



Araştırma Makalesi

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

Berat ÇINAR ACAR^{1*}, Hazer YÜKSEKDAĞ²

ÖZ

Bu çalışmada, tavuk gastrointestinal sisteminden elde edilen 25 laktobasil izolatının β -glukozidaz, β -galaktozidaz enzim aktiviteleri ve hücre içi/hücre dışı folat üretim miktarları belirlenmiştir. İzolatların, β -glukozidaz ve β -galaktozidaz aktiviteleri sırasıyla, 0.42 U/mg-7.40 U/mg ve 0.06 U/mg-6.35 U/mg arasında değişirken, hücre içi folat üretimleri 10.1 μ g/L-124.2 μ g/L, hücre dışı folat üretimleri ise 4.2 μ g/L-121.0 μ g/L arasında değişkenlik göstermiştir. Çalışmada, farklı parametrelerin (pH, sıcaklık) β -glukozidaz/ β -galaktozidaz enzim aktivitesi ve hücre içi/dışı folat üretimleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. İzolatların hem enzim aktivitelerinin hem de hücre içi/hücre dışı folat üretimi için optimum pH'nın 6.2, sıcaklığın 37°C olarak tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Laktobasil, β -glukozidaz, β -galaktozidaz, folat

The Relationship Between Intracellular and Extracellular Folate Production and β -Glucosidase and β -Galactosidase Enzyme Production of Lactobacillus Genus Bacteria

ABSTRACT

In this study, β -glucosidase, β -galactosidase enzyme activities, and intracellular/extracellular folate production amounts of 25 lactobacillus isolates obtained from the chicken gastrointestinal tract were determined. While the β -glucosidase and β -galactosidase activities of the isolates ranged between 0.42 U/mg-7.40 U/mg and 0.06 U/mg-6.35 U/mg, respectively, their intracellular folate production was 10.1 μ g/L-124.2 μ g/L, extracellular folate production varied between 4.2 μ g/L-121.0 μ g/L. The effect of different parameters (pH, temperature) on β -glucosidase/ β -galactosidase enzyme activity and intracellular/extracellular folate production was investigated in the study. The optimum pH for the isolates' enzyme activities and intracellular/extracellular folate production was 6.2, and the temperature was 37°C.

Keywords: *Lactobacillus*, β -glucosidase, β -galactosidase, folate

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0000-0003-4662-0865, 0000-0001-7953-2920

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 17.11.2023

Kabul Tarihi: 24.05.2024

¹ Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye

² Gazi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Gölbaşı, Ankara, Türkiye

*E-posta: beratcinar@gazi.edu.tr

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

Giriş

Enzimler, organizmalarda çeşitli biyolojik fonksiyonlara aracılık eden hayati moleküllerdir (Wang ve ark., 2019). Proseste kendileri tüketilmeden substrat moleküllerini farklı ürünlere dönüştürürler. Yüksek özgülük ve katalitik etkinlik nedeniyle vücuttaki enzim metabolizmasının dengesizliği birçok hastalığa neden olabilmektedir (Wu ve ark., 2021; Lian ve ark., 2022). Bu nedenle, enzim aktivitesinin yüksek hassasiyet ve doğrulukla belirlenmesi oldukça önemlidir.

Endüstriyel enzim kullanımı, tüketici tercihleri, çevre ve doğal kaynakların tükenmesine yönelik endişeler nedeniyle önemli ölçüde artmıştır. Enzimatik süreçler, daha az enerji gerektirmesi, toksik olmaması, çevre dostu ve daha sürdürülebilir olması nedeniyle ilaç, süt ürünleri, tekstil, kağıt, deri, biyoyakıtlar, deterjanlar, özel kimyasallar, deterjanlar ve tüketici ürünleri gibi bir çok endüstride kullanılmaktadır (Wu ve ark., 2021, Sheldon ve ark., 2022, Kabir ve Ju, 2023). Laktik Asit Bakterileri (LAB) ve özellikle laktobasiller, sahip oldukları primer (asitler, enzimler, vitaminler vb.) ve sekonder metabolitleri (bakteriyosin vb.) nedeniyle endüstride yoğun ilgi gören bir bakteri grubudur (Zacharof ve ark., 2010). LAB, bozulabilir gıdaların ve süt, sebze, et, balık, baklagiller ve tahıllar gibi diğer gıdaların besleyici niteliklerini ve raf ömrünü iyileştirmek için dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır (Sumengen ve ark., 2013). Gastrointestinal sistemde de yaygın olarak bulunan LAB enzim ve vitamin kaynağı olarak kullanılabilirliklerinin belirlenmesi amacıyla sıklıkla taranmaktadır.

