

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

**TARHANADAN İZOLE EDİLEN BAZI LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİ TARAFINDAN ÜRETİLEN
EKZOPOLİSAKKARİTLERİN KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DUYGU ZEHİR

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2017

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



**TARHANADAN İZOLE EDİLEN BAZI LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİ TARAFINDAN ÜRETİLEN
EKZOPOLİSAKKARİTLERİN KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DUYGU ZEHİR

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

Duygu ZEHİR tarafından hazırlanan "TARHANADAN İZOLE EDİLEN BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ TARAFINDAN ÜRETİLEN EKZOPOLİSAKKARİTLERİN KARAKTERİZASYONU" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 04.08.2017 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

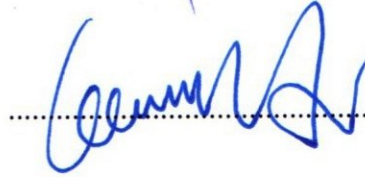
Danışman
Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK
Pamukkale Üniversitesi



Üye
Prof. Dr. Sebahattin NAS
Pamukkale Üniversitesi



Üye
Yrd. Doç. Dr. Enes DERTLİ
Bayburt Üniversitesi



Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 17/08/2017. tarih ve ...32/08.. sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Uğur YÜCEL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 116O525 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

DUYGU ZEHİR



ÖZET

**TARHANADAN İZOLE EDİLEN BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ
TARAFINDAN ÜRETİLEN EKZOPOLİSAKKARİTLERİN
KARAKTERİZASYONU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
DUYGU ZEHİR
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. ÖMER ŞİMŞEK)**

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2017

Fermente gıdaların temel mikroflorasını oluşturan laktik asit bakterileri (LAB) teknolojik açıdan birçok fonksiyonel özelliklere sahiptir. Bunlardan birisi bu bakterilerin ekzopolisakkarit (EPS) üretebilmeleridir. LAB suşları tarafından üretilen EPS'ler gıdaların vizkozitesinin geliştirilmesinde, sineresisin engellenmesinde, jelleşme ve stabilitenin artırılmasında faydalıdır. Bu çalışmanın amacı, tarhana fermentasyonundan toplanmış LAB izolatları arasında EPS üreticilerinin belirlenmesi, bu suşların ürettikleri EPS'lerin karakterize edilmesidir. Bu kapsamda 1044 tarhana izolatından 18 adedinin kolonilerinin uzama özelliği gösterdikleri belirlenmiştir. Ardından bu izolatlar (GTG)₅ parmak izine göre sınıflandırılmış ve 16S rDNA dizi analizi sonucunda; 8 adedinin *Lactobacillus plantarum*, 3 adedinin *Lactobacillus brevis* ve 7 adedinin LAB dışındaki türlerden oldukları anlaşılmıştır. EPS üretimlerine göre seçilen 6 adet *L. plantarum* suşlarının MRS ortamında 521-1166 µg mL⁻¹ arasında EPS üretebildikleri belirlenmiştir. Bu suşların EPS üretiminde inkübasyon sıcaklığı, karbon kaynağı ve ortam pH'sının etkili olduğu bulunmuştur. Özellikle EPS üretimi sakkaroz ve maltoz varlığında anlamlı oranda artmıştır. Biyoreaktör ölçeğinde BHI substratı ile en fazla EPS, *L. plantarum* PFC310 ve PFC311 suşları ile üretilmiştir. Saflaştırılan EPS'lerin viskozitesi asidik koşullarda yüksek bulunurken, alkali koşullarda PFC311E hariç düşük bulunmuştur. Ayrıca EPS'lerin viskozite özellikleri sıcaklığın artışı ile düşmüştür. En yüksek viskozite PFC311E ve PFC313E'de sırasıyla 0,015 ve 0,018 Pa.s olarak ölçülmüştür. *L. plantarum* suşlarının ürettikleri EPS'ler ısıl direnci yüksek bulunmuştur. Bu suşların ürettikleri EPS'lerde ısıl bozulma PFC311E hariç 314°C'de olmuştur. PFC311E'de ise 295.7°C'de meydana gelmiştir. *L. plantarum* suşları tarafından üretilen EPS'lerin glukoz, galaktoz ve fruktoz birimlerinden oluştuğu belirlenmiştir. Sonuç olarak tarhana fermentasyonunda EPS üreticisi LAB türlerinin *L. plantarum* olduğu, yüksek miktarda EPS üretmesi ve ürettikleri EPS'lerin gerek reolojik özellikleri ve gerekse de termal özellikleri nedeniyle *L. plantarum* PFC310 ve PFC311 suşları teknolojik açıdan önemli bulunmuştur.

ANAHTAR KELİMELER: Ekzopolisakkaritler, *Lactobacillus plantarum*, tarhana, reoloji, termal özellikler

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF EXOPOLYSACCHARIDES PRODUCED BY SOME LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM TARHANA FERMENTATION

MSC THESIS

DUYGU ZEHİR

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
FOOD ENGINEERING
(SUPERVISOR:ASSOC. PROF. DR. ÖMER ŞİMŞEK)

DENİZLİ, AUGUST 2017

The lactic acid bacteria (LAB), members of the microflora of the fermented foods, have many functional properties technologically. Exopolysaccharide (EPS) production is one of these. The EPSs produced from LAB have role in developing the viscosity, preventing the sineresis, increasing the gelling and stability of foods. The aim of this study was determining the EPS producing LAB strains among the previously isolated LAB isolates from tarhana dough and characterization of their EPSs. In this respect, 18 of 1044 tarhana LAB isolates was observed to have sliming phenotype. Then these isolates were clustered according to the (GTG)₅ profile and identified with 16S rDNA sequence homology as; *Lactobacillus plantarum* (8), *Lactobacillus brevis* (3) and other out of LAB (7). Six *L. plantarum* strains, selected according to EPS production, were determined to have ability to produce 521-1166 µg mL⁻¹ EPS in MRS medium. The incubation temperature, carbon source and the medium pH effected the EPS production at these strains. Expecially, EPS production was increase significantly in the presence of sucrose and maltose. The highest EPS amount was produced at *L. plantarum* PFC310 and PFC311 with BHI substrate at bioreactor scale. While the viscosity of purified EPS were found high at acidic conditions, but they were low at alcali conditions except PFC311E. Also, the viscosity of EPSs decreased with increasing the temperature. The highest viscosity was recorded at PFC311E and PFC313E as 0,015 and 0,018 Pa.s, respectively. Thermal resistance of EPSs produced from *L. plantarum* were found high. The main thermal degradation was occurred at 314 °C. But PFC311E was thermally degraded at 295,7°C. Glucose, galactose and fructose were found the moieties of EPSs produced by *L. plantarum*. As a conclusion, *L. plantarum* are the main EPS producers species in tarhana fermentation, in addition *L. plantarum* PFC310 and PFC311 are technologically signifcant for high EPS production ability and both rheological and thermal properties of their EPSs.

KEYWORDS: *Lactobacillus plantarum*, Exopolysaccharide, Rheology and Thermal Properties

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Tezin Amacı	3
1.2 Literatür Özeti	3
1.2.1 Laktik Asit Bakterileri	3
1.2.2 LAB Tarafından Üretilen EPS'lerinin Kimyasal Kompozisyonu .	5
1.2.2.1 Homopolisakkarit.....	5
1.2.2.1.1 Dekstran	6
1.2.2.1.2 Mutan	7
1.2.2.1.3 Alternan	8
1.2.2.1.4 Reuteran	8
1.2.2.1.5 Levan	9
1.2.2.1.6 İnülin.....	10
1.2.2.2 Heteropolisakkarit.....	10
1.2.3 LAB'ler Tarafından Üretilen EPS'lerin Biyosentezi.....	11
1.2.4 LAB'de EPS Üretimini Genetik Doğası.....	16
1.2.5 LAB'de EPS Üretimini Etkileyen Faktörler	21
1.2.6 LAB'ler Tarafından Üretilen EPS'lerin Gıda Teknolojisi Açısından Önemi	23
2. MATERYAL VE METOT	27
2.1 Materyal.....	27
2.2 Yöntem	27
2.2.1 LAB İzolatlarında Uzama Fenotipinin Belirlenmesi	27
2.2.2 EPS Üreticisi LAB izolatlarının Tanımlanması.....	27
2.2.3 <i>Lactobacillus plantarum</i> Suşları Tarafından Üretilen EPS'nin Saflaştırılması ve Miktar Analizi.....	29
2.2.4 <i>Lactobacillus plantarum</i> Suşlarında EPS Üretimine Farklı Faktörlerin Etkisinin Belirlenmesi.....	30
2.2.5 Fermentör Sisteminde <i>Lactobacillus plantarum</i> Suşlarından EPS'nin Üretilmesi	31
2.2.6 <i>Lactobacillus plantarum</i> Suşlarından Üretilen EPS'lerin Reolojik Özelliğinin Belirlenmesi	32
2.2.7 <i>Lactobacillus plantarum</i> Suşları Tarafından Üretilen EPS'lerin Termal Özelliklerinin Belirlenmesi	32
2.2.8 <i>Lactobacillus plantarum</i> Suşları Tarafından Üretilen EPS'lerin Şeker İçeriğinin Belirlenmesi	32
2.3 İstatistiksel Analiz	33
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	34
3.1 EPS üreticisi izolatlarının seçilmesi	34

3.2	EPS Üreticisi LAB İzolatlarının Tanımlanması	35
3.3	<i>Lactobacillus plantarum</i> suşlarının EPS üretim miktarları	36
3.4	<i>Lactobacillus plantarum</i> suşlarında EPS üretimi üzerine inkübasyon sıcaklığı, karbon kaynağı, pH ve inkübasyon süresinin etkisi.....	37
3.5	<i>Lactobacillus plantarum</i> suşları tarafından EPS üretimi ve EPS'lerin Saflaştırılması	42
3.6	<i>Lactobacillus plantarum</i> Suşları Tarafından Üretilen EPS'lerin Reolojik Özellikleri	43
3.7	<i>Lactobacillus plantarum</i> Suşları Tarafından Üretilen EPS'lerin Termal Özellikleri	45
3.8	<i>Lactobacillus plantarum</i> Suşları Tarafından Üretilen EPS'lerin Şeker İçeriği	48
4.	GENEL SONUÇLAR ve ÖNERİLER	51
5.	KAYNAKLAR.....	53
6.	EKLER.....	67
	EK A.1 Tablolar	67
7.	ÖZGEÇMİŞ	71

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Dekstran'ın yapısı	7
Şekil 1.2: Mutan'ın yapısı	7
Şekil 1.3: Alternan'ın yapısı	8
Şekil 1.4: Reuteran'ın yapısı	9
Şekil 1.5: Levan'ın yapısı	9
Şekil 1.6: İnülin'in yapısı	10
Şekil 1.7: Sitoplazmada laktoz, galaktoz ve glukozun dönüşümü yoluyla LAB'ın EPS üretiminin detaylı şematik gösterimi	13
Şekil 1.8: <i>L. lactis</i> NIZO'nun EPS biyosentez modeli	15
Şekil 1.9: GTF'lerin genel yapısının şematik gösterimi	16
Şekil 1.10: (A) <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NIZO B40 ve (B) <i>S. thermophilus</i> Sfi6'ların <i>eps</i> operonlarının organizasyonu ve varsayılan fonksiyonel mekanizmaları	17
Şekil 2.1: Glikoz standart eğrisi	30
Şekil 3.1: PFC311 izolatı kolonisinin agar üzerindeki uzama görüntüsü	34
Şekil 3.2: Uzama özelliği gösteren LAB izolatlarının (GTG) ₅ profilleri	35
Şekil 3.3: <i>L. plantarum</i> suşları tarafından üretilen EPS miktarı	37
Şekil 3.4: <i>L. plantarum</i> suşlarının EPS üretimine farklı inkübasyon sıcaklıklarının etkisi	39
Şekil 3.5: <i>L. plantarum</i> suşlarının EPS üretimine farklı karbon kaynaklarının etkisi	40
Şekil 3.6: <i>L. plantarum</i> suşlarının EPS üretimine ortam pH'sının etkisi	41
Şekil 3.7: <i>L. plantarum</i> suşlarında EPS üretimine farklı inkübasyon sürelerinin etkisi	41
Şekil 3.8: PFC312 Suşunun fermentörde üretimi ve liyofilize görüntüsü	42
Şekil 3.9: Tüm EPS'lerin liyofilize görüntüsü	42
Şekil 3.10: <i>L. plantarum</i> suşları tarafından üretilen EPS'lerin farklı pH koşullarındaki reolojik özellikleri	44
Şekil 3.11: <i>L. plantarum</i> suşları tarafından üretilen EPS'lerin farklı sıcaklıklardaki reolojik özellikleri	44
Şekil 3.12: <i>L. plantarum</i> PFC308 suşu tarafından üretilen EPS'nin TGA kütle kaybı spektrumu	46
Şekil 3.13: <i>L. plantarum</i> PFC309 suşu tarafından üretilen EPS'nin TGA kütle kaybı spektrumu	46
Şekil 3.14: <i>L. plantarum</i> PFC310 suşu tarafından üretilen EPS'nin TGA kütle kaybı spektrumu	46
Şekil 3.15: <i>L. plantarum</i> PFC311 suşu tarafından üretilen EPS'nin TGA kütle kaybı spektrumu	47
Şekil 3.16: <i>L. plantarum</i> PFC312 suşu tarafından üretilen EPS'nin TGA kütle kaybı spektrumu	47
Şekil 3.17: <i>L. plantarum</i> PFC313 suşu tarafından üretilen EPS'nin TGA kütle kaybı spektrumu	47
Şekil 3.18: <i>L. plantarum</i> PFC308 suşunun ürettiği EPS'nin şeker içeriği kromatogramı	48

Şekil 3.19: <i>L. plantarum</i> PFC309'un ürettiği EPS'nin şeker içeriğinin kromatogramı	49
Şekil 3.20: <i>L. plantarum</i> PFC310'nun ürettiği EPS'nin şeker içeriğinin kromatogramı	49
Şekil 3.21: <i>L. plantarum</i> PFC311'in ürettiği EPS'nin şeker içeriğinin kromatogramı	49
Şekil 3.22: <i>L. plantarum</i> PFC312'nin ürettiği EPS'nin şeker içeriğinin kromatogramı	50
Şekil 3.23: <i>L. plantarum</i> PFC313'ün ürettiği EPS'nin şeker içeriğinin kromatogramı	50

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1: Modifiye BHI besiyeri (1 litre için) (İspirli 2016).....	31
Tablo 3.1: LAB izolatlarının 16S rDNA homolojisi ve tanımlama sonuçları ..	36
Tablo 3.2: Fermentör sisteminde <i>L. plantarum</i> suşları tarafından üretilen EPS'lerin miktarı.....	43

SEMBOL LİSTESİ

dk	:Dakika
sn	:Saniye
g	:Gram
mg	:Miligram
µg	:Mikrogram
Da	:Dalton
L	:Litre
mL	:Mililitre
µL	:Mikrolitre
M	:Molarite
cm	:Santimetre
µm	:Mikrometre
nm	:Nanometre
g	:Relatif santrifüj kuvveti
rpm	:Dakikadaki devir sayısı
bç	:Nükleotit baz çifti
Pa	:Paskal
mTorr	:Militorr
°C	:Santigrat derece
PZR	:Polimeraz zincir reaksiyonu
HPLC	:Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
LAB	:Laktik asit bakterisi
EPS	:Ekzopolisakkarit

ÖNSÖZ

Bu çalışmayı destekleyen TÜBİTAK'a, tez konumun belirlenip, çalışmalarının yönlendirilmesinde ve tamamlanmasında her türlü bilgi ve desteği esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK'e çalışmalarım için gerekli imkanları sağlayan Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanlığına ve her türlü desteğini gördüğüm Bölüm Öğretim Üyelerine, deneysel çalışmalarımda yardımcı olan ve tecrübelerinden yararlandığım Prof. Dr. Nazım USTA, Yrd. Doç.Dr. Enes DERTLİ, Arş. Gör. İlyas ATALAR, Arş. Gör. Halil İbrahim KAYA, Arş. Gör. Osman YELER, Arş. Gör. Erkin AKDOĞAN ve Yüksek Gıda Mühendisi Selime Hazır DALCA'ya son olarak; eğitim hayatım boyunca maddi manevi destek olan annem Gönül ZEHİR, babam Kenan ZEHİR'e, kardeşlerime ve daima yanımda olduğunu hissettiren sevgili eşim İbrahim ŞENTÜRK'e teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB) fermente gıdaların temel mikroflorasını oluşturan bakterilerdir. Bu familyanın bazı üyeleri endüstriyel üretimlerde starter kültür olarak kullanılır. LAB'lerin fermente gıdalarda starter kültür görevi laktik asit üretimiyle ortamın asitlenmesini sağlamak, ayrıca fermente ürünlerin karakteristik özelliklerini kazandırmaktır. Ancak LAB'lerin starter kültür olarak asit üretiminin yanında farklı fonksiyonel özelliklere de sahip olduğu da anlaşılmıştır. Bu yönde önemli bazı örnekler; bakteriyosin üretimiyle patojen özellikteki bakterilerin engellenmesi, çeşitli aroma bileşenlerinin üretimiyle fermente gıdaların lezzetinin geliştirilmesi, probiyotik etkisi ile birlikte insan sağlığının iyileştirilmesidir. Tüm bunların dışında LAB'lerin ürettiği ekzopolisakkarit yapıları ile gerek gıdaların yapısal ve fiziksel özelliklerinin iyileştirilmesinde, gerekse de insan sağlığının korunmasında önemli yer tutmaktadır.

Ekzopolisakkaritler (EPS) en yalın ifadeyle mikroorganizmaların şeker birimlerini bir araya getirerek hücre dışına salgıladıkları polisakkarit yapılarıdır. Mikroorganizmalar tarafından üretilen EPS'ler hücrede bulunduğu konuma göre iki grupta toplanabilir. Birinci grubu oluşturanlar hücrenin dış yüzeyinde tutuklu olarak bulunan kapsüller polisakkaritlerdir. Diğeri ise mikrobiyal salgılama sistemleri ile hücre dışına salgılanan hücre dışı polisakkarit yapılarıdır. Çeşitli mikroorganizmalar tarafından şeker içeriği, bağlanma özellikleri ve büyüklüğüne göre çok farklı EPS üretimleri mevcuttur.

LAB'ler farklı özellikte ve miktarlarda EPS üretebilmektedir. Bu familya üyelerinden en iyi bilinen EPS üreticileri *Leuconostoc* ve *Weisella* cinsleri başı çekmektedir. Ancak *Lactobacillus* ve *Lactococcus* cinslerine ait bazı türlerin de EPS üreticisi oldukları bilinmektedir. LAB türleri tarafından üretilen EPS içerdikleri şeker birimlerine göre homopolisakkaritler veya heteropolisakkaritler olarak sınıflandırılmaktadır. Örneğin en iyi bilinen LAB homopolisakkariti dekstran, *Leuconostoc mesenteroides* tarafından üretilmekte ve sadece glukoz birimlerinin α -(1,6) glikozidik bağ ile bağlanarak arada α -(1,2) ve α -(1,3) dallanma göstererek tekrarı ile oluşmaktadır. Diğeri yandan, yoğurt bakterisi *Lactobacillus delbrueckii* ssp.

bulgaricus suşu tarafından üretilen heteropolisakkarit glukoz, galaktoz ve ramnoz şekerlerini içeren birimleri tekrar edilmektedir.

LAB'lerin ürettiği EPS'lerin bakteri fizyolojisindeki rolü kesin bilinmemesine rağmen, bunların bakterinin gelişimini etkileyen sıcaklık, pH, ışık, kuruma, faj saldırısı, osmotik stres vb. gibi stres koşullarına karşı koruyucu etki gösterdiği bilinmektedir. Yine üretilen EPS'lerin üreticisi LAB tarafından enerji kaynağı olarak kullanılabilirdiği ve bazı probiyotik LAB'lerinin diğer bakteriler tarafından üretilen EPS'yi parçaladığı da rapor edilmiştir.

LAB tarafından üretilen EPS'lerin gıda teknolojisi açısından da önemi bulunmaktadır. Özellikle LAB türleri tarafından üretilen EPS'ler; viskozitör, emülsifiyer, stabilizör ve jelleşme ajanı olarak gıdaların tekstürel ve reolojik kalitesini geliştirmek amacıyla kullanılmaktadır. Bu gibi fonksiyonların yanında LAB tarafından üretilen EPS'lerin kolesterol düşürücü, antitumoral ve bağışıklık sistemi üzerindeki düzenleyici etkisi belirlenmiştir. Sindirilemeyen gıda maddesi olarak tanımlanan ve kolondaki bir ya da sınırlı sayıdaki bakterinin büyüme ve gelişmesini artıran prebiyotikler insan sağlığını düzeltici etkiye sahiptir. Oligosakkaritlerin proksimal kolondaki sindirimi polisakkaritlere göre daha hızlı olduğundan LAB tarafından üretilen EPS'lerin prebiyotik özellikte olduğu düşünülebilir.

Doğal fermentasyonların gerçekleştiği gıda sistemlerin mikroflorası endüstriyel özellikler bakımından yararlı zengin genetik çeşitliliğe sahip LAB'lerce zengindir. Anadolu mutfağının geleneksel lezzetlerinden biri olan tarhananın üretiminde de uzun bir fermentasyon gerçekleşmektedir. Kısaca tarhana üretimi; buğday unu, yoğurt ile çeşitli sebze ve baharatların karıştırılıp fermentasyona tabi tutulduktan sonra kurutulup öğütülmesi sonucu elde edilen fermente bir gıdadır. Yöreden yöreye üretimi farklılıklar göstermekle birlikte tarhana besleyici değerinin yüksek olması ve kolay sindirim gibi özellikleri nedeniyle gerek çocuk gerekse yetişkin diyetinde güvenli bir şekilde yer almaktadır. Tarhana fermentasyonunun temel mikroflorasını LAB'ler ile mayalar oluşturmaktadır. Özellikle un, yoğurt ve çeşitli sebzelerin katılması, tarhana fermentasyonunun oldukça geniş LAB çeşitliliği ile fermente olmasını sağlamaktadır. Bu tez çalışmasında da geleneksel gıdamız tarhananın fermentasyonunda bulunan geniş çeşitlilikteki LAB'ler arasında EPS

üreticilerinin tespiti yapılmış, ardından üretilen EPS'ler saflaştırılarak karakterize edilmiştir.

1.1 Tezin Amacı

Bu çalışmanın amacı tarhana hamurlarından toplanmış izolatlar arasından EPS üreticilerinin belirlenmesi, bu izolatların nihai tür tanımlamalarının yapılması, tanımlanan suşlarda EPS üretimini etkileyen faktörlerin belirlenmesi, üretilen EPS'lerin saflaştırılması ve karakterizasyonudur.

1.2 Literatür Özeti

1.2.1 Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB) Gram pozitif, spor oluşturmeyen, anaerobik veya fakültatif aerobik, kok veya çubuk şekilli olabilen düşük GC oranına sahip, katalaz negatif ve karbonhidrat metabolizması sonucu temel ürün olarak laktik asit üreten bakterilerdir. LAB'ler gelişme sıcaklıkları bakımından termofil ve mezofil özellik gösterir. 10-45 °C arası sıcaklıklarda, yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişme ve asit veya alkali ortamı tolere etme yeteneklerine sahiptir (Axelsson 1998). Yaygın fizikolojik sınıflandırmaya göre 20 cinsten oluşmakta olup günümüz sınıflandırmasında gıda teknolojisi açısından *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* cinsleri LAB 'yi oluşturur (Stiles ve Holzapfel 1997, Klein ve diğ. 1998).

LAB'ler karbonhidratları farklı metabolik yollar kullanarak parçalamaları ve farklı son ürünler oluşturmalarına göre homofermantatif ve heterofermantatif LAB olarak iki farklı sınıfa ayrılır. Homofermantatif LAB glikoz femantasyonundan temel ürün olarak laktik asit oluştururken; heterofermantatif LAB laktik asite ek olarak asetik asit, etanol ve CO₂ de üretir (Blandino ve diğ. 2003, Liu ve diğ. 2011).

LAB B grubu vitaminler ile pürin ve pirimidin bazlarına ihtiyaç duyar. Genellikle pH 4,0-4,5 aralığında gelişir, ancak 3,2 gibi düşük veya 9,6 gibi yüksek pH'larda gelişebilen türler de mevcuttur. Bazı türleri zayıf proteolitik ve lipolitik aktivite gösterir (Liu ve diğ. 2011).

Son 50 yıl içerisinde LAB'lerin genetiği, biyokimyası ve fizyolojisi üzerine yeni bilgilere ulaşılmasıyla, bu bakterilerin kalitenin geliştirilmesi ve standardizasyonun sağlanması amacıyla fermente gıdaların üretiminde starter kültür olarak kullanımı mevcuttur (Botina ve diğ. 2006). Gıdaya tat, koku gibi aromatik özelliklerin yanında gıda ürünlerinin korunması, duyuşal ve reolojik özelliklerin geliştirilmesine katkıda bulunan starter kültürler, daha önce uygulanan klasik pasajlama sisteminin yerini almıştır. Günümüzde LAB'ler fermente süt ürünlerinin, etlerin ve sebzelerin fermentasyonunda temel görev üstlenen ve gıda endüstrisinde ürün kalitesini arttıran mikroorganizmalar olarak kabul edilmektedir. Bunun yanında kahve, hayvan yemi, kakao, ekmek hamuru ve çok sayıda doğal yiyeceğin fermentasyonunda kritik rol oynadıkları da saptanmıştır (Wood 1998, Makarova ve diğ. 2006).

LAB'lerin endüstriyel önemi ve sahip olduğu genetik zenginliği dolayısıyla fonksiyonel kültür olarak uygulamaları ön plana çıkmıştır. Fonksiyonel kültür gıdaya mikrobiyal güvenliğ, duyuşal, teknolojik, beslenme veya sağlık avantajlarından birisi veya bir kaçıını sağlayan kültürler olarak tanımlanmaktadır. Yapılan çalışmaları LAB'lerin temel görevi olan laktik asit üretimine ilavaten, bir takım fonksiyonlar ile de katkı sağladığı anlaşılmıştır (Leroy ve diğ. 2006, de Vuyst ve Leroy 2007). Bunlara örnek olarak ön plana çıkan fonksiyonel özelliklerden bazıları; antimikrobiyal bileşiklerin sentezi, gıdaların aroma özelliklerinin geliştirilmesi, bakteriyofaj dirençliliği ile probiyotik özellikleridir. Ancak son yıllarda gerek gıdaların reolojik özelliklerinin iyileştirilmesi gerekse de insan sağlığının iyileştirilmesi açısından LAB'ler tarafından üretilen EPS'ler dikkati çekmektedir. Yapılan çalışmaları LAB'lerin birçok üyesinin EPS üretebildikleri gösterilmiştir.

1.2.2 LAB Tarafından Üretilen EPS'lerinin Kimyasal Kompozisyonu

Bakterilerin büyük çoğunluğunda olduğu gibi LAB'lerde peptidoglikan ve lipoteikoik asit gibi hücre duvarı yapısal polisakkaritleri ve hücre dışı polimerleri sentezleyebilirler. LAB'lerde hücre yüzeyine kovalent bağlı kapsüller ve hücreye zayıf şekilde bağlı olup ortama salgılanabilen ekzopolisakkarit tipleri üretilir (Torino ve diğ. 2015). EPS'nin yapısını karbohidratlar (% 75-90) oluşturur ancak az da olsa proteinler de bulunur (More ve diğ. 2014). EPS'ler dallanmış şeker tekrar ünitelerinden oluşan uzun zincirli moleküllerdir. Genellikle glikoz, galaktoz ve ramnoz farklı oranlarda bu şeker ünitelerinde bulunur (Sanlibaba ve Çakmak, 2016). Buna ilaveten EPS'ler yapılarında bazen lipit ve protein derivatlarını da bulundurduğundan lipopolisakkarit ve glikoprotein türevi şeklindedir. Üronik asitlerin veya asetat ester, piruvat ketaller, formatlar, süksinatlar ve inorganikler (fosfat ve sülfat) gibi yaygın ikame maddelerinin varlığı EPS makromoleküllerinin yapısının nötr, anyonik veya katyonik olmasını belirler (More ve diğ. 2014). Karakteristik yapıları göz önüne alındığında, LAB'ler tarafından sentezlenen EPS'ler moleküler yapı, kütle, yükte ve bunun sonucu olarak reolojik özellikleri bakımından oldukça farklıdırlar. Oldukça çeşitli olan bu polimerlerin sınıflandırılması için monomer kompozisyonu dikkate alınır. Temelde tekrarlayan ünitelerin kompozisyonu ve biyosentez mekanizmasına göre EPS'ler iki grupta toplanabilir. Bu sınıflandırmaya göre EPS'ler homopolisakkarit (HoPS) veya heteropolisakkarit (HePS) olarak isimlendirilebilir (Sanlibaba ve Çakmak 2016).

1.2.2.1 Homopolisakkarit

Homopolisakkaritler (HoPS) LAB'lerde en fazla tespit edilen ekzopolisakkarittir (Sanlibaba ve Çakmak, 2016). Glikoz, fruktoz gibi tek tip monosakkarit içermektedir ve moleküler ağırlığı $10^5 - 10^6$ Da aralığındadır (Korakli ve Vogel 2006, Caggianiello 2016).

HoPS üreticisi LAB suşları ile bu EPS'nin moleküler ve yapısal karakterizasyonu, biyosentez enzim ve gıdalardaki uygulamaları tanımlanmıştır. Buna göre *Weissella* ve *Leuconostoc* suşları başlıca HoPS üreticileridir (Sanlibaba ve Çakmak 2016).

Homopolisakkaritler arasındaki farklılık; ana zincirdeki bağlar, moleküler ağırlık ve dallanma yapısı gibi temel yapı özelliklerindedir (Harutoshi 2013).

LAB arasında bağ tipi ve bağdaki karbonun pozisyonuna bağlı olarak bir alt sınıflandırma elde edilebilir. Bu sınıflandırmaya göre glukanlar glukoz birimlerini içerenlerdir;

- (i) α -glukan (dekstran: α -D-Glc(1,4); mutan: α -D-Glc(1,3); alternan: (α -D-Glc(1,6)/ α -D-Glc(1,3) ve reuteran: α -D-Glc(1,4)/ α -D-Glc(1,6) ile α -D-Glc(1,4)/ α -D-Glc(1,6) dallanma noktaları),
- (ii) β -glukan (β -D-Glc(1,3) yan zincirle bağlanmış) olarak alt sınıflarına ayrılabilir.

Fruktanlar fruktoz birimlerini içerdiklerinden levan olarak da isimlendirilir;

- (i) Levan tip : β -D-Fru(2,6)
- (ii) İnulin tip: β -D-Fru(2,1) olarak alt sınıfa ayrılır ve bu sınıflandırma da her ikisi de β -fruktandır.

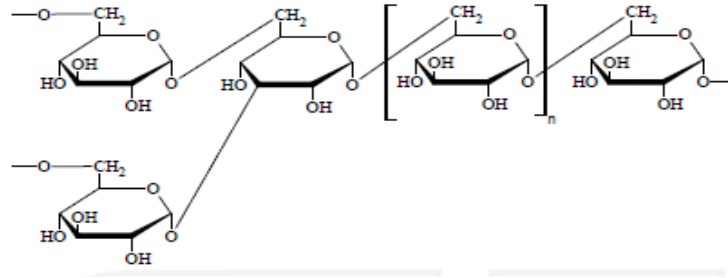
Galaktozun bir pentamerik tekrar ünitesini içeren poligalaktonlar ise oldukça nadir olup sadece *Lactococcus lactis subsp. lactis* H414 ve *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 'un iki suşu (CRL 406 ve 142) için tanımlanmıştır (Torino ve diğ. 2015).

1.2.2.1.1 Dekstran

Dekstran ana zincirde α -(1,6) glikozidik bağ ve dallanma noktalarında α -(1,2), α -(1,3) ve α -(1,4) glikozidik bağ içerir. Dekstran *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* tarafından üretilir, bu bakterinin sahip olduğu dekstransükraz dekstran üretiminin temel enzimidir (Harutoshi 2013, Patel ve diğ. 2012).

Dekstran sükrazın orijinine bağlı olarak, dekstranda α -(1,2), α -(1,3) ve α -(1,4) bağlarının dallanma derecesi değişir. Dekstranlar, kısmen parçalanmış ve bunların

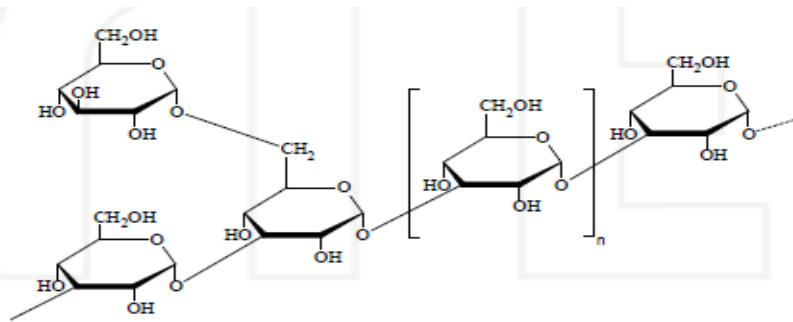
derivatları yardımcı, emülsifiyer, taşıyıcı ve stabilizör olarak gıda, farmasötik ve kimya sanayinde büyük ticari uygulama alanına sahiptir (Patel ve diğ. 2012).



Şekil 1.1: Dekstran'ın yapısı (Harutoshi 2013)

1.2.2.1.2 Mutan

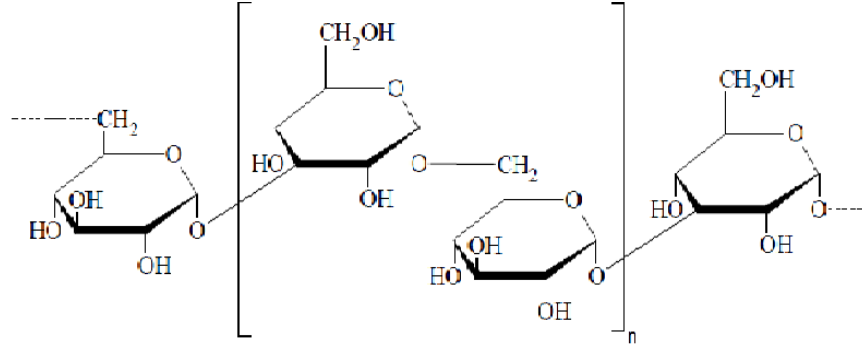
Mutan *Streptococcus mutans*'in çeşitli serotipleri tarafından sentezlenen bir glukandır. α -(1,3) bağlarını oldukça yüksek oranda içermesi nedeniyle dekstrandan farklıdır. Çözünürlüğündeki farklılıklar bağlarının farklı tiplerinin oranından kaynaklanır. Örneğin suda çözülebilen glukanalarda α -(1,6) bağları fazla iken suda çözünemeyen glukanalarda α -(1,3) bağlarının yüksek olduğu gözlenlenmiştir. Ağız florasında bulunan *Str. mutans* tarafından üretilen mutan diş çürümesi ile ilişkilendirilmiştir. Çünkü çözünemeyen mutanlar diş yüzeyine yapışarak mikroorganizmaların dişlere tutunmasına yardım ederler (Harutoshi 2013).



Şekil 1.2: Mutan'ın yapısı (Harutoshi 2013)

1.2.2.1.3 Alternan

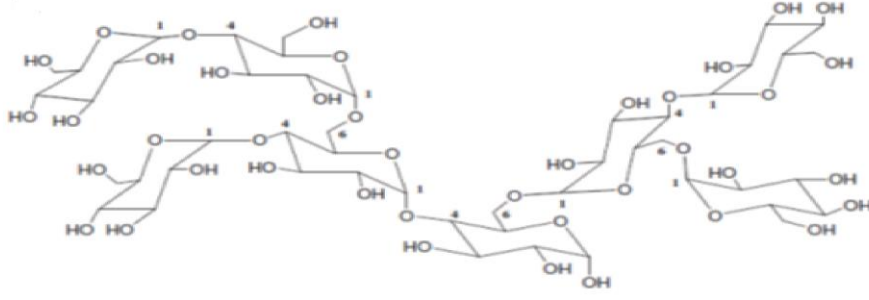
Alternan yapısında α -(1,6) ve α -(1,3) glikozidik bağları ile α -(1,3) dallarını içeren polimer yapılarıdır. Bu EPS'nin üretimi, *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355, NRRL B-1501 ve NRRL B-1498 suşlarının içerdiği alternan-sükraz enzimi ile gerçekleşmektedir. Kendine özgü yapısı nedeniyle alternan, yüksek çözünürlük ve düşük viskoziteye sahiptir. Alternan ticari olarak düşük viskozite artırıcı ajan ve genişletici olarak gıda sanayinde ve kozmetikte kullanılır. Ekstraselüler alternaz alternanı oligosakkaritlere indirger. Alternanlar şekerlerde düşük glisemik indeksi düşürmek veya gıdalarda prebiyotik amaçları doğrultusunda kullanılır (Patel ve diğ. 2012).



Şekil 1.3: Alternan'ın yapısı (Harutoshi 2013)

1.2.2.1.4 Reuteran

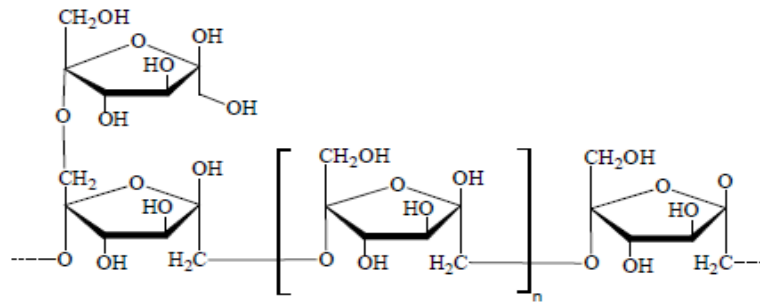
Reuteran, reuteran sükraz tarafından üretilen suda çözülebilir glukandır. %70 oranında α -(1,4) ve α -(1,6) glikozidik bağ ve dallanma noktasında %16 oranında α -glikozil ünitelerini içerir. Moleküler ağırlığı 40 MDa'dur. Suda çözünebilir özelliği sayesinde fırıncılıkta kullanılır. *Lactobacillus reuteri* LB 121, *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 ve *Lactobacillus reuteri* 35-5 reuteran üreticisidir (Patel ve diğ. 2012).



Şekil 1.4: Reuteran'ın yapısı (Badel ve diğ. 2011)

1.2.2.1.5 Levan

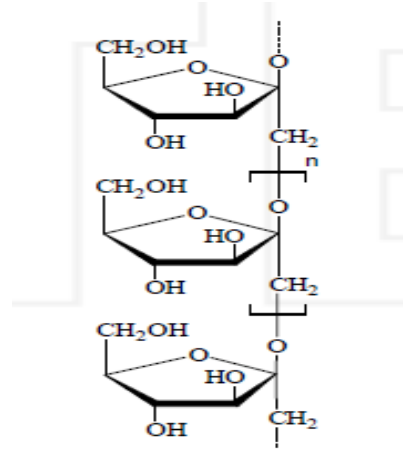
Levan, β -(2,1) bağlı yan zincirler içeren ana yapıda β -(2,6) glikozidik bağa sahip bir fruktandır. Levan sükröz, levan üretimi için fruktozdan D- fruktozil rezidüllerinin transferini katalizler. *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590 ve *Lactobacillus reuteri* LB121 levan üreticileridir. Moleküler ağırlığı yüksek benzer moleküllerden nispeten daha düşük iç viskoziteye sahip olması nedeniyle özel bir polisakkarittir. Oda sıcaklığında suda jelleşmez veya şişmez. *L. sanfranciscensis* LTH2590'den elde edilen levan prebiyotik etkiye de sahip olduğu gösterilmiştir. Anti tümör özelliği ve kolesterol düşürücü etkisi nedeniyle levanın üzerinde ilgiyle durulmaktadır. Ayrıca kıvamlaştırıcı olarak da umut vaad etmektedir (Patel ve diğ. 2012).



Şekil 1.5: Levan'ın yapısı (Harutoshi 2013)

1.2.2.1.6 İnülin

İnülin β -(1,2) glikozidik bağları içeren fruktan ya da fruktooligosakkaritlerdir. *Lactobacillus johnsonii* NCC533'ün inulosükras enzimi ile sukrozdan yüksek molekül ağırlıklı inülin üretilir. *Streptococcus mutans* JC2, *Leuconostoc citreum* CW28 ve *Lactobacillus reuteri* 121 inülin üretici diğer LAB'dir. Bu EPS sindirilemediğinden insan ve hayvanlarda prebiyotik fonksiyonu bulunur. Bağırsak lümeninde pH'yı düşürür ve patojen bakterilerin tutunmasını engeller. İnülin tip fruktanlar kolon kanser tedavisinde ilacın verilmesinde araç olarak kullanılabilir. Sulu çözeltilerde inülinin jelleşme eğilimi gıda tekstür ve stabilitesini sağladığı için gıda ürünlerinde arzulanan bir bileşendir (Patel ve diğ. 2012).



Şekil 1.6: İnülin'in yapısı (Harutoshi 2013)

1.2.2.2 Heteropolisakkarit

Heteropolisakkaritler, homopolisakkaritlerin aksine hücre içi glikoziltransferaz aktivitesi ile iki veya daha fazla şekerlerden oluşan bir ünitenin tekrarı ile oluşur (Galle ve Arendt 2014). Tekrar üniteleri en yaygın olarak D-glikoz, D-galaktoz ve L-ramnozdan şekerlerinden oluşur. Bunlara ilaveten fruktoz, *N*-asetil-D-glukozamin, *N*-asetil-D-galaktozamin ve poliolden de sentezlenebilir (Harutoshi 2013, Galle ve Arendt 2014, Korakli ve Vogel 2006).

LAB'den heteropolisakkarit (HePS) biyosentezi ve salgılanması bakteriyal büyümenin farklı fazlarında meydana gelir. HePS'nin tipi ve miktarı bakteri gelişme

koşulları tarafından düzenlenir. Yapıları bakımından yapışkan özelliindedir. Optimal kültür şartları altında 0.15–0.6 gL⁻¹ HePS üretilebilir. HePS polimerinin moleküler kütlesi 1.0x10⁴ ve 6.0x10⁶ Da aralığındadır. Üretici suş, büyüme ortamı kompozisyonu ve pH, sıcaklık, oksijen basıncı, bulanıklık gibi kültür şartları glikozidik bağda varyasyonların ve HePS'nin monomer kompozisyonunu etkiler (Patel ve diğ. 2012).

Sentezlenen EPS'nin tipi ve miktarı ortamda bulunan substrat veya alıcı molekül gibi davranan şekerlere ve çevresel şartlara bağlıdır (Peyer ve diğ. 2016). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB2772'in gelişme ortamında eş hücre yoğunluğunda glukoz ve fruktoz varlığında EPS içeriği araştırılmış ve glukozun fruktoza oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır (Grobben ve diğ. 1997).

1.2.3 LAB'ler Tarafından Üretilen EPS'lerin Biyosentezi

LAB'nin bazı üyeleri farklı yapılarda homopolimerik ve heteropolimerik EPS'leri geniş bir çeşitlilikte üretebilmektedir. Bu EPS'lerin biyosentezi özel glikoziltransferaz enzimleri ile başarılmaktadır. LAB türlerinde EPS üretimi benzer biyosentez mekanizmayla gerçekleşir (Jolly ve Stingle 2001). LAB suşlarında üretilen homopolimerik EPS'ler tek bir gen ile üretilirken, heteropolimerik EPS'ler eps gen kümeleri tarafından kodlanan birden fazla genlerin birlikte fonksiyonu ile biyosentezlenir. Ayrıca her iki EPS'nin üretiminde, birkaç ekspresyonu değişmeyen temel gen ürünlerinin fonksiyonu da gereklidir (Laws ve diğ. 2001).

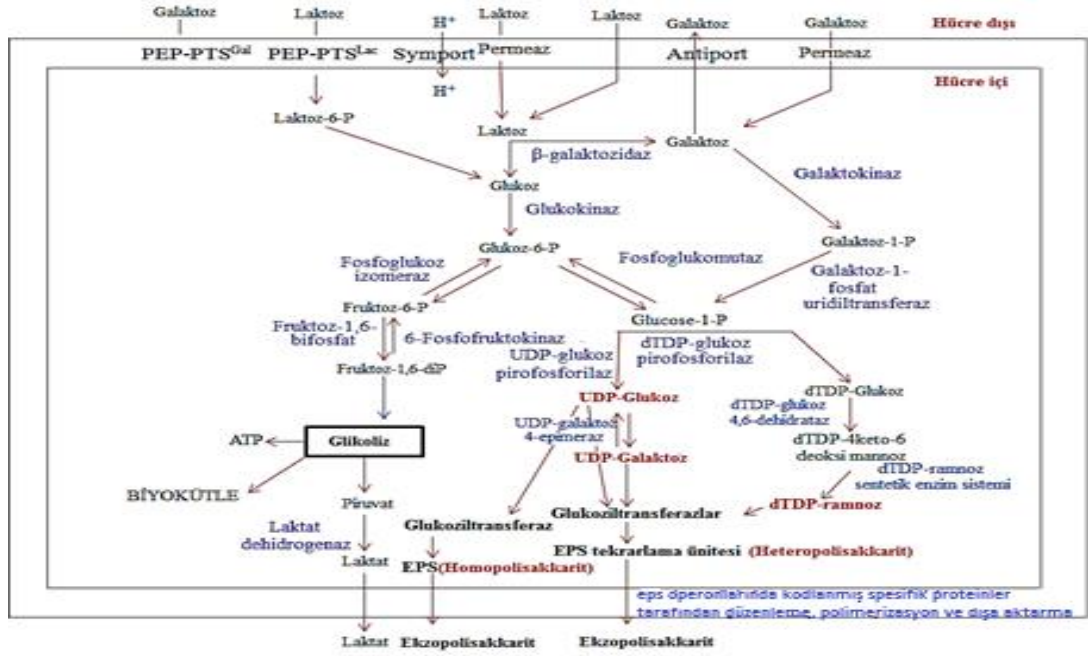
EPS üretimi için özel gen kümeleri, *Lactococcus* gibi mezofilik LAB cinsleri için plazmid üzerinde, *Streptococcus* ve *Lactobacillus* gibi termofilik cinsler için ise kromozom tarafından kodlanmaktadır (Laws ve diğ. 2001). Fakat *Lactobacillus casei* CG11'nin EPS üretiminin bir plazmidle bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Diğer bir *L. casei* suşunun EPS üretiminin kromozomlarla bağlantılı olduğu belirtilmiştir (Dupont ve diğ. 2000, Kojic ve diğ.1992).

Homopolimerik EPS'lerin biyosentezi, hücre duvarında veya hücre duvarında tutuklu glukoz sukraz enzimlerinin hücre dışı şeker birimleri arasında glikozidik bağ kurarak gerçekleşir. LAB'ler dekstran, levan ve reuteran gibi homopolimerik EPS'nin farklı çeşitlerini üretirler (Badel ve diğ. 2011, Donot ve diğ. 2012, Kralj ve diğ. 2004a).

Dekstranlar, mikrobiyal aktiviteyle ilişkili olan şeker kamışı şuruplarının pelteleşme prosesinde ilk defa Pastör tarafından keşfedilmiştir ve pelteleşme prosesine sebep olan ürünlerin pozitif dönel gücünün bir sonucu olarak ürün “dekstran” terimiyle ifade edilmiştir (Van Hijum ve diğ. 2006). LAB’lerde homopolisakkaritlerin yapısı farklı glikozidik bağ ya glukoz birimleri ya da fruktoz birimlerinden oluşur. Ayrıca bu yapıların özellikleri, dallanma noktalarındaki çeşitlilik ve sayısına, zincir uzunluklarına, molekül kütlesine ve glukoziltransferazın aktivitesine dayanan konformasyonuna göre değişiklik gösterebilir (Van Hijum ve diğ. 2006). Glukoziltransferazlar, kültür ortamında sükrozun degradasyonunu katalize ederler. Polisakkarit oluşturmak amacıyla alıcı moleküllerine glukozil rezidülerini transfer etmek için degradasyon reaksiyonunda ortaya çıkan enerjiyi kullanırlar (Badel ve diğ. 2011). Homopolimerik EPS’lerin sentezini gerçekleştiren glukoziltransferazlar, *gtf* ve *ftf* genleri tarafından kodlanan glukoziltransferazlar ve fruktoziltransferazlar olarak ikiye ayrılır. *Gtf* ve *ftf* genleri, sırasıyla glukoz ve fruktan üretiminden sorumludurlar ve her enzimin konformasyonuna bağlı olarak farklı bağlantılarla bağlanmışlardır (Badel ve diğ. 2011, Cote ve diğ. 2012, Kralj ve diğ. 2004a, Kralj ve diğ. 2002, Van Hijum ve diğ. 2002, Walter ve diğ. 2008). Mikrobiyal glukozanlar, glukoz birimleri arasındaki glukozidik bağlara bağlı olarak iki gruba ayrılırlar. α -glukozanlar, β -glukozanlar ve farklı birkaç glukozan LAB için tanımlanmıştır. Tersine, LAB için β -(2,6) bağlantılı levan ve β -(2,1) bağlantılı inülin tip olmak üzere sadece iki farklı fruktan karakterize edilmiştir (Korakli ve Vogel 2006).

Heteropolimerik EPS biyosentezinin ilk molekülü, katabolik şeker yolunun başlangıç metaboliti olan glukoz-6-fosfattır (Welman ve Maddox 2003) (Şekil 1.7). Glukoz-6-fosfat, ekspresyonu değişmeyen temel gen ürünü fosfoglukomutaz enzimi tarafından glukoz-1-fosfata dönüştürülür (Laws vd, 2001). Son olarak, glukoz-1-fosfattan şeker nükleotidlerin sentezi gerçekleşir (Laws vd, 2001) (Şekil 1.7). Örneğin; UDP-glukoz pirofosforilaz ve dTDP-glukoz pirofosforilaz aracılığıyla sırasıyla UDP-glukoz ve dTDP-glukoz şeker nükleotidleri üretilir. Daha sonra epimerizasyon, dekarboksilasyon ve dehidrogenasyon reaksiyonları ile farklı şeker nükleotidleri oluşturulur. Bu kapsamda en fazla UDP-galaktoz ve UDP-ramnoz üretilir (Welman ve Maddox, 2003). Şeker nükleotidlerinin üretimi için farklı genler tarafından kodlanan enzimler, farklı LAB suşları için belirlenmiştir (de Vos ve Vaughan 1994; De Vuyst ve Degeest 1999, Grobber ve diğ. 1996, Kleerebezem ve diğ. 1999; Peant

ve diğ. 2005). Örneğin, beş *L. rhamnosus* suşunun *eps* kümesinde prekürsör dTDP-ramnozun biyosentezi için gerekli genlerin bulunduğu gösterilmiştir (Lebeer ve diğ. 2009, Peant ve diğ. 2005). Bu şeker nükleotidleri, monosakkaritlerin polimerizasyonu ve diğer tip monosakkaritleri üretmek için gereklidir (De Vuyst ve Degeest 1999).



Şekil 1.7: Sitoplazmada laktoz, galaktoz ve glukozun dönüşümü yoluyla LAB'ın EPS üretiminin detaylı şematik gösterimi. Bazı modifikasyonlarla uyarlanmıştır. (Welman ve Maddox 2003) (PEP-PTS: Fosfoenol püruvat: karbonhidrat fosfo-transferaz sistemi)

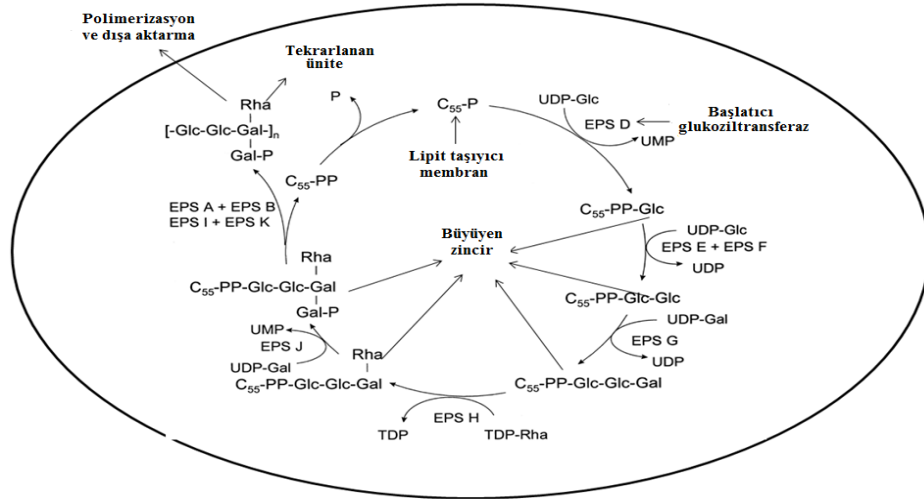
Temel genler ve *eps* operonlarına yerleşen özel genler tarafından şeker nükleotidlerinin üretimi yapıldıktan sonra, tekrarlayan şeker üniteleri oluşturulur. Bu birimlerin üretimi spesifik glukoziltransferaz enzimi tarafından gerçekleştirilir. Ayrıca EPS üretiminin gerçekleşmesinde bazı spesifik enzimler de görev alır (De Vuyst ve Degeest 1999). LAB'de *eps* operonu tarafından kodlanan bu özel enzimler, birkaç LAB türü için belirlenmiştir (Jolly ve diğ. 2002, Nierop Groot ve Kleerebezem 2007, Stingle ve diğ. 1996, Van Kranenburg ve diğ. 1997). Kısaca glukoziltransferaza ek olarak bu *eps* operonunda, EPS zincir uzunluğunun belirlenmesini, polimerizasyonu, transferini ve tekrarlayan birimlerin biyosentezini kodlayan genler bulunur (Badel ve diğ. 2011).

Yukarıdan da anlaşıldığı üzere gerek homopolimerik gerekse de heteropolimerik EPS'lerin biyosentezi glukoziltransferaz enzimleri ile başarılmaktadır.

Bu enzimler aynı zamanda prokaryot ve ökaryotlarda oligosakkaritler ve disakkaritlerin biyosentezini de gerçekleştirir. Nitekim hücre duvarının biyosentezinde de bu enzimler N-asetil glukozamin ve muramik asit arasında bağın kurulmasını katalizler. Bu özel enzimlerin spesifik aktivitesinde, aktive olan verici nükleotid şekerlerin fosfat ya da şekeri, alıcı sakkaritlere veya sakkarit olmayan bileşiklere transfer edilmesi kataliz edilir. Spesifik alıcı bölgede, glukoziltransferaz enziminin yapısına bağlı olarak yeni glukozidik bağların oluşumuyla meydana gelen şeker monomerleri ya da lipit taşıyıcı moleküller ya da büyüyen bir karbonhidrat zinciri olabilir (Saxena ve diğ. 1995).

Glukoziltransferaz α -glikozidik bağları oluşturma özelliğinde ise, verici şeker nükleotidlerin anomerik konfigürasyonu α bağlantıları ile bir arada tutulmaktadır. Eğer enzim β -glikozidik bağları oluşturuyorsa da, verici şeker nükleotidleri β -glikozidik bağ ile bağlanır (Lairson ve diğ. 2008, María Laura Werning 2012). Glukoziltransferazlar aktivitesine göre ilerleyen ve ilerlemeyen enzimler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. İlerleyen enzimler, alıcı uca şeker birimlerini sürekli transfer edebilen enzimlerdir. İlerlemeyen enzimler ise alıcı moleküllere tek bir şeker biriminin transferini katalizleyebilen enzimlerdir (Saxena ve diğ. 1995). Her iki tipteki glukoziltransferazlar, LAB'nin homopolimerik ve heteropolimerik EPS için tekrarlayan birim yapılarının biyosentezinde gereklidir.

Heteropolimerik EPS üretiminde tekrar şeker ünitelerinin oluşturulmasının ilk aşamasında glukoziltransferaz, izoprenoid lipit taşıyıcısına ilk şekerin bağlanmasını katalizler. Devam eden süreçte, ardışık farklı spesifik glukoziltransferazlar şeker nükleotidlerinden şeker birimlerinin transferini gerçekleştirir. Bu aşamada glukoziltransferaz enzimlerinin önemli bir kısmı ana zinciri uzatırken, bazıları dallanma bağlantılarını kurar (Şekil 1.8). Glukoziltransferazlar, LAB'da EPS'nin tekrarlayan birimlerine şekil vermek için eps operonlarında kodlanırlar (De Vuyst ve Degeest 1999).



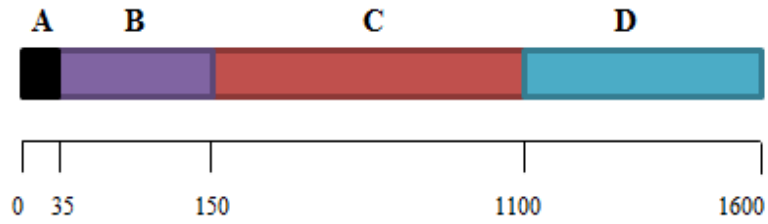
Şekil 1.8: *L. lactis* NIZO'nun EPS biyosentez modeli (Van Kranenburg ve diğ. 1997, De Vuyst ve Degeest 1999)

Hücre zarının iç kısmından zarın dış kısmına doğru tekrar şeker ünitelerinin dışa transferi ve polimerizasyonu takip eden adımdır. Heteropolimerik EPS üretimiyle ilişkili operonlarda kodlanan üç farklı protein bulunmaktadır ve bu proteinler hücre dışına transfer ve polimerizasyon reaksiyonlarını gerçekleştirirler. İlk olarak, flippaz ya da translokaz, membranın sitoplazmik yüzeyinden membranın periplazmik yüzeyine lipit taşıyıcı moleküle bağlı tekrar şeker ünitesini taşır. İkinci olarak, polimeraz bu tekrar şeker ünitelerini katalizler. Son olarak EPS zincir uzunluğunu belirleyen protein, lipit taşıyıcı-tekrarlayan birim kompleksleri kopararak, transfer ve polimerizasyon reaksiyonlarını durdurur (Laws ve diğ. 2001).

Tirozin kinaz gibi bazı enzimler de EPS'nin zincir uzunluğuna karar verilmesi için önemli bir rol oynar (Cieslewicz ve diğ. 2001, Morona ve diğ. 2003, Morona ve diğ. 2000). Daha sonra bu EPS polimerleri ya hücre dışına salgılanır ya da hücre yüzeyine tutundurulur. Hücre yüzeyine tutuklu olan EPS'ler kapsüller olarak tanımlanır (De Vuyst ve Degeest 1999). Gram pozitif bakterilerde bazı polimerler hücre yüzeyinden salınmasına rağmen, kapsüller EPS'ler kovalent bağlarla hücre zarına ya da duvar yapısında bulunan peptidoglukana kovalent bağlanır (Yother 2011). Hücre yüzeyine EPS'nin bağlanma mekanizması veya hücre büyüme ortamına salınımı henüz bilinmemesine rağmen, Gram negatif *E. coli*'de dış membran proteini Wzi'nın EPS'nin bağlanmasında rol aldığı ilişkilendirilmiştir. Nitekim bu proteinin yokluğunda dış çevreye salgılanan polimer miktarında artış gözlemlenmiştir (Rahn ve diğ. 2003).

1.2.4 LAB’de EPS Üretimine Genetik Doğası

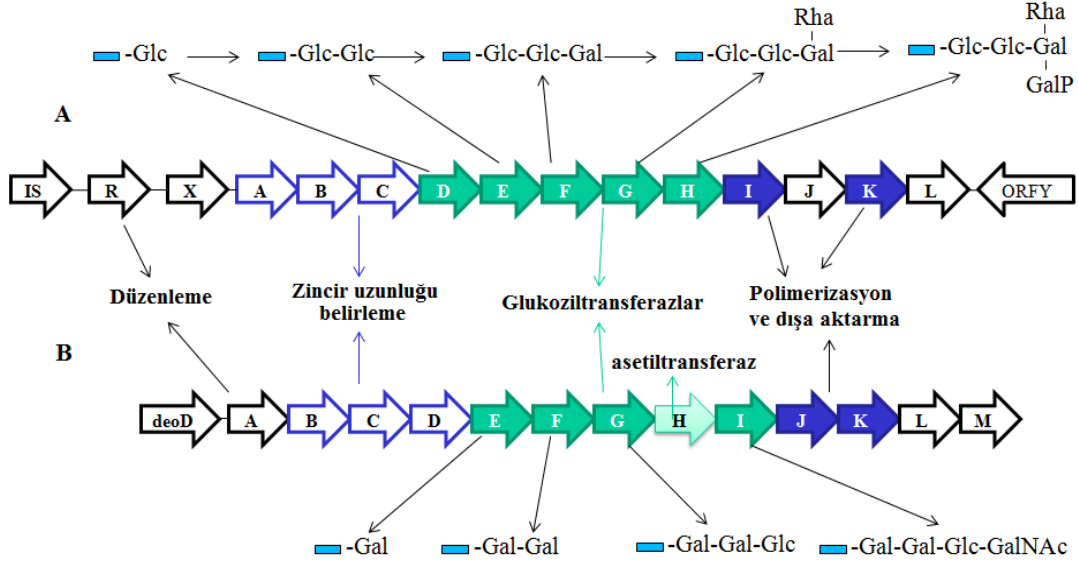
Heteropolimerik EPS üretiminden operonda toplanmış birden fazla gen sorumlu iken, homopolimerik EPS üretiminden tek bir gen sorumludur. Homopolimerik glukanların ve fruktanların üretimi için *gtf* ve *ftf* genleri bazı LAB suşlarının genomunda tespit edilmiştir (Kralj ve diğ. 2004a, Kralj ve diğ. 2002, Schwab ve Ganzle 2006, Van der Meulen ve diğ. 2007, Van Leeuwen ve diğ. 2008). Ayrıca bazı LAB’lerin genomlarında birden fazla *gtf* geni de bulunmuştur (Korakli ve Vogel 2006). GTF ve FTF’lerin amino asit dizilimlerine göre GTF’ler arasındaki benzerlik düşük, FTF’lerde ise benzerlik yüksektir (Korakli ve Vogel 2006). Bu nedenle LAB türleri sınırlı sayıda fruktan üretebilmektedir. GTF genleri ve enzimleri altı farklı *Lactobacillus* suşunda araştırılmıştır ve kromozom içerisinde *gtf* genlerinin lokasyonunun bu altı suş için oldukça değişken olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu *gtf* genlerinin transpozon dizileri ile yüksek benzerlik gösteren bölgeler arasında olduğu rapor edilmiştir (Kralj ve diğ. 2004a). Aynı araştırmacılar GTF’lerin yapısının kısımlarının; a) Tipik bir gram pozitif sinyal peptidi; b) değişken bölge (Kralj ve diğ. 2004a); c) enzimatik aktivite için gerekli katalitik bölge; d) varsayılan bir glukan bağlanma alanı olarak belirlemişlerdir (Kralj ve diğ. 2004b). LAB’da GTF enzimlerinin bu genel yapısı farklı LAB’ların otuzdan fazla GTF için daha önceden rapor edilmiş ve genel yapısı Şekil 1.9’da gösterilmiştir.



Şekil 1.9: GTF’lerin genel yapısının şematik gösterimi; A) N-ucu sinyal bölümü, B) değişken bölge, C) katalitik alan, D) glukan bağlayıcı alan (Monsan ve diğ. 2001)

Heteropolimerik EPS üretimi için, *eps* operonunda kodlanan birkaç genin birlikte çalışması zorunludur ve karmaşık bir mekanizması bulunur. Şimdiye kadar, LAB’lerde bazı *eps* operonları belirlenmiş ve tanımlanmıştır (Jolly ve diğ. 2002, Lebeer ve diğ. 2009, Nierop Groot ve Kleerebezem 2007, Stingle ve diğ. 1996, Van Kranenburg ve diğ. 1997). Bu *eps* operonları dört fonksiyonel genleri içermektedir. İlk genler, EPS’de tekrar eden şeker ünitelerinin biyosentezi için gerekli spesifik glukoziltransferazları; ikinci genler, glukoziltransferaz genlerinin üst akışında

bulunan, EPS'nin zincir uzunluğunu belirlediği düşünülen proteinleri; üçüncü genler, glukoziltransferaz genlerinin alt akışında bulunan, EPS'nin transferini ve polimerizasyonunu ve son olarak dördüncü genler, *eps* operonlarının başlangıcında yer alan EPS biyosentezinin transkripsiyonel düzenlemesini kodlamaktadır (Şekil 1.10) (De Vuyst ve Degeest 1999).



Şekil 1.10: (A) *L. lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 (Van Kranenburg ve diğ. 1997) ve (B) *S. thermophilus* Sfi6 (Stingele ve diğ. 1996)'ların *eps* operonlarının organizasyonu ve varsayılan fonksiyonel mekanizmaları

Bu *eps* operonları *Streptococcus* ve *Lactobacillus* suşlarında kromozoma bağlı olarak yerleştirilmişken *Lactococcus* suşlarında ise bu *eps* operonları genellikle plazmit üzerindedir. Bu operonlar ekzopolisakkaritler ve kapsüler ekzopolisakkaritleri yansıtan, *eps* ya da *cps* operonları olarak isimlendirilmektedir. LAB'lerde ilk defa *eps* operonu *S. thermophilus* Sfi6 suşunda bulunmuştur. Bu suşta bulunan *eps* operonu 13 gen içermekte ve 14,5 kb büyüklüğündedir. Söz konusu operonda bulunan genler kapsüler polisakkarit oluşumuyla ilgili olan farklı organizmalara ait genlerle yüksek homoloji göstermiştir (Şekil 1.10) (Stingele ve diğ. 1996). Daha sonra başka bir *eps* operonu, *L. lactis* NIZO B40 suşunun 40 kb'lık plazmidi üzerinde bulunmuştur (Şekil 1.10) (Van Kranenburg ve diğ. 1997). Bu operonlarda genlerin okuma yönü aynı doğrultudadır ve tek bir polisistronik mRNA olarak transkripsiyonu çıkarılmaktadır. (Van Kranenburg ve diğ. 1997). Diğer bir çalışmada, 18 *eps* geni içeren dört *L. rhamnosus* suşunun *eps* operonları karşılaştırılmıştır. Bu operonlarda transkripsiyonel düzenleyici ve transpozonları kodlayan iki gen haricinde 18 *eps* genleri aynı doğrultuda olduğu gösterilmiştir. Bu genlerin on beş tanesi de polisistronik olarak

üretilmektedirler (Fanning ve diğ. 2012). Fakat araştırmacılar, *L. rhamnosus* suşlarının *eps* operonlarında beş farklı promotörün bulunduğunu belirlemişlerdir (Peant ve diğ. 2005). Bu bulgu *L. rhamnosus* suşlarında glukoziltransferaz enzimleri kodlayan genlerin kendi promotörleri ile transkripsiyonlarının çıkarıldığına işaret etmiştir. Böylece bu durumun *L. rhamnosus* suşunda EPS biyosentezini hızlandırdığı şeklinde yorumlanmıştır. (Peant ve diğ. 2005). Tüm bu örnekler özellikle laktobasillerin *eps* operonlarındaki genlerin okuma yönlerinin aynı yönde olduğunu göstermektedir. *Eps* operonlarının transkripsiyonu ya tek polisistronik mRNA, ya da *eps* operonundaki genlerin genetik yapısına bağlı ayrı bir monosistronik mRNA olarak üretilmektedir. İyi bir probiyotik olarak bilinen *L. rhamnosus* GG’de hücre yüzeyi EPS ile bağlantılı olan bir operon belirlenmiştir. Bu operonun dTDP-rhamnoz prekürsör biyosentezi ile ilgili spesifik genleri bünyesinde bulundurduğu için LAB ve laktobasillerin *eps* operonlarından önemli farklılıklar göstermiştir (Lebeer ve diğ. 2009). Aslında önceleri *L. rhamnosus* suşlarının *eps* operonu organizasyonunun laktobasillerden önemli bir biçimde değişkenlik gösterdiği rapor edilmiştir. Fakat *L. rhamnosus* GG’nin *eps* operonuyla uyum gösteren *L. rhamnosus* suşları arasında, *eps* operonu oldukça benzerdir (Peant ve diğ. 2005). LAB’nin *eps* operonunun organizasyonel yapısında bazı farklılıklar tespit edilmesine rağmen, laktobasil suşlarının *eps* operonu son derece benzer genetik organizasyon gösterir (Jolly ve Stingle 2001).

LAB’nin *eps* operonları transkripsiyonel düzenleyici “*epsA*” olarak tanımlanan tek bir genle başlar. EPS biyosentezinde transkripsiyonel düzenleyicinin rolü *Streptococcus* suşunda bu genin susturulması durumunda kapsül oluşumunun azalmasının görülmesi ile anlaşılmıştır (Bender ve diğ. 2003, Ciesiewicz ve diğ. 2001, Morona ve diğ. 2000). Bir *Lactococcus* suşunda plazmide yerleşen *eps* operonundan transkripsiyonel düzenleyicinin durdurulması sonucunda, bu suşta EPS biyosentezi tamamen kaybedilmiştir (Nierop Groot ve Kleerebezem 2007). Birçok çalışmada *Lactobacillus* türlerinde EPS üretiminin transkripsiyonel düzenleyicileri tespit edilmiştir. Fakat *eps* operonlarının transkripsiyonel düzenlemesinin mekanizmasına ilişkin veriler eksiktir.

LAB’nin *eps* operonunda takip eden üç gen *epsB*, *epsC* ve *epsD* olarak tanımlanmıştır ve bunların EPS’nin zincir uzunluğunu belirlemeden sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (Broadbent ve diğ. 2003). *Lactobacillus*’da son ürünün zincir

uzunluğunu belirlemek için kompleks *eps B-C-D*'nin birlikte nasıl çalıştıkları yeterince bilinmemektedir. Ancak bu genler, polimerizasyon ve zincir uzunluğunun belirlenmesine ilişkin sırasıyla protein tirozin kinaz ve fosfotirozin protein fosfotazı kodlayan diğer suşlardaki genlerle yüksek homoloji göstermektedir. Hücrel metabolizmalarda örneğin EPS biyosentezinde önemli rol oynayan fosfotirozin-protein ve protein-tirozin kinaz enzimlerine bir takım organizmaların (ökaryotlar, prokaryotlar) sahip olduğu gösterilmiştir (Vincent ve diğ. 1999). Öncü çalışmalarda *E. coli*'de protein-tirozin kinaz (Wzc) ve fosfotirozin-protein fosfotaz (Wzb) olarak iki protein tanımlanmıştır. Bu iki protein birbirine ters fonksiyona sahiptir: wzc tirozin rezidülerini oto-fosforillerken, wzb defosforile etmektedir. Bu gözlem, tirozin rezidülerinin fosforilasyon ve defosforilasyon yapılarak bakteriyel metabolik proseslerde düzenleyici rolünün olduğunu desteklemiştir. Araştırmacılar birkaç bakteriyel türde bu gen kompleksinin varlığından dolayı, EPS'lerin biyosentezi ile bağlantılı olduğunu ileri sürmüşlerdir (Vincent ve diğ. 1999). Benzer gözlemler Gram pozitif *Streptococcus pneumoniae*'nin kapsüler polisakkarit kümesinde yer alan otofosforile eden protein tirozin kinazın kapsüler EPS'nin üretiminde cpsD geninde yapılan mutasyon sonucunda önemli olduğu gösterilmiştir (Morona ve diğ. 2000). Bu çalışmada *Streptococcal* cpsC ve cpsD'nin birbirleriyle etkileşime girdiğini ardından ATP'nin bu etkileşime bağlandığı ve cpsD'yi fosforile ederek tirozin fosforilasyonu ile sonuçlandığı gözlenmiştir. Aynı çalışmada ardından cpsB bu etkileşimi defosforile ederek EPS üretimi ve uzunluğu regüle edildiği belirlenmiştir (Morona ve diğ. 2002, Morona ve diğ. 2000). CpsD'nin defosforilasyonunun, Streptococcal suşlarda kapsül oluşumu için gerekli olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, *S. pneumoniae*'nin kapsül oluşturması ile ilgili bir diğer araştırmada, cpsD'nin fosforilize olmuş formunun daha fazla kapsül oluşturduğu gösterilmiştir (Bender ve diğ. 2003). *Streptococcus agalactiae*'de EPS zincir uzunluğunun azalması, cpsC ve cpsD'nin inaktivasyonu sonucunda görülmüştür (Cieslewicz ve diğ. 2001). Diğer bir kapsamlı çalışmada, *S. pneumoniae*'de kapsül oluşumunun zincir uzunluğu belirleme mekanizmasında cpsB, cpsC, cpsD ve ATP 'nin stabil bir kompleks oluşturduğu gösterilmiştir (Bender ve Yother 2001). Ayrıca, varsayılan polimerizasyon ve zincir uzunluğunu belirleme proteini ve protein-tirozin kinaz kodlayıcı epsC ve epsD'den yoksun mutant *S. thermophilus* hücreleri EPS üretememiştir. Fakat epsB tarafından kodlanan fosfotirozin-protein fosfataz'ın susturulması EPS üretimini sonlandırmamıştır (Minic

ve diğ. 2007). Bu gözlemler, *epsB*, *epsC* ve *epsD*'den oluşan *eps* genlerinin zincir uzunluğunun belirtilmesinde rolünü açıkça göstermiştir.

Eps operonundaki merkezi bölge, tekrarlayan EPS birimlerinin biyosentezi için gerekli olan spesifik glukoziltransferazları kodlayan genlerden oluşmuştur (De Vuyst ve Degeest 1999). Bu bölgenin ilk geni *epsE*'dir. Bu gen tarafından üretilen glukoziltransferazlar aktive olmuş şekerler nükleotidlerden, fosforilize olmuş lipit taşıyıcısına ilk şeker monomerinin transferini katalizler (Almiron-Roig ve diğ. 2000, Broadbent ve diğ. 2003, De Vuyst ve Degeest 1999, Jolly ve diğ. 2002, Jolly ve Stinglele 2001, Lamothe ve diğ. 2002, Lebeer ve diğ. 2009, Van Kranenburg ve diğ. 1997). Başlatıcı glukoziltransferaz geni olan *epsE* geninin susturulması birkaç bakteriyel türde EPS üretiminin kaybına neden olmuştur (Bentley ve diğ. 2006; Cieslewicz ve diğ. 2001, Dabour ve LaPointe 2005, Minic ve diğ. 2007, Van Kranenburg ve diğ. 1997). *L. rhamnosus* GG'de *epsE* geninin susturulması galaktozca zengin EPS üretiminin kaybıyla sonuçlanmıştır. Fakat glukozca zengin EPS hücre yüzeyinde tespit edilmiştir. Buna göre *L. rhamnosus* GG'nin iki tip EPS üretebildiği ve *epsE* geninin galaktozca zengin EPS için (glukozca zengin olan için değil) başlatıcı glukoziltransferaz olduğu şeklinde yorumlanmıştır (Lebeer ve diğ. 2009). Birkaç LAB'de *epsE* genlerinin fonksiyonel analizleri ile bir başlatıcı glukoziltransferaz olan *epsE*'nin biyokimyasal rolü de anlaşılmıştır. Başlatıcı glukoziltransferazlar, sitoplazmik zarın iç yüzeyinde fosforilize olmuş lipit taşıyıcısına glukozil-1-fosfat ya da galaktozil-1-fosfat ekleyerek EPS üretimini başlatmaktadır (Almiron-Roig ve diğ. 2000, Jolly ve diğ. 2002, Stinglele ve diğ. 1996, Stinglele ve diğ. 1999). Lipit taşıyıcı membrana ilk şeker ilavesinden sonra, *eps* operonu tarafından kodlanan diğer glukoziltransferazlar tekrarlayan EPS birimlerini oluşturmak için lipit taşıyıcı-şeker kompleksine şeker monomerlerini ilave eder (Broadbent ve diğ. 2003).

Glikoziltransferazları kodlayan genlerin alt akışı yönünde transfer ve polimerizasyondan sorumlu genler ile mutazı ve fonksiyonu bilinmeyen diğer genler yer alır (Broadbent ve diğ. 2003, Delcour ve diğ. 1999, Lebeer ve diğ. 2009, Stinglele ve diğ. 1999). *Eps* operonunun polimerizasyon ve transfer fonksiyonlarının gerçekleştirildiği bölgede bulunan flippaz, lipit taşıyıcısına takılı olan heteropolimer EPS'nin birimini oluşturan şeker tekrarını hücre zarınının iç kısmından periplazmik kısma transfer edilmesini sağlar. (Jolly ve Stinglele 2001, Laws ve diğ. 2001). Bu

bölge EPS'nin tekrar şeker ünitelerinin polimerizasyonundan sorumlu enzimi kodlayan genleri bulundurur. Polimeraz hücre zarı boyunca EPS zincirlerinde tekrar şeker ünitelerinin birbirine bağlar (Jolly ve Stingle 2001). LAB *eps* operonlarında belirlenen son gen *glf*'dir. Söz konusu bu genin, bakteri hücresindeki şeker havuzundan EPS'de tekrarlayan şeker üniteleri için gerekli şeker nükleotidlerin çevrimini gerçekleştiren mutaz enzimini kodlamaktadır (Lebeer ve diğ. 2009, Remus ve diğ. 2012). Benzer şekilde *L. rhamnosus* suşlarının *eps* kümelerinin, son EPS yapısıyla ilişkili olan dTDP-rhamnoz prekürsör biyosentezi genlerini içerdiği gösterilmiştir (Lebeer ve diğ. 2009, Peant ve diğ. 2005). Son olarak, LAB'inin *eps* kümeleri bilinmeyen fonksiyonlu birkaç geni bünyesinde barındırır (Broadbent ve diğ. 2003).

1.2.5 LAB'de EPS Üretimini Etkileyen Faktörler

LAB'ler tarafından EPS'lerin üretim düzeyleri oldukça değişkendir ve çevresel faktörler tarafından etkilenmektedir. EPS metabolizmasını düzenlemek, EPS üretim düzeyini arttırmak ve LAB'ın EPS yapılarını modifiye etmek için EPS üretimini etkileyen faktörlerin anlaşılması gerekmektedir. Hücre gelişme ortamının bileşimi, pH, inkübasyon sıcaklığı hücre büyümesini etkileyen faktörler LAB'lerde üretilen EPS miktarını önemli ölçüde etkilemektedir (Boels ve diğ. 2003, Dupont ve diğ. 2000). Örneğin, EPS biyosentezi için benzer genetik yapıya sahip 4 adet *L. rhamnosus* suşlarında EPS üretiminin 61-1611 mg L⁻¹ arasında olduğu belirlenmiştir (Peant ve diğ. 2005). Fermentasyon süresi, sıcaklık ve kullanılan karbon kaynağına bağlı *L. rhamnosus* suşlarında farklı seviyede EPS üretilirken, EPS yapısında bir farklılık olmadığı rapor edilmiştir (Van Calsteren ve diğ. 2002). Buna karşın, *L. casei* CG11 tarafından üretilen EPS'nin kompozisyonu ve miktarı kültür ortamında kullanılan karbon kaynağına bağlı olarak değişmiştir (Cerning ve diğ. 1994). LAB türlerinde EPS üretimini besiyeri bileşimi ve hücre gelişme şartları (sıcaklık, inkübasyon süresi, karbon-nitrojen oranı, pH, mineral tuzlar, vitaminler) (Broadbent ve diğ. 2003, De Vuyst ve Degeest 1999), bazal metabolizmada hücrelerin şeker nükleotid temini (Boels ve diğ. 2001, Levander ve diğ. 2002, Looijesteijn ve diğ. 1999), şeker katabolik yollarda genlerin ifade seviyesi, bakteriler tarafından kullanılan karbon çeşitliliği ve EPS üretiminde sorumlu genlerin ifade oranı etkili bulunmuştur

(Levander ve diğ. 2002, Svensson ve diğ. 2005). Üç farklı *Lactobacillus* suşundan EPS üretiminde, karbon kaynağı olarak glukoz ve laktoz kullanılmış, 32 ve 37 °C fermentasyon sıcaklığı uygulanmış ve sonuçta EPS üretim miktarında önemli bir değişiklik saptanmamıştır. Fakat EPS üretimi bu laktobasil suşları arasında değişkenlik göstermiştir (Audy ve diğ. 2010). Diğer bir çalışmada ise yoğurt starter kültürlerinin EPS üretiminin pH, sıcaklık ve inkübasyon süresine bağlı olarak değiştiği (Aslim ve diğ. 2005) ayrıca birkaç bakteriyel EPS için inkübasyon süresi boyunca EPS'nin degradasyonunun gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Cerning ve diğ. 1988, Cerning ve diğ. 1992). Uzayan fermentasyon süresince *L. rhamnosus* tarafından üretilen EPS'nin azalma nedeninin bu bakteri tarafından üretilen farklı glukohidrolazların fonksiyonundan kaynaklandığına bağlanmıştır (Pham ve diğ. 2000). Karbonhidrat kaynağı hem hücre büyümesi hem de EPS üretimi için gerekli enerjiyi sağlarken, biyokütle ve EPS öncüllerinin biyosentezi için karbonhidrat kaynağının bir kısmı kullanılır. Amino asitler, EPS üretimine doğrudan katılmazlar, ancak büyüme için gerekli olan karbon ve azot kaynakları olarak kullanılırlar. EPS üretimi *S. thermophilus*' da hücre gelişimi ile ilişkili olması (de Vuyst ve diğ. 1998) ve EPS üretiminin enerji gerektirmesi (de Vuyst ve diğ. 2001) yüksek karbonhidrat veya amino asit alımı EPS üretiminde avantaj olduğu düşünülmektedir. *S. thermophilus* LY03 sütte 600 mgL⁻¹ den az seviyede EPS üretirken, MRS ortamında karbon /nitrojen oranı ve kullanılan karbonhidrat kaynağına bağlı olarak EPS üretimi 1500 mgL⁻¹'ye ulaşmıştır (Degeest ve diğ. 2002).

LAB'lerde EPS üretimi genetik mühendisliği teknikleri ile de artırılmaya çalışılmıştır. Bu yöndeki ilk örneklerden birisinde *L. lactis* NIZO B40 suşunda eps üretimi ile ilişkili genleri taşıyan plazmittin kopya sayısı artırılmış ve hücresel EPS üretiminde dört kat artış sağlanmıştır. Lakin söz konusu düzenlenmiş suşların gelişim hızları düşmüştür (Boels ve diğ. 2003). *Lb.casei*'de EPS üretimini artırmak amacıyla EPS biyosentezinde yer alan kofaktörlerin etkisi araştırılmıştır. Bu doğrultuda *Streptococcus mutans*'tan NADH-oksidad (nox) kodlayan gen, *Lb.casei* LC2W'ye klonlanmış ve aşırı ifade edilmiştir. Rekombinant suş, doğal suştan daha yavaş gelişmesine rağmen, %46 daha fazla EPS üretmiştir (Stefanovic ve diğ. 2017).

Rekombinant düzenlenen mutantlardaki düşük gelişim hızı, bakterinin şeker havuzunda bulunan şeker nükleotidlerin EPS üretiminde kullanıldığına işaret

etmektedir. Bakteri şeker havuzu hücre duvarı biyosentezini içeren bakteriyel metabolik aktiviteler için de bir kaynak oluşturur (Boels ve diğ. 2003, MacedoLooijesteijn ve diğ. 1999, Ramos ve diğ. 2001). *L. casei* CG11'in gelişimi değişmeksizin EPS üretiminin artışı EPS biyosentezi için izoprenoid fosfat lipid taşıyıcısının kullanılabilir olmasından dolayı gerçekleştiği araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Cerning ve diğ. 1994). *S. thermophilus* LY03'de EPS üretiminde merkezi şeker katabolizmasının önemi ve rolü, söz konusu suşta UDP-pirofosforilazı kodlayan *galU* geni ile birlikte fosfoglukomutazı kodlayan *pgmA* geninin kopya sayısının artırılması EPS veriminde yaklaşık iki kat artış sağlanmıştır (Levander ve diğ. 2002). Yapılan bir çalışmada, EPS üreticisi LAB suşunda başlatıcı glukoziltransferazın aşırı ifadesi, EPS üretimini %15 artırmıştır (Van Kranenburg ve diğ. 1999).

Sonuç olarak LAB'de son EPS üretim verimini etkileyen en önemli faktörlerden birisi de kullanılan karbon kaynağıdır. Bununla beraber bazı LAB'ler kullanılan karbon kaynağına bağlı olarak farklı EPS yapıları üretebilirken (Cerning ve diğ. 1994) bazıları üretemezler (Degeest ve diğ. 2001). Bu durum, LAB'lerin *eps* operonlarında kodlanan glukoziltransferazın rolünden kaynaklanmaktadır. Diğer taraftan genetik mühendisliği teknikleri de LAB'lerde EPS üretiminin geliştirilmesi açısından fırsatlar sunmaktadır. Özellikle metabolik yol üzerinde yapılan değişiklikler olumlu sonuçlar vermiştir.

1.2.6 LAB'ler Tarafından Üretilen EPS'lerin Gıda Teknolojisi Açısından Önemi

Gıda sanayinde LAB'ler süt, et sebze ve tahıl gibi fermente gıdaların üretimlerinde standart ve güvenilir kalitede ürün elde etmek amacıyla starter kültür olarak kullanılır. Bu bakterilerin starter kültür olarak kullanılmasında ortamın asitlendirilmesinin yanında fonksiyonel diğer özellikleri ile teknolojik açıdan ürünlerin geliştirilmesi temel hedeftir. Starter kültürlerin fonksiyonel özelliklerine ilişkin örnekler; bakteriyosin üretimi ile ürünlerin mikrobiyal güvenliğinin sağlanması, çeşitli aroma bileşenleri üreterek ve proteolitik aktivite göstererek duyu özelliklerinin iyileştirilmesi ve EPS üreterek reolojik özelliklerin geliştirilmesidir. Gıda ortamında

EPS'lerin viskoziteyi artırıcı, yapıyı düzenleyici, su bağlayıcı, stabilize ve emülsiyeci özellikleri bulunmaktadır (Gallardo-Escamilla ve diğ. 2007). Ayrıca EPS'lerin gıdalarda yağ ve şekerlerin ikamesi için de kullanımı son yıllarda gündemdedir (Sandoval-Castilla ve diğ. 2004). LAB tarafından üretilen ve GRAS (genel olarak güvenli kabul edilen) statüsünde yer alan EPS'ler başta süt endüstrisinde olmak üzere, et ve sebze gibi çiğ gıda ürünlerinin fermantasyonunda endüstriyel ölçekte kullanılmaktadır (Leroy ve diğ. 2002, Ryan ve diğ. 2015).

LAB tarafından üretilen EPS'ler, yoğurt başta olmak üzere fermente süt ürünlerinin yapısal özelliklerini geliştirmektedir (Ryan ve diğ. 2015, Folkenberg ve diğ. 2006; Ramchandran ve Shah 2009, Mende ve diğ. 2013;). EPS'lerin süt ürünlerindeki sağladığı faydalar sırasıyla; yoğurdun viskozitesini geliştirir, yapıyı ve aromayı iyileştirir, fermantasyon süresi boyunca ve depolama sırasında sinerezisi önler ayrıca tekstürün oluşmasında, lezzetin algılanmasında, ağızdaki hissi ve istenilen yapının oluşmasında temel rol oynar (Gallardo-Escamilla ve diğ. 2007). Ayrıca EPS'ler peynirde yağ ikamesi olarak da fonksiyoneldir (Sandoval-Castilla vd., 2004).

Yoğurtta viskozite ve su tutma kapasitesi geliştirilerek ve serum ayrılması azaltılarak yapının geliştirilmesi amacı ile EPS üreticisi *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* suşları starter kültür olarak kullanılmaktadır (Badel ve diğ. 2011). Çeşitli çalışmalarda yoğurtta LAB'ler tarafından üretilen EPS'nin 45-350 mg L⁻¹ arasında olduğu rapor edilmiştir (Zannini ve diğ. 2016). Söz konusu üretilen bu EPS'lerin yoğurdun duyuşsal özellikleri üzerine raf ömrü süresince olumlu etkisi bulunmaktadır. Üç ticari EPS üreticisi kültürün kullanıldığı bir çalışmada (Feldmane ve diğ. 2013) kültürler MRS besiyeri, süt ve yoğurt ortamlarına inoküle edip EPS miktarı tayin edilmiştir. Yoğurtta EPS miktarı 144,08 mg L⁻¹ ile 440,81 mg L⁻¹ arasında bulunmuştur.

Ticari kültür ile birlikte EPS üreticisi *L. bulgaricus* B3 ve *S. thermophilus* W22 suşlarının kullanıldığı (%1,5) yoğurtlarda daha yüksek EPS üretimi tespit edilmiştir. Bu suşların kullanıldığı yoğurtların viskozite açısından daha kıvamlı olduğu belirlenmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise polisakkarit üreten kültürlerin kullanımı ile yoğurdun viskozitesinin önemli ölçüde arttığı belirlenmiş ve mukoz yapıda EPS üreten suşlarla yapılan yoğurtların izogenik kültürlerle üretilenlere göre viskozitelerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Hassan ve diğ. 2001). *S.*

thermophilus ST285 ve ST1275 suşlarını kullanarak, farklı sıcaklıklarda ürettikleri set tipi yoğurtların depolama süresi boyunca teknolojik ve reolojik özellikleri incelemiş, ST1275 suşu ile üretilen yoğurtların düşük sinerezis ve yüksek akış indeksine sahip olduğu belirlenmiştir.

EPS'lerin oldukça başarılı su tutma kapasiteleri nedeniyle düşük yağlı peynirlerin fiziksel ve duyuşsal özelliklerini geliştirmek amacı ile peynir teknolojisinde de geniş bir kullanım alanına sahiptir. Nitekim düşük yağlı peynirlerdeki sert ve esnek yapı ve yüksek ısıda erimeleri önemli bir dezavantajdır. Bu nedenle düşük yağ oranına sahip peynirlerde yüksek su tutma kapasitesine sahip EPS'lerin kullanımına yönelik çeşitli çalışmalar yürütülmüştür. *L. bulgaricus* MR-1R ve *S. thermophilus* MR-1C suşları tarafından sentezlenen EPS'lerin su bağlama özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, *S. thermophilus* MR-1C suşu tarafından üretilen kapsüller EPS'nin peynirin nem miktarını artırdığı tespit edilmiştir (Low ve diğ. 1998, Sandoval-Castilla ve diğ. 2004). Aynı şekilde EPS üreticisi *L. lactis* suşuyla üretilen yarım yağlı ceddar peyniri, tam yağlı ceddar peyniri ile aynı teknolojik özelliklere sahip olduğu bulunmuştur (Costa ve diğ. 2010).

EPS'ler yoğurt ve peynirin yanı sıra kefir, ekşi hamur gibi diğere bazı fermente süt ürünlerinin de reolojik özelliklerini iyileştirmektedir (Di Sabatino ve Corazza 2009). EPS üreten LAB'lerin kullanımı sadece fermente süt ürünlerinin üretimi ile sınırlı değildir. Örneğin LAB'ler tarafından üretilen EPS'ler çölyak hastaları için bir çözüm getirmektedir. Bilindiği üzere çölyak hastalığı, gluten alımı ile bireylerde genetik predispozisyona bağlı olarak ince bağırsakta inflamasyona ve malabsorpsiyona neden olan kronik otoimmün enteropatidir (Di Sabatino ve Corazza 2009). Bu hastalığın seyrinde ağrı, yorgunluk ve anemi görülmekte ve bu şikayetler sadece sıkı glutenden yoksun diyetlerle veya tıbbi beslenme terapileriyle yeterince kontrol edilebilir. Bu hastalar için üretilen glutensiz ekmeklerde ciddi tekstürel ve reolojik sorunlar yaşanmaktadır. Bu yapısal ve duyuşsal sorunların üstesinden gelebilmek için kullanılan katkı maddelerine olan tüketici tepkisi nedeniyle, LAB'ler tarafından üretilen EPS'ler doğal olmaları dolayısıyla dikkati çekmektedir. Özellikle EPS üreticileri kullanılarak yapılan fermentasyonlarda ortamda EPS birikimi sağlanmaktadır. Buna örnek olarak ekşihamur florasında bulunan *L. sanfranciscensis* suşunun levan ürettiği belirlenmiştir. Bugüne kadar ekmek üretiminde tespit edilen

EPS üreticisi LAB'lerin homopolisakkarit ürettikleri görülmüştür. Özellikle *Weissella* en fazla tespit edilen cinslerdir (Galle ve diğ. 2010). Glukan ve fruktan üreten LAB'lerle birlikte %12 sakkaroz ilavesi, ekşihamur fermentasyonunda teknolojik açıdan faydalı oranda (0.5-2 g kg⁻¹) EPS'nin üretilmesini sağlamıştır (Tieking vd., 2003). *L. reuteri* ekşihamur fermentasyonunda kullanılan EPS üreticisi laktobasillerdendir. Glukan ve fruktan üreten bu bakteri kullanılarak üretilen glutensiz ekmeklerin yumuşak ve daha uzun raf ömürlü oldukları tespit edilmiştir (Schwab ve diğ. 2008).

LAB'ler yüzyıllardır etlerin depolama ömrünü uzatabilmek için kullanılmaktadır. Özellikle LAB'ler sucuk gibi fermente et ürünlerinin temel florasını oluşturur. Bu bakteriler et ürünlerinde esasen asitlenmeyi sağlamakla birlikte duyuşal özelliklerin geliştirilmesinde ve tüketici güvenliğinin sağlanmasında rol almaktadır. LAB suşları tarafından üretilen EPS'lerin de bazı et ürünlerinde fiziksel yapının iyileştirilmesinde faydalı olabileceği öne sürülmüştür. Son yapılan bir çalışmada Dertli ve diğ. (2016) EPS üreticisi *L. plantarum* 162 R ve *L. mesenteroides* N6 suşlarını kullanarak sucuk üretimi yapmış ve sonuçta EPS üreticisi suşların sucuğun tekstürel özelliklerini iyileştirdiklerini, özellikle daha sıkı ve daha az yapışkan olduğunu belirtmiştir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

Bu tez çalışmasında Özel (2012) tarafından tarhana hamurundan izole edilmiş ve Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Kültür Koleksiyonunda (PUFECC) saklanan 1044 adet LAB izolatları kullanılmıştır. Söz konusu LAB izolatları MRS (Merck, Almanya) ve % 0,5 glukoz içeren M17 (Merck, Almanya) katı ve sıvı ortamlarında 30 °C’de 18 saat geliştirilmiştir. Hücre stokları besiyerinde gelişen kültürlerin üzerine %30 olacak şekilde gliserol ilavesi yapılarak hazırlanmış ve -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

2.2 Yöntem

2.2.1 LAB İzolatlarında Uzama Fenotipinin Belirlenmesi

LAB izolatlarında potansiyel EPS üreticilerinin belirlenmesi için, katı besiyeri üzerindeki kolonilerinin uzama özellikleri incelenmiştir. Bunun için LAB’ler ilk olarak -20 °C’den MRS ve %0,5 glukoz içeren M17 sıvı ortamında iki defa pasajlanarak aktifleştirilmiş, ardından aynı besiyerlerinin agarı üzerine çizme usulle inoküle edilmiştir. Hazırlanan petriyeler 30 °C’de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tek düşen kolonilere yavaşça steril bir kürdan ile temas edilmiş ve kürdanın çekilmesi ile uzama özelliğinin varlığı test edilmiştir. Kolonisi uzama özelliği gösteren izolatlar potansiyel EPS üreticileri olarak değerlendirilmiş ve daha sonraki çalışmalar için seçilmiştir. (Ruas-Madiedo ve Reyes-Gavilan, 2005).

2.2.2 EPS Üreticisi LAB izolatlarının Tanımlanması

Potansiyel EPS üreticisi olarak seçilen LAB izolatlarını nihai tanımlamak için, önce (GTG)₅ parmak izi analizi yapılmış ardından 16S rDNA dizi analizine göre tanımlamaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaların yürütülmesi için öncelikle söz

konusu izolatların genomik DNA'sı, hazır genomik DNA izolasyon kitinde (İnvitrogen, Thermo Fischer, ABD) belirtilen protokole göre elde edilmiştir.

Çalışmada seçilen 18 adet LAB izolatının (GTG)₅ profilleri (5-GTGGTGGTGGTGGTG-3) primeri kullanılarak oluşturulmuştur (Groenewald ve diğ. 2008, Scheirlinek ve diğ. 2008). Hücre genomu üzerinde (GTG)₅ tekrar serilerinin çoğaltılması için 20 µL PZR karışımı hazırlanmıştır. Bu karışıma 4 µL PZR Master Mix (5*FIREPol^R Master Mix/SOLIS Bio Dyne), 0,75 µL primer, 2 µL her bir bakterinin genomik DNA'sı konulmuş ve toplam hacim 20 µL'ye steril ultra saf su ile tamamlanmıştır. PZR işleminde 95 °C 3 dk ön denatürasyon, 30 çevrim 95 °C 1 dk, 45 °C 30 sn, 72 °C 10 dk protokol uygulanmıştır. PZR ürünleri %1'lik agaroz (Sigma, ABD) jelde yürütülerek, jel görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat, Fransa) oluşan bant profilleri görüntülenmiştir. Jel üzerinde (GTG)₅ bantlarının aldıkları mesafelere göre LAB izolatları benzerlikleri belirlenmiştir

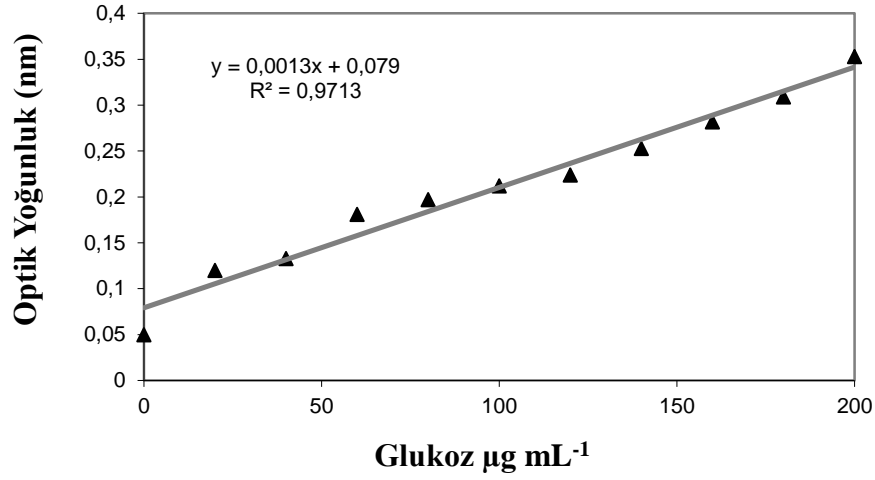
LAB izolatlarının tanımlanması için 16S rDNA geninin 1464 bp bölümü iki farklı primer çifti (529F-1491R ve 27F-780R) kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır. PZR karışımı 5 µL tampon, 2 µL dNTP karışımı (Fermentas, Thermo Scientific, ABD), 1'er µL (529F 5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3', 1491R 5'ACGGCTACCTTGTACGACTT-3' ve 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' - 780R 5'-TACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3') ileri ve geri yönlü primer, 1 µL Hi-Fi Taq DNA polimeraz (Fermentas, Thermo Scientific, ABD) ve 2 µL genomik DNA'dan oluşturulmuştur ve toplam hacim 50 µL'ye tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan tüplere PZR cihazında (Techne, UK) 95°C'de 3 dk başlangıç denatürasyonunu takiben 30 döngü 95°C'de 30 sn, 57°C'de 30 sn, 72°C'de 1 dk ve son aşamada ise 72°C'de 5 dk içeren bir program uygulanmıştır.

PZR ile çoğaltılan fragmentlerin doğruluğu ve saflık kontrolü %1 agaroz jelde (Sigma, ABD) yürütülerek izlenmiştir. Doğru büyüklükte ve saflıktaki PZR fragmentlerin PZR saflaştırma kiti (İnvitrogen, Thermo Scientific, ABD) ile temizliği yapıldıktan sonra, MACROGEN tarafından DNA dizi analizi yapılmıştır. Çalışmada bakterilerden elde edilen fragmentlerin DNA dizileri EMBL veri tabanında taranarak nihai tanımlanmıştır.

2.2.3 *Lactobacillus plantarum* Suşları Tarafından Üretilen EPS'nin Saflaştırılması ve Miktar Analizi

-20 °C de muhafaza edilen EPS üreticisi *L. plantarum* suşları ilk olarak 5 mL'lik MRS sıvı besiyerinde 30 °C'de 24 saat iki kez aktifleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürler 6000 g'de 30 dk santrifüj edilmiş, kültür üst sıvısı toplanmıştır. Kültür üst sıvısına hacmi kadar soğuk etanol ilave edilip 4 °C'de bir gece bekletilmiştir. Takiben 6000 g'de 30 dk santrifüjden sonra çöktürülen EPS 10 mL dH₂O'da çözündürülmüş ve hacminin 2 katı kadar soğuk etanol ilave edilip 1 gece 4 °C'de tutulmuştur. Tekrar 6000 g'de, 30 dk santrifüjlenmiş, elde edilen pelet 5 mL dH₂O'da çözündürülmüş, son hacimde %15 olacak şekilde %100'lük trikloroasetik asit (TCA) eklenmiş, 4 °C'de 3-4 saat çalkalanmıştır. Ardından 6000 g'de 30 dk ile safsızlık ve proteinler uzaklaştırılmıştır. Elde edilen üst sıvının pH'sı, 5M NaOH ile 7'ye ayarlanmış ve üzerine hacminin 5 katı kadar soğuk etanol ilavesi yapılarak 4 °C'ye bırakılmıştır. Son aşamada, 6000 g'de 30 dk santrifüj sonunda çöken pellet (EPS) 3-5 mL saf suyla kazanılmıştır (Dertli 2013, Pingitore ve diğ. 2016).

L. plantarum suşları tarafından üretilen EPS'lerin izolasyonundan sonra, EPS miktarı analizi fenol-sülfirik asit yöntemine göre yapılmıştır (Dubois ve diğ. 1956). Bu yöntemde 96'lık mikropłaka kuyularına 50 µL örnek üzerine, 150 µL %96'lık sülfirik asit ilavesi yapılmış, EPS örnekleri yakılarak monosakkarit birimlerine indirgenmiştir. Daha sonra kuyulara 30 µL %5'lik fenol ilave edilmiş ve 5 dk inkübe edilmiştir. Son aşamada mikropłakalar ELISA okuyucuya (Multiscan, Thermo Scientific, ABD) konulmuş, 494 nm dalga boyunda tarama yapılmıştır. LAB suşları tarafından üretilen EPS miktarı (µg mL⁻¹) Şekil 2.1'de verilen standart glikoz eğrisi ve denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. Glikoz eğrisi, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan glikoz solüsyonlarının yukarıdaki fenol-sülfirik asit yöntemine göre optik yoğunluğu hesaplanarak oluşturulmuştur.



Şekil 2.1: Glikoz standart eğrisi

2.2.4 *Lactobacillus plantarum* Suşlarında EPS Üretimine Farklı Faktörlerin Etkisinin Belirlenmesi

L. plantarum suşlarında EPS üretimi üzerine etkili faktörlerin belirlenmesi için, -20°C’de muhafaza edilen suşlar, MRS sıvı besiyerinde 30°C’de 18 saat iki kez aktifleştirilmiştir. *L. plantarum* suşlarının EPS üretimine inkübasyon sıcaklığı, farklı karbon kaynağı, ortam pH’sı ve inkübasyon süresinin etkileri araştırılmıştır (Tallon ve diğ. 2003, Pingitore ve diğ. 2016).

İnkübasyon sıcaklığının söz konusu suşlarda EPS üretimine etkisini belirlemek için aktif *L. plantarum* suşları MRS sıvı ortamlarına aşılınmış ve 20, 30 ve 37 °C’de 18 saat inkübe edilmiştir. Aynı suşların farklı karbon kaynaklarındaki EPS üretiminin belirlenmesi için, MRS sıvı besiyeri içerisindeki glukoz yerine sırasıyla sakkaroz, maltoz, laktoz ve fruktoz şekerlerinden %2 oranında kullanılmıştır. Farklı karbon kaynakları ile hazırlanan modifiye MRS sıvı ortamında *L. plantarum* suşları 30 °C’de 18 saat geliştirilmiştir. Diğer taraftan ortam pH’sının EPS üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi için, *L. plantarum* suşları pH’sı sırasıyla 4, 5, 6 ve 7’ye ayarlanmış MRS sıvı ortamlarında 30 °C’de 18 saat çoğaltılmıştır. Son olarak *L. plantarum* suşlarında

EPS üretiminin inkübasyon süresi ile ilişkisinin belirlenmesi için, MRS sıvı ortamında suşlar 24, 36 ve 48 saat inkübe edilmiştir.

Yukarıda tanımlanan farklı koşullarda geliştirilen *L. plantarum* suşları tarafından üretilen EPS miktarının belirlenmesi Kısım 2.2.3'te anlatıldığı şekilde fenol-sülfirik asit yöntemi ile belirlenmiştir.

2.2.5 Fermentör Sisteminde *Lactobacillus plantarum* Suşlarından EPS'nin Üretilmesi

Büyük ölçek EPS üretimi için, *L. plantarum* suşları fermentör (Minifors, İsviçre) sisteminde modifiye BHI substratında geliştirilmiştir. EPS üretimi için kullanılan modifiye BHI ortamının bileşimi Tablo 2.1'de gösterilmiştir. *L. plantarum* suşları fermentöre aşılardan önce 5 mL BHI besiyerinde bir gece 30 °C'de geliştirilmiş, ardından fermentöre aşılama için yetecek kadar hacimde (20 mL) hücreler tekrar çoğaltılmıştır. Fermentör sistemi *L. plantarum* suşlarından EPS üretimi için 30 °C'de ve 100 rpm karıştırma hızında çalıştırılmıştır. Ayrıca ortamın asitleşmesi ile birlikte 3N NaOH kullanılarak pH 6'ya ayarlanmıştır. Bu koşullarda 24 saat fermentasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra fermentör durdurulmuş ve hücre kültürü alınarak önce bakteri biyokütlesinin yüksek kapasiteli santrifüjle ayrılması sağlanmış ardından Kısım 2.2.3'de anlatıldığı şekilde EPS saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Büyük hacimde üretilerek, saflaştırılan EPS'ler son aşamada 200 mTorr vakum altında liyofilize (Modulyo, Thermo Scientific, ABD) edilmiştir.

Tablo 2.1: Modifiye BHI besiyeri (1 litre için) (İspirli 2016)

BHI Besiyeri	37 g
Tween 20	1 g
MgSO ₄	0.2 g
Sodyum Asetat	5 g
D-Glikoz	8 g
Sükroz	20 g

2.2.6 *Lactobacillus plantarum* Suşlarından Üretilen EPS'lerin Reolojik Özelliğinin Belirlenmesi

L. plantarum suşları tarafından üretilerek saflaştırılan EPS'ler, liyofilize edildikten sonra pH'sı 3, 4, 6 ve 7'ye ayarlanmış 3 mL suda 30 mg EPS çözüldürülmüş ve 25 °C'de reometrede (Haake Mars, Thermo Scientific, ABD) 2 dk süresince ölçüm gerçekleştirilmiştir. 50⁻¹ sn'deki ölçümler dikkate alınarak EPS'lerin kayma gerilimine göre vizkozitesi (Pa.s) hesaplanmıştır. Benzer şekilde dH₂O'da çözüldürülen EPS'ler, 25, 45 ve 60 °C sıcaklıklarda reometrede analiz edilmiştir (Wang ve diğ. 2015).

2.2.7 *Lactobacillus plantarum* Suşları Tarafından Üretilen EPS'lerin Termal Özelliklerinin Belirlenmesi

L. plantarum suşları tarafından üretilen EPS'lerin piroliz ve yanma özellikleri Perkin-Elmer Diamond (TG/DTA) cihazında, azot gazı ortamında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla liyofilize edilmiş örnekler darası alınmış seramik kaplara 3 mg EPS doldurulmuş ve 10 °C dk⁻¹ ısıtma hızında 50-1000 °C'ye ısıtılarak tarama yapılmıştır. Analizde EPS'nin ısıtma ile birlikte kütle kaybı (%) ve derivatif kütle (%/°C) değerleri belirlenmiştir (Wang ve diğ. 2015).

2.2.8 *Lactobacillus plantarum* Suşları Tarafından Üretilen EPS'lerin Şeker İçeriğinin Belirlenmesi

Üretilen toz haldeki EPS'lerden 1 g ağız kapaklı tüplere tartılmış ve 0,5 M 25 mL sülfirik asit ilavesiyle 12 saat boyunca 95 °C sıcaklıkta hidrolizasyona uğratılmıştır. Oda sıcaklığında soğutulma işleminden sonra 4 M NaOH ile nötrale edilip son hacim 30 mL'ye tamamlanmıştır. Ardından tüpler 1600 g'de 10 dk santrifüj edilmiş, üst sıvı 0,45 µm şırınga filtrelerden geçirilerek safsızlıkları giderilmiştir. Hazırlanan örnekler refraktif indeks dedektörüne sahip yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC-RID, Shimadzu, Japonya) sistemine 20 µL olarak enjekte edilmiştir. Kolon olarak CARBOsep CHO-682 Pb Column kolon kullanılmıştır. Hareketli faz olarak su kullanılmış ve kolon sıcaklığı 25 °C'de sabit tutulmuştur.

Örneklerin şeker içerikleri daha önceden hazırlanmış kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplanmıştır (de Vuyst ve diğ. 2002).

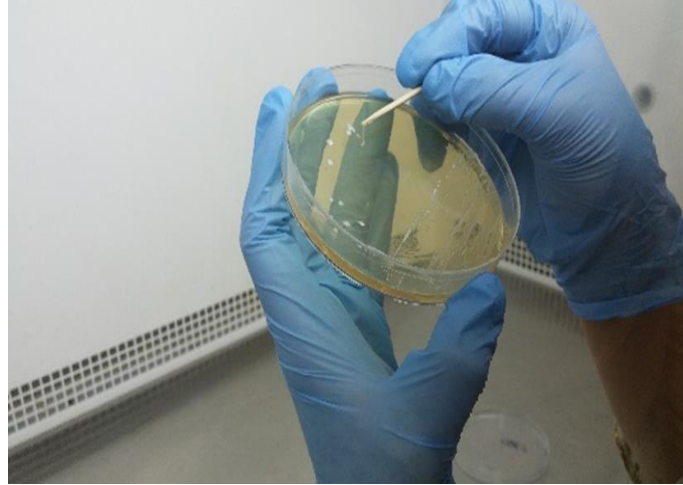
2.3 İstatistiksel Analiz

Çalışmada Minitab paket programında one-way ANOVA testi kullanılarak, *L. plantarum* suşlarında EPS üretimi üzerine çevresel faktörlerin etkisinin karşılaştırılması için istatistiki analizler yapıldı. Örnekler arasındaki farkı karşılaştırmak amacıyla Tukey's testi uygulandı ($p < 0.05$).

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 EPS üreticisi izolatlarının seçilmesi

Bu çalışmada Özel (2012) tarafından tarhana fermentasyonunda LAB çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla izole edilen 1044 adet izolat kullanılmıştır. Bu izolatlar arasında EPS üretim yeteneği olanlar, besiyeri üzerinde gelişen kolonilerinin uzama özelliği göstermelerine göre belirlenmiştir. Buna göre Şekil 3.1’de görüldüğü gibi 18 adet izolat uzama özelliği göstermiştir. Bu izolatlar arasında PFC308, PFC309, PFC310, PFC311, PFC312, PFC313 kodluların oldukça belirgin uzama özelliklerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen toplam izolatların %1,7’sinin kolonisi uzama davranışına sahip bulunmuştur. Bakterilerde EPS üretim özelliklerinin belirlenmesinde koloni uzama fenotipinin araştırılması pratik uygulamalardan birisidir. Ancak bu teknikle birlikte sadece bakterilerde uzama özelliği gösteren EPS’ler tespit edilmektedir (Ruas-Madiedo ve Reyes-Gavillan 2005). Nitekim uzama özelliği göstermeyen EPS üreticileri de bulunmaktadır. Buna göre tarhana fermentasyonundan izole edilen bakteriler arasında EPS üreticisi sayısı az bulunsa da, %1,7’si tarhana’da uzama özelliği gösteren EPS üreticileri olduğu dikkate alınmalıdır.

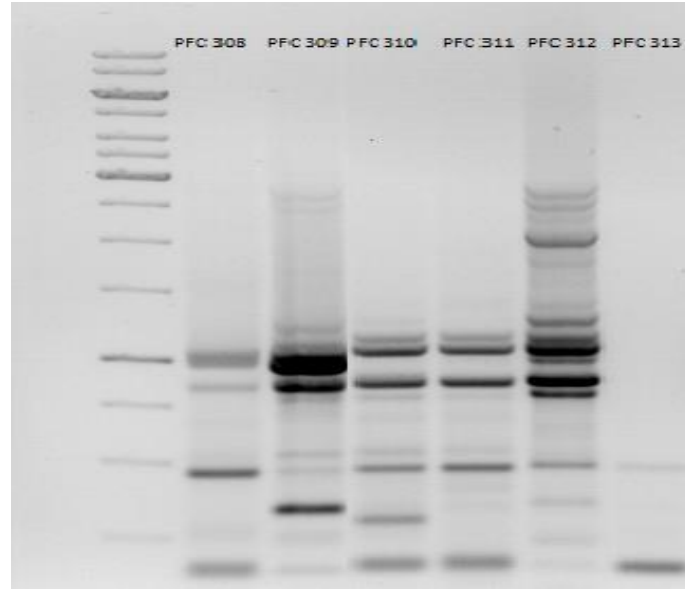


Şekil 3.1: PFC311 izolatı kolonisinin agar üzerindeki uzama görüntüsü

3.2 EPS Üreticisi LAB İzolatlarının Tanımlanması

Çalışma kapsamında iyi uzama özellikleri gösteren izolatların (GTG)₅ parmak izleri belirlenmiş ve ardından 16S rDNA bölgelerinin DNA dizisi çıkarılarak, nihai tanımlanmıştır.

Koloni taraması sonucunda EPS üreticisi olarak seçilen 18 adet LAB izolatının (GTG)₅ profil çeşitliliği Şekil 3.2’de gösterilmiştir. Buna göre izolatlar (GTG)₅ profillerine göre 6 grupta toplanmıştır. En fazla bant sayısı PFC312, en az ise PFC313 suşlarında olduğu izlenmiştir. İzolatlar arasında özellikle 1000 bç bölgesinde benzer (GTG)₅ bantlarının bulunduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.2: Uzama özelliği gösteren LAB izolatlarının (GTG)₅ profilleri

18 adet LAB izolatlarının tanımlanması 16S rDNA bölgesinin 1464 bç kısmı taranarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için merkezde üst üste bölgeleri de tarayan iki çift primerler (529F-1491R ve 27F-780R) kullanılarak 16S rDNA bölgesi çoğaltılmıştır. PZR sonunda beklendiği gibi tüm izolatlardan 962 bç ve 753 bç fragmentler çoğaltılabildiği görülmüştür. Bu aşamadan sonra fragmentlerin DNA dizisi analizi gerçekleştirilmiş ve söz konusu diziler birleştirilerek 1464 bç’lik 16S rDNA bölgesinin bütün kısmına ulaşılmıştır. Ardından tüm izolatlara ait DNA dizileri NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) üzerinden tarandığında Tablo 3.1’de özetlenen sonuca ulaşılmıştır.

Tablo 3.1: LAB izolatlarının 16S rDNA homolojisi ve tanımlama sonuçları

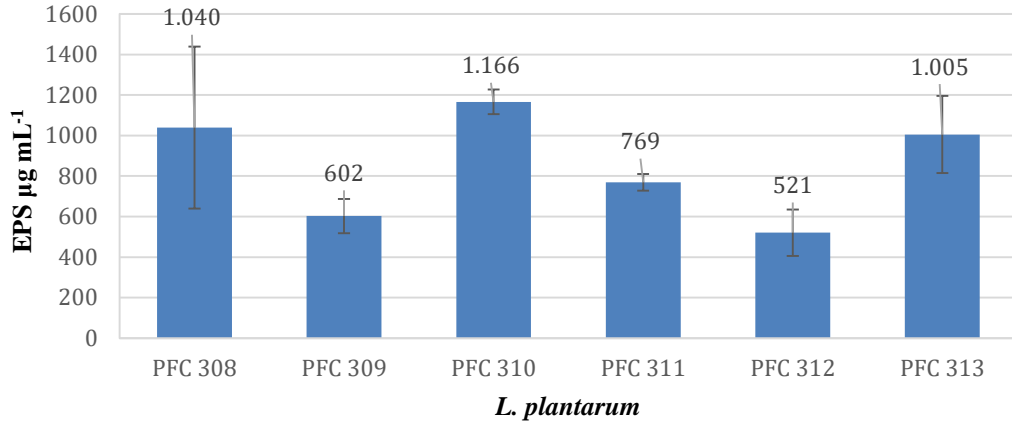
İzolat No	Homoloji (%)	Tanımlama Sonucu
3CL25	96	<i>Lactobacillus brevis</i>
10BL13	100	<i>Lactobacillus plantarum</i>
0EL12	99	<i>Lactobacillus plantarum</i>
1KL5	99	<i>Staphylococcus warneri</i>
15BL9	99	<i>Lactobacillus plantarum</i>
3EL26	99	<i>Lactobacillus plantarum</i>
5HL13	100	<i>Enterobacter cloacae</i>
3CL1	99	<i>Lactobacillus brevis</i>
1CL29	99	<i>Lactobacillus brevis</i>
3GL23	99	<i>Lactobacillus plantarum</i>
0FL20	99	<i>Lactobacillus plantarum</i>
15BL8	100	<i>Lactobacillus plantarum</i>
3HL11	99	<i>Lactobacillus plantarum</i>
5CL11	100	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
1FL26	99	<i>Staphylococcus warneri</i>
3H21	100	<i>Staphylococcus warneri</i>
5FL15	100	<i>Enterobacter cloacae</i>
15EL4	100	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

Tablo 3.1’den anlaşıldığı üzere izolatlar en az %96 benzerlikle tanımlanmıştır. Bu izolatlardan 8 adedi *L. plantarum*, 3 adedi *L. brevis*, 3 adedi *S. warneri*, 2 adedi *E. cloacae*, ve 2 adedi de *S. epidermidis* ile benzer bulunmuştur. Bu sonuçlar tarhana fermentasyonunun mikroflorası için yapılan çalışmalar ile uyumludur (Şengün ve diğ. 2009, Settanni ve diğ. 2011). Nitekim *L. plantarum* birçok fermente gıdaların mikroflorasının temel üyelerinden birisidir. Özellikle bu türün büyük bir genom yapısına sahip olması nedeniyle adaptasyon gücünün yüksek olduğu daha önce belirtilmiştir. Bu türün genom analizleri sonucunda birçok şekerin katabolizması ile ilişkili büyük bir bölgenin bulunması, *L. plantarum*’da fermentasyonda adaptasyon gücü ile ilişkilendirilmiştir (Makarova ve diğ. 2006, Makarova ve Koonin 2007). EPS üreticisi *L. plantarum* suşlarının birçok fermente gıdanın fermentasyonun izole edildiği rapor edilmiştir (Leroy ve de Vuyst 2004, De Vries ve diğ. 2006).

3.3 *Lactobacillus plantarum* suşlarının EPS üretim miktarları

En yüksek uzama özelliği gösteren farklı (GTG)₅ profiline sahip olan ve tanımlanan LAB suşlarının besiyerinde ürettikleri EPS’ler, fenol sülfürik asit yöntemi

ile ekstrakte edilerek miktar analizi yapılmıştır. Buna göre çalışılmaya devam edilen 6 adet *L. plantarum* suşları, 521-1166 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aralığında EPS üretmiştir. En yüksek EPS üretimi *L. plantarum* PFC310, en düşük ise *L. plantarum* PFC312 suşlarında tespit edilmiştir (Şekil 3.3). Bu sonuçlar literatür verileri ışığında söz konusu *L. plantarum* suşlarının orta düzeyde üreticiler olduklarını göstermiştir. Nitekim bugüne kadar yapılan çalışmalarda LAB'lerde EPS üretiminin suşa bağlı olarak farklı seviyelerde olduğu görülmüştür (Welman ve Maddox 2003; Ruas-Madiedo ve Reyes-Gavillan 2005; Harutoshi 2013; Torino ve diğ. 2015; Caggianiello ve diğ. 2016). LAB'lerde homopolisakkarit üretimi en yüksek 11-16 g L^{-1} olarak tespit edilirken, en yüksek heteropolisakkarit *L. rhamnosus* RW-9595M (2775 mg L^{-1}) (Macedo ve diğ. 2002) ve *L. kefiranofaciens* WT-2B (2500 mg L^{-1}) (Maeda ve diğ. 2004) suşlarında üretildiği tespit edilmiştir. Bunların dışında *L. lactis* subsp. *cremoris* (80–600 mg L^{-1}), *S. thermophilus* (50–350 mg L^{-1}), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (60–150 mg L^{-1}), *L. casei* (50–60 mg L^{-1}) (Cerning 1995), ve *L. plantarum* (140 mg L^{-1}) (Tsuda ve Miyamoto 2010) suşlarında daha düşük heteropolisakkarit üretilmiştir.



Şekil 3.3: *L. plantarum* suşları tarafından üretilen EPS miktarı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

3.4 *Lactobacillus plantarum* suşlarında EPS üretimi üzerine inkübasyon sıcaklığı, karbon kaynağı, pH ve inkübasyon süresinin etkisi

L. plantarum suşlarında yüksek EPS üretimine ulaşmak için ve bu suşlarda EPS üretiminin teknolojik açıdan değerlendirmek amacıyla, söz konusu suşların EPS

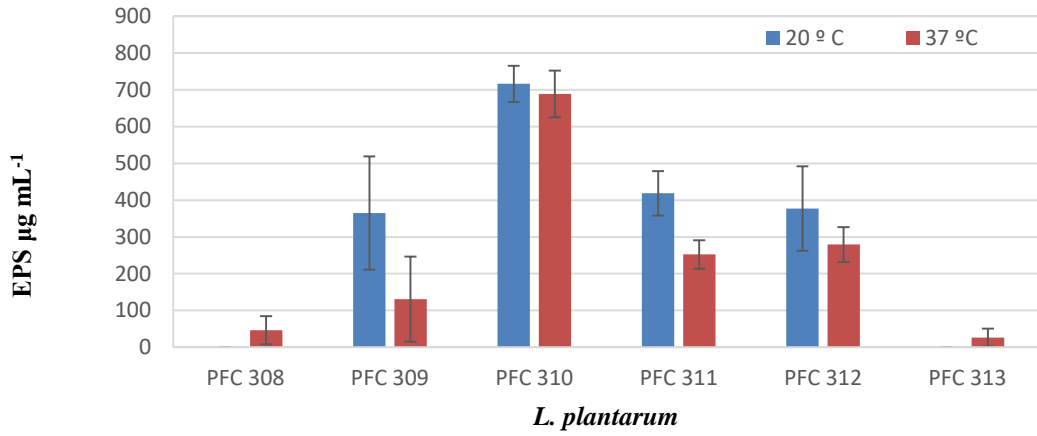
üretimi farklı inkübasyon sıcaklığı, karbon kaynağı olarak şeker farklılığı, ortamın pH'sı ve inkübasyon süresi faktörleri kullanılarak araştırılmıştır.

20 °C'de *L. plantarum* PFC308 ve *L. plantarum* PFC313 suşlarında herhangi bir EPS üretimi tespit edilmemiştir. Bu inkübasyon sıcaklığında en yüksek EPS, *L. plantarum* PFC310 suşu tarafından üretilmiştir. *L. plantarum* PFC309, PFC311 ve PFC312 suşlarında ise aynı miktarlarda EPS üretimi gerçekleşmiştir. İnkübasyon sıcaklığı 37 °C'ye çıkarıldığında *L. plantarum* PFC310 en yüksek miktarda EPS'yi üretmiştir. Bunu *L. plantarum* PFC311 ve PFC312 suşları takip etmiştir (Şekil 3.4).

L. plantarum PFC310'da her iki inkübasyon sıcaklığında üretilen EPS miktarında farklılık bulunmamıştır. Ancak *L. plantarum* PFC309, PFC311 ve PFC312 suşlarında 20 °C'de 37 °C'ye kıyasla daha fazla ($p<0.05$) EPS üretilmiştir. *L. plantarum* suşlarının 30 °C'deki EPS üretimi (Şekil 3.3) 20 ve 37 °C'deki üretimleri ile birlikte değerlendirildiğinde (Şekil 3.4), 30 °C'de üretimin daha yüksek ($p<0.05$) olduğu anlaşılmıştır. Tüm suşlarda inkübasyon sıcaklığının 37 °C'ye yükseltilmesi durumunda EPS üretimi miktarı düşmüştür. *L. plantarum* suşları mezofilik karakterde olduğundan hücre sistemlerindeki enzimler mezofilik koşullara adapte edilmiştir. Bu çalışmada denenen *L. plantarum* suşlarının inkübasyon sıcaklıklarına göre EPS üretim davranışları da bununla ilişkilidir. Pingitore ve diğ. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada *L. plantarum* Q823 suşunun inkübasyon sıcaklığının 30 °C'den 37 °C'ye yükseltildiğinde EPS üretimi 10 kat azalmıştır. Başka bir çalışmada *L. plantarum* EP56 suşunda EPS üretimi en yüksek 18 °C'de tespit edilirken, sıcaklığın 37 °C'ye çıkarılmasıyla EPS üretimi düşmüştür. Bu suşta 30 °C'de EPS üretimi 75,6 mg L⁻¹ olarak ölçülmüştür (Tallon ve diğ. 2003).

Tez kapsamında üzerinde çalışılan *L. plantarum* suşlarının inkübasyon sıcaklığına göre EPS üretim davranışları endüstriyel açıdan değerlendirildiğinde, 20 ve 30 °C'de 37 °C'ye göre daha fazla EPS'nin üretilmesi önemli bir sonuçtur. Özellikle söz konusu *L. plantarum* suşlarının tarhana fermentasyonundan izole edilmesi ve tarhananın da oda koşullarında (yaklaşık 22-25 °C) fermente edildiği dikkate alındığında bu özelliğin *L. plantarum* suşlarının tarhana fermentasyonunda EPS üretebilebileceği sonucuna varılabilir. Diğer taraftan *L. plantarum* PFC310 suşunun denenen tüm inkübasyon sıcaklıklarında da yüksek miktarda EPS üretebilmesi, bu suş

çeşitli fermente gıdaların üretiminde starter kültür olarak kullanılması açısından ön plana çıkmıştır.



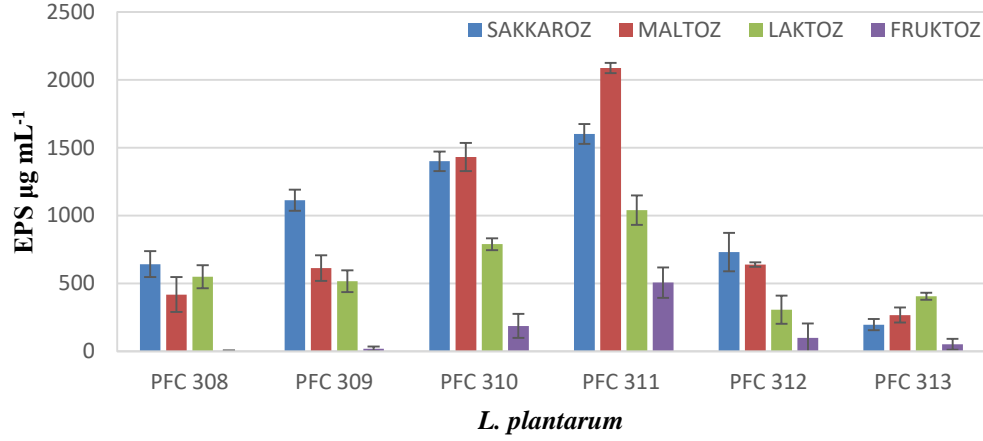
Şekil 3.4: *L. plantarum* suşlarının EPS üretimine farklı inkübasyon sıcaklıklarının etkisi

L. plantarum suşlarının farklı şeker tiplerinin EPS üretimine etkisini belirlemek için, sakkaroz, maltoz, laktoz ve fruktoz MRS besiyerinde glukoz yerine kullanılmıştır. *L. plantarum* suşlarında EPS üretimi karbon kaynağına göre farklılık göstermiştir. *L. plantarum* PFC308, PFC309 ve PFC312 suşlarında sakkaroz şekerinin bulunması durumunda en yüksek miktarda EPS üretilmiştir. Buna karşın *L. plantarum* PFC310 ve PFC311 suşlarında ise maltozun bulunması durumunda en yüksek oranda EPS tespit edilmiştir. *L. plantarum* PFC313 suşunda ise diğerlerinden farklı bir şekilde laktoz varlığında en yüksek EPS üretimi saptanmıştır. Tüm *L. plantarum* suşlarında en düşük miktarda EPS üretimi fruktoz varlığında ölçülmüştür (Şekil 3.5).

Besiyerinde farklı şeker kullanılmasına bağlı olarak *L. plantarum* suşları arasında en yüksek EPS üretimi *L. plantarum* PFC311 suşunda maltoz varlığında 2086 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak üretilmiştir ($p < 0,05$). Aynı suшта laktoz varlığında 1601 $\mu\text{g mL}^{-1}$ EPS üretimi gerçekleşmiştir. Glukoz varlığında en yüksek EPS üretimi (Şekil 3.3) tespit edilen *L. plantarum* PFC310 suşunda ise sakkaroz ve maltoz şekerlerinin kullanılması durumunda eşit düzeyde (1400 ve 1431 $\mu\text{g mL}^{-1}$) EPS üretilmiştir (Şekil 3.5). Bu iki suшта glukoz varlığına göre sakkaroz ve maltoz ile birlikte daha fazla EPS üretimi tespit edilmiştir. Özellikle dikkati çeken diğer bir sonuç disakkarit bulunması durumunda *L. plantarum* suşlarında daha fazla EPS üretilmesidir. *L. plantarum* EP56'da EPS üretimine karbon kaynağının etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, en yüksek EPS üretimi laktoz şekerinin varlığında bunu ise sakkaroz şekeri takip etmiştir (Tallon ve

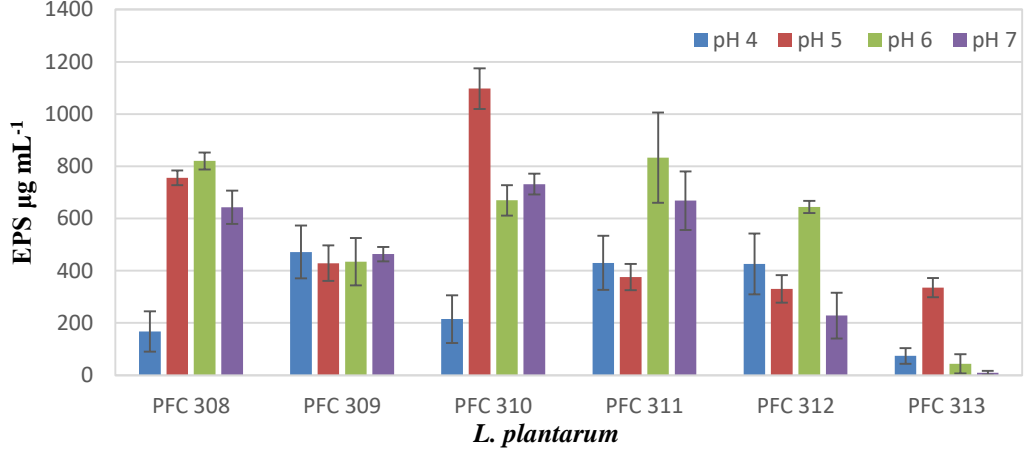
diğ. 2003). Benzer şekilde *L. plantarum* MTCC9510 suşunda en yüksek EPS laktoz varlığında üretilmiştir (Ismail ve Nampoothiri 2010).

Teknolojik açıdan *L. plantarum* suşlarının özellikle sakkaroz ve maltoz bulunması durumunda daha fazla EPS üretilmesi özellikle tahıl bazlı fermente gıdaların üretilmesi açısından önem taşımaktadır. Çünkü ortamda bulunan maltoz kullanılarak yüksek miktarda EPS üretilmesi mümkündür.



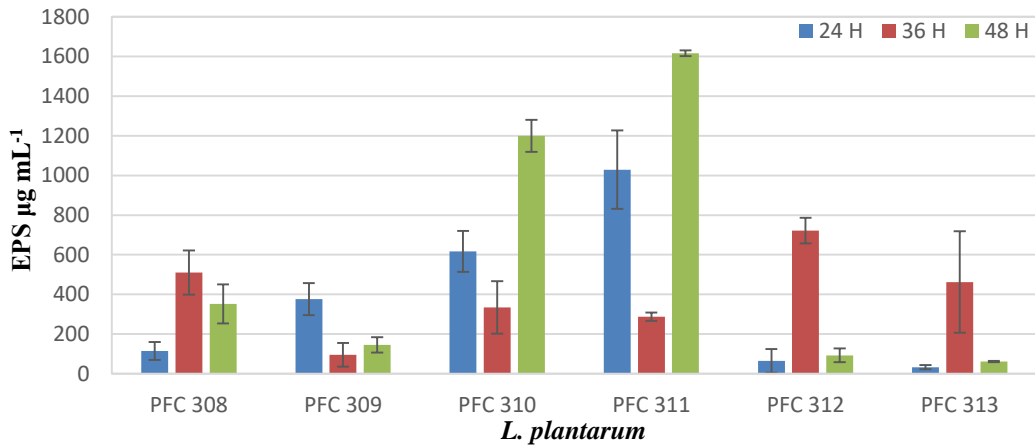
Şekil 3.5: *L. plantarum* suşlarının EPS üretimine farklı karbon kaynaklarının etkisi

L. plantarum suşlarında EPS üretimi ortam pH'sından etkilenmiştir (Şekil 3.6). Suşlarda EPS üretimi genellikle nötr pH değerlerinde daha yüksek tespit edilmiştir. Sadece *L. plantarum* PFC309 suşunda denen pH değerlerinde eşit düzeyde EPS üretimi izlenmiştir. Ayrıca tüm suşlarda EPS üretimi bakımından pH 5 ve 6'nın verimli olduğu görülmüştür. Nitekim *L. plantarum* PFC310 ve PFC313 suşlarında pH 5'de en yüksek ($p < 0.05$) EPS üretilmiştir. Diğer taraftan *L. plantarum* PFC308, PFC311 ve PFC312'de en yüksek EPS üretimi ($p < 0.05$) pH 6'da gerçekleşmiştir. *L. plantarum* suşlarında en yüksek EPS üretiminin nötr pH değerlerinde gerçekleşmesi hücrelerin gelişim fizyolojisi ile yakından ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Nitekim hücre sayısının artması ortamda EPS birikimini de artırmaktadır. LAB'lerin fizyolojik gelişme pH'ları 5 ila 6 aralığındadır (Welman ve Maddox, 2003; Ruas-Madiedo ve Reyes-Gavillan 2005; Harutoshi 2013; Torino ve diğ. 2015; Caggianiello ve diğ. 2016). Dolayısıyla *L. plantarum* suşlarında EPS biyosentezinden sorumlu enzimlerin de söz konusu pH değerlerinde stabil ve fonksiyonel oldukları ifade edilebilir. Karbon kaynağı olarak laktozun kullnıldığı bir çalışmada, ortam pH'sının artışı ile birlikte *L. plantarum* MTCC9510 suşunda EPS üretimi artmıştır (Ismail ve Nampoothiri 2010).



Şekil 3.6: *L. plantarum* suşlarının EPS üretimine ortam pH'sının etkisi

L. plantarum suşlarında inkübasyon süresi ile EPS üretimi arasında anlamlı ilişki kurulamamıştır (Şekil 3.7). Çünkü *L. plantarum* PFC308, PFC312 ve PFC313 suşlarında en yüksek EPS miktarı 36 saat inkübasyon sonunda belirlenmiştir. Ancak *L. plantarum* PFC310 ve PFC311 suşlarında ise 48 saat sonunda en yüksek EPS tespit edilmiştir. Ayrıca bu suşlarda 24 saat sonra EPS üretimi 36. saate kıyasla daha fazla bulunmuştur. Diğer bir farklı durum da *L. plantarum* PFC309 suşunda gözlenmiştir. Bu suşta 36 ve 48 saat inkübasyondan sonra düşük EPS miktarı belirlenmiştir (Şekil 3.7). Yapılan çalışmalar LAB'lerde EPS üretiminin hücre biyokütlesi ile doğrusal olduğunu göstermiştir. Ancak bu bulgular söz konusu bilgiyi destekler nitelikte değildir. Kısaca inkübasyon süresi EPS üretimini suşa bağlı olarak etkilemiştir.



Şekil 3.7: *L. plantarum* suşlarında EPS üretimine farklı inkübasyon sürelerinin etkisi

3.5 *Lactobacillus plantarum* suşları tarafından EPS üretimi ve EPS'lerin Saflaştırılması

L. plantarum suşları tarafından üretilen EPS'lerin karakterizasyonu için, söz konusu üretici suşlar 2 L biyoreaktör (Minifors, İsviçre) hacminde, modifiye BHI ortamında 18 saat pH 6'da geliştirilmiş ve üretilen EPS'ler saflaştırılarak liyofilize edilmiştir (Şekil 3.8 ve 3.9). Biyoreaktör ortamında *L. plantarum* suşları tarafından üretilen EPS'lerin ve biyokütle miktarları Tablo 3.2'de gösterilmiştir. Buna göre en fazla miktarda EPS *L. plantarum* PFC311 suşunda üretilmiştir. LAB türlerinde değişen seviyelerde EPS üretilmektedir. *L. plantarum* suşlarında bugüne kadar rapor edilen EPS üretim miktarı 59-599 mg L⁻¹ arasında değiştiği rapor edilmiştir (Wang ve diğ. 2017). Buna göre tez kapsamında kullanılan suşların bu aralıklarda EPS ürettiği görülmüştür. Ayrıca suşlar arasında EPS üretimi bakımından kıyaslama yapıldığında *L. plantarum* PFC311 endüstriyel ölçekte EPS üretimi bakımından önerilebilir.



Şekil 3.8: PFC312 Suşunun fermentörde üretimi ve liyofilize görüntüsü



Şekil 3.9: Tüm EPS'lerin liyofilize görüntüsü

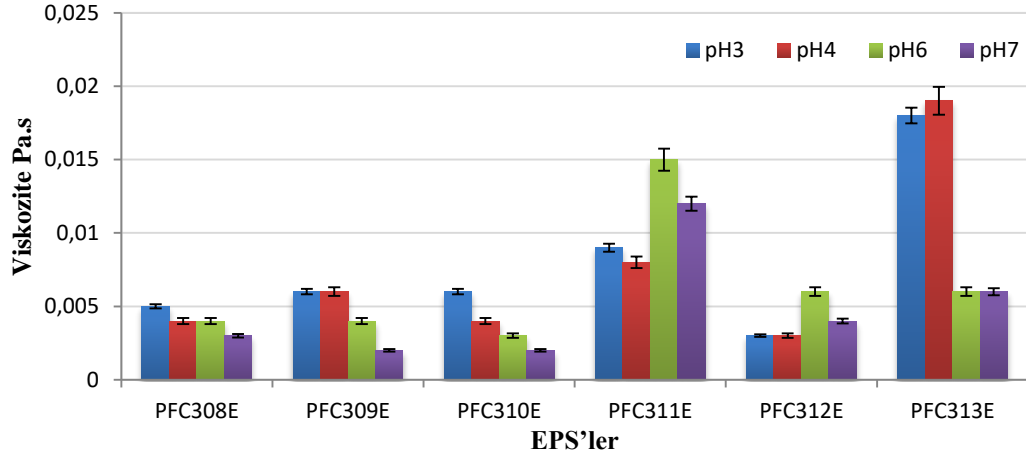
Tablo 3.2: Fermentör sisteminde *L. plantarum* suşları tarafından üretilen EPS'lerin miktarı

İzolat No	EPS Miktarı (mg L ⁻¹)
PFC308	198
PFC309	120
PFC310	211
PFC311	400
PFC312	258
PFC313	290

3.6 *Lactobacillus plantarum* Suşları Tarafından Üretilen EPS'lerin Reolojik Özellikleri

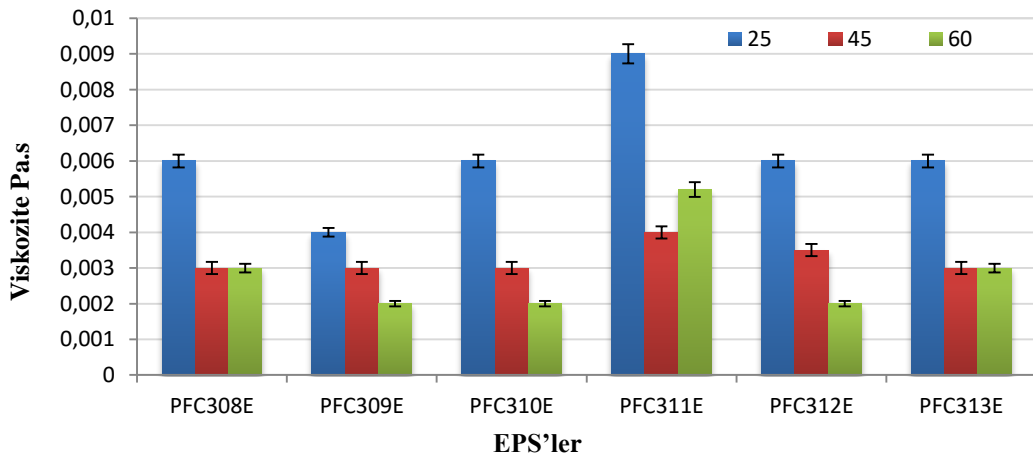
L. plantarum suşlarının ürettiği EPS'ler, kayma ile incelme davranışı göstermiştir. Yani kayma hızı ile birlikte vizkozitede azalma kaydedilmiştir. Muhtemelen kayma kuvveti ile birlikte oluşan hidrodinamik kuvvetlerle EPS'nin yapısal birimlerinde kırılmalar söz konusudur (Kavita ve diğ. 2014). Bu özellik gıdaların duyuşal özelliklerinin algılanmasında örneğin ağızda bıraktığı dolgunluk ve aroma salınımında olduğu kadar karıştırma, pompalama, kurutma ve doldurma gibi gıda prosesleri açısından önem taşımaktadır (Zhou ve diğ. 2014).

L. plantarum suşları tarafından üretilen EPS'ler, PFC311E ve PFC312E hariç, asidik koşullarda nötr koşullara kıyasla daha viskoz bulunmuştur ($p < 0.05$). PFC311E'de ise diğerlerinden farklı ($p < 0.05$) olarak, pH artışı ile birlikte viskozite artmıştır. Bu özellik asidik fermente gıdalarda viskozitenin artırılması açısından önem taşımaktadır. *L. kefiranofaciens* ZW3 suşu tarafından üretilen EPS'nin de asidik koşullarda daha viskoz özellik gösterdiği rapor edilmiştir (Wang ve diğ. 2015). pH 3 ve 4'te en viskoz EPS; PFC313E, pH 6 ve 7'de ise en viskoz EPS, PFC311E olarak belirlenmiştir (Şekil 3.10). Bu iki EPS'nin diğerlerine kıyasla daha viskoz reolojik özelliğe sahip oldukları anlaşılmıştır.



Şekil 3.10: *L. plantarum* suşları tarafından üretilen EPS'lerin farklı pH koşullarındaki reolojik özellikleri

L. plantarum suşları tarafından üretilen EPS'lerin viskozitesi sıcaklığın artışı ile birlikte düşmüştür. Ortam sıcaklığının 25'den 45 ve 60 °C'ye artırılması durumunda söz konusu EPS'lerin viskoziteleri yaklaşık %50 oranında azalmıştır. Tüm sıcaklık değerlerinde en yüksek viskozite PFC311E'de belirlenmiştir (Şekil 3.11). Sıcaklık artışıyla viskozitesi en az düşen EPS, PFC309E olmuştur. Ortam sıcaklığının artışı ile birlikte EPS yapısındaki bağlantıların muhtemelen açılmasından dolayı söz konusu EPS'lerin viskozitesi düşebilmektedir. Bu EPS'leri üreten *L. plantarum* suşlarının izolasyon kaynağının tarhana olması dikkate alındığında, tarhananın tüketim sıcaklığının yüksek olması nedeniyle söz konusu EPS'lerin tarhananın reolojik özelliklerinin iyileştirilmesi yönünde önemli katkı sağlamayabilir. Ancak düşük sıcaklık derecelerinde tüketilen veya muhafaza edilen fermente gıdalarda fermente gıdaların reolojisi üzerinde etkili olacaktır.

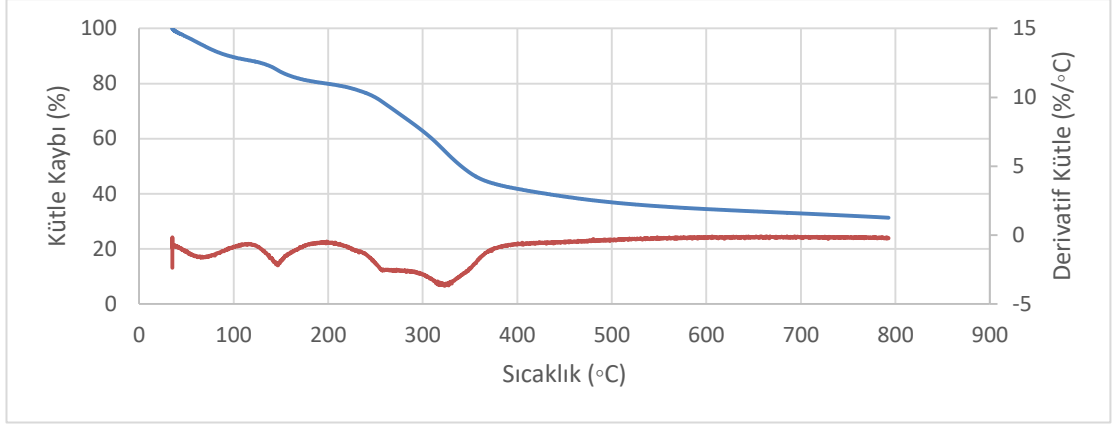


Şekil 3.11: *L. plantarum* suşları tarafından üretilen EPS'lerin farklı sıcaklıklardaki reolojik özellikleri

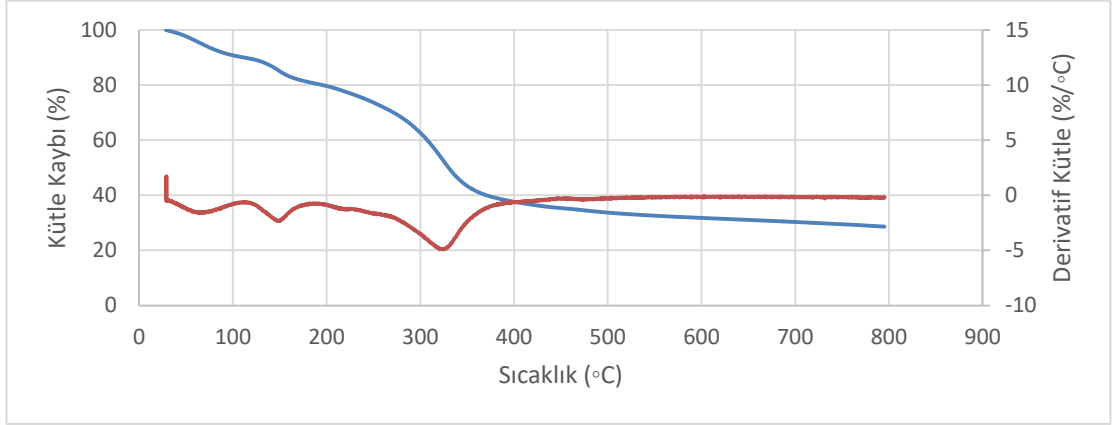
3.7 *Lactobacillus plantarum* Suşları Tarafından Üretilen EPS'lerin Termal Özellikleri

L. plantarum suşları tarafından üretilen EPS'lerin TGA analizleri, dinamik olarak sıcaklık artışı ile kütle kaybı belirlenerek yapılmıştır. EPS'lere ait termogramlar (Şekil 3.12-3.17) incelendiğinde PFC310E ve PFC311'de iki, PFC313E, PFC308E ve PFC309E'de üç, PFC312E'de ise dört bozulma piki gözlenmektedir. Tüm EPS örneklerinde 47,51-59,94 °C aralığında %8,4'den 10,46'ya kadar değişen oranlarda birinci kütle kaybı meydana gelmiştir. Bu aşamada EPS'lerin kabonil grupları içermesinden dolayı bağlanmış olan suyun uzaklaştırıldığı tahmin edilmektedir (Kumar ve diğ. 2004). Bunun dışında 140-147°C arasında ise PFC308E, PFC309E, PFC312E ve PFC313E sırasıyla %9,08, 10,73, 10,30 ve 11,45 oranlarında ikinci kütle kaybı oluşmuştur (Şekil 3.12, 3.13, 3.16, 3.17). PFC311E hariç tüm EPS örneklerinde ana kütle kaybı 314±1 °C'de gerçekleşmiştir. PFC311E'de ise ana kütle kaybı sıcaklığı 295,72 °C'dir. 200 ila 400 °C aralığında en düşük PFC312E'de %39,15, en yüksek PFC311E'de %58,90 oranında kütle kaybedilmiştir. Diğer PFC310E, PFC313E, PFC308E ve PFC309E EPS'lerinde sırasıyla %49,32, 45,51, 48,11 ve 47,99 oranında kütle kaybı meydana gelmiştir. *L. plantarum* suşları tarafından üretilen EPS'lerin 800 °C'ye kadar yakılması sonucunda PFC312E, PFC311E, PFC313E, PFC308E ve PFC309E EPS'lerinde %34±2 oranında rezidü oranı tespit edilmiştir. Yanma sonunda en yüksek oranda rezidü PFC310E'de %41,44 oranında kalmıştır.

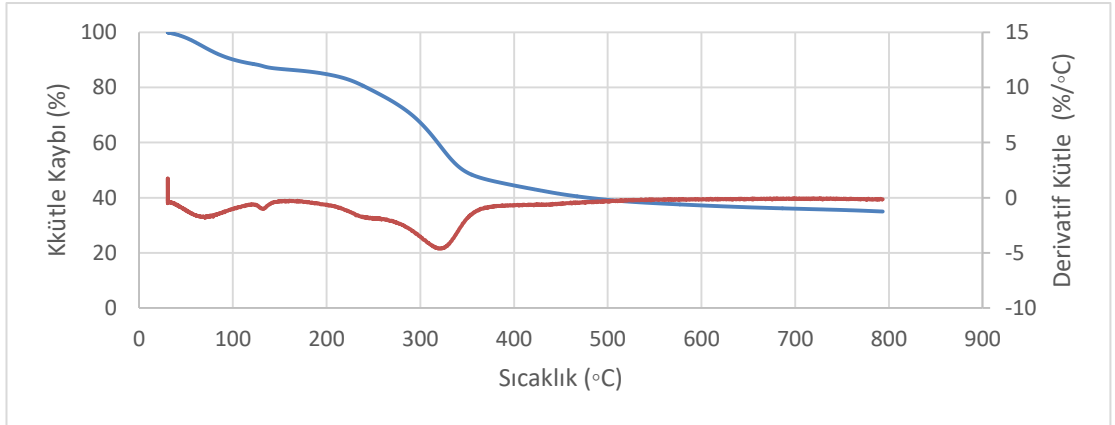
L. plantarum suşları tarafından üretilen PFC311 hariç diğer EPS'lerin termal degradasyon sıcaklığı bugüne kadar rapor edilen EPS'lerden yüksek bulunmuştur (Ismail ve Nampoothiri, 2010; Wang ve diğ. 2010; Wang ve diğ. 2015; Wang ve diğ. 2017). En iyi bilinen ksantan ve keçiyoynuzu gamlarının degradasyon sıcaklığı 282,65 ve 278,46 °C olduğuna göre (Wang ve diğ. 2010; Ahmed ve diğ. 2013) bu çalışmada üretilen EPS'lerin degradasyon sıcaklığı yüksektir. Aynı şekilde diğer LAB suşları tarafından üretilen EPS'lere göre de degradasyon sıcaklığı daha yüksektir. EPS'lerin termal stabilitesi şeker içeriği ve yapısı ile yakından ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Wang ve diğ. 2017). EPS'lerin termal stabilitelerinin yüksek olması, özellikle yüksek ısı işlem proseslerinde stabilitelerini koruyabilmeleri açısından önemlidir. Özellikle yüksek ısı işlem uygulanan gıdaların işlenmesinde *L. plantarum* PFC310 suşunun ürettiği EPS yüksek ısı direnci nedeniyle ön plana çıkmaktadır.



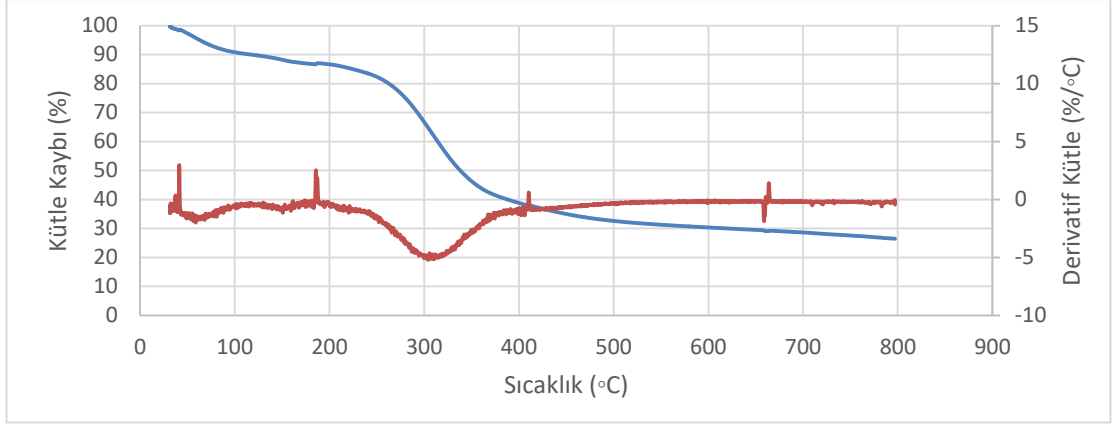
Şekil 3.12: *L. plantarum* PFC308 suşu tarafından üretilen EPS'nin TGA kütle kaybı spektrumu



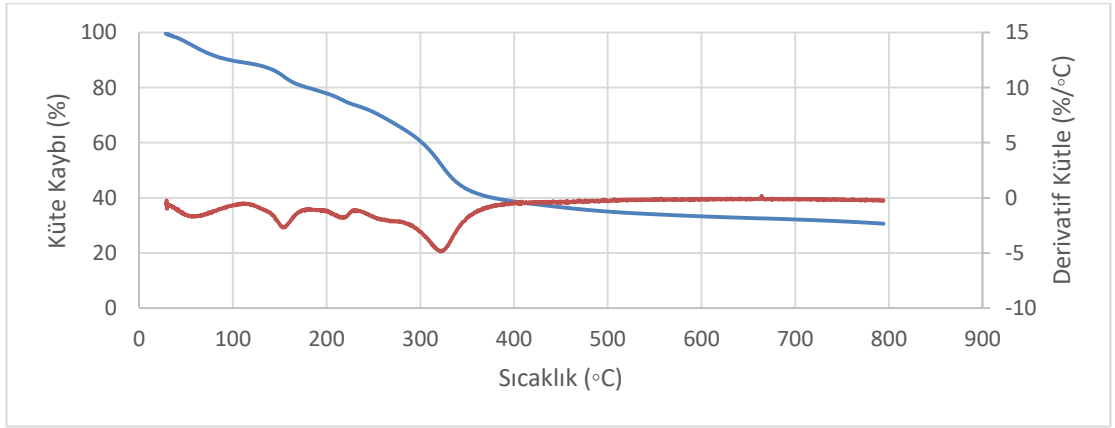
Şekil 3.13: *L. plantarum* PFC309 suşu tarafından üretilen EPS'nin TGA kütle kaybı spektrumu



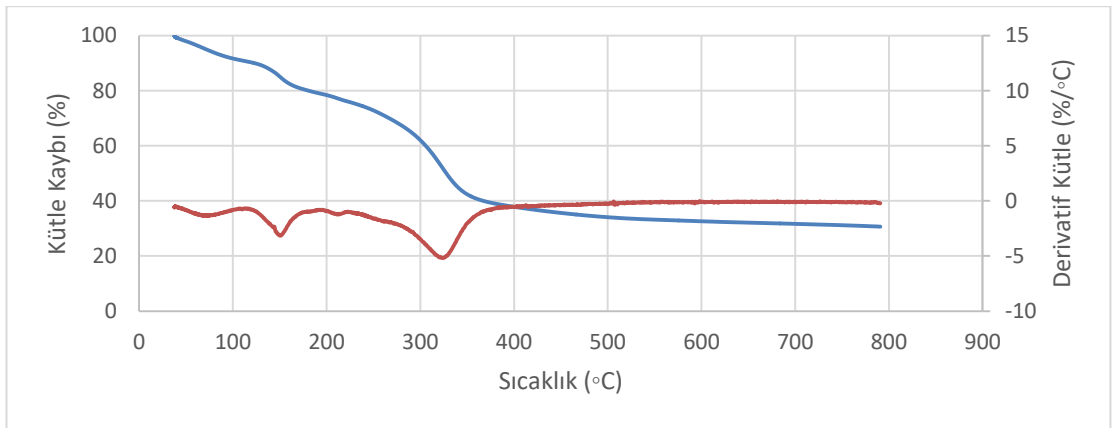
Şekil 3.14: *L. plantarum* PFC310 suşu tarafından üretilen EPS'nin TGA kütle kaybı spektrumu



Şekil 3.15: *L. plantarum* PFC311 suşu tarafından üretilen EPS'nin TGA kütle kaybı spektrumu



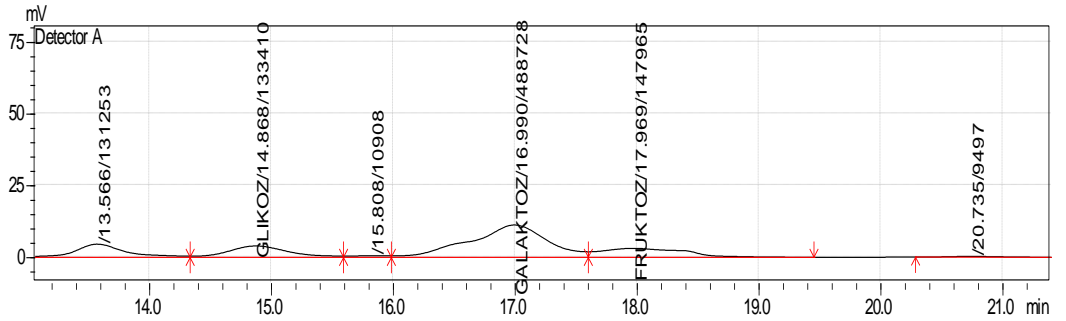
Şekil 3.16: *L. plantarum* PFC312 suşu tarafından üretilen EPS'nin TGA kütle kaybı spektrumu



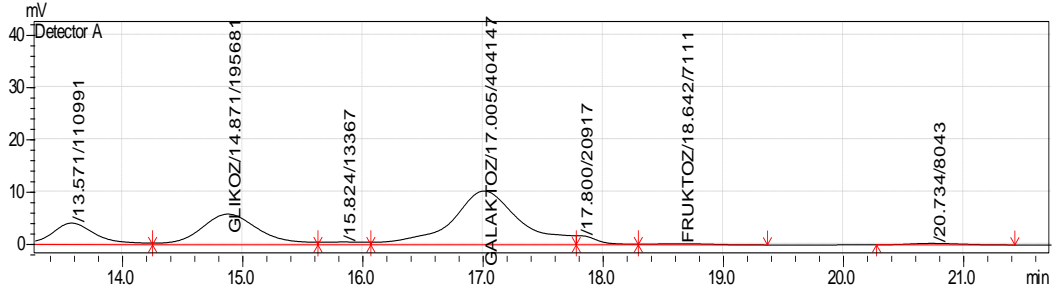
Şekil 3.17: *L. plantarum* PFC313 suşu tarafından üretilen EPS'nin TGA kütle kaybı spektrumu

3.8 *Lactobacillus plantarum* Suşları Tarafından Üretilen EPS'lerin Şeker İçeriği

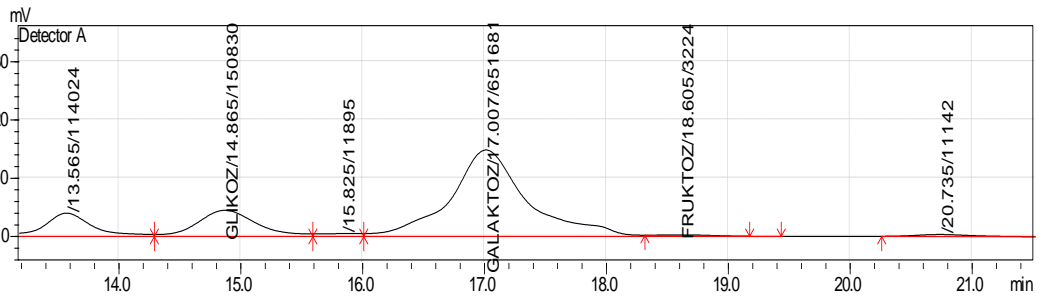
L. plantarum suşları tarafından üretilen EPS'lerin şeker içeriği HPLC analizi ile belirlenmiştir. Asitle yakıldıktan sonra, EPS'lerin glukoz, galaktoz ve fruktoz birimlerinden oluştuğu anlaşılmıştır (Şekil 3.18-23). EPS'lerin kromatogramlarında glukoz, galaktoz ve fruktozun sırasıyla 14,86, 17,01 ve 18,67 dk'da tespit edilmiştir. PFC309E ve PFC313E EPS'lerinde 1:3 oranında glukoz ve galaktoz (Şekil 3.19 ve 3.23), PFC310E ve PFC312E EPS'lerinde 1:4 glukoz ve galaktoz (Şekil 3.20 ve 3.22), PFC308E'de 1:3:1 oranında glukoz, galaktoz ve fruktoz (Şekil 3.18), PFC311E'de 2:2:1 oranında glukoz, galaktoz ve fruktoz içerdiği belirlenmiştir (Şekil 3.21). Buna göre söz konusu EPS'lerin galaktoz içerikleri daha fazla bulunmuştur. Ayrıca tüm EPS'lerde glukoz PFC311E hariç diğerlerinde aynı orandadır. Fruktoz ise sadece PFC308E ve PFC311E'de tespit edilmiştir. Glukoz ile fruktozun birlikte EPS yapısında bulunmadığı dikkate alındığında, söz konusu suşlarda bu sonuçlar *L. plantarum* suşları tarafından üretilen EPS'lerin heteropolimerik yapıda olduklarını göstermiştir. Ayrıca *L. plantarum* suşları tarafından üretilen diğer EPS'ler ile şeker içeriği uyumludur. Çünkü bugüne kadar *L. plantarum* suşları tarafından üretilen EPS'lerde yapılan şeker analizlerinde özellikle glukoz ve galaktozun mutlaka bulunduğu, bunun dışında iki EPS'te arabinoz (Liu ve diğ. 2011; Wang ve diğ. 2017), beş EPS'te mannoz (Dilna ve diğ. 2015; Zhou ve diğ. 2016) birimlerinin yer aldığı rapor edilmiştir. Ayrıca früktoz ise üç *L. plantarum* EPS'inde tespit edilmiştir (Liu ve diğ. 2011; Wang ve diğ. 2015).



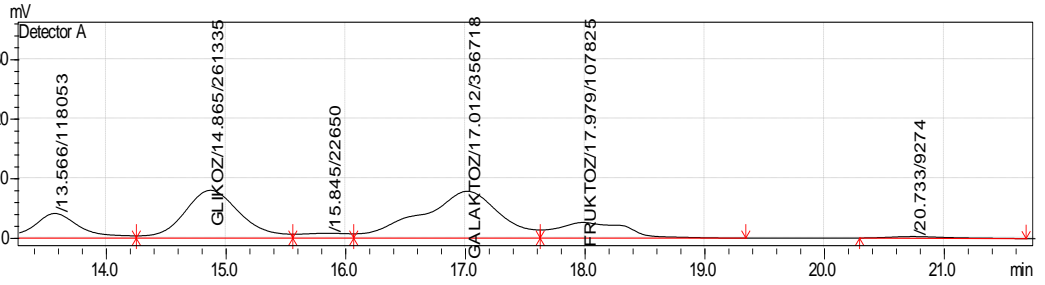
Şekil 3.18: *L. plantarum* PFC308 suşunun ürettiği EPS'nin şeker içeriği kromatogramı



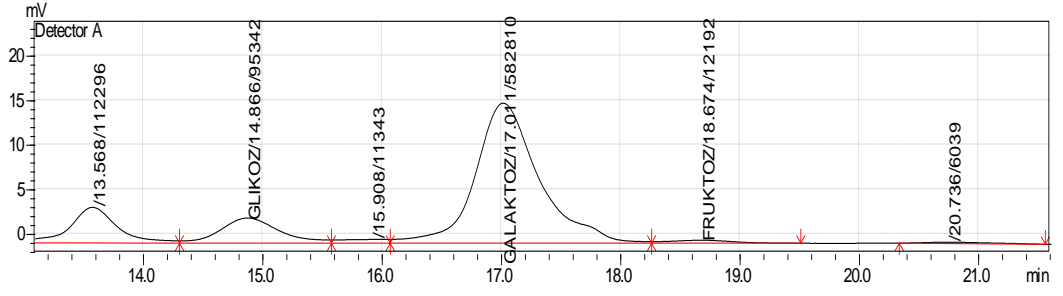
Şekil 3.19: *L. plantarum* PFC309'un ürettiği EPS'nin şeker içeriğinin kromatogramı



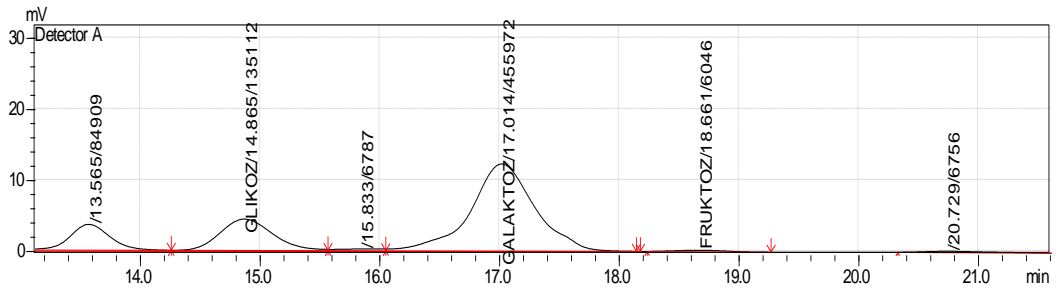
Şekil 3.20: *L. plantarum* PFC310'nun ürettiği EPS'nin şeker içeriğinin kromatogramı



Şekil 3.21: *L. plantarum* PFC311'in ürettiği EPS'nin şeker içeriğinin kromatogramı



Şekil 3.22: *L. plantarum* PFC312'nin ürettiği EPS'nin şeker içeriğinin kromatogramı



Şekil 3.23: *L. plantarum* PFC313'ün ürettiği EPS'nin şeker içeriğinin kromatogramı

4. GENEL SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmanın temel konusu tarhana kaynaklı izolatlar arasından EPS üreticisi LAB suşlarının belirlenmesi ve üretilen EPS'lerin karakterize edilmesidir. Yapılan çalışmalar neticesinde aşağıdaki sonuçlara ulaşılmış ve öneriler çıkarılmıştır.

1. 1044 adet tarhana izolatından 18 adet kolonide uzama özelliği belirlenmiş, ardından (GTG)₅ parmak izine göre sınıflandırılmış ve 16S rDNA dizileri ile tanımlanmıştır. Çalışmada tarhana florasında %1,72 oranında kolonisi uzama fenotipi gösteren izolat bulunmuştur. 18 adet izolatın da 8 tanesi (%44) *L. plantarum* olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar tarhana florasında bulunan EPS üreticilerinin düşük oranda bulunduğu ve *L. plantarum* türlerinin ağırlıklı olduğuna işaret etmiştir.
2. Tarhana kaynaklı 6 adet *L. plantarum* suşlarında EPS üretiminin farklı oranlarda olduğu anlaşılmıştır. Bu sonuç EPS üretiminin suşa bağlı olarak değiştiğine işaret etmiştir. En fazla EPS *L. plantarum* PFC310 suşunda üretilmiştir. Bu suş endüstriyel boyutta EPS'nin üretilmesi açısından önem taşımaktadır. Özellikle EPS üretim mekanizmasına yönelik yapılacak çalışmalar neticesinde endüstriyel ölçekte EPS üretimi için ciddi kazanımlar elde edilebilir.
3. *L. plantarum* suşlarında EPS üretimi sakkaroz ve maltoz varlığında artmıştır. Bu sonuç disakkaritlerin söz konusu *L. plantarum* suşlarında EPS üretimini teşvik ettiğini göstermiştir. *L. plantarum* suşlarının sakkaroz ve maltoz varlığında yüksek EPS üretebilmesi nedeniyle bu suşlar özellikle tahıl bazlı fermente gıdaların üretimi için önerilebilir. Diğer taraftan endüstriyel EPS üretiminde maltoz ve sakkaroz içeren substrat kaynaklarının kullanılması ile daha fazla EPS üretilir.
4. *L. plantarum* suşları tarafından üretilen EPS'ler, viskoziteyi düşük oranda artırmıştır. Ancak asidik koşullarda PFC311E hariç diğer EPS'lerin varlığında viskozite yükselmiştir. PFC311E'nin ise nötr koşullarda viskozitesi yüksek bulunmuştur. Fonksiyonları bakımından farklı davranışlar göstermesi nedeniyle PFC311E, farklı amaçlar doğrultusunda kullanılabilir.
5. *L. plantarum* suşları tarafından üretilen EPS'lerin termal dirençlerinin yüksek bulunması özellikle bu EPS'lerin yüksek ısı işlem uygulanan gıdaların yapısal

özelliklerinin iyileştirilmesi açısından fayda sağlayacaktır. Çünkü yüksek sıcaklıklarda bozulmadan stabil kalacaktır.

6. *L. plantarum* suşları tarafından EPS'lerin glukoz, galaktoz ve fruktoz şekerlerini içerdikleri belirlenmiştir. Bu şekerler arasında galaktozun daha fazla oranda olduğu dikkati çekmektedir.
7. Bu çalışmayla birlikte tarhana fermentasyonundan EPS üreticisi çeşitli *L. plantarum* suşları belirlenmiş ve mutlak tanımlanmıştır. Bu suşlar arasında *L. plantarum* PFC310 ve PFC311 suşlarının yüksek EPS üreticisi olması ve üretilen EPS'lerinin temel direnç ve viskoziteyi artırıcı özellikleri nedeniyle, üretici suşların fermente gıdaların üretiminde kullanılması veya üretilen EPS'lerin gıdaların yapısal özelliklerinin iyileştirilmesinde amacıyla katılması önerilir.

5. KAYNAKLAR

- Ahmed, Z., Wang, Y., Anjum, N., Ahmad, A. and Khan, S. T., “Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir–Part II”, *Food Hydrocolloids*, 30(1), 343-350, (2013).
- Almiron-Roig, E., Mulholland, F., Gasson, M. J. and Griffin, A. M., “The complete Cps gene cluster from *Streptococcus thermophilus* NCFB 2393 involved in the biosynthesis of a new exopolysaccharide”, *Microbiology*, 146 (Pt 11), 2793-2802, (2000).
- Aslim, B., Yüksekdağ, Z., Beyatlı, Y. and Mercan, N., “Exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains under different growth conditions”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 673-677, (2005).
- Audy, J., Labrie, S., Roy, D. and Lapointe, G., “Sugar source modulates exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* CRC 002”, *Microbiology*, 156(Pt 3), 653-664, (2010).
- Axelsson, L., “Lactic acid bacteria: Classification and physiology”, (eds: S. Salminen, A. Von Wright), *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, 2, New York: *Marcel Dekker Inc.*, 1-72, (1998).
- Badel, S., Bernardi, T. and Michaud, P., “New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides”, *Biotechnol Adv*, 29(1), 54-66, (2011).
- Bender, M. H. and Yother, J., “CpsB is a modulator of capsule-associated tyrosine kinase activity in *Streptococcus pneumoniae*”, *J Biol Chem*, 276(51), 47966-47974, (2001).
- Bender, M. H., Cartee, R. T. and Yother, J., “Positive correlation between tyrosine phosphorylation of CpsD and capsular polysaccharide production in *Streptococcus pneumoniae*”, *J Bacteriol*, 185(20), 6057-6066, (2003).
- Bentley, S. D., Aanensen, D. M., Mavroidi, A., Saunders, D., Rabinowitsch, E., Collins, M., et al., “Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 Pneumococcal serotypes”, *PLoS Genet*, 2(3), e31, (2006).
- Blandino, A., Al-Aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D., and Webb, C., “Cereal-based fermented foods and beverages”, *Food Research International*, 36(6), 527-543, (2003).

Boels, I. C., Ramos, A., Kleerebezem, M. and de Vos, W. M., “Functional analysis of the *Lactococcus lactis* galU and galE genes and their impact on sugar nucleotide and exopolysaccharide biosynthesis”, *Appl Environ Microbiol*, 67(7), 3033-3040, (2001).

Boels, I. C., Van Kranenburg, R., Kanning, M. W., Chong, B. F., De Vos, W. M. and Kleerebezem, M., “Increased exopolysaccharide production in *Lactococcus lactis* due to increased levels of expression of the NIZO B40 Eps gene cluster”, *Appl Environ Microbiol*, 69(8), 5029-5031, (2003).

Botina, S. G., Tsygankov, Y. D. and Sukhodolets, V. V., “ Identification of industrial strains of lactic acid bacteria by methods of molecular genetic typing” *Russian Journal of Genetics*, 42(12), 1367-1379, (2006).

Broadbent, J. R., McMahon, D. J., Welker, D. L., Oberg, C. J. and Moineau, S., “Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review”, *J Dairy Sci*, 86(2), 407-423, (2003).

Caggianiello, G., Kleerebezem, M. and Spano, G., “Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(9), 3877-3886, (2016).

Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M. J. and Landon, M., “Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*”, *Biotechnology Letters*, 10(4), 255-260, (1988).

Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M. and Desmazeaud, M., “Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic Lactic Acid Bacteria”, *J Dairy Sci*, 75(3), 692-699, (1992).

Cerning, J., Renard, C. M., Thibault, J. F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M. and Topisirovic, L., “ Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer”, *Appl Environ Microbiol*, 60(11), 3914-3919, (1994).

Cerning, J., “ Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria ”, *Lait*75, 463–472, (1995).

Cieslewicz, M. J., Kasper, D. L., Wang, Y. and Wessels, M. R., “Functional analysis in type Ia group B *Streptococcus* of a cluster of genes involved in extracellular polysaccharide production by diverse species of *Streptococci*”, *J Biol Chem*, 276(1), 139-146, (2001).

Costa, N. E., Hannon, J. A., Guinee, T. P., Auty, M. A. E., McSweeney, P. L. H., and Beresford, T. P., “Effect of exopolysaccharide produced by isogenic strains of *Lactococcus lactis* on half-fat Cheddar cheese”, *Journal of dairy science*, 93(8), 3469-3486, (2010).

- Cote, G. L., Skory, C. D., Unser, S. M. and Rich, J. O., “The Production of glucans via glucansucrases from *Lactobacillus satsumensis* isolated from a fermented beverage starter culture”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, (2012).
- Dabour, N. and LaPointe, G., “Identification and molecular characterization of the chromosomal exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461”, *Appl Environ Microbiol*, 71(11), 7414-7425, (2005).
- De Vos, W. M. and Vaughan, E. E., “Genetics of lactose utilization in Lactic Acid Bacteria”, *FEMS Microbiol Rev*, 15(2-3), 217-237, (1994).
- De Vries, M. C., Vaughan, E. E., Kleerebezem, M. and de Vos, W. M., “*Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract”, *International Dairy Journal*, 16(9), 1018-1028, (2006).
- De Vuyst, L., Vanderveken, F., Van de Ven, S. and Degeest, B., “Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis”, *Journal of Applied Microbiology*, 84(6), 1059-1068, (1998).
- De Vuyst, L. and Degeest, B., “Heteropolysaccharides from Lactic Acid Bacteria”, *FEMS Microbiol Rev*, 23(2), 153-177, (1999).
- De Vuyst, L., De Vin F., Vaningelgem F. and Degeest, B., “Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from Lactic Acid Bacteria”, *International Dairy Journal*, 11:678-707, (2001).
- De Vuyst, L., Schrijvers, V., Paramithiotis, S., Hoste, B., Vancanneyt, M., Swings, et al., “The biodiversity of lactic acid bacteria in Greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation”, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6059-6069, (2002).
- De Vuyst, L., & Leroy, F., “Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications”, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(4), 194-199, (2007).
- Degeest, B., Janssens, B. and De Vuyst, L., “Exopolysaccharide (EPS) biosynthesis by *Lactobacillus sakei* 0-1: production kinetics, enzyme activities and EPS yields”, *J Appl Microbiol*, 91(3), 470-477, (2001).
- Degeest, B., Mozzi, F. and De Vuyst, L., “Effect of medium composition and temperature and pH changes on exopolysaccharide yields and stability during *Streptococcus thermophilus* LY03 fermentations”, *International Journal of Food Microbiology*, 79(3), 161-174, (2002).
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E. and Hols, P., “The biosynthesis and functionality of the cell-wall of Lactic Acid Bacteria”, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76(1-4), 159-184, (1999).

- Dertli, E., Colquhoun, I. J., Gunning, A. P., Bongaerts, R. J., Le Gall, G., et al., "Structure and biosynthesis of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus johnsonii* FI9785", *Journal of Biological Chemistry*, 288(44), 31938-31951, (2013).
- Dertli, E., Yilmaz, M. T., Tatlisu, N. B., Toker, O. S., Cankurt, H. and Sagdic, O., "Effects of in situ exopolysaccharide production and fermentation conditions on physicochemical, microbiological, textural and microstructural properties of Turkish-type fermented sausage (sucuk)", *Meat Science*, 121, 156-165, (2016).
- Di Sabatino, A. and Corazza, G. R., "Coeliac disease", *The Lancet*, 373(9673), 1480-1493, (2009).
- Dilna, S. V., Surya, H., Aswathy, R. G., Varsha, K. K., Sakthikumar, D. N., et al., "Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF 4", *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1179-1186, (2015).
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C. and Schorr-Galindo, S., "Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction", *Carbohydrate Polymers*, 87,(2),951-962, (2012).
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T. and Smith, F., "Colorimetric method for determination of sugars and related substances", *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356, (1956).
- Dupont, I., Roy, D. and Lapointe, G., "Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24(4), 251-255, (2000).
- Fanning, S., Hall, L. J., Cronin, M., Zomer, A., MacSharry, J., Goulding, D. and Van Sinderen, D., "Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection", *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(6), 2108-2113, (2012).
- Feldmane, J., Semjonovs, P. and Ciprovica, I., "Potential of exopolysaccharides in yoghurt production", *In Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology* (No. 80, p. 299), World Academy of Science, Engineering and Technology (WASET), (2013).
- Folkenberg, D. M., Dejmek, P., Skriver, A., Guldager, H. S. and Ipsen, R., "Sensory and rheological screening of exopolysaccharide producing strains of bacterial yoghurt cultures", *International Dairy Journal*, 16(2), 111-118, (2006).
- Gallardo-Escamilla, F. J., Kelly, A. L. and Delahunty, C. M., "Mouthfeel and flavour of fermented whey with added hydrocolloids", *International Dairy Journal*, 17(4), 308-315, (2007).

- Galle, S., Schwab, C., Arendt, E. and Gänzle, M., “Exopolysaccharide-forming *Weissella* strains as starter cultures for sorghum and wheat sourdoughs”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5834-5841, (2010).
- Galle, S. and Arendt, E. K., “Exopolysaccharides from sourdough lactic acid bacteria”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(7), 891-901, (2014).
- Grobben, G. J., Smith, M. R., Sikkema, J. and de Bont, J. A. M., “Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar metabolism and the synthesis of sugar nucleotides in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46(3), 279-284, (1996).
- Grobben, G. J., Van Casteren, W. H. M., Schols, H. A., Oosterveld, A., Sala, G., Smith, M. R., et al., “Analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in continuous culture on glucose and fructose”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(4), 516-521, (1997).
- Groenewald, J. H. and Botha, F. C., “Down-regulation of pyrophosphate: fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase (PFP) activity in sugarcane enhances sucrose accumulation in immature internodes” *Transgenic Research*, 17(1), 85-92, (2008).
- Harutoshi, T., “Exopolysaccharides of lactic acid bacteria for food and colon health applications”, *In Lactic Acid Bacteria-R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, InTech, (2013).
- Hassan, A. N., Corredig, M. and Frank, J. F., “Viscoelastic properties of yogurt made with ropy and non-ropy exopolysaccharides producing cultures”, *Milchwissenschaft*, 56(12), 684-686, (2001).
- Ismail, B. and Nampoothiri, K. M., “Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510”, *Archives of Microbiology*, 192(12), 1049-1057, (2010).
- İspirli, H., “Erzincan Tulum Peynirinden Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) İzolasyonu, Moleküler Metotlarla Tanımlanması Ve Ekzopolisakkarit (EPS) Üretim Potansiyellerinin Genetik Olarak Belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Bayburt, (2016).
- Jolly, L. and Stinglele, F., “Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria”, *International Dairy Journal*, 11(9), 733-745, (2001).
- Jolly, L., Newell, J., Porcelli, I., Vincent, S. J. and Stinglele, F., “*Lactobacillus helveticus* glycosyltransferases: from genes to carbohydrate synthesis”, *Glycobiology*, 12(5), 319-327, (2002).

Kavita, K., Singh, V. K., Mishra, A. and Jha, B., “Characterisation and anti-biofilm activity of extracellular polymeric substances from *Oceanobacillus iheyensis*”, *Carbohydrate Polymers*, 101, 29-35, (2014).

Kleerebezem, M., Van Kranenburg, R., Tuinier, R., Boels, I. C., Zoon, P., Looijesteijn, E., Hugenholtz, J. and de Vos, W. M., “Exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*: from genetic engineering to improved rheological properties?”, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76(1-4), 357-365, (1999).

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. and Reuter, G., “Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria”, *International Journal of Food Microbiology*, 41(2), 103-125, (1998).

Kojic, M., Vujcic, M., Banina, A., Cocconcelli, P., Cerning, J. and Topisirovic, L., “Analysis of exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11, isolated from cheese”, *Appl Environ Microbiol*, 58(12), 4086-4088, (1992).

Korakli, M. and Vogel, R. F., “Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosyltransferases and therapeutic potential of their synthesised glycans”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(6), 790-803, (2006).

Kralj, S., Van Geel-Schutten, G. H., Rahaoui, H., Leer, R. J., Faber, E. J., Van der Maarel, M. J. and Dijkhuizen, L., “Molecular characterization of a novel glucosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 synthesizing a unique, highly branched glucan with α -(1 \rightarrow 4) and α -(1 \rightarrow 6) glucosidic bonds”, *Appl Environ Microbiol*, 68(9), 4283-4291, (2002).

Kralj, S., Van Geel-Schutten, G. H., Dondorff, M. M., Kirsanovs, S., Van der Maarel, M. J. and Dijkhuizen, L., “Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains”, *Microbiology*, 150(Pt 11), 3681-3690, (2004a).

Kralj, S., Van Geel-Schutten, G. H., Van der Maarel, M. J. and Dijkhuizen, L., “Biochemical and molecular characterization of *Lactobacillus reuteri* 121 reuteransucrase”, *Microbiology*, 150(Pt 7), 2099-2112, (2004b).

Kumar, C. G., Joo, H. S., Choi, J. W., Koo, Y. M. and Chang, C. S., “Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp. I-450”, *Enzyme and microbial technology*, 34(7), 673-681, (2004).

Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J. and Withers, S. G., “Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms”, *Annu Rev Biochem*, 77, 521-555, (2008).

Lamothe, G. T., Jolly, L., Mollet, B. and Stinglele, F., “Genetic and biochemical characterization of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*”, *Arch Microbiol*, 178(3), 218-228, (2002).

Laws, A., Gu, Y. and Marshall, V., “Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria”, *Biotechnol Adv*, 19(8), 597-625, (2001).

Lebeer, S., Verhoeven, T. L. A., Francius, G., Schoofs, G., Lambrichts, I., Dufrene, Y., Vanderleyden, J. and De Keersmaecker, S. C., “Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long, galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase”, *Appl Environ Microbiol*, 75(11), 3554-3563, (2009).

Leroy, F., Degeest, B. and De Vuyst, L., “A novel area of predictive modelling: describing the functionality of beneficial microorganisms in foods”, *International Journal of Food Microbiology*, 73(2), 251-259, (2002).

Leroy, F. and De Vuyst, L., “Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry”, *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78, (2004).

Leroy, F., Verluyten, J. and De Vuyst, L., “Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation”, *International Journal of Food Microbiology*, 106(3), 270-285, (2006).

Levander, F., Svensson, M. and Radstrom, P., “Enhanced exopolysaccharide production by metabolic engineering of *Streptococcus thermophilus*”, *Appl Environ Microbiol*, 68(2), 784-790, (2002).

Liu, C. F., Tseng, K. C., Chiang, S. S., Lee, B. H., Hsu, W. H. and Pan, T. M., “Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus exopolysaccharides*”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(12), 2284-2291, (2011).

Low, D., Ahlgren, J. A., Horne, D., McMahon, D. J., Oberg, C. J. and Broadbent, J. R., “Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention”, *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2147-2151, (1998).

Macedo, M. G., Lacroix, C., Gardner, N. J. and Champagne, C. P., “Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate”, *International Dairy Journal*, 12(5), 419-426, (2002).

MacedoLooijesteijn, P. J., Boels, I. C., Kleerebezem, M. and Hugenholtz, J., “Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by the sugar source”, *Appl Environ Microbiol*, 65(11), 5003-5008, (1999).

Maeda, H., Zhu, X., Suzuki, S., Suzuki, K. and Kitamura, S., “Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2BT” ,*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(17), 5533-5538, (2004).

- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., et al., “Comparative genomics of the lactic acid bacteria”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42), 15611-15616, (2006).
- Makarova, K. S., & Koonin, E. V., “Evolutionary genomics of lactic acid bacteria”, *Journal of Bacteriology*, 189(4), 1199-1208, (2007).
- Mende, S., Peter, M., Bartels, K., Rohm, H. and Jaros, D., “Addition of purified exopolysaccharide isolates from *S. thermophilus* to milk and their impact on the rheology of acid gels”, *Food Hydrocolloids*, 32(1), 178-185, (2013).
- Minic, Z., Marie, C., Delorme, C., Faurie, J. M., Mercier, G., Ehrlich, D. and Renault, P., “Control of EpsE, the phosphoglycosyltransferase initiating exopolysaccharide synthesis in *Streptococcus thermophilus*, by EpsD tyrosine kinase”, *J Bacteriol*, 189(4), 1351-1357, (2007).
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R. M. and Remaud-Siméon, M., “Homopolysaccharides from lactic acid bacteria”, *International Dairy Journal*, 11(9), 675-685, (2001).
- More, T. T., Yadav, J. S. S., Yan, S., Tyagi, R. D. and Surampalli, R. Y., “Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications”, *Journal of Environmental Management*, 144, 1-25, (2014).
- Morona, J. K., Paton, J. C., Miller, D. C. and Morona, R., “Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*”, *Mol Microbiol*, 35(6), 1431-1442, (2000).
- Morona, J. K., Morona, R., Miller, D. C., and Paton, J. C., “*Streptococcus pneumoniae* capsule biosynthesis protein CpsB is a novel manganese-dependent phosphotyrosine-protein phosphatase”, *J Bacteriol*, 184(2), 577-583, (2002).
- Morona, J. K., Morona, R., Miller, D. C. and Paton, J. C., “Mutational analysis of the carboxy-terminal (YGX)₄ repeat domain of CpsD, an autophosphorylating tyrosine kinase required for capsule biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*”, *J Bacteriol*, 185(10), 3009-3019, (2003).
- Nierop Groot, M. N. and Kleerebezem, M., “Mutational analysis of the *Lactococcus lactis* NIZO B40 exopolysaccharide (EPS) gene cluster: EPS biosynthesis correlates with unphosphorylated EpsB”, *J Appl Microbiol*, 103(6), 2645-2656, (2007).
- Özel, S., “Tarhana hamuru fermantasyonunun mikrobiyal taksonomik yapısı ve populasyon dinamiğinin belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Denizli, (2012).

- Patel, S., Majumder, A. and Goyal, A., “Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria”, *Indian Journal of Microbiology*, 52(1), 3-12, (2012).
- Peant, B., LaPointe, G., Gilbert, C., Atlan, D., Ward, P. and Roy, D., “Comparative analysis of the exopolysaccharide biosynthesis gene clusters from four strains of *Lactobacillus rhamnosus*”, *Microbiology*, 151(Pt 6), 1839-1851, (2005).
- Peyer, L. C., Zannini, E. and Arendt, E. K., “Lactic acid bacteria as sensory biomodulators for fermented cereal-based beverages”, *Trends in Food Science & Technology*, 54, 17-25, (2016).
- Pingitore, E. V., Pessione, A., Fontana, C., Mazzoli, R. and Pessione, E., “Comparative proteomic analyses for elucidating metabolic changes during EPS production under different fermentation temperatures by *Lactobacillus plantarum* Q823”, *International Journal of Food Microbiology*, 238, 96-102, (2016).
- Pham, P. L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G. and Cerning, J., “Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation”, *Appl Environ Microbiol*, 66(6), 2302-2310, (2000).
- Rahn, A., Beis, K., Naismith, J. H. and Whitfield, C., “A novel outer membrane protein, Wzi, is involved in surface assembly of the *Escherichia coli* K30 group 1 capsule”, *J Bacteriol*, 185(19), 5882-5890, (2003).
- Ramchandran, L. and Shah, N. P., “Effect of exopolysaccharides and inulin on the proteolytic, angiotensin-I-converting enzyme- and α -glucosidase-inhibitory activities as well as on textural and rheological properties of low-fat yogurt during refrigerated storage”, *Dairy Science and Technology*, 89(6), 583-600, (2009).
- Ramos, A., Boels, I. C., de Vos, W. M. and Santos, H., “Relationship between glycolysis and exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*”, *Appl Environ Microbiol*, 67(1), 33-41, (2001).
- Remus, D. M., Van Kranenburg, R., Van Swam, I. I., Taverne, N., Bongers, R. S., Wels, M., Wells, J. M., Bron, P. A. and Kleerebezem, M., “Impact of 4 *Lactobacillus plantarum* capsular polysaccharide clusters on surface glycan composition and host cell signaling”, *Microb Cell Fact*, 11, 149, (2012).
- Ruas-Madiedo, P. and De Los Reyes-Gavilán, C. G., “Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria”, *Journal of Dairy Science*, 88(3), 843-856, (2005).
- Ryan, P. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Caplice, N. M. and Stanton, C. “Sugar-coated: exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications”, *Food & Function*, 6(3), 679-693, (2015).

Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., Aguirre-Mandujano, E. and Vernon-Carter, E. J., "Microstructure and texture of yogurt as influenced by fat replacers", *International Dairy Journal*, 14(2), 151-159, (2004).

Sanlibaba, P. and Çakmak, G. A., "Exopolysaccharides production by lactic acid bacteria", *Applied Microbiology, Open Access*, 2(2), (2016).

Saxena, I. M., Brown, R. M., Jr., Fevre, M., Geremia, R. A. and Henrissat, B., "Multidomain architecture of beta-glycosyl transferases: implications for mechanism of action", *J Bacteriol*, 177(6), 1419-1424, (1995).

Scheirlinck, I., Van der Meulen, R., Van Schoor, A., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., Vandamme, P. and Huys, G., "Taxonomic structure and stability of the bacterial community in Belgian sourdough ecosystems as assessed by culture and population fingerprinting", *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2414-2423, (2008).

Schwab, C. and Ganzle, M. G., "Effect of membrane lateral pressure on the expression of fructosyltransferases in *Lactobacillus reuteri*", *Syst Appl Microbiol*, 29(2), 89-99, (2006).

Schwab, C., Mastrangelo, M., Corsetti, A. and Gänzle, M., "Formation of oligosaccharides and polysaccharides by *Lactobacillus reuteri* LTH5448 and *Weissella cibaria* 10M in sorghum sourdoughs", *Cereal Chemistry*, 85(5), 679-684, (2008).

Sengun, İ. Y., Nielsen, D. S., Karapınar, M. and Jakobsen, M., "Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food", *International Journal of Food Microbiology*, 135(2), 105-111, (2009).

Settanni, L., Tanguler, H., Moschetti, G., Reale, S., Gargano, V. and Erten, H., "Evolution of fermenting microbiota in tarhana produced under controlled technological conditions", *Food Microbiology*, 28(7), 1367-1373, (2011).

Stefanovic, E., Fitzgerald, G. and McAuliffe, O., "Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review", *Food Microbiology*, 61, 33-49, (2017).

Stiles, M. E. and Holzapel, W. H., "Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy", *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1-29, (1997).

Stingle, F., Neeser, J. R. and Mollet, B., "Identification and characterization of the eps (Exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6", *J Bacteriol*, 178(6), 1680-1690, (1996).

Stingle, F., Newell, J. W. and Neeser, J. R., "Unraveling the function of glycosyltransferases in *Streptococcus thermophilus* Sfi6", *J Bacteriol*, 181(20), 6354-6360, (1999).

Svensson, M., Waak, E., Svensson, U. and Radstrom, P., "Metabolically improved exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* and its influence on the

rheological properties of fermented milk”, *Appl Environ Microbiol*, 71(10), 6398-6400, (2005).

Tallon, R., Bressollier, P. and Urdaci, M. C., “Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56”, *Research in Microbiology*, 154(10), 705-712, (2003).

Tieking, M., Korakli, M., Ehrmann, M. A., Gänzle, M. G. and Vogel, R. F., “In situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria”, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 945-952, (2003).

Torino, M. I., de Valdez, G. F. and Mozzi, F., “Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages”, *Frontiers in Microbiology*, 6, (2015).

Tsuda, H. and Miyamoto, T., “Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus plantarum* and the prebiotic activity of the exopolysaccharide”, *Food Science and Technology Research*, 16(1), 87-92, (2010).

Van Calsteren, M. R., Pau-Roblot, C., Begin, A. and Roy, D., “Structure determination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains RW-9595M and R. ”, *Biochem J*, 363(Pt 1), 7-17, (2002).

Van der Meulen, R., Grosu-Tudor, S., Mozzi, F., Vaningelgem, F., Zamfir, M., de Valdez, G. F. and De Vuyst, L., “Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved”, *Int J Food Microbiol*, 118(3), 250-258, (2007).

Van Hijum, S. A., Van Geel-Schutten, G. H., Rahaoui, H., Van der Maarel, M. J. and Dijkhuizen, L., “Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides”, *Appl Environ Microbiol*, 68(9), 4390-4398, (2002).

Van Hijum, S. A., Kralj, S., Ozimek, L. K., Dijkhuizen, L. and Van Geel-Schutten, I. G., “Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria”, *Microbiol Mol Biol Rev*, 70(1), 157-176, (2006).

Van Kranenburg, R., Marugg, J. D., Van, S., II, Willem, N. J. and de Vos, W. M., “Molecular characterization of the plasmid-encoded eps gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*”, *Mol Microbiol*, 24(2), 387-397, (1997).

Van Kranenburg, R., Vos, H. R., Van, S., II, Kleerebezem, M. and de Vos, W. M., “Functional analysis of glycosyltransferase genes from *Lactococcus lactis* and other gram-positive cocci: complementation, expression, and diversity”, *J Bacteriol*, 181(20), 6347-6353, (1999).

Van Leeuwen, S. S., Kralj, S., Gerwig, G. J., Dijkhuizen, L. and Kamerling, J. P., “Structural analysis of bioengineered alpha-D-glucan produced by a triple mutant of the Glucansucrase GTF180 enzyme from *Lactobacillus reuteri* strain 180: generation of (alpha1-->4) linkages in a native (1-->3)(1-->6)-alpha-D-glucan”, *Biomacromolecules*, 9(8), 2251-2258, (2008).

Vincent, C., Doublet, P., Grangeasse, C., Vaganay, E., Cozzone, A. J. and Duclos, B., “Cells of *Escherichia coli* contain a protein-tyrosine kinase, Wzc, and a phosphotyrosine-protein phosphatase, Wzb”, *J Bacteriol*, 181(11), 3472-3477, (1999).

Walter, J., Schwab, C., Loach, D. M., Ganzle, M. G. and Tannock, G. W., “Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell aggregation, in vitro biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract”, *Microbiology*, 154(Pt 1), 72-80, (2008).

Wang, Y., Li, C., Liu, P., Ahmed, Z., Xiao, P. and Bai, X., “Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir”, *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 895-903, (2010).

Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y. and Yang, Z., “Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir”, *Carbohydrate Polymers*, 125, 16-25, (2015).

Wang, X., Shao, C., Liu, L., Guo, X., Xu, Y. and Lü, X., “Optimization, partial characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* KX041”, *International Journal of Biological Macromolecules*, (2017).

Welman, A. D. and Maddox, I. S., “Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges”, *Trends in Biotechnology*, 21(6), 269-274, (2003).

Werning, M. L., Notararigo, S., Nácher, M., de Palencia, P. F., Aznar, R. and López, P., “Biosynthesis, purification and biotechnological use of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria”, *In Food additive*, InTech, (2012).

Wood, C. D., Stewart, J. L. and Vargas, J. E., “Genetic variation in the nutritive value of *Gliricidia sepium*.: 2. Leaf chemical composition and fermentability by an in vitro gas production technique”, *Animal Feed Science and Technology*, 75(2), 125-143, (1998).

Yother, J., “Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation”, *Annu Rev Microbiol*, 65, 563-581, (2011).

Zannini, E., Waters, D. M., Coffey, A. and Arendt, E. K., “Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1121-1135, (2016).

Zhou, F., Wu, Z., Chen, C., Han, J., Ai, L. and Guo, B., “ Exopolysaccharides produced by *Rhizobium radiobacter* S10 in whey and their rheological properties”, *Food Hydrocolloids*, 36, 362-368, (2014).

Zhou, K., Zeng, Y., Yang, M., Chen, S., He, L., Ao, X., et al., “Production, purification and structural study of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* BC-25”, *Carbohydrate Polymers*, 144, 205-214, (2016).

EKLER

6. EKLER

EK A.1 Tablolar

Tablo A.1: Tarhanadan izole edilen LAB izolatlarının 16S rDNA bölgesinin çoğaltılması sonucu elde edilen PZR ürünlerinin jel üzerinde görülen DNA bantlarının dizileri.

İzolat Kodu	Tanımlama Sonucu	DNA Dizisi
PFC 308	<i>Lb. plantarum</i>	GAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGG GGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTT GGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCAC TTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTATCTAGATGGTGGGGTAAAC GGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCTACCTGAGAGGGTAA TCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGG AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGAT GGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAA ACTCTGTTGTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCA GGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGG ATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTG ATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAAC TGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTG TAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCG AAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAG TATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACC GTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAG TGCTGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGC CGCAGGCTGAACTCAA

Tablo A.1 (Devamı)

<p>PFC 309 <i>Lb. plantarum</i></p>	<p>GTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCT GGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGG TCCGAGCTTGAAAGATGGCTTTGGCTATCACTTTTGGATGGTC CCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATG GCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATT GGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTA GGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCC GCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTA AAGAAGAACATATCTGAGAGTAACCTGTTTCAGGTATTGACGGT ATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGT AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTT CGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAG TGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATG CGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCT GGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAA CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAAT GCTAATTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAAC GCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAA ACTCAA</p>
<p>PFC 310 <i>Lb. plantarum</i></p>	<p>GTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCT GGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGG TCCGAGCTTGAAAGATGGCTTTGGCTATCACTTTTGGATGGTC CCGCGGCGTATTATCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATG GCAATGATACGTAGCCTACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATT GGGACTGAGACACGGCCCAAACCTACTACGGGAGGCAGCAGT AGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGC CGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTT AAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACCTGTTTCAGGTATTGACGG TATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGC GTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGC CTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTT GAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAA ATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTG TCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGC AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATG AATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCT AACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCT GAAACTCAAAGG</p>

Tablo A.1 (Devamı)

<p>PFC 311 <i>Lb. plantarum</i></p>	<p>TGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAAC ACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCG CATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGG ATGGTCCC GCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTC ACCATGGTAATGATACCTAGCCTACCTGAGAGGGTAATCGG CCACATTGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGG CAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGG AGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAA CTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTTCA GTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGG ATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCT GATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAA ACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCAT GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGACACCAGTG GCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCG AAAGTATGGGTAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA TACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCC TTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAG TACGGCCGCAGGCTGAAACTCAAAGG</p>
<p>PFC 312 <i>Lb. plantarum</i></p>	<p>GGACATCTGCCCTCAGGCGGTGGAGAACACGTGGAAACGCG TGCTAATACCGCAGATTAACGGGGACCGCATGCGCTTCTGGG CAGGTATGGCTGTGGCTATCACTTGTGGATGGCCCCCGGCG TGTTATCTTGATGGTGGGGCAACTGCTCACCATGGTTCCGAT ACCTTGCCTACCTGAGAGGGCGCCGCGGGCGTTTGGGACTGA GACACGGCCCATCCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC TTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGA GTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAA GAACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAAGGTATTGACGGTATTTA ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAA GCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCG GCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGT GCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATG CGTAGATATATGGAAGACACCAGTGGCGAATGCGGCTGTCT GGTCTGTAACCTGACGCTGAGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAC AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAAT GCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAA CGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCANGCTGA AACTCAAAG</p>

Tablo A.1 (Devamı)

PFC 313	<i>Lb. plantarum</i>	<p>AGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGATAACACG TGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATG GTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGT CCC GCGGCGTATTATCTTGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATG GTAATGATACCTTGCCTACCTGAGAGGGTAATCGGCCGTTTGG GACTGAGACACGGCCATCCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG GAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGC GTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAA GAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATT TAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAA AGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCG GCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTG CAGAAGAGGACAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCG TAGATATATGGAAGACACCAGTGCGGAANGCGGCTGTCTGGT CTGTAAGTACGCTGAGCTCGAAAGTATGGGTAGCAACAGGA TTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAG TGTTGGAGGGTTTCCGCCCTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTA AGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAA AGGAATTGACGGGGC</p>
---------	----------------------	--

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Duygu ZEHİR

Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul/01.01.1989

Lisans Üniversitesi : 19 Mayıs Üniversitesi

Elektronik posta : dzehir@pau.edu.tr

İletişim Adresi : Zeytinköy Mahallesi, Mimar Sinan Caddesi,
No:49/1, Pamukkale/DENİZLİ

Yayın Listesi :

Şimşek, Ö., Zehir, D., Yazıcı, G. Ve Kördikanlıoğlu B., (2015), “ Determination Of The Microbiological And Chemical Changes At The Fermentation Of Uşak Tarhana Prepared With Enriched Formulation For Infant Nutrition ”, The 3 Rd International Symposium On Traditional Foods From Adriatic To Caucasus, Poster Sunum, 1-4 Ekim, Sarajevo /Bosnia And Herzegovina.

Şimşek, Ö. ve Zehir, D., (2016), “ The Diversity Of Exopolysaccharide Producer Lactic Acid Bacteria In Tarhana Fermentation ”, Symposium On Euroasian Biodiversity (SEAB), Poster Sunum, 23-27 Mayıs, Antalya/Türkiye.

Zehir, D., Kaya, H.İ. ve Şimşek, Ö., (2017), “Determination Of Antimicrobial Activities Of Sage And Linden Herbal Teas Which Are Sold By Tea Bag And Unpacked ”, Uluslararası Tıbbi Ve Aromatik Bitkiler Kongresi (TABKON), Poster Sunum,10-12 Mayıs, Konya/Türkiye.

Kaya, H.İ. ve Zehir, D., (2017), “ Microbiological Properties Of Strained (Süzme) And Burnt (Yanık) Yoghurts Consumed in Denizli ”, International Conference On Agriculture, Forest, Food Sciences And Technologies (ICAFOF), Poster Sunum, 15-17 Mayıs, Kapadokya/Türkiye.