus* türünü içermektedir. *L. bulgaricus*, *L. lactis*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *S. thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *E. feacalis* ve *Bifidobacterium* sp. gibi LAB türleri, probiyotik ürünlerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde, dünya çapında LAB içeren birçok ürün mevcuttur. Probiyotik ürünler, tabletler veya tozlar gibi çeşitli formlarda ve süt, sakızlar, lifli ürünler, tatlılar, kekler, bira ve soya sütü gibi gıdalar şeklinde üretilmektedir (Naidu ve diğ., 1999).

Fermente gıdalar ve probiyotik ürünler arasında güçlü bir ilişki vardır ve LAB gibi mikroorganizmaların kullanımını bu ürünlerin üretiminde önemli bir rol oynamaktadır.

2.2.4. Starter Kültür Olarak Laktik Asit Bakterilerinin Kullanımı

Fermente gıdaların üretimi, başlangıç olarak ham maddenin hızlı asitlenmesini başlatan laktik asit bakterileri gibi starter kültürlerin kullanımına dayanır. Son zamanlarda, endüstriyel açıdan önemli bir işlevselliğe sahip yeni laktik asit bakterisi starter kültürleri geliştirilmektedir. Bu starter kültürler, mikrobiyal güvenlik sağlayabilir veya organoleptik, teknolojik, besinsel veya sağlık avantajları sunabilir. Örnek olarak, antimikrobiyal maddeler, şeker polimerleri, tatlandırıcılar, aromatik bileşikler, vitaminler veya kullanışlı enzimler üreten laktik asit bakterileri veya probiyotik özelliklere sahip olan mikroorganizmalar gösterilebilir. Bir starter kültür, bir ham maddede fermantasyon sürecini hızlandırarak ve yönlendirerek fermente bir

gıda üretmek için en az bir mikroorganizmanın büyük miktarlarda hücresel hazırlığı olarak tanımlanabilir (Leroy ve De Vuyst, 2004).

Laktik asit bakterileri (LAB) bu süreçlerde merkezi bir rol oynamakta olup, fermente gıdaların ve içeceklerin üretiminde uzun ve güvenli bir geçmişe sahiptir (Ray, 1992; Wood ve Holzapfel, 1995; Caplice ve Fitzgerald, 1999). LAB, organik asitlerden özellikle laktik asit olmak üzere ham maddenin hızlı asitlenmesine neden olarak katkıda bulunurlar. Ayrıca, asetik asit, etanol, aroma bileşikleri, bakterisitler, ekzopolisakaritler ve çeşitli enzimlerin üretiminde önemli rol oynarlar. Bu şekilde, raf ömrünü ve mikrobiyal güvenliği artırır, ürünü iyileştirir ve son ürünün hoş duyuşal profiline katkıda bulunurlar (Harris, 1998).

LAB, farklı endüstriyel sektörlerde uygulama geçmişi olan, starter kültürler olarak kullanımlarıyla uzun bir geçmişe sahiptir. Bu amaçla, ham maddeye birçok mikroorganizmanın enjekte edildiği mikrobiyal preparatlar kullanılarak hızlandırılmış ve yönlendirilmiş bir süreçle fermente ürün geliştirilir (Florou-Paneri ve diğ., 2013; Peng ve diğ., 2020). Son yıllarda, birçok araştırmacı, arı polenin doğal fermantasyonunu laboratuvar ortamında çeşitli işlem koşullarında mikroorganizmaların inokülasyonu ile simüle etmeye çalışmış, böylece besleyici ve fonksiyonel arı ekmeğine benzer ürünler geliştirilmiştir. Bu süreç Şekil 2.3'te şematize edilmiştir (Barta ve diğ., 2022; Örsel, 2022).

Laktik asit bakterileri, sağlık açısından faydalı bileşiklerin üretimine katkıda bulunabilir ve gıdaların besin değerini artırabilir. Bu nedenle, laktik asit bakterileri ve fermantasyon süreçleri, gıda endüstrisinde yeni ürünlerin geliştirilmesinde ve tüketici taleplerine cevap veren sağlıklı ve fonksiyonel gıdaların üretiminde önemli bir rol oynamaktadır.

2.2.5. Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmasında Kullanılan Klasik ve Moleküler Yöntemler

Arı ekmeği, arılar tarafından üretilen ve yüksek besin değerine sahip bir üründür. Bu ürünün ticari üretimi için ise kaliteli ve standartlara uygun ürünler elde etmek gerekmektedir. Bu nedenle, arı ekmeği örneklerindeki laktik asit bakterilerinin tanımlanması oldukça önemlidir.

Laktik asit bakterileri, arı ekmeği üretiminde sadece koruyucu bir rol oynamakla kalmaz, aynı zamanda ürünün besin değerini de artırır. Bu nedenle, ticari arı ekmeği üreticileri, ürünlerindeki laktik asit bakterilerini belirlemek ve kontrol etmek isterler.

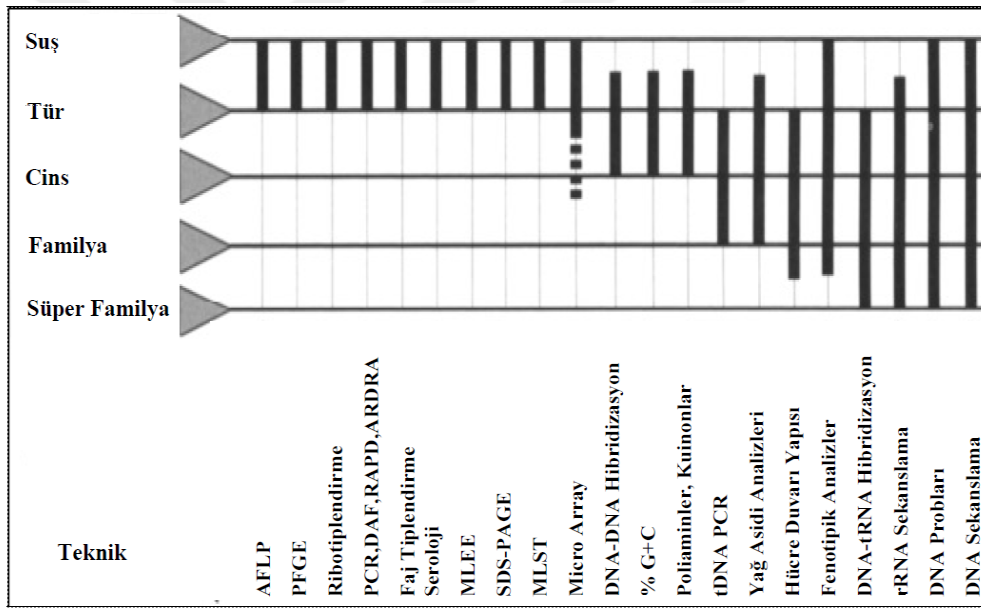
Laktik asit bakterileri, arı ekmeği üretiminde önemli bir role sahiptir. Bu bakterilerin tanımlanması için kullanılan yöntemlerden biri kültür yöntemidir. Bu yöntem, örneklerin belirli bir besiyerinde inkübe edilmesini ve ardından kolonilerin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin incelenmesini içerir (Tajabadi ve diğ., 2013).

Klasik yöntemlerle laktik asit bakterilerinin tanımlanması için ilk adım, bakterilerin bulunduğu ortamdan izole edilerek saf kültürlerin elde edilmesidir. Bu amaçla çeşitli besiyerlerinden faydalanılabilir. MRS agar ve MRS broth besiyerleri, laktobasilleri üretmek ve izole etmek için yaygın olarak kullanılan yüksek besleyici özelliklere sahip besiyerlerdir. Laktik asit bakterilerinin izolatları saf kültür olarak elde edildikten sonra, klasik yöntemlerle tanımlanmaları için çeşitli adımlar izlenir. İlk olarak, bu izolatların Gram boyama, mikroskopik morfolojisi ve katalaz aktivitesi gibi özellikleri belirlenir. Bu sayede, Gram (+), spor oluşturmeyen, çubuk veya kok şeklinde ve katalaz (-) olan bakteri izolatları laktik asit bakterileri olarak ayrıştırılır. Daha sonra, bu izolatların cins düzeyinde tanımlanabilmesi için morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik testler uygulanır (Rogosa ve diğ., 1953; Hitchener ve diğ., 1982; Schillinger ve Lücke, 1987).

Genetik analizlere dayanan yöntemler, organizmanın genetik yapısının incelenmesini temel alır. DNA temelli teknikler, kullanılan yöntemin tipine bağlı olarak mikroorganizmaların cins seviyesinden suş seviyesine kadar tanımlanmasını sağlayabilir. Nükleotid sekanslarının kullanıldığı bu teknikler hızlıdır ve besiyerindeki değişikliklerden etkilenmez, bu nedenle fenotipik tanımlama yöntemlerine göre önemli avantajlar sunar. Ayrıca, kültür edilemeyen laktik asit bakterilerinin de tanımlanabilmesine olanak sağlar (Moschetti ve diğ., 1998; Busch ve Nitschko, 1999). Günümüzde, LAB tanımlama ve tiplendirme çalışmalarında moleküler yöntemlere doğru bir kayma olmuştur, çünkü bu yöntemler daha kesin ve hassas sonuçlar sunar (Babalola, 2003). DNA temelli moleküler yöntemler, filogenetik çalışmalarda mikroorganizmalar arasındaki ilişkilerin belirlenmesinde sıkça kullanılan yaklaşımlardan biridir ve kullanılan yönteme bağlı olarak mikroorganizmaların farklı seviyelerde

tanımlanmasında ilerlemiş bir bakış açısı sunar. Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan yöntemler Şekil 2.4'te belirleyebileceği taksonomik basamaklara göre gösterilmiştir (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011).

Laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve karakterizasyonu, endüstriyel ve bilimsel açıdan giderek daha önemli hale gelmektedir (Rademaker ve diğ., 2004). Laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve karakterizasyonunda kullanılan moleküler yöntemler, güvenilir ve ekonomik bir seçenek olarak değerlendirilmektedir. Bu yöntemler, laktik asit bakterilerinin daha iyi anlaşılmasına ve endüstriyel uygulamalarda kullanılmalarına katkı sağlamaktadır (Moschetti ve diğ., 1998; Busch ve Nitschko, 1999).



Şekil 2.4: LAB tiplendirmesinde kullanılan fenotipik ve moleküler yöntemlerin taksonomik olarak derecelendirilmesi (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011).

Moleküler tekniklerin son yıllardaki gelişimiyle beraber, DNA dizi analizi yöntemleri *Lactobacillus* cinsinin tanımlanmasında en doğru sonuçları veren yöntemlerden biri haline gelmiştir. Bu yöntem, bakterileri DNA dizi analizi yoluyla tanımlar. Bu yöntemle, bakterilerin genetik yapılarındaki farklılıklar tespit edilerek daha kesin sonuçlar elde edilebilir. Moleküler teknikler arasında en yaygın kullanılan yöntem, 16S rRNA geni dizi analizidir. Bu yöntem,

Lactobacillus cinsi bakterilerin tanımlanmasında yüksek doğruluk oranı sağlamaktadır (Felis ve Dellaglio, 2007). Bu yöntemle ilgili ayrıntılı bilgiler aşağıda aktarılmıştır.

2.3. LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN FİLOGENETİK ANALİZİ

2.3.1. 16S rRNA Geni Dizi Analizi

Filogenetik olarak organizmalar arasındaki akrabalık derecesi 16S rRNA gen dizilerinin belirlenmesiyle ortaya konur. rRNA genleri evrimin erken aşamalarındaki protein sentezindeki rolü ile yüksek oranda korunmuştur, organizmalar arasındaki yatay gen transferine bu genler dahil olmamıştır, farklı bireyler arasındaki dizilerin benzerlik oranı genomlarının varyasyonunu temsil eder.

İki organizmanın %97'den daha az 16S rRNA gen dizisi özdeşliğine sahip olması, bunların genomik düzeyde zayıf ilişkili olduklarını ve farklı türlere ait olduklarını gösterir. Eğer %97'den daha yüksek bir özdeşlik içeriyorlarsa aynı cins oldukları kabul edilir (Felis ve Dellaglio, 2007).

Filogenetik analiz DNA hibridizasyon testlerine göre daha çok tercih edilir çünkü dizi analizi ile tanımlamada spesifik DNA amplifikasyonu çok daha hızlı, daha fazla tekrarlanabilir ve maliyeti daha düşük protokollerdir. Ayrıca açık veri tabanı ile karşılaştırma olanağı sağlar (Gevers ve diğ., 2005).

2.3.2. NGS (Yeni Nesil Dizileme) Yöntemleri

Birinci nesil dizileme olarak kabul edilen Sanger Dizileme 1980'ler ve 1990'larda yaygın olarak kullanılmaktaydı. NGS (Yeni Nesil Dizileme)'nin ortaya çıkmasıyla fazla tercih edilmemeye başlandı. NGS, Sanger Dizilemeye göre daha yüksek verimli, düşük maliyetli ve daha hızlıdır. NGS, belirli bir organizmanın DNA'sında bulunan nükleotidlerin sayısını ve sırasını belirlemeye yardımcı olan bir tekniktir. Yeni nesil dizileme (NGS), diziyi tanımlamak için çok sayıda küçük DNA fragmanının paralel dizilemesini kullanan bir DNA dizileme yöntemidir. Üçüncü nesil dizileme NGS ile benzerlik gösterir ancak şablon olarak tekli DNA moleküllerini kullanır, amplifiye edilmiş DNA kullanmaz (Thakur ve diğ., 2018).

Dizileme metotlarını iki temel grup altında toplayabiliriz. Bunlar;

A) Klasik Metotlar

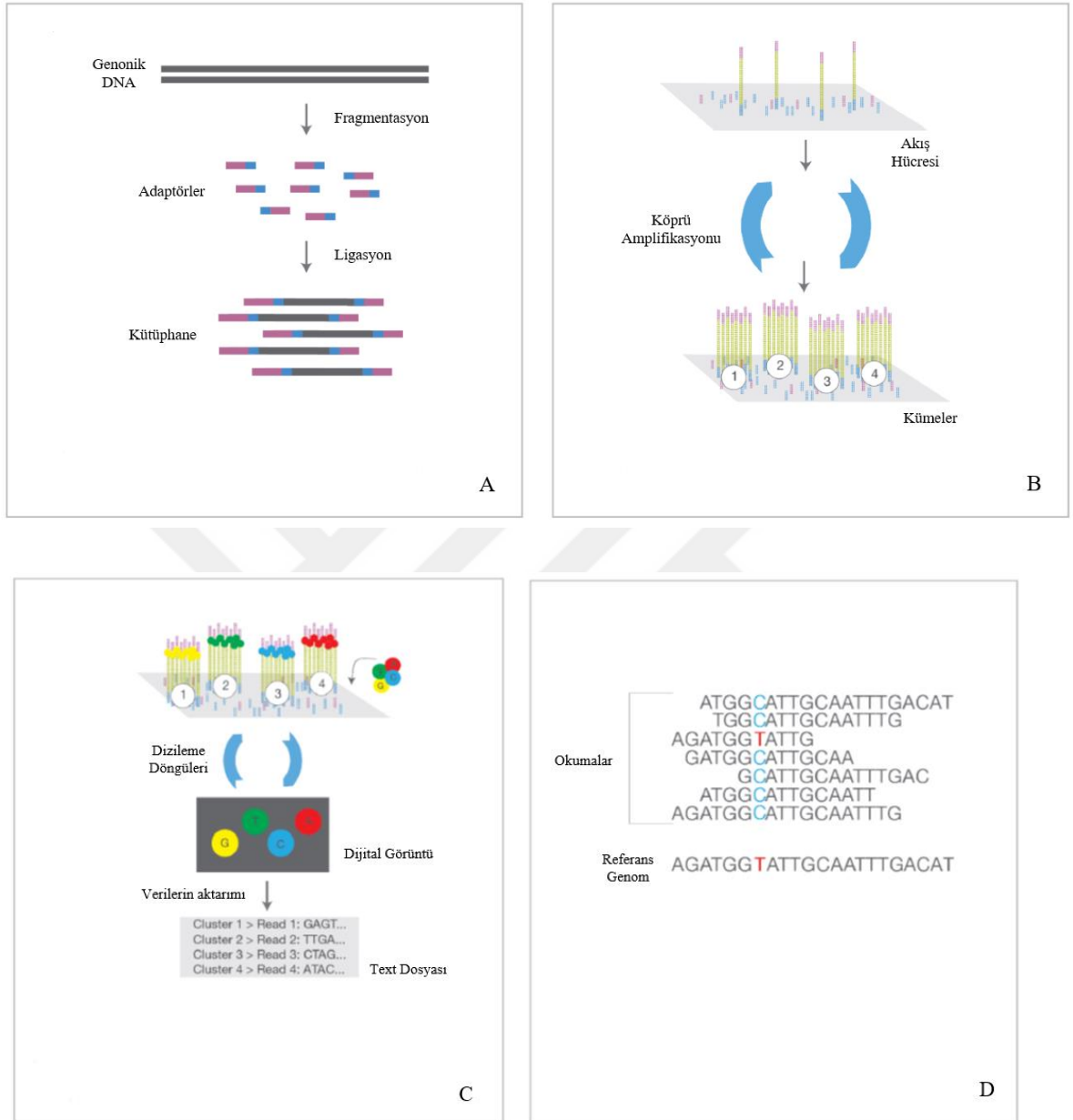
- 1) Maxam ve Gilbert kimyasal bozunma yöntemi
- 2) Sanger yöntemi (Dideoksinükleotid zincir sonlandırma yöntemi)

B) Yeni Nesil Dizileme Teknikleri (NGS)

- 1) İkinci Nesil Dizileme Teknikleri
 - a) 454 dizileme ya da pirodizileme
 - b) Illumina (Solexa) dizileme
 - c) SOLiD dizileme
 - d) Polony dizileme
 - e) Büyük ölçüde paralel imza dizilemesi (“Massively parallel signature sequencing”, MPSS)
- 2) Üçüncü Nesil Dizileme Teknikleri
 - a) Tek molekül gerçek zamanlı (“Single-molecule real-time”, SMRT) dizileme
 - b) Heliscope dizileme
- 3) Dördüncü Nesil Dizileme Teknikleri
 - a) DNA nanoball dizileme
 - b) Nano pore DNA dizileme

2.3.3. Illumina (Solexa) Dizileme

Katı bir cam desteği üzerinde özgün adaptörler kalıp DNA dizisinin uçlarına bağlanır. Tamamlayıcı diziler akış hücresi şeritlerinin iç kısmında bulunur. Hedef DNA'nın diğer ucu da destek üzerinde bulunan tamamlayıcı diziye hibritleştiğinde, bir köprü yapısı oluşturulur. Akış hücresi kanalına DNA polimeraz ve nükleotidlerin eş zamanlı eklenmesiyle dizi sentezi gerçekleşir. Amplifikasyondan sonra 40 milyondan fazla küme ve “flow cell” oluşur. Her kümede bir kalıp molekülden yaklaşık 1000 klon kopya bulunur. Nükleotidler farklı floresan etiket taşır, 3'OH grubu kimyasal olarak kapatılmıştır ve zincir sonlanmasına neden olur. Her yıkamadan sonra DNA'ya bir nükleotid eklenir. Floresan sinyalleri bir CCD kamera kaydederek DNA dizisi belirlenir. 3'OH grubu kimyasal olarak bloke olmuş grubun uzaklaştırılması ve yeni bazların eklenmesi belirlenen döngüye kadar devam eder, bu da 25-35 baz aralığında okuma uzunlukları yapabileceği olanağı sağlar (Şekil 2.5). Biyoinformatik yazılımlar ile okuma sonuçları değerlendirilir, uygun olmayan diziler çıkarılır ve Illumina verisi olarak kayıt edilir (Dönmez ve diğ., 2015; Bruijns ve diğ., 2018).



Şekil 2.5: İllumina NGS dört adımdan oluşur: (A) Kütüphane hazırlanması, (B) Küme oluşturma, (C) Dizileme, (D) Hizalama ve veri analizi.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN KİMYASALLAR, SARF MALZEMELER VE ALETLER

Kimyasallar

- MRS Broth
- MRS Agar
- %3'lük H₂O₂
- PBS
- Absolü etanol
- Lizozim
- RNaz
- Proteinaz K
- Kristal viyole
- Lugol
- Sulu fuksin
- Taq Master Mix
- MgCl₂
- Salin (0.9% w/v NaCl, 0.1% w/v Tween 80 and 0.1% w/v Pepton)
- Agaroz
- DNA izolasyon kiti (Hibrigen)
- Etidyum bromür

Sarflar

- 50 mL Falkon Tüp
- 15 mL Falkon Tüp
- Petri (60 mm)
- Cam tüp
- Lam-lamel
- Mikropipet ucu (2-20 µL)

- Mikropipet ucu (100-1000 μL)
- Mikropipet ucu (2-200 μL)
- Mikropipet ucu (0,5-10 μL)
- 1.5 mL mikro tüp
- 2 mL mikro tp
- Spin kolon mikro tp
- Anaerobik kültür kavanozu
- Anaerob ped
- Anaerob indikatör
- Cam erlen

Aletler

- Mikropipet
- Class 2 biyogüvenlik kabini
- Etüv
- Soğutmalı santrifüj
- Isıtıcı blok
- Distile su cihazı
- Vorteks
- Işık mikroskobu
- Elektroforez sistemi
- Mikrodalga fırın
- Nanodrop
- Buzdolabı ve derin dondurucu
- Otoklav
- PCR cihazı
- UV jel görüntüleyici

3.2. BİYOLOJİK MATERYALLER

3.2.1. Arı Ekmeği Örneklerinin Temini

Çalışmada kullanılan arı ekmeği örnekleri, 2022 ilkbahar mevsiminde Çanakkale ili ve Kırklareli ilinin Kıyıköy beldesindeki yerel üreticilerden temin edildi. Laboratuvara ulaşan arı ekmeği örnekleri deneylerde kullanılmaya dek -80 °C derin dondurucuda saklandı.

3.2.2. Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Elde Edilmesi

Arı ekmeği örneklerindeki mikroorganizmaların kültürlenmesi için standart yöntemler kullanıldı. Önce steril salin çözeltisi, MRS Broth ve MRS Agar besiyerleri hazırlandı. Class 2 biyogüvenlik kabini içinde 15 mL falkon tüplere 5 mL salin eklendi, daha sonra üzerine 4 g arı ekmeği eklenip vortekle çalkaladı. Bu karışımdan 1 mL MRS Broth besiyerine aktarıldı. Kültürler anaerobik kültür kavanozuna alınarak 35 °C'de 72 saat inkübe edildi. Daha sonra sıvı kültürlerden MRS Agar besiyerlerine ekim yapıldı ve petripler anaerobik kültür kavanozuna alınarak 35 °C'de 72 saat inkübe edildi.

3.2.3 Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi

Elde edilen izolatlarda, Gram boyama ve katalaz testi yapıldı. Laktik asit bakteri izolatlarından bir yayma preparatı hazırlandı. Preparat ateşle fikse edildi. Preparatın üzerini tamamen kapatacak şekilde bazik boya olan kristal viyole (Jansiyan moru) eklendi ve 1 dakika bekletildi, boya saf su ile uzaklaştırıldı. Preparat lugol çözeltisi ile muamele edilip 1 dakika bekletildi ve saf su ile yıkandı.

%96'lık alkol ile dekolare edildi. Saf su ile yıkandı. Preparatın üzerini tamamen kaplayacak şekilde, zıt boya olan Sulu fuksin (safranin) ile 30 sn boyandı. Preparat kurumaya bırakıldı ve immersiyon objektifinde incelendi. Gram pozitif olan bakteriler olası laktik asit bakterisi olarak değerlendirildi.

MRS Agar besiyerinde üreyen bakterilerden lam üzerine alınarak %3'lük H₂O₂ çözeltisi damlatıldı. 10-15 sn beklendi; gaz kabarcıklarının oluşmaması katalaz negatif olarak

değerlendirildi. Katalaz negatif, Gram pozitif olan bakteriler olası laktik asit bakterisi olarak değerlendirildi.

3.2.4. DNA İzolasyonu

Bakteri DNA izolasyon kiti (Hibrigen) ve içeriğindeki hazır solüsyonlar kullanılarak kit talimatına uygun şekilde DNA izolasyonu yapıldı. 0.5 – 2 mL bakteri kültürü 1.5 mL'lik mikro tüplere alındı. Hücreleri çöktürmek için 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pellet kit içeriğindeki LB1 tamponunun 500 µL'sinde çözündürülüp 2 µL RNaz eklenip vortekslendi. 45 µL Proteinaz K ve 20 µL Lizozim eklenerek 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra 175 µL LB2 tamponu eklenerek vortekslendi ve 50 °C'de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Örnekler 10 saniye vortekslenip önceden BDE tamponu ile dengeye getirilen filtreli tüpler üzerine alındı. 10.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpüne süzülen sıvılar atıldı. 500 µL BDE tamponu filtreli tüplere eklendi 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi, toplama tüpüne toplanan sıvı atıldı. Aynı işlem bir kez daha uygulandı. Filtreli tüpün membranının kurumması için 12.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı. Filtreli tüp temiz bir 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı ve membran üzerine 40 µL BDE tamponu eklenip oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek pürifiye edilmiş DNA elde edildi. Nanodrop ile ölçüm yapıldı. 260/280 nm absorpsiyon oranı 1.5 ile 2.0 arasında ve 260/230 nm absorpsiyon oranı 1.7'den fazla olan DNA örnekleri, PCR analizi için uygun olarak kabul edildi (Gryson, 2010). DNA örneklerinin kalitesi %1'lik agaroz jel elektroforeziyle doğrulandı ve örnekler -20 °C'de saklandı.

3.2.5. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Üniversal primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ve 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') kullanılarak PCR reaksiyonu kuruldu. 1X Taq Master Mix, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 mM forward primer, 0.25 mM reverse primer ve 0.4 ng DNA olacak şekilde toplam hacim 25 µL olarak hazırlandı. PCR için sıcaklık döngüleri: 95 °C' de 3 dakika ilk denatürasyon, 95 °C'de 30 saniye denatürasyon, 55 °C'de 55 saniye bağlanma, 72 °C'de 1 dakika uzama ve 72 °C'de 10 dakika son inkübasyon ve sonlandırma olacak şekilde 40 döngü olarak belirlendi (Tajabadi ve diğ., 2013). Elde edilen PCR ürünlerine agaroz jel elektroforezi

uygulandı, marker olarak Hibrigen marka 1kb DNA Ladder kullanıldı. Laktik asit bakterileri olduğu doğrulan örnekler yeni nesil dizileme yöntemi ile 16S rRNA gen dizilerini belirlemek üzere anlaşmalı firmaya gönderildi.



4. BULGULAR

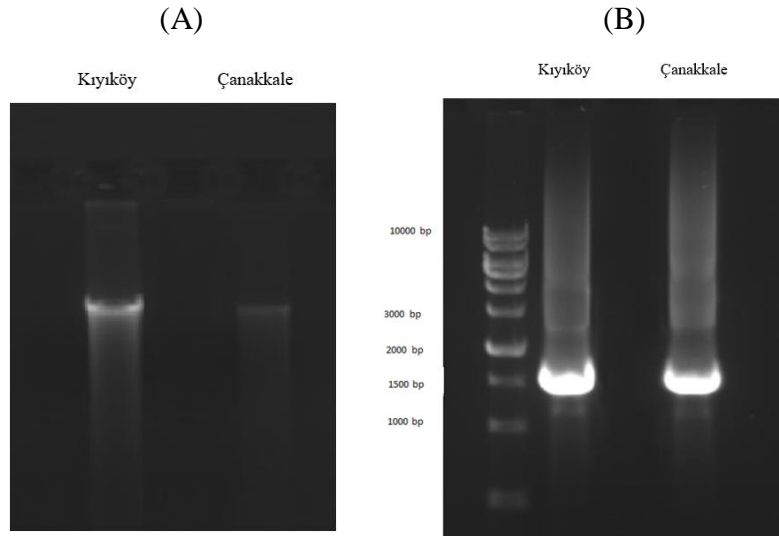
4.1. ARI EKMEĞİ ÖRNEKLERİNİN DNA KALİTESİ

Ekstre edilen DNA'nın saflığı, NanoDrop spektrofotometrede A260/A280 ve A260/A230 UV absorpsiyon oranlarının ölçülmesiyle değerlendirildi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Çanakkale ve Kıyıköy DNA örneklerinin NanoDrop ile ölçüm sonucu.

Örnekler	DNA konsantrasyonu (ng/μL)	A _{260/280}	A _{260/230}
Çanakkale	223.2	2.15	2.22
Kıyıköy	465.7	2.17	2.29

Çanakkale örneği için A260/A280 oranı 2.15 ve A260/A230 oranı 2.22 olduğu için DNA kalitesi iyi olarak değerlendirildi. Kıyıköy örneği için A260/A280 oranı 2.17 ve A260/A230 oranı 2.29 olduğu için DNA kalitesi iyi olarak değerlendirildi. Çanakkale örneğinin DNA konsantrasyonu 223.2 ng/μL ve Kıyıköy örneğinin DNA konsantrasyonu 465.7 ng/μL olarak bulundu. Her iki örnek için de DNA konsantrasyonlarının yeterli olduğuna karar verildi. DNA örnekleri agaroz jel elektroforezi ile incelendi ve jel görüntüleri Şekil 4.1'de verildi.



Şekil 4.1: DNA örneklerinin elektroforezden sonra agaroz jeldeki görüntüsü (A) DNA izolasyonu sonrası, (B) PCR sonrası.

4.2. ARI EKMEĞİ ÖRNEKLERİNİN YENİ NESİL DİZİLEME ANALİZİ

Bu çalışmada Çanakkale ve Kıyıköy olmak üzere iki farklı bölgeden toplanan arı ekmeği örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu yapılarak 16S rRNA geni V3-V4 bölgeleri İllumina NGS yöntemi kullanılarak dizi analizi yapıldı.

Çanakkale ilinden toplanan arı ekmeği örneklerinde belirlenen laktik asit bakterilerine ait 16S rRNA geni dizileme sonuçlarına göre;

Lactobacillus %77.7'lik oranla en baskın mikrobiyal grup olarak belirlendi. Bu grupta 92 farklı operasyonel takson birimi (OTU) belirlenmiştir. Bu OTU'ların 427-428 baz çifti (bp) boyunca yapılan dizilemelerinde %99-100 benzerlik gösterdiği görülmüştür. Ayrıca, bu grup içinde 72 sınıflandırılmayan *Lactobacillus* suşu ile birlikte *Lactobacillus alvei*, *Lactobacillus helsingborgensis*, *Lactobacillus kimbladii*, *Lactobacillus kullabergensis*, *Lactobacillus kunkeei*, *Lactobacillus mellis*, *Lactobacillus melliventris*, *Lactobacillus panisapium* ve *Lactobacillus rhamnosus* gibi diğer *Lactobacillus* türleri de belirlenmiştir.

Bifidobacterium % 14.7'lik oranla ikinci en baskın mikrobiyal gruptur. Bu grupta 5 farklı OTU belirlenmiştir. Bu OTU'ların 404 baz çifti (bp) boyunca yapılan dizilemelerinde %99-100 benzerlik gösterdiği görülmüştür. Bu grupta sınıflandırılmayan *Bifidobacterium* suşları ile birlikte *Bifidobacterium asteroides* türü de belirlenmiştir.

Bacillus coagulans %3.5'lik oranla üçüncü en yaygın türdür. Bu grupta 6 farklı OTU belirlenmiştir. Bu OTU'ların 428 baz çifti (bp) boyunca yapılan dizilemelerinde %99-100 benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Bacillus %2.1'lik oranla dördüncü sırada yer alan mikrobiyal gruptur. Bu grupta 4 farklı OTU belirlenmiştir. Bu OTU'ların 428 baz çifti (bp) boyunca yapılan dizilemelerinde %99-100 benzerlik gösterdiği görülmüştür. Bu grupta sınıflandırılmayan *Bacillus* suşları ile birlikte *Bacillus coagulans* türü de belirlenmiştir.

Actinobacteria %2.0 ile, arı ekmeği örneğinde tespit edilen mikrobiyal gruplar arasında beşinci sırada ve en az temsil edilen gruptur. Bu grup içerisinde 404 baz çifti (bp) boyunca yapılan dizilemelerde %100 benzerlik gösteren bir operasyonel takson birimi (OTU) belirlenmiştir. Bu

OTU, 30 sınıflandırılmayan *Bifidobacterium* suşları ile birlikte *Bifidobacterium asteroides* ve *Schaalia odontolytica* gibi diğer taksonomik birimleri içerir (Tablo 4.2).

Actinobacteria, geniş bir filumdur; bu mikroorganizmalar bal arılarının midesinde, toprak ve bitki yüzeylerinde yaygın olarak bulunurlar. Arı ekmeği örneğindeki varlıkları, arıların çevreleriyle temas ederken bu bakterileri topladıklarını ya da arı ekmeği üretim sürecinde arının midesinden gelmiş olabileceğini düşündürebilir. Aynı zamanda bu mikroorganizma grubu arı ekmeğinin fermantasyon sürecinde önemli bir rol oynayabilir. Ancak, daha fazla araştırma ve analiz yapılması gerekmektedir.

Sonuçlara göre, en yaygın mikrobiyal grup Laktobasillerdir. Çanakkale'den toplanan arı ekmeği örneğinde *Lactobacillus* türleri daha baskındır. Ayrıca, daha düşük oranlarda *Bifidobacterium*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus* ve *Actinobacteria* gibi diğer mikrobiyal gruplar da tespit edilmiştir.

Tablo 4.2: Çanakkale ilinden toplanan arı ekmeği örneğinde bulunan laktik asit bakterilerinin % oranları.

Çanakkale arı ekmeği örneği	% Oranı
<i>Lactobacillus:</i>	
<i>Lactobacillus alvei</i>	
<i>Lactobacillus helsingborgensis</i>	
<i>Lactobacillus kimbladii</i>	
<i>Lactobacillus kullabergensis</i>	
<i>Lactobacillus kunkeei</i>	% 77.7
<i>Lactobacillus mellis</i>	
<i>Lactobacillus melliventris</i>	
<i>Lactobacillus panisapium</i>	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
<i>Bifidobacterium:</i>	% 14.7
<i>Bifidobacterium asteroides</i>	
<i>Bacillus coagulans</i>	% 3.5
<i>Bacillus</i>	% 2.1
<i>Actinobacteria:</i>	
<i>Bifidobacterium asteroides,</i>	% 2.0
<i>Schaalia odontolytica</i>	

Kıyıköy yöresinden toplanan arı ekmeği örneklerinde belirlenen laktik asit bakterilerine ait 16S rRNA dizileme sonuçlarına göre;

Lactobacillus oranı %71.9 olarak bulunmuş ve en yaygın görülen mikroorganizma grubunu oluşturmuştur. Bu grupta 84 farklı operasyonel takson birimi (OTU) belirlenmiştir. Bu OTU'ların 427-428 baz çifti (bp) boyunca yapılan dizilemelerinde %99-100 benzerlik gösterdiği görülmüştür. Bu grup içinde Çanakkale örneğinde olduğu gibi 72 sınıflandırılmayan *Lactobacillus* suşu ile birlikte *Lactobacillus alvei*, *Lactobacillus helsingborgensis*, *Lactobacillus kimbladii*, *Lactobacillus kullabergensis*, *Lactobacillus kunkeei*, *Lactobacillus mellis*, *Lactobacillus melliventris*, *Lactobacillus panisapium* ve *Lactobacillus rhamnosus* gibi diğer *Lactobacillus* türleri de belirlenmiştir.

Bifidobacterium %23.9'lük oranla İkinci en yaygın mikrobiyal grup olarak belirlenmiştir. Bu grupta 8 farklı OTU belirlenmiştir. Bu OTU'ların 404-405 baz çifti (bp) boyunca yapılan dizilemelerinde %99-100 benzerlik gösterdiği görülmüştür. Bu grup içinde sınıflandırılmayan *Bifidobacterium* suşları ile birlikte *Bifidobacterium asteroides* türü belirlenmiştir.

Actinobacteria %3.9'lük oranla üçüncü en yaygın görülen mikrobiyal grubu oluşturur. Bu grupta 3 farklı OTU belirlenmiştir. Bu OTU'ların 404 baz çifti (bp) boyunca yapılan dizilemelerinde %99-100 benzerlik gösterdiği görülmüştür. Bu grup içinde de Çanakkale örneğindeki gibi 30 sınıflandırılmayan *Bifidobacterium* suşları ile *Bifidobacterium asteroides* ve *Schaalia odontolytica* gibi taksonomik birimler de belirlenmiştir (Tablo 4.3).

Bifidobacterium sp. %0.3'lük oranda ve az temsil edilen gruptur. Bir OTU bulunmuştur. Bu OTU, 404 baz çifti boyunca %100 benzerlik gösteren bir *Bifidobacterium* türünü temsil etmektedir.

Tablo 4.3: Kıyıköy yöresinden toplanan arı ekmeği örneğinde bulunan laktik asit bakterilerinin % oranları.

Kıyıköy arı ekmeği örneği	% Oranı
<i>Lactobacillus:</i>	
<i>Lactobacillus alvei</i>	
<i>Lactobacillus helsingborgensis</i>	
<i>Lactobacillus kimbladii</i>	
<i>Lactobacillus kullabergensis</i>	
<i>Lactobacillus kunkeei</i>	% 71.9
<i>Lactobacillus mellis</i>	
<i>Lactobacillus melliventris</i>	
<i>Lactobacillus panisapium</i>	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
<i>Bifidobacterium:</i>	% 23.9
<i>Bifidobacterium asteroides</i>	
<i>Actinobacteria:</i>	
<i>Bifidobacterium asteroides</i>	% 3.9
<i>Schaalia odontolytica</i>	
<i>Bifidobacterium sp.</i>	% 0.3

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Arı ekmeği, süper gıda olarak kabul edilen bir arı ürünüdür (Kafantaris ve diğ., 2021). Arı ekmeği, polen, nektar ve arıların salgıladığı tükürük bezlerinin karışımıdır (Jaya ve diğ., 2020). Arılar tarafından peteklerde, polen, balmumu ve bal ile kaplanarak anaerobik bir ortam oluşturulur ve ardından laktik asit bakterileri ve mayalar tarafından doğal olarak fermente edilir. (Mohammad ve diğ., 2021; Barta ve diğ., 2022). Bu nedenle, arı ekmeği, probiyotiklerin yanı sıra çoklu doymamış yağlar, karbonhidratlar, tüm esansiyel amino asitler ve fenolik bileşikler gibi besleyici maddeler içerir (Dranca ve diğ., 2020; Didaras ve diğ., 2020; Zuluaga-Dominguez ve Fuenmayor, 2022). Ayrıca, fermente polen olan arı ekmeği, fermente olmayan polene göre daha kolay sindirilebilir. Arı ekmeğinin bileşimi coğrafi ve bitki kökenine bağlı olarak değişir, çünkü işçi arılar topladıkları bitki polenlerini kovana taşır. Arı ekmeğinde bulunan mikroorganizmalar, polenlerden veya arıların bağırsak mikrobiyotasından kaynaklanır. Arı ekmeğinde genellikle *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve *Weissella* gibi mikroorganizmalar bulunur (Zuluaga-Dominguez ve Fuenmayor, 2022). Arı ekmeği, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerine ait bakteriler başta olmak üzere çeşitli mikroorganizmaları içermektedir. Ancak, baskın bakteri florasını oluşturan başlıca grup *Lactobacillus* cinsine ait bakterilerdir. Bu mikroorganizmaların yaklaşık iki hafta süren fermantasyon süreci, pH düşüşü, lipid içeriğinin artışı, laktik asit içeriğinin artışı ve amino asit bileşiminin değişimi gibi biyokimyasal özellikleri etkiler. *Lactobacillus kunkeei* gibi faydalı probiyotikler, arı ekmeğinin antimikrobiyal etkisini artırır (Vásquez ve Olofsson, 2009; Zuluaga-Dominguez ve Fuenmayor, 2022).

Bir çalışmada, sarmaşık çiçeklerindeki, taze toplanmış arı polenindeki, kovan içinde depolanmış arı ekmeğindeki ve bal arısı gastrointestinal sistemindeki laktik asit bakterileri araştırılmıştır ve RAPD-PCR analizi yoluyla tiplendirme yapılmıştır (Di Cagno ve diğ., 2019) (Tablo 5.1). Çiçekler ve taze arı poleni önemli bir mikrobiyal çeşitlilik sergilese de, laktik asit bakteri türlerinin çoğu arı ekmeği olgunlaşması sürecinde kaybolmuş ve uzun süre depolanmış arı ekmeği ve arı kovanında *Lactobacillus kunkeei* ve *Fructobacillus fructosus*'un baskın hale gelmesine yol açmıştır. Laktik asit bakterilerinin adaptasyonu, temel olarak türe özgü ve daha derinlemesine incelendiğinde, suşa özgü özelliklere bağlıdır. Arı ekmeğinin korunması,

özellikle bazı *L. kunkeei* suşları tarafından üretilen bakteri metabolitlerine bağlı gibi görünmektedir ve bu metabolitler muhtemelen laktik asit bakterilerinin diğer mikrobiyal gruplarla rekabet edebilmesini sağlamaktadır. *L. kunkeei* suşları ve *Hanseniaspora uvarum* kullanılarak arı polenin fermantasyonunu doğal olarak taklit eden bir fermantasyon protokolü geliştirilmiştir, fermente arı poleninde doğal olarak bulunan besin maddeleri ve biyoaktif bileşiklerin sindirilebilirlik özelliklerinin ve biyoaktivitelerinin arttığı görülmüştür (Di Cagno ve diğ., 2019).

Tablo 5.1: Sarmaşık çiçeklerinde, arı poleninde, 15 gün kovanda depolanan arı ekmeğinde ve 30 gün kovanda depolanan arı ekmeğinde tanımlanan laktik asit bakteri türleri (Di Cagno ve diğ., 2019).

Kaynak	Tür
Sarmaşık çiçekleri	<i>Lactococcus lactis</i>
Arı Poleni	<i>Fructobacillus fructosus</i> <i>Lactobacillus kunkeei</i> <i>Lactobacillus curvatus</i>
15 gün kovanda depolanmış arı ekmeği	<i>L. kunkeei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>F. fructosus</i> <i>Leuconostoc citreum</i> <i>Leuconostoc citreum</i> <i>L. curvatus</i>
30 gün kovanda depolanmış arı ekmeği	<i>L. kunkeei</i> <i>F. fructosus</i>

Yapay arı ekmeği üretimi ile insanlar için besinsel değeri yüksek, istikrarlı, güvenli ve standartlaştırılmış bir fermente ürün elde edilebilir. Yapay arı ekmeği üretiminin iyileştirilmiş besinsel ve fonksiyonel özelliklerini doğrulamak amacıyla ileride daha fazla deneyler yapılması gerekmektedir.

Bal arısı ürünleri ve bal arılarında (*Apis mellifera*) immünoglobulin A (IgA) üretimini teşvik eden laktik asit bakteri izolatlarını tanımlamak için bir çalışma yürütülmüştür (Asama ve diğ., 2015). Bal arısı ürünleri ve bal arılarının mikrobiyotasının pyro dizileme analizi, bal, arı poleni, arı ekmeği ve arı sütünde *Lactobacillus kunkeei*'nin baskın olduğunu ortaya koymuştur. *Lactobacillus kunkeei*, arı poleni, arı ekmeği ve arı midesinde izole edilmiş ve IgA üretimi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Arı poleninden elde edilen YB38 ve YB83 izolatları, fare Peyer patch hücrelerinde IgA üretimini artırmıştır. 11 sağlıklı yetişkin üzerinde yapılan bir ön

çalışma, 1000 mg/gün dozunda 4 hafta boyunca alınan YB38'in tükürük IgA (SIgA) konsantrasyonlarını ve salgısını artırdığını ve herhangi bir olumsuz etkisi olmadığını göstermiştir (Asama ve diğ., 2015).

Laktik asit bakterileri (LAB) konusunda, Gilliam (1979) polen ve arı ekmeğinde *Bacillus* cinsine ait mikroorganizmaların, özellikle *Bacillus subtilis*'in baskın olduğunu bulmuştur. Genel olarak, *Bacillus*, özellikle arı ekmeğinde olduğu gibi düşük pH gibi zorlu ortamlara dayanabilir ve glukozu ve daha az miktarda ksilozu, mannitolu, arabinozu ve trehalozu fermente etme yeteneğine sahiptir.

Vásquez ve diğ., (2012) Malezya, Tayland, İsveç, Kenya ve Meksika'dan farklı arı türlerinde [Apini (bal arısı) ve Meliponini (iğnesiz arılar)], 16S rRNA genlerini dizileyerek *Lactobacillus kunkeii* tarafından domine edilen bir mikroorganizma popülasyonuna sahip olmak üzere 50'den fazla farklı LAB tespit etmiştir.

Yapılan çalışmalar insan bağırsak mikrobiyotasının aktivitesi ile sağlık arasında bir bağlantı olduğunu göstermektedir, özellikle kardiyovasküler ve sinir sistemindeki etkileri ile bağışıklık ve metabolik aktivite üzerindeki etkileri iyi bilinmektedir. Bazı bakteriler, örneğin farklı *Lactobacillus* türleri, patojenik bakterilere karşı bağırsak bariyer fonksiyonunu iyileştirmede daha fazla faydalı etki göstermiştir (Karczewski ve diğ., 2010; Xue ve diğ., 2017). *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* bakterileri, antikanser etkiler göstermiş, laktoz intoleransını azaltmıştır (Almeida ve diğ., 2012). Ayrıca antialerjik etkilere sahip olduğu, bağışıklık sistemini güçlendirdiği, ilaç tedavilerini desteklediği bulunmuştur. Konsantrasyonu, hafızayı ve sindirim sisteminin işlevini iyileştirmiştir. Ayrıca kolesterol içeriğini ve kan lipid seviyelerini düzenlemiştir (Kieliszek ve diğ., 2018).

Laktik asit bakterilerinin bir diğer faydası da β -galaktozidaz üretimiyle laktoz sindiriminde iyileşme sağlanması ve konjuge linoleik asit, biyoaktif peptitler ve fenolik bileşiklerin seviyelerini artırmasıdır (Marco ve diğ., 2017). Diğer bir etkisi ise kolesterol düşürücü, antidiyabetik, antioksidan ve immünomodülatör özelliklere sahip ekzopolisakkaritlerin üretiminde rol almasıdır (Nampoothiri ve diğ., 2017). Bu tür ekzopolisakkaritlerin fermente ürünlerin reolojik özelliklerinin değişimine neden olduğu bildirilmiştir (Hassan, 2008; Behare ve diğ., 2009).

Endo ve diğ. (2012) arı poleninde 16S rRNA gen dizileme yöntemi ile *Fructobacillus fructosus*'un yaygın olarak bulunduğunu tespit etmiştir. Disayathanoowat ve diğ. (2020) farklı arı ekmeği örneklerinde *Acinetobacter* ve *L. kunkeii* türlerini 16S rRNA gen dizi analizi yöntemiyle tespit etmiştir.

Filannino ve diğ. (2016) polen ve arı ekmeği örneklerinde *L. kunkeii*, *F. fructosus*, *L. plantarum* ve *L. fermentum*'un bulunduğunu bildirmiştir. Bu mikroorganizmaların sıklıkla bulunmasından dolayı, evrimsel birliktelik ve konakçılarla karşılıklı etkileşim olabileceği iddia edilmiştir (Endo ve Salminen, 2013).

Tang ve diğ. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada Çin'de *T. pagdeni*'ye ait arı ekmeği örneklerinde yapılan analizlere göre, *Lactobacillus* bakterisi cinsinin en baskın olduğu görülmüştür ve toplam popülasyonun %39.94 ila %92.26'sını oluşturmuştur. Bunun yanında, *Carnimonas* cinsinden daha küçük bir popülasyon (%1.20 ila %15.18) bulunmuştur. *Lactobacillus*, *Carnimonas*, *Escherichia-Shigella* ve *Acinetobacter* cinsleri tüm arı ekmeği örneklerinde bulunmuştur.

Yapılan bir çalışmada, Türkiye'nin farklı bölgelerinden (Marmara, Ege ve Akdeniz) elde edilen üç Anadolu arı ekmeği örneğinin bakteriyel ve postbiyotik potansiyeli ve insan tüketimi için sunulan özellikleri araştırılmıştır. Anadolu arı ekmeğinde en sık bulunan familyalar *Lactobacillaceae*, *Oscillospiraceae*, *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae* ve *Lachnospiraceae*'dir. *Lactobacillus delbruckeii* oldukça yaygın bulunurken, aynı zamanda *Prevotalla copri*, *Faecalibacterium prausnitzii* ve *Akkermansia muciniphila* gibi yeni nesil probiyotikler olarak bilinen diğer faydalı bakteriler de arı ekmeğinde bulunmuştur. Yağ asidi bileşimi, arı ekmeği örneklerinde postbiyotik olarak kısa zincirli bir yağ asidi olan butirik asidin bulunduğunu göstermektedir. Ayrıca, alfa-linolenik asit ve eikozadienoik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleri de bulunmaktadır. En yüksek miktarda bulunan yağ asitleri palmitik asit (~30%), stearik asit (~17%) ve alfa-linolenik asit (~12%)'tir. Örneklerden biri *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Kahraman-Ilıkkın, 2023).

Arı ekmeği, insanlar tarafından tüketilen değerli bir arı ürünüdür. Ancak ticari olarak temin edilebilen arı ekmeği örneklerinin içerdiği mikrobiyal gruplar hakkında kapsamlı bir şekilde

araştırma yapılmamıştır. Bununla birlikte, bu arı ürününün insanlar tarafından tüketildiği göz önüne alındığında, mikrobiyal grupların analizinin önemli olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışma, Çanakkale ili ve Kıyıköy beldesinden toplanan ticari arı ekmeği örneklerinden elde edilen laktik asit bakterilerini tanımlamak ve mikrobiyal çeşitliliklerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. İki farklı arı ekmeği örneği kullanılarak 16S rRNA geninin V3-V4 bölgesinde yapılan dizileme analiziyle mikrobiyal topluluklar incelenmiştir. Elde edilen veriler, arı ekmeğinde yaygın olarak bulunan laktik asit bakterilerini ortaya çıkarmış ve mikrobiyal çeşitlilikteki farklılıkları göstermiştir. Literatürdeki benzer çalışmalara bakıldığında arı ürünlerinde bulunan laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında 16S rRNA gen dizileme yöntemi sıklıkla kullanılmıştır; bu yöntem ile taksonomik olarak cins ve tür düzeyinde tiplendirme yapılabilmektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, literatürdeki benzer çalışmalarla uyumludur.

Kıyıköy arı ekmeği örneği, Çanakkale arı ekmeği örneğine kıyasla farklı bir laktik asit bakterisi profilini temsil etmektedir (bkz. Tablo 4.2 ve Tablo 4.3). Her iki örnekte de *Lactobacillus* cinsi en yüksek oranda bulunmuştur. Kıyıköy örneğinde düşük oranda "*Bifidobacterium sp.*" olarak tanımlanan bir operasyonel takson birimi (OTU) bulunmuştur, ancak bu mikroorganizma Çanakkale örneğinde tespit edilmemiştir. Aynı zamanda *Bacillus* cinsi bakteriler ve *Bacillus coagulans* türü Çanakkale örneğinde bulunmasına rağmen Kıyıköy örneğinde tespit edilememiştir. Farklı arı kolonileri veya kaynaklar, farklı mikroorganizma profillerine sahip olabilir. Ayrıca, çevresel faktörler ve diğer etkileyici faktörler de mikrobiyal toplulukların farklılık göstermesine neden olabilir.

Bu sonuçlar, arı ekmeği örneğinin mikrobiyal çeşitliliğinin farklı olduğunu ve laktik asit bakterileri açısından bir örnekten diğerine değişebileceğini göstermektedir. Örneğin, *Lactobacillus* Çanakkale örneğinde %77.7'lik bir oranla temsil edilirken, Kıyıköy örneğinde %71.9'luk bir orana sahiptir. Ayrıca bu grup içerisinde sınıflandırılmayan *Lactobacillus* suşları ile birlikte *Lactobacillus alvei*, *Lactobacillus helsingborgensis*, *Lactobacillus kimbladii*, *Lactobacillus kullabergensis*, *Lactobacillus kunkeei*, *Lactobacillus mellis*, *Lactobacillus melliventris*, *Lactobacillus panisapium* ve *Lactobacillus rhamnosus* gibi farklı *Lactobacillus* türleri belirlenmiştir. Arı ekmeği, arılar tarafından özel bir fermantasyon süreciyle üretilir ve

bu süreçte laktik asit bakterileri önemli bir rol oynar. Bu bakteriler, arı ekmeğinin karakteristik özelliklerine katkıda bulunan metabolik aktiviteleriyle bilinirler.

Benzer şekilde *Bifidobacterium* Çanakkale örneğinde %14.7 bulunurken Kıyıköy örneğinde bu oran %23.9'a yükselmiştir, Kıyıköy örneğinde *Bifidobacterium* ve *Actinobacteria* gruplarının Çanakkale örneğe göre daha yüksek oranda bulunduğu gözlemlenmiştir. *Actinobacteria* grubu da Kıyıköy örneğinde %3.9 oranında bulunmuştur. Bu grup içinde *Bifidobacterium asteroides* ve *Schaalia odontolytica* gibi taksonomik birimler belirlenmiştir.

Bu durum, farklı arı ekmeği örneklerindeki mikrobiyal çeşitlilikteki doğal farklılıkları yansıtabilir. Bu farklılıkların nedeni çeşitli faktörler olabilir. Örneğin, arı kolonisinin konumu, çevresel koşullar, çiçek çeşitliliği, beslenme ve diğer faktörler mikrobiyal çeşitlilik üzerinde etkili olabilir. Ayrıca, arıların doğal mikrobiyal popülasyonları, kovanın içindeki ve dışındaki mikroorganizmalarla etkileşim halinde olduğundan, bu da mikrobiyal çeşitlilikte farklılıklara yol açabilir.

Çanakkale, coğrafi konumu nedeniyle geçiş iklimi özellikleri gösteren bir bölgede yer almaktadır ve genel olarak Akdeniz ikliminin karakteristik özelliklerini taşır. İklim koşulları, bitki örtüsünün varlığını etkilemiştir ve Çanakkale ili arılar için zengin bir beslenme alanı sağlamaktadır. İl yüzölçümünün %55'i ormanlık alandır, geri kalan alanlar ise çayır, mera ve tarım arazileridir. Kızılçam, kestane, ıhlamur, püren, defne, hayıt, çeşitli makiler, kocayemiş, mersin ve çeşitli çiçekli çalılıklar gibi Akdeniz iklimine özgü bitki türleri il genelinde yaygın olarak bulunmaktadır. Ormanlarda karma otsu ve odunsu bitki toplulukları da görülür. Kızılçam, karaçam, köknar, meşe, kayın gibi ağaç türlerinden oluşan ormanlar Çanakkale'de çoğunluktadır. Çanakkale'de bal üretimi için en yaygın nektar kaynakları arasında ak ve kırmızı üçgül, ayçiçeği, yonca, mısır, çeşitli meyve ağaçları, püren, çam, kekik, geven, hardal, melisa, akasya, iğde, söğüt ve kestane gibi bitkiler bulunmaktadır (İlgar, 2018).

Kıyıköy bitki örtüsü çoğunlukla ağaçlardan oluşmaktadır. Bu ormanlık alandaki ağaçların çoğunluğunu meşe (*Quercus* sp.) ve kara çam (*Pinus nigra*), kayın (*Fagus orientalis*), kızılğaç (*Carpinus betulus*), dişbudak (*Fraxinus ornus*) ve ıhlamur (*Tilia* sp.) gibi ağaçlar oluşturur. Kıyıköy, Yıldız Dağları ve Istranca Ormanları ile çevrili olduğu için çok sınırlı bir alana sahiptir

ve tarım sadece kısıtlı alanlarda yapılmaktadır. Bölgede ayrıca aromatik bitki yetiştiriciliği ve organik arıcılık yapılmaktadır (Kiper ve diğ., 2016).

Bölgedeki ormanlık alanlar, diş budak, meşe, kızılağaç, kavak, karaağaç, kızılçık, ıhlamur, sütleğen, kuşburnu, kocayemiş, sarmaşık ve bakırtaş gibi ağaç türlerini de içermektedir. Orman açıklıklarında sarı su sümbülleri, yaygın çuha çiçeği ve kardelen gibi bitkiler bulunurken, orman zemininde sıklıkla çiğdemler ve orkide türleri gözlemlenmektedir. Ayrıca, sahil kumullarında beyaz kirpikotu ve çuha çiçeği gibi bitkiler görülebilirken, sahil kumullarının arkasındaki alan ve sahil kumulları ile bataklıklar arasındaki geçiş bölgesinde ise alıç, kızılçık, karaağaç, zeytin ve meşe ağaçları ile kuşkonmaz gibi bitki türleri bulunmaktadır. Bu bitki çeşitliliği sayesinde bölge zengin bir floristik bileşime sahiptir (Kiper ve diğ., 2016).

Bitki örtüsündeki bu farklılıklar, arı ekmeği örneklerindeki laktik asit bakterilerinin mikrobiyal çeşitlilik açısından farklılık gösterebileceğini ve arı kolonileri veya arı ekmeği kaynakları arasında değişebileceğini göstermektedir. Ayrıca, çevresel faktörlerin ve diğer faktörlerin mikrobiyal toplulukların farklılık göstermesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

Bu nedenle, farklı arı ekmeği örneklerinin mikrobiyal profilini tam olarak anlamak için daha fazla örnek analiz edilmeli ve çeşitli faktörlerin mikrobiyal çeşitlilik üzerindeki etkisi daha ayrıntılı bir şekilde incelenmelidir.

Bu çalışmada, arı ekmeği örneklerindeki laktik asit bakterilerinin mikrobiyal çeşitliliğini belirlemek için genetik analizler kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, arı ekmeği örneklerinde *Lactobacillus* türlerinin baskın olduğunu ve çeşitli *Lactobacillus* türlerinin tanımlanabildiğini göstermektedir. Ayrıca, *Bifidobacterium* ve *Actinobacteria* gibi diğer mikrobiyal grupların da arı ekmeği örneklerinde bulunduğu belirlenmiştir.

Çalışmamız, arı ekmeği örneklerindeki laktik asit bakterilerinin çeşitliliğinin anlaşılması açısından önemli bir adımdır. *Lactobacillus* cinsi, arı ekmeğinde bulunan ana mikrobiyal grup olarak belirlenmiştir ve bu grubun sağlık üzerinde olumlu etkileri olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra, *Bifidobacterium* cinsi ve diğer *Actinobacteria* gruplarının da arı ekmeği mikrobiyotasında bulunması, bu arı ürününün probiyotik özelliklere sahip olabileceği ve insan sağlığına faydalar sağlayabileceği anlamına gelmektedir.

Bununla birlikte, bu çalışmanın sınırlamaları da vardır. Örneğin, sadece belirli bir bölgeden toplanan arı ekmeği örnekleri kullanılmıştır, bu nedenle elde edilen sonuçlar genellemeler yapmak için sınırlı olabilir. Ayrıca, sadece 16S rRNA geninin V3-V4 bölgelerine dayanan genetik analizler kullanılmıştır, dolayısıyla diğer mikrobiyal genlerin ve işlevlerin incelenmediği unutulmamalıdır. Bu tür dizileme çalışmaları, mikrobiyal çeşitliliği anlamak, taksonomik sınıflandırmaları güncellemek ve belirli *Lactobacillus* türlerini belirlemek için önemli bir araçtır. Hiç şüphesiz ki, gelişen teknolojiye paralel olarak gelecekte yeni yöntemlerle daha detaylı araştırmalar ve analizler yürütülebilir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması arı ekmeği örneklerindeki laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve mikrobiyal çeşitliliğin anlaşılmasına önemli bir katkı sağlamıştır. Elde edilen sonuçlar, arı ekmeğinin mikrobiyal çeşitlilik açısından kompleks olduğunu ve arı kolonileri, coğrafi faktörler ve diğer çevresel etkilerin bu mikrobiyal çeşitliliği etkileyebileceğini göstermektedir. Ülkemizin değişik iklim ve floraya sahip farklı coğrafi bölgelerinden de toplanacak arı ekmeği örneklerinin benzer şekilde incelenmesi, farklı biyolojik ve kimyasal içeriğe sahip arı ekmeği örneklerinin sağlığa yararlı etkilerinin çeşitli *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerle araştırılması yararlı olacaktır. Bu çalışma, arı ekmeği ile sağlık arasındaki ilişkiyi daha iyi anlamak ve yapay fermente ürünler üretmek üzere gelecekte yürütülecek araştırmalara temel oluşturmuş ve yararlı olabilecek önemli moleküler veriler sunmuştur.

KAYNAKLAR

- Abouda, Z., Zerdani, I., Kalalou, I., Faid, M., Ahami, M. T., 2011, The antibacterial activity of Moroccan bee bread and bee-pollen (fresh and dried) against pathogenic bacteria, *Research Journal of Microbiology*, 6(4), 376-384.
- Almeida, C. C., Lorena, S. L. S., Pavan, C. R., Akasaka, H. M. I., Mesquita, M. A., 2012, Beneficial effects of long-term consumption of a probiotic combination of *Lactobacillus casei* Shirota and *Bifidobacterium breve* Yakult may persist after suspension of therapy in lactose-intolerant patients, *Nutrition in Clinical Practice*, 27(2), 247-251.
- Almeida-Muradian, L. B. D., Pamplona, L. C., Coimbra, S., Barth, O. M., 2005, Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets, *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(1), 105-111.
- Anđelković, B., Jevtić, G., Mladenović, M., Marković, J., Petrović, M., Nedić, N., 2012, Quality of pollen and honey bee bread collected in spring, *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 1, 275-277.
- Anderson, K. E., Carroll, M. J., Sheehan, T. I. M., Mott, B. M., Maes, P., Corby-Harris, V., 2014, Hive-stored pollen of honey bees: many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion, *Molecular Ecology*, 23(23), 5904-5917.
- Asama, T., Arima, T. H., Gomi, T., Keishi, T., Tani, H., Kimura, Y., ... & Hashimoto, K., 2015, *Lactobacillus kunkeei* YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults, *Journal of Applied Microbiology*, 119(3), 818-826.
- Atkin, S. L., Barrier, S., Cui, Z., Fletcher, P. D., Mackenzie, G., Panel, V., ... & Zhang, X., 2011, UV and visible light screening by individual sporopollenin exines derived from *Lycopodium clavatum* (club moss) and *Ambrosia trifida* (giant ragweed), *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 102(3), 209-217.
- Aylanc, V., Falcão, S. I., Ertosun, S., Vilas-Boas, M., 2021, From the hive to the table: Nutrition value, digestibility and bioavailability of the dietary phytochemicals present in the bee pollen and bee bread, *Trends in Food Science & Technology*, 109, 464-481.
- Aylanc, V., Falcão, S. I., Vilas-Boas, M., 2023, Bee pollen and bee bread nutritional potential: Chemical composition and macronutrient digestibility under *in vitro* gastrointestinal system, *Food Chemistry*, 413, 135597.
- Babalola, O. O., 2003, Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria, *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 710-713.
- Badary, O. A., Taha, R. A., Gamal El-Din, A. M., Abdel-Wahab, M. H., 2003, Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger, *Drug and Chemical Toxicology*, 26(2), 87-98.

- Bakour, M., Fernandes, Â., Barros, L., Sokovic, M., Ferreira, I. C., 2019, Bee bread as a functional product: Chemical composition and bioactive properties, *LWT*, 109, 276-282.
- Bakour, M., Laaroussi, H., Ousaaïd, D., El Ghouizi, A., Es-Safi, I., Mechchate, H.; Lyoussi, B., 2022, Bee bread as a promising source of bioactive molecules and functional properties: An up-to-date review, *Antibiotics*, 11, 203.
- Baltrušaitytė, V., Venskutonis, P. R., Čeksterytė, V., 2007, Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts, *Food Chemistry*, 101(2), 502-514.
- Barene, I., Daberte, I., Siksna, S., 2015, Investigation of bee bread and development of its dosage forms, *Medicinos Teorija ir Praktika*, 21, 16-22.
- Barta, D. G., Cornea-Cipcigan, M., Margaoan, R., Vodnar, D. C., 2022, Biotechnological processes simulating the natural fermentation process of bee bread and therapeutic properties—An overview, *Frontiers in Nutrition*, 9, 871896.
- Begum, H. A., Iqbal, J., Aziz, A., 2021, Characterization of pollen profile of *Apis mellifera* L. in arid region of Pakistan, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(5), 2964-2974.
- Behare, P., Singh, R., Singh, R. P., 2009, Exopolysaccharide-producing mesophilic lactic cultures for preparation of fat-free Dahi - an Indian fermented milk, *The Journal of Dairy Research*, 76(1), 90-97.
- Borycka, K., Grabek-Lejko, D., Kasprzyk, I., 2015, Antioxidant and antibacterial properties of commercial bee pollen products, *Journal of Apicultural Research*, 54(5), 491-502.
- Bruijns, B., Tiggelaar, R., Gardeniers, H., 2018, Massively parallel sequencing techniques for forensics: A review, *Electrophoresis*, 39(21), 2642-2654.
- Busch, U., & Nitschko, H. (1999). Methods for the differentiation of microorganisms. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 722(1-2), 263-278.
- Caplice, E., Fitzgerald, G. F., 1999, Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation, *International Journal of Food Microbiology*, 50(1-2), 131-149.
- Chevtchik, V., 1950, Mikrobiologie pyloveho kvaseni, *Publ. Fac. Sci. Univ. Masaryk*, 323, 103-130.
- DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y., Rivera, R., Carroll, M., Chambers, M., Hidalgo, G., de Jong, E. W., 2016, Honey bee colonies provided with natural forage have lower pathogen loads and higher overwinter survival than those fed protein supplements, *Apidologie*, 47(2), 186-196.

- DeGrandi-Hoffman, G., Eckholm, B. J., Huang, M. H., 2013, A comparison of bee bread made by Africanized and European honey bees (*Apis mellifera*) and its effects on hemolymph protein titers, *Apidologie*, 44(1), 52-63.
- Deveza, M. V., Keller, K. M., Lorenzon, M. C. A., Nunes, L. M. T., Sales, É. O., Barth, O. M., 2015, Mycotoxicological and palynological profiles of commercial brands of dried bee pollen, *Brazilian Journal of Microbiology*, 46, 1171-1176.
- Di Cagno, R., Filannino, P., Cantatore, V., Gobbetti, M., 2019, Novel solid-state fermentation of bee-collected pollen emulating the natural fermentation process of bee bread, *Food Microbiology*, 82, 218-230.
- Didaras, N. A., Karatasou, K., Dimitriou, T. G., Amoutzias, G. D., Mossialos, D., 2020, Antimicrobial activity of bee-collected pollen and beebread: State of the art and future perspectives, *Antibiotics*, 9(11), 811.
- Disayathanoowat, T., Li, H., Supapimon, N., Suwannarach, N., Lumyong, S., Chantawannakul, P., Guo, J., 2020, Different dynamics of bacterial and fungal communities in hive-stored bee bread and their possible roles: A case study from two commercial honey bees in China, *Microorganisms*, 8(2), 264.
- Dönmez, D., Şimşek, Ö., Kaçar, Y. A., 2015, Yeni nesil DNA dizileme teknolojileri ve bitkilerde kullanımı, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 1, 30-37.
- Dranca, F., Ursachi, F., Oroian, M., 2020, Bee bread: Physicochemical characterization and phenolic content extraction optimization, *Foods*, 9(10), 1358.
- Egorova, A. I., 1971, Preservative microflora in stored pollen, *Veterinariya*, 8, 40-41.
- Elsayed, N., El-Din, H. S., Altemimi, A. B., Ahmed, H. Y., Pratap-Singh, A., Abdelmaksoud, T. G., 2021, *In vitro* antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Egyptian citrus beebread, *Molecules*, 26(9), 2433.
- Endo, A., Okada, S., 2005, Monitoring the lactic acid bacterial diversity during shochu fermentation by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(3), 216-221.
- Endo, A., Salminen, S., 2013, Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria, *Systematic and Applied Microbiology*, 36(6), 444-448.
- Endo, A., Irisawa, T., Futagawa-Endo, Y., Takano, K., du Toit, M., Okada, S., Dicks, L. M., 2012, Characterization and emended description of *Lactobacillus kunkeei* as a fructophilic lactic acid bacterium, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt_3), 500-504.
- Estevinho, L., Pereira, A. P., Moreira, L., Dias, L. G., Pereira, E., 2008, Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey, *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3774-3779.

- Felis, G. E., Dellaglio, F., 2007, Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria, *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8(2), 44.
- Filannino, P., Cavoski, I., Thlien, N., Vincentini, O., De Angelis, M., Silano, M., ... & Di Cagno, R., 2016, Lactic acid fermentation of cactus cladodes (*Opuntia ficus-indica* L.) generates flavonoid derivatives with antioxidant and anti-inflammatory properties, *PLoS One*, 11(3), e0152575.
- Florou-Paneri, P., Christaki, E., Bonos, E., 2013, Lactic acid bacteria as source of functional ingredient, In *Lactic Acid Bacteria-R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, IntechOpen.
- Foote, H. L., 1957, Possible use of microorganisms in synthetic bee bread production, *American Bee Journal*, 97, 476-478.
- Fuenmayor B, C., Zuluaga D, C., Díaz M, C., Quicazán de C, M., Cosio, M., Mannino, S., 2014, Evaluation of the physicochemical and functional properties of Colombian bee pollen, *Revista MVZ Córdoba*, 19(1), 4003-4014.
- Funakoshi-Tago, M., Nakamura, K., Tago, K., Mashino, T., Kasahara, T., 2011, Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, apigenin, luteolin and fisetin, *International Immunopharmacology*, 11(9), 1150-1159.
- Gänzle, M. G., Follador, R., 2012, Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: a review, *Frontiers in Microbiology*, 3, 340.
- Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T., Feil, E. J., ... & Swings, J., 2005, Re-evaluating prokaryotic species, *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 733-739.
- Gilliam, M., 1979, Microbiology of pollen and bee bread: The genus *Bacillus*, *Apidologie*, 10(3), 269-274.
- Gilliam, M., Prest, D. B., Lorenz, B. J., 1989, Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds, *Apidologie*, 20(1), 53-68.
- Grassberger, M., Sherman, R. A., Gileva, O. S., Kim, C. M., Mumcuoglu, K. Y., 2013, *Biotherapy—History, Principles and Practice, A Practical Guide to the Diagnosis and Treatment of Disease using Living Organisms*, Springer, ISBN 978-94-007-6585-6 (eBook).
- Gryson, N., 2010, Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: A review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 2003-2022.
- Habryka, C., Kruczek, M., Drygaś, B., 2016, Bee products used in apitherapy, *World Scientific News*, 48, 254-258.

- Hammes, W. P., Hertel, C., 2006, *The Genera Lactobacillus and Carnobacterium*, The Prokaryotes, 3rd Edition, In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. and Stackebrandt, E. (Eds.), 4, Springer, New York, pp. 320-403.
- Harris, L. J., 1998, *The microbiology of vegetable fermentations*, Microbiology of Fermented Foods, In: Wood, B.J.B. (Ed.), 2, Springer, Boston, MA. 45-72.
- Hassan, A. N., 2008, ADSA Foundation Scholar Award: Possibilities and challenges of exopolysaccharide-producing lactic cultures in dairy foods, *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1282-1298.
- Haydak, M. H., 1958, Pollen-pollen substitutes-beebread, *American Bee Journal*, 98(4), 145-146.
- Haydak, M. H., Palmer, L. S., 1942, Royal jelly and bee bread as sources of vitamins B1 B2, B6, C and nicotinic and pantothenic acids, *Journal of Economic Entomology*, 35, 319-320.
- Haydak, M. H., Vivino, A. E., 1950, The changes in the thiamine, riboflavin, niacin and pantothenic acid content in the food of female honeybees during growth with a note on the vitamin K activity of royal jelly and beebread, *Annals of the Entomological Society of America*, 43(3), 361-367.
- Hellner, M., Winter, D., von Georgi, R., Münstedt, K., 2008, Apitherapy: Usage and experience in German beekeepers, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5(4), 475-479.
- Herbert Jr, E. W., Shimanuki, H., 1978, Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen, *Apidologie*, 9(1), 33-40.
- Hitchener, B. J., Egan, A. F., Rogers, P. J., 1982, Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged beef, *Journal of Applied Microbiology*, 52(1), 31-37.
- Huang, Y., Wang, X., Wang, J., Wu, F., Sui, Y., Yang, L., Wang, Z., 2013, *Lactobacillus plantarum* strains as potential probiotic cultures with cholesterol-lowering activity. *Journal of Dairy Science*, 96(5), 2746-2753.
- Ilgar, R., 2018, Çanakkale İlinde Arıcılık Faaliyetleri, *Electronic Turkish Studies*, 13(26), 713-724.
- Isidorov, V. A., Isidorova, A. G., Szczepaniak, L., Czyżewska, U., 2009, Gas chromatographic–mass spectrometric investigation of the chemical composition of beebread, *Food Chemistry*, 115(3), 1056-1063.
- Ivanišová, E., Miroslava, K., Helena, F., Jana, P., Jana, H., Valerii, B., ... & Janette, M., 2015, Bee bread-perspective source of bioactive compounds for future, *Potravinarstvo*, 9(1), 592-598.

- Jaya, F., Rosyidi, D., Radiati, L. E., Minarti, S., Susilo, A., Muslimah, R. H., Husolli, M., 2020, Antioxidant activity and microbiological quality of bee bread collected from three different species honey bee, In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, Vol. 475, No. 1, IOP Publishing, 012033.
- Kafantaris, I., Amoutzias, G. D., & Mossialos, D., 2021, Foodomics in bee product research: a systematic literature review, *European Food Research and Technology*, 247, 309-331.
- Kahraman-Ilkkan, Ö., 2023, Bacterial profile and fatty acid composition of anatolian bee bread samples by metataxonomic and metabolomic approach, *Current Microbiology*, 80(3), 90.
- Karczewski, J., Troost, F. J., Konings, I., Dekker, J., Kleerebezem, M., Brummer, R. J. M., Wells, J. M., 2010, Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(6), G851-G859.
- Kaškonienė, V., Adaškevičiūtė, V., Kaškonas, P., Mickienė, R., Maruška, A., 2020, Antimicrobial and antioxidant activities of natural and fermented bee pollen, *Food Bioscience*, 34, 100532.
- Kaškonienė, V., Venskutonis, P. R., Čeksterytė, V., 2008, Composition of volatile compounds of honey of various floral origin and beebread collected in Lithuania, *Food Chemistry*, 111(4), 988-997.
- Katan, M. B., Grundy, S. M., Jones, P., Law, M., Miettinen, T., Paoletti, R., Participants, S. W., 2003, Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels, *Mayo Clinic Proceedings*, 78(8), 965-978.
- Kerry, R. G., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S., Das, G., 2018, Benefaction of probiotics for human health: A review, *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(3), 927-939.
- Khalid, K., 2011, An overview of lactic acid bacteria, *Int. J. Biosci*, 1(3), 1-13.
- Khalifa, S. A., Elashal, M., Kieliszek, M., Ghazala, N. E., Farag, M. A., Saeed, A., El-Seedi, H. R., 2020, Recent insights into chemical and pharmacological studies of bee bread, *Trends in Food Science & Technology*, 97, 300-316.
- Kıran, F., Osmanağaoğlu, Ö., 2011, Laktik asit bakterilerinin (LAB) identifikasyonunda/tiplendirmesinde kullanılan moleküler yöntemler, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 27(1), 62-74.
- Kieliszek, M., Piwożarek, K., Kot, A. M., Błażej, S., Chlebowska-Śmigiel, A., Wolska, I., 2018, Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review, *Trends in Food Science & Technology*, 71, 170-180.
- Kiper, T., Uzun, O., Topal, T. Ü., 2016, *Developing ecotourism development strategies for sustainable rural development: a case study of Kiyıköy, Kırklareli*, Global Issues and

- Trends in Tourism, In: Avcıkurt, C., Dinu, M.S., Hacıoğlu, N., Efe, R., Soykan, A., Tetik, N. (Eds.), St. Kliment Ohridski University Press, Sofia, 60, 679-699.
- Kosedag, M., Gulaboglu, M., 2023, Pollen and bee bread expressed highest anti-inflammatory activities among bee products in chronic inflammation: an experimental study with cotton pellet granuloma in rats, *Inflammopharmacology*, 31(4), 1967-1975.
- Lamson, D. W., Brignall, M. S., 2000, Antioxidants and cancer, part 3: Quercetin, *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, 5(3), 196-208.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S. C., 2008, Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 728-764.
- Leroy, F., & De Vuyst, L., 2004, Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry, *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.
- Lirdprapamongkol, K., Sakurai, H., Abdelhamed, S., Yokoyama, S., Maruyama, T., Athikomkulchai, S., Saiki, I., 2013, A flavonoid chrysin suppresses hypoxic survival and metastatic growth of mouse breast cancer cells, *Oncology Reports*, 30(5), 2357-2364.
- Liu, J. Y., Li, A. H., Ji, C., & Yang, W. M., 2009, First description of a novel *Weissella* species as an opportunistic pathogen for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China, *Veterinary Microbiology*, 136(3-4), 314-320.
- Loper, G. M., Standifer, L. N., Thompson, M. J., Gilliam, M., 1980, Biochemistry and microbiology of bee-collected almond (*Prunus dulcis*) pollen and bee bread, I-fatty acids, sterols, vitamins and minerals, *Apidologie*, 11(1), 63-73.
- Loukas, P., Maria, T., 2023, The application of honeybee products in the health sector, *Advances in Biological Chemistry*, 13(1), 1-16.
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., Gänzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E. J., Hutkins, R., 2017, Health benefits of fermented foods: Microbiota and beyond, *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 94-102.
- Market Analysis Report, 2023, <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/probiotics-market>, [Ziyaret tarihi: 20.05.2023].
- Markiewicz-Żukowska, R., Naliwajko, S. K., Bartosiuk, E., Moskwa, J., Isidorov, V., Soroczyńska, J., Borawska, M. H., 2013, Chemical composition and antioxidant activity of beebread, and its influence on the glioblastoma cell line (U87MG), *Journal of Apicultural Science*, 57(2), 147-157.
- Mayda, N., Özkök, A., Bayram, N. E., Gerçek, Y. C., Sorkun, K., 2020, Bee bread and bee pollen of different plant sources: determination of phenolic content, antioxidant activity, fatty acid and element profiles, *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(4), 1795-1809.

- Michener, C. D., 1974, *The Social Behavior of the Bees: A Comparative Study*, Harvard University Press.
- Milek, M., Mołoń, M., Kula-Maximenko, M., Sidor, E., Zaguła, G., Dżugan, M., 2023, Chemical composition and bioactivity of laboratory-fermented bee pollen in comparison with natural bee bread, *Biomolecules*, 13(7), 1025.
- Miranda, C., Contente, D., Igrejas, G., Câmara, S. P., Dapkevicius, M. D. L. E., Poeta, P., 2021, Role of exposure to lactic acid bacteria from foods of animal origin in human health, *Foods*, 10(9), 2092.
- Mohammad, S. M., Mahmud-Ab-Rashid, N. K., Zawawi, N., 2020, Botanical origin and nutritional values of bee bread of stingless bee (*Heterotrigona itama*) from Malaysia, *Journal of Food Quality*, 2020, 1-12.
- Moschetti, G., Blaiotta, G., Aponte, M., Catzeddu, P., Villani, F., Deiana, P., Coppola, S., 1998, Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains, *Journal of Applied Microbiology*, 85(1), 25-36.
- Nagai, T., Nagashima, T., Myoda, T., Inoue, R., 2004, Preparation and functional properties of extracts from bee bread, *Food/Nahrung*, 48(3), 226-229.
- Nagai, T., Nagashima, T., Suzuki, N., Inoue, R., 2005, Antioxidant activity and angiotensin I-converting enzyme inhibition by enzymatic hydrolysates from bee bread, *Zeitschrift für Naturforschung C*, 60(1-2), 133-138.
- Naidu, A. S., Bidlack, W. R., Clemens, R. A., 1999, Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB), *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39(1), 13-126.
- Nampoothiri, K. M., Beena, D. J., Vasanthakumari, D. S., Ismail, B., 2017, *Health benefits of exopolysaccharides in fermented foods*, *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*, In: Frias J., Martinez-Villaluenga, C. and Peñas, E. (Eds.), Chapter 3, Academic Press, 49-62.
- Olofsson, T., Vásquez, A., 2018, *Honeybee-specific bifidobacteria and lactobacilli*. The Bifidobacteria and Related Organisms, In: Mattarelli, P., Biavati, B., Holzapfel, W. H., Wood, B.J.B. (Eds.), Chapter 14, Academic Press, 235-241.
- Örsel, E.K., 2022, *Çeşitli Probiyotik Suşlar Kullanarak Polen Fermantasyonu ile Arı Ekmeği Üretimi*, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Pain, J., Maugenet, J., 1966, Recherches biochimiques et physiologiques sur le pollen emmagasiné par les abeilles, *Les Annales de l'Abeille*, 9(3), 209-236.
- Peng, K., Koubaa, M., Bals, O., Vorobiev, E., 2020, Recent insights in the impact of emerging technologies on lactic acid bacteria: A review, *Food Research International*, 137, 109544.

- Rademaker, J. L. W., Louws, F. J., Versalovic, J., de Bruijn, F. J., 2004, *Characterization of the diversity of ecological important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting*, Molecular Microbial Ecology Manual, Second Edition, In: Kowalchuk, G.A., de Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D., van Elsas, J.D. (Eds.), Chapter 5.3.2, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1-33.
- Ramos, O. Y., Basualdo, M., Libonatti, C., Vega, M. F., 2020, Current status and application of lactic acid bacteria in animal production systems with a focus on bacteria from honey bee colonies, *Journal of Applied Microbiology*, 128(5), 1248-1260.
- Ray, B., 1992, *The need for food biopreservation*, Food Biopreservatives of Microbial Origin, In: Ray, B. (Ed.), Chapter 1, CRC Press, 1-23.
- Rogosa, M., Wiseman, R. F., Mitchell, J. A., Disraely, M. N., Beaman, A. J., 1953, Species differentiation of oral lactobacilli from man including description of *Lactobacillus salivarius* nov spec and *Lactobacillus cellobiosus* nov spec, *Journal of Bacteriology*, 65(6), 681-699.
- Sanders, M.E., Merenstein, D., Merrifield, C.A., Hutkins, R., 2018, Probiotics for human use, *Nutr Bull*, 43, 212-225.
- Schillinger, U., Lücke, F. K., 1987, Identification of lactobacilli from meat and meat products, *Food Microbiology*, 4(3), 199-208.
- Scholz-Ahrens, K. E., Ade, P., Marten, B., Weber, P., Timm, W., Asil, Y., Glüer, C.-C., Schrenzenmeir, J., 2007, Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure, *The Journal of Nutrition*, 137(3), 838S-846S.
- Semkiw, P., Skubida, P., 2021, Bee bread production—A new source of income for beekeeping farms? *Agriculture*, 11(6), 468.
- Smith, J. P., Heard, T. A., Beekman, M., Gloag, R., 2017, Flight range of the Australian stingless bee *Tetragonula carbonaria* (Hymenoptera: Apidae), *Austral Entomology*, 56(1), 50-53.
- Sobral, F., Calhelha, R. C., Barros, L., Dueñas, M., Tomás, A., Santos-Buelga, C., ... & Ferreira, I. C., 2017, Flavonoid composition and antitumor activity of bee bread collected in northeast Portugal, *Molecules*, 22(2), 248.
- Tajabadi, N., Mardan, M., Manap, M. Y. A., Mustafa, S., 2013, Molecular identification of *Lactobacillus* spp. isolated from the honey comb of the honey bee (*Apis dorsata*) by 16S rRNA gene sequencing, *Journal of Apicultural Research*, 52(5), 235-241.
- Tang, Q. H., Miao, C. H., Chen, Y. F., Dong, Z. X., Cao, Z., Liao, S. Q., ... & Guo, J., 2021, The composition of bacteria in gut and beebread of stingless bees (Apidae: Meliponini) from tropics Yunnan, China, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 114(8), 1293-1305.

- Thakur, N., Shirkot, P., Pandey, H., Thakur, K., 2018, Next generation sequencing-Techniques and its applications, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(6), 1316-1320.
- Urcan, A., Mărghitaş, L. A., Dezmirean, D. S., Bobiş, O., Bonta, V., Mureşan, C. I., Mărgăoan, R., 2017, Chemical composition and biological activities of beebread-Review, *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca, Animal Science & Biotechnologies*, 74(1), 6-14.
- Vásquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R. J., Flaberg, E., Szekely, L., Olofsson, T. C., 2012, Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees, *PloS One*, 7(3), e33188.
- Vásquez, A., Olofsson, T. C., 2009, The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread, *Journal of Apicultural Research*, 48(3), 189-195.
- Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M. J., Spencer, J. P., 2010, Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action, *Nutrients*, 2(11), 1106-1131.
- Vossler, F. G., 2015, Broad protein spectrum in stored pollen of three stingless bees from the chaco dry forest in South America (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) and its ecological implications, *Psyche: A Journal of Entomology*, 2015, 1-7.
- Walter, J., Schwab, C., Loach, D. M., Gänzle, M. G., & Tannock, G. W. (2008). Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1. 106 contribute to cell aggregation, in vitro biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Microbiology*, 154(1), 72-80.
- Wood, B. J., Holzapfel, W. H., 1995, *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Vol 2, Blackie Academic & Professional, Cheriton House, North Way UK, ISBN 07-514-0215 X.
- Xue, L., He, J., Gao, N., Lu, X., Li, M., Wu, X., ... & Geng, Y., 2017, Probiotics may delay the progression of nonalcoholic fatty liver disease by restoring the gut microbiota structure and improving intestinal endotoxemia, *Scientific Reports*, 7(1), 1-13.
- Yang, S., Lian, G., 2020, ROS and diseases: role in metabolism and energy supply, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 467, 1-12.
- Yang, D., Lyu, W., Hu, Z., Gao, J., Zheng, Z., Wang, W., Firman, J., Ren, D., 2021, Probiotic effects of *Lactobacillus fermentum* ZJUIDS06 and *Lactobacillus plantarum* ZY08 on hypercholesteremic golden hamsters, *Frontiers in Nutrition*, 8, 705763.
- Yörük, G., Güner, A., 2011, Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması ve *Weissella* türlerinin gıda mikrobiyolojisinde önemi, *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6(2), 163-176.
- Zielińska, D., Kolożyn-Krajewska, D., 2018, Food-origin lactic acid bacteria may exhibit probiotic properties, *BioMed Research International*, 2018, 5063185.

- Zorba, E., Karaman, M. R., Gönülateş, S., Karaman, M., 2019, Perga (arı ekmeği) içeren Perga Sport'un farklı spor disiplinlerinde sporcular ve sedanterlerde performans ve yaşam kalitesi üzerine etkileri, *Spor ve Eğitim Bilimleri Dergisi*, 6(4), 407-419.
- Zuluaga, C. M., Serratob, J. C., Quicazana, M. C., 2015, Chemical, nutritional and bioactive characterization of Colombian bee-bread, *Chem. Eng*, 43, 175-180.
- Zuluaga-Dominguez, C. M., Fuenmayor, C. A., 2022, *Bee bread and gut microbiota*, Bee Products and Their Applications in the Food and Pharmaceutical Industries, In: Boyacioglu, D. (Ed.), Chapter 13, Academic Press, 315-345.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Nermin ÇELİK
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	17.06.2005

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik A.B.D.
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik

Makale ve Bildiriler	