Glukosidazlar, doğada glikozitlerin hidrolizini katalize edebilen çok yaygın bir enzim grubudur. β -glukozidaz (β -glu), biyotransformasyon, sekonder metabolizma, patojenlere karşı bitki savunması ve insan dokularında ve hücre duvarlarında glukozit seramid katabolizması gibi çeşitli biyolojik süreçlerde önemli rol oynayan glukozidaz türüdür (Bi ve ark., 2019; Chen ve ark., 2021; Yuan ve ark., 2022). Disakkaritler, oligosakkaritler ve diğer glukoz içeren moleküllerdeki β -glikosidik bağları hidrolize edebilme yeteneği gösterirler (Liu ve

ark., 2022; Yao ve ark., 2023). β -glukozidazlar, glukozidik bağların hem sentezini hem de bozunmasını katalize eden çift karakterli enzimlerdir (Pereira ve ark., 2023). Memelilerde, bitkilerde ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan bu enzim, Gaucher hastalığı, nekrotizan enterokolit, lizozomal depo hastalığı, metastatik kanser gibi hastalıklarda erken teşhisi için biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Zhou ve ark., 2017; Han ve ark., 2021; Sinha ve ark., 2021). Ayrıca, gıda endüstrisinde içeceklerin tatlarının iyileştirilmesinde ve soya fasulyesi ürünlerindeki glikosil flavonoidlerin glikozit parçalarını uzaklaştırılmasında da oldukça önemlidir. Bu sayede flavonoidler bağırsak tarafından kolaylıkla emilebilmekte ve yararlı etki sağlayabilmektedir (de Ovalle ve ark., 2021; Ningtyas ve ark., 2021; Liu ve ark., 2022).

Glikozit hidrolaz enzimi olan β -galaktozidaz (β -gal), gıda endüstrisinde laktoz içermeyen süt ürünleri üretiminde kullanılmaktadır. Sütte bulunan laktozu hidrolize ederek laktoz sindirim bozukluğunun etkilerini önlemeye yardımcı olması nedeniyle gıda endüstrisinde kullanılan en önemli biyoteknolojik enzimlerden biridir (Kayukawa ve ark., 2020). Laktozun allolaktoza transgalaktosilasyonunu katalize etme yeteneği gösteren β -galaktozidaz enzimi, allolaktoz sentezinin ardından, disakkariti galaktooligosakkaritlere (prebiyotik) polimerize edebilmektedir (Yañez-Ñeco ve ark., 2021). β -galaktozidaz, laktoz açısından zengin ortamlarda çok sayıda mikroorganizmadan etkili bir şekilde elde edilebilmektedir (Bentahar ve ark., 2019). Yararlı bir raportör enzim olarak iyi bilinen β -galaktozidaz, gen ekspresyonu, enzime bağlı immünosorbent testi, transkripsiyon, transfeksiyon ve hibridizasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Birkaç çalışma, β -galaktozidazın kolorektal ve yumurtalık kanserleri dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar için güçlü bir biyobelirteç olabileceğini göstermiştir (Asanuma ve ark., 2015; Gu ve ark., 2016; Kim ve ark., 2017; Lee ve ark., 2021).

Folat (B9 vitamini), hücre bölünmesi, DNA replikasyonu, metilasyon, nükleotit biyosentezi ve amino asit metabolizmasında yer aldığı için

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

insan metabolizması için gereklidir (Preedy, 2013; Mahara ve ark., 2019). Nöral tüp defektleri, megaloblastik anemi ve kolorektal kanser gibi birçok sağlık bozukluğuna yol açan folat eksikliği hem gelişmiş hem de düşük gelirli ülkelerde küresel bir sağlık sorun haline gelmiştir (Bailey ve ark., 2015; Bationo ve ark., 2020). Folat sadece bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilmektedir (Donnelly, 2001). İnsan vücudunda üretilmediği için besinler yoluyla alınması gerekmektedir (Mahara ve ark., 2019). Maya ve birçok laktik asit bakterisi (LAB), fermantasyon sırasında folatı sentezleyebildiğinden, fermantasyon ayrıca gıda ürünlerinin folat içeriğini artırmanın iyi bir yolu olarak kabul edilmektedir (Saubade ve ark., 2017). *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* ve *Bifidobacteria* dâhil olmak üzere birçok LAB'nin folat üretebildiği ve farklı suşların folat üretim kapasitelerinin de değişebileceği bildirilmiştir (Mattarelli ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2020).

Doğal kaynaklardan izole edilen mikroorganizmaların ürettikleri primer metabolitlerin (enzim, vitamin gibi) endüstriyel üretimde kullanılabilmesi ve büyük ölçekli süreçlerde uygulanabilmesi için öncelikli olarak kullanılacak mikroorganizmanın üretilen metabolitler açısından laboratuvar koşullarında taranmasına odaklanılmaktadır. Bu amaçla bu çalışmada, enzim ve vitamin üretiminde endüstriyel olarak kullanılabilirliği olabilecek izolatlar taranmıştır. Çalışmada, tavuk gastrointestinal sisteminden elde edilen 25 laktobasil bakterisinin β -glukozidaz/ β -galaktozidaz enzim aktivitesi ve hücre içi/hücre dışı folat üretim kapasitelerinin belirlenerek endüstriyel üretimlerde potansiyel bakteri olabirliğinin araştırılması hedeflenmiştir. Ayrıca, yüksek β -glukozidaz/ β -galaktozidaz spesifik enzim aktivitesine ve yüksek hücre içi ve hücre dışı folat üretimine sahip izolatlarında, farklı pH ve sıcaklık koşullarının enzim aktivitesine ve folat üretimine etkisi araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem Bakteriler ve Elishme Ortamları

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarı stok kültür koleksiyonunda yer alan, tavuk gastrointestinal sisteminden izole edilen 25 laktobasil izolatının β -glukozidaz spesifik enzim aktivitesi ve hücre içi/hücre dışı folat üretim kapasitelerinin belirlenmesinde Man & Rogosa ve Sharp (MRS, 10 g/L pepton, 5 g/L yeast ekstrakt, 10 g/L beef ekstrakt, 20 g/L glukoz, 2 g/L dipotasyum fosfat, 5 g/L sodyum asetat, 0.2 g/L magnezyum sülfat, 0.05 g/L mangan sülfat, 2 g/L amonyum sitrat, 1.08 mL tween 80, pH 6.2) besi ortamı kullanılırken β -galaktozidaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde ise MRS içeriğindeki %2'lik glukoz yerine aynı oranda laktoz ilave edilen Lac-MRS besiyeri kullanılmıştır. İzolatların gelişmeleri MRS besi ortamında 37°C'de 24 saat inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir.

Enzim Aktivitesi

Uygun besi ortamlarında iki kez aktifleştirilen izolatlar, inkübasyon sonunda 5000 rpm'de 20 dk +4°C'de santrifüj edilmiştir (Sigma 2-16 KC). Hücre pelleti serum fizyolojik (SF, %0.876 NaCl) ile iki kez yıkanarak Mc Farland 5'e (~15 log kob/mL) ayarlanmıştır. Kültürlerden elde edilen pellet β -glukozidaz enzim aktivitesi çalışmalarında 0.5 M potasyum fosfat (%0.02 KCl, %0.144 Na₂HPO₄, %0.8 NaCl, %0.024 KH₂PO₄, pH 6.2) ve β -galaktozidaz enzim aktivitesi çalışmalarında ise 0.03 M potasyum fosfat tamponu (pH 6.2) ile yıkanmış ve örnekler 1 mL'lik uygun tamponda çözülmüştür. İzolatların hücre duvarı, ultrasonikasyon cihazı (50 MHz, 5 dk, Vibra-Cell, Sonics & Materials Inc. Danbury) ile parçalanmış ve hücre atıkları 1000 rpm'de 10 dk +4°C'de santrifüj ile uzaklaştırılmıştır.

β -glukozidaz Aktivite: Enzim aktivitesinin ölçümü için substrat olarak p-nitrofenil- β -D glukopiranozit (p-NPG) kullanılmıştır (Matsuda ve ark., 1994; Strahsburger ve ark., 2017). 0.5 M potasyum fosfat tamponunda (pH 6.2), 2 mL 2.5 mM p-NPG içeren karışıma, hücre süspansiyonundan 0.5 mL eklenmiş ve karışım 30°C'da 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyonu durdurmak için karışım 95°C'da 5 dk bekletilmiştir. β -glukozidaz aktivite tespiti

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

için 420 nm dalga boyunda (Hitachi UV-1800) ölçüm yapılmıştır (Choi ve ark., 2002).

β -galaktozidaz Aktivite: Enzim aktivitesinin belirlenmesinde substrat olarak o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozit (oNPG, Sigma) kullanılmıştır. 0.03 M potasyum fosfat tamponu (pH 6.8) içinde, 15 mM 0.2 mL o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozit (o-NPG) içeren karışıma, enzim ekstraktından 1 mL eklenmiş ve 37°C'da 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyonu durdurmak için 1 M 0.5 mL sodyum karbonat (Merck) solüsyonu eklenmiştir. 1000 rpm'de 10 dk +4°C'da santrifüj edilmiş ve β -galaktozidaz aktivite tespit için 420 nm dalga boyunda (Hitachi UV-1800) ölçüm yapılmıştır (Zhang ve ark., 2012). Enzim aktivite çalışmalarında, hücre dışı β -Glu/ β -Gal aktivitesi için kültürlerin süpernatantı, hücre içi β -Glu/ β -Gal aktivitesi için ise pellet kullanılmıştır (Matsuda ve ark., 1994; Zhang ve ark., 2012).

1 ünite enzim aktivitesi dakikada 1 μ mol ürünü serbest bırakan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Bir miligram (mg) proteinde bulunan enzim ünite sayısı ise spesifik aktivite olarak kabul edilmektedir ($U = \mu\text{mol/dk}$). Enzimin saflığını kabaca tanımlamak için kullanılan spesifik aktivite aşağıdaki formüle göre hesaplanmaktadır (Temizkan ve ark., 2008).

Enzim aktivitesi = $(V_t \times dA/dt \times \text{dilüsyon faktörü}) / (\epsilon \lambda \times v_s \times d) = (U/mL)$

$\epsilon \lambda$ = Absorpsiyon katsayısı ($\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$)

d = Küvetin ışık yolu (genellikle 1 cm)

dA/dt = Birim zamanda (dakikada) absorbans değişimi (dk^{-1})

V_t = Reaksiyon karışımının toplam hacmi (mL)

v_s = Reaksiyona katılan örnek (enzim) hacmi (mL)

Spesifik enzim aktivitesi ise aşağıda yer alan formüle göre hesaplanmıştır;

Spesifik Aktivite (U/mg) = $(\text{Enzim aktivitesi } (U/mL) / (\text{Protein miktarı } (\text{mg/mL}))$

pH ve Sıcaklığın β -glukozidaz/ β -galaktozidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

β -glukozidaz aktiviteleri belirlenen izolatlardan, en yüksek spesifik aktiviteyi gösteren iki laktobasil izolatı (ZD26 ve ZD37) ve β -glakozidaz aktiviteleri belirlenen izolatlardan en yüksek spesifik aktiviteyi gösteren iki laktobasil izolatı (ZD22 ve ZD34) seçilerek farklı pH ve sıcaklığın enzim aktivitelerine etkisi tespit edilmiştir.

Farklı pH'lardaki enzim aktivitelerin belirlenmesinde; β -glukozidaz için reaksiyon ortamı olan 0.5 M potasyum fosfat tamponunun ve β -galaktozidaz için ise reaksiyon ortamı olan 0.03 M potasyum fosfat tamponunun pH'sı 5.5, 6.2 (Kontrol) ve 7.5'e ayarlanarak reaksiyon 30°C, 37°C (Kontrol) ve 45°C'de gerçekleştirilmiştir (Kara, 2004; Ismail ve ark., 2010; Cinar Acar ve Yuksekdog, 2023).

Folat Üretimi

Sybesma ve ark. (2003 a,b) ve Aswathy ve ark. (2008) metotlarında bazı değişiklikler yapılarak bakterilerin folat üretme kapasitesi tespit edilmiştir. MRS besi ortamı ve 0.1 M potasyum fosfat tamponu (pH 6.2) kullanılarak bakterilerin hücre içi ve hücre dışı folat üretimleri belirlenmiştir.

Hücre içi folat üretimi: Mc Farland 5'e ($\sim 15 \log$ kob/mL) ayarlanan izolatlar besi ortamına %2 oranında eklendikten sonra 37°C'de 24 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 5 dk boyunca 50 MHz frekansta sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Folat bağlayıcı proteinlerin folattan ayrılması için örnekler 100°C'de 15 dk bekletildikten sonra 4000 $\times g$ 'de 10 dk 4°C'da santrifüj edilmiştir. Sıcak su banyosunda ikinci kez (5 dk) bekletme işleminden sonra 10 000 $\times g$, 5 dk, 4°C yeniden santrifüj yapılmıştır. Santrifüj işlemi sonrası oluşan süpernatant 0.45 μm 'lik filtreden geçirilmiş ve 96'lık mikro-kuyucuklarda OD₅₈₀ nm'de ölçüm yapılarak hücre içi folat üretim miktarı tespit edilmiştir. 0.1-10 $\mu\text{g/L}$ arasında değişen derişimlerde standart çözeltiler hazırlanarak bakterilerdeki folik asit konsantrasyonu spektrofotometrede ölçülmüştür ve hücre içi folat üretimi $\mu\text{g/L}$ cinsinden hesaplanmıştır (Horne ve Patterson, 1988).

Hücre dışı folat üretimi: Mc Farland 5'e ($\sim 15 \log$ kob/mL) ayarlanan izolatlar besi ortamına %2

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

oranında eklendikten sonra 37°C'de 24 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 12 000xg'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Aynı oranda (1:1) süspansiyon edilen süpernatant ve potasyum fosfat tamponu karışımdan folat bağlayıcı proteinlerin ayrılması için örnekler 100°C'de 15 dk bekletilmiş ve 4000xg'de 10 dk 4°C'da santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatanta (2 mL) 0.4 mL insan plazması, 0.1 M 2-merkaptetanol, %0.5 sodyum askorbat eklenerek çalkalamalı etüvde 37°C'da 1 saat süresince bekletilmiştir. Sıcak su banyosunda ikinci kez (5 dk) bekletme işleminden sonra 27 000xg, 10 dk, 4°C santrifüj uygulanmıştır. Santrifüj sonrası süpernatant 0.45 μ m'lik filtreden geçirilmiş ve 96'lık mikrokuyucuklarda OD₅₈₀ nm'de ölçüm yapılarak hücre dışı folat üretim miktarı tespit edilmiştir.

pH ve Sıcaklığın Folat Üretimine Etkisi

Farklı sıcaklık ve pH' koşullarının folat üretimini artırıcı ya da azaltıcı etkisinin bulunup bulunmadığını belirlemek amacıyla hücre içi ve hücre dışı folat üretimi en yüksek çıkan iki izolat (ZD20 ve ZD28) seçilmiştir. İzolatlar pH'sı 5.5, 6.2, 7.5'ye ayarlanmış 0.1 M potasyum fosfat tamponu içeren MRS besi ortamında (pH değişimi ve potansiyel olarak folat analizini etkileyebilecek reaktif türlerin oluşumunu engellemek amacıyla steril olarak filtrelenen) geliştirilmiştir. Ardından 15 ile 30 saat boyunca üç farklı sıcaklıkta (30, 37 ve 45°C) gelişmeye bırakılmıştır. İzolatların 30, 37 (Kontrol), 45°C ve pH 5.5, 6.2 (Kontrol), 7.5 koşullarındaki hücre içi ve hücre dışı folat üretim kapasiteleri yukarıda verilen yöntemlere göre belirlenmiştir.

İstatistiksel Analizler

Tüm çalışmalar üç paralel ve üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir ve bulunan değerlerin ortalama sonuçları verilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen veriler bu tekrarların ortalaması \pm standart sapma (SD) şeklinde verilmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS Inc. Yazılım (sürüm 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılmıştır. Değişkenlerin her birinin (β -glukozidaz, β -galaktozidaz, hücre içi ve hücre

dışı folat üretimi) ayrı ayrı birbirleri arasındaki ilişki korelasyon analizi ile belirlenmiştir. Değişkenler arasındaki korelasyonun önem değerleri $p < 0.01$ olarak belirlenmiştir.

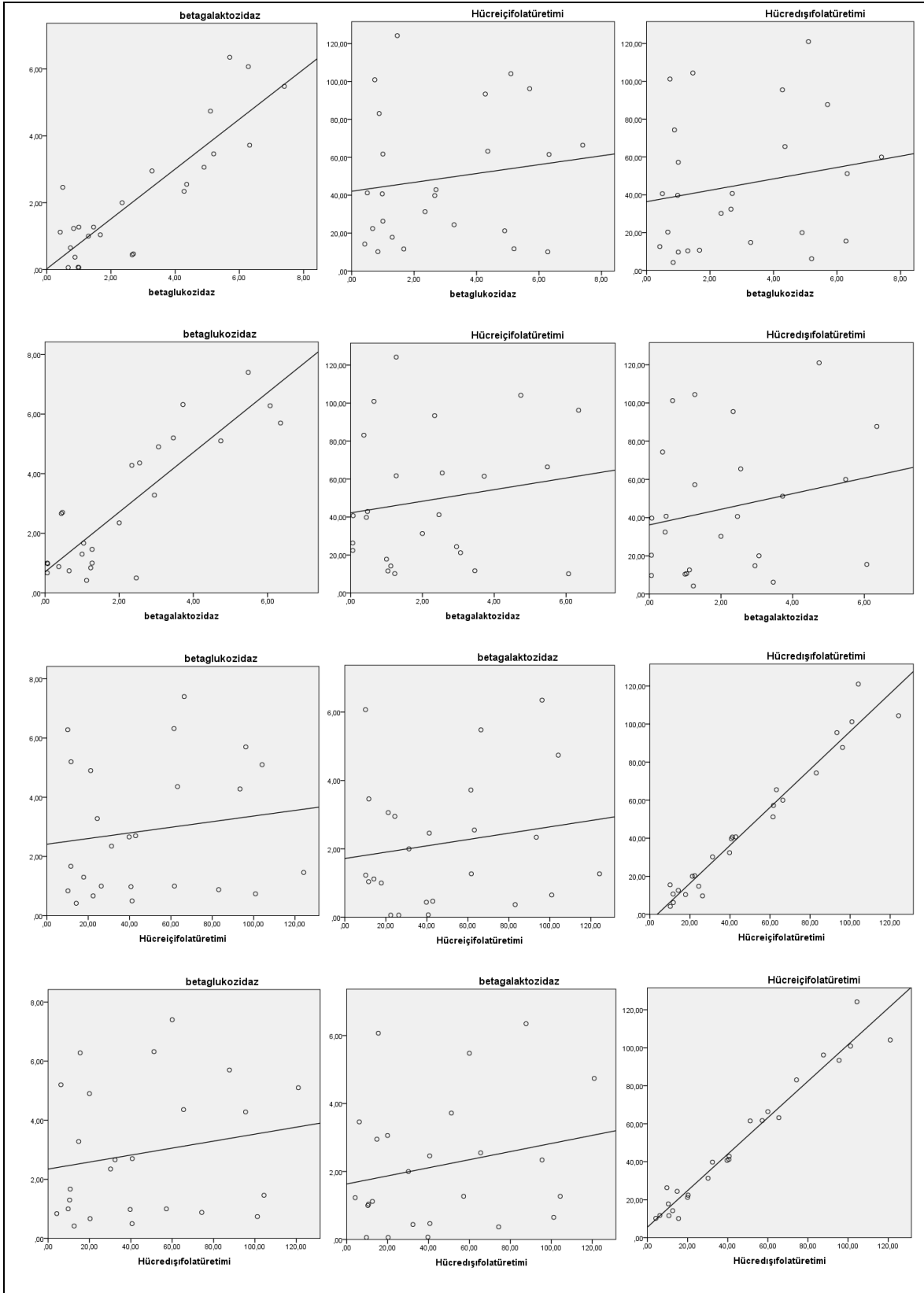
Bulgular ve Tartışma

Bu çalışmada tavuk gastrointestinal sisteminden izole edilen toplam 25 izolatın β -glukozidaz ve β -galaktozidaz enzim aktiviteleri ve folat üretim yetenekleri (değişkenler) araştırılmış ve istatistiksel olarak değişkenlerin birbirleriyle olan ilişkileri serpmme grafikleri ile Şekil 1'de gösterilmiştir.

Beta-glukozidaz, glikozidik bağın hem sentezini hem de bozunmasını içeren çift karakterli bir enzimdir ve β -glukozidazın bu özelliği, onu endüstriyel açıdan muazzam potansiyele sahip bir enzim yapmaktadır (Singh ve ark., 2016; Srivastava ve ark., 2019).

Çalışmamızda, 25 izolatan *Lactobacillus* sp. ZD33 0.42 U/mg ile en düşük, *Lactobacillus* sp. ZD26 izolatu ise 7.40 U/mg ile yüksek β -glukozidaz spesifik enzim aktivitesi göstermiştir (Tablo 1). Tsangalis ve ark. (2002), *Bifidobacterium longum*-b'nin MRS-glu besi ortamında geliştirildiğinde β -Glu aktivitesinin 4.625 U/mg olduğunu bildirmişlerdir. 63 *Lactobacillus* suşunun β -Glu aktivitesinin incelendiği bir çalışmada, en yüksek enzim aktivitesinin pH 6.4 ve 42°C'de *L. rhamnosus* CRL981 (22.93 UE/mg) suşunda gözlemlendiği rapor edilmiştir (Marazza ve ark., 2009). *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Propionibacterium* cinslerinin kullanıldığı bir çalışmada, kültürlerin 0.250-3.000 U/mg arasında değişen seviyelerde β -Glu spesifik enzim aktivitesine sahip oldukları ifade edilmiştir. Genel olarak *Propionibacterium* suşlarının, diğer *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarına kıyasla daha düşük spesifik aktivite gösterdiği ve enzimatik aktivitenin türe, büyüme ortamına ve kültür koşullarına bağlı olarak değişkenlik gösterdiği rapor edilmiştir (Yuksekdag ve ark., 2018).

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki



Şekil 1. Değişkenlerin (β -glukozidaz, β -galaktozidaz, hücre içi folat üretimi ve hücre dışı folat üretimi) birbirleriyle olan ilişkilerini gösteren serpmne grafikleri

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

Tablo 1. *Lactobacillus* izolatlarının β -galaktozidaz/ β -glukozidaz spesifik enzim aktivitesi ile hücre içi/hücre dışı folat üretimleri

<i>Lactobacillus</i> izolatları	β -glukozidaz (U/mg) Spesifik Aktivite	β -galaktozidaz (U/mg) Spesifik Aktivite	Hücre içi folat üretimi (μ g/L)	Hücre dışı folat üretimi (μ g/L)
ZD 11	5.20±0.10	3.46±0.00	11.7±0.1	6.2±0.0
ZD 13	1.30±0.00	1.00±0.00	17.8±0.3	10.4±0.3
ZD 14	2.70±0.15	0.47±0.10	42.9±1.0	40.7±0.0
ZD 15	1.00±0.00	0.06±0.00	26.3±1.3	9.7±0.7
ZD 16	2.66±0.21	0.44±0.00	39.8±1.5	32.4±1.0
ZD 17	0.98±0.00	0.07±0.00	40.7±0.6	39.7±0.0
ZD 18	0.88±0.00	0.37±0.00	83.1±1.2	74.3±1.2
ZD 19	0.74±0.10	0.65±0.10	100.9±0.1	101.2±1.3
ZD 20	1.46±0.10	1.27±0.10	124.2±1.2	104.4±0.0
ZD 21	2.35±0.20	2.00±0.15	31.3±0.4	30.2±0.0
ZD 22	5.70±0.10	6.35±0.00	96.2±1.3	87.7±1.2
ZD 23	4.28±0.00	2.34±0.00	93.4±0.0	95.5±0.0
ZD 24	1.00±0.00	1.27±0.12	61.7±0.0	57.2±0.7
ZD 26	7.40±0.00	5.48±0.11	66.4±0.1	60.0±0.0
ZD 27	4.90±0.20	3.06±0.00	21.2±0.0	20.0±0.4
ZD 28	5.10±0.10	4.74±0.15	104.1±0.2	121.0±0.0
ZD 29	0.84±0.00	1.23±0.00	10.2±0.1	4.2±1.1
ZD 30	1.67±0.10	1.04±0.00	11.6±1.1	10.7±1.2
ZD 31	0.67±0.15	0.06±0.10	22.4±0.0	20.3±0.0
ZD 32	0.50±0.00	2.46±0.10	41.2±0.3	40.6±0.6
ZD 33	0.42±0.10	1.12±0.20	14.2±0.1	12.6±0.0
ZD 34	6.28±0.00	6.07±0.00	10.1±0.4	15.5±0.8
ZD 35	4.36±0.10	2.55±0.00	63.2±0.0	65.5±0.0
ZD 37	6.32±0.00	3.72±0.00	61.5±0.0	51.2±0.0
ZD 38	3.28±0.00	2.95±0.00	24.4±0.5	14.8±1.2

±: standart sapma şeklinde sunulmuştur.

Başka bir çalışmada, β -glukozidaz aktivitesine sahip potansiyel probiyotik suşlar arasından, *L. perolens* FI10842'nin en yüksek (49.10 mU/mL), *L. brevis* FI10700'in en düşük (2.13 mU/mL) β -glukozidaz aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Son ve ark., 2018). Cinar Acar ve Yuksekdağ (2023). çalışmalarında gıda (peynir, yoğurt) ve hayvansal (tavuk) kaynaklı 39 *Lactobacillus* spp. ile insan kaynaklı (yenidoğan dışkısı) üç *Bifidobacterium* spp. kullanmışlar ve kültürlerin β -glu spesifik aktivitelerini belirlemişlerdir. Araştırmacılar, *Lactobacillus* suşlarının 0.250-4.500 U/mg, Bifidobakterilerin ise 1.200-2.670 U/mg arasında spesifik aktivite yeteneği gösterdiklerini bildirmiştir. Lorn ve ark. (2021) Kamboçya ve Vietnam fermente gıdalarından izole ettikleri 200 LAB'nin β -glukozidaz aktivitesini incelemişler ve 40 suş'un

β -glukozidaz pozitif olduğunu, bunlar arasından 14 suşun ise 10-27 UA arasında enzim aktivitesi sergilediklerini rapor etmiştir.

β -Galaktozidaz, yaygın adı laktaz olan ve galaktoz ve glukoz arasındaki β -glikozidik bağın hidrolizini katalize eden bir enzimdir (Juers ve ark. 2012; Kolev ve ark. 2022). Sindirilmemiş laktozun ince bağırsakta emilmesi bu enzimin aktivitesine bağlıdır (Saqib ve ark., 2017). Fermente gıdalarda bulunan LAB, ürettikleri laktaz enzimi ile laktoz sindirimine yardımcı olur ve sağlık açısından belirgin avantajlar sağlarlar. Laktoz intoleransı semptomları, insan patojeninin adezyonunu önleyen ve β -galaktosidaz üreten probiyotiklerle desteklenen süt ürünleriyle yönetilebilir (Vasudha ve ark. 2023).

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

Çalışmamızda 25 izolatın kantitatif β -galaktozidaz taramasında, tüm izolatların β -galaktozidaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. *Lactobacillus* sp. ZD15 ve ZD31 izolatları 0.06 U/mg ile en düşük, *Lactobacillus* sp. ZD22 izolatı ise 6.35 U/mg ile en yüksek β -galaktozidaz spesifik enzim aktivitesi göstermiştir (Tablo 1). Yüksek β -galaktosidaz aktivitesine sahip olan ZD22 ve ZD34 izolatları fermente ürünlerin geliştirilmesinde starter ve potansiyel probiyotik kültürler olarak kullanıldıklarında laktoz intoleransı semptomlarını hafifletebilir. Gül Güven ve ark. (2011). termoasidofilik *Alicyclobacillus acidocaldarius rittmannii*'den elde ettikleri ve saflaştırdıkları intraselüler β -galaktozidaz enziminin spesifik aktivitesinin 113 U/mg olduğunu bildirmişlerdir. β -galaktozidaz'ın probiyotik *Pediococcus acidilactici*'den izole edildiği ve saflaştırıldığı başka bir çalışmada, enzimin 0.883 U/mg spesifik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Chanalia ve ark., 2018). Kılıc ve ark. (2014) 39 *Lactobacillus* ve 3 *Bifidobacterium* cinsine ait toplam 42 bakteriyi çalışmalarında kullanarak β -galaktozidaz spesifik aktivitelerini tespit etmişlerdir. *Lactobacillus* cinsi içerisinde en yüksek ve en düşük enzim aktivitesi sırasıyla *L. fermentum* (2.468 U/mg) ve *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (0.065 U/mg) suşlarında gözlenirken, *Bifidobacterium* cinsinde 0.420-0.726 U/mg arasında β -galaktozidaz aktivite belirlendiği bildirilmiştir. Petrol istasyonundan izole edilen *Enterobacter* sp.'nin, 76.5 U/mg β -galaktozidaz üretme yeteneği gösterdiği tespit edilmiştir (Shaikhan ve ark., 2020). Yüksekdağ ve Yüksekdağ (2021) çalışmalarında, 31 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve 34 *Streptococcus thermophilus* bakterisinin β -galaktozidaz spesifik aktivitesini incelemişler ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarının 0.186-6.500 U/mg arasında, *S. thermophilus* suşlarının ise 0.172-5.064 U/mg arasında β -galaktozidaz aktivite gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Enzimler, mikroorganizma cinsine/türüne göre intraselüler veya ekstraselüler olarak üretilmektedir (Palmer ve Bonner, 2007; İsmail ve ark., 2010). Çalışmada izolatların

enzim aktiviteleri hem hücre pelletinde hem de kültür süpernatantında çalışılmış ancak hücre pelletinde β -glukozidaz/ β -galaktozidaz aktivite belirlenirken, kültür süpernatantında tespit edilmemiştir. Böylece izolatların her iki enzimi de intraselüler olarak sentezledikleri desteklenmiştir. Ayrıca çalışmada izolatların spesifik β -glukozidaz ve β -galaktozidaz aktiviteleri arasında istatistiksel olarak $p < 0.01$ düzeyinde anlamlı bir ilişki (Pearson Correlation katsayısı 0.865) bulunmuştur (Şekil 1). Yaptığımız enzim çalışmalarında elde edilen sonuçlar bazı araştırmacıların sonuçlarına benzerlik gösterirken, bazılarınkinden düşük ve/veya yüksek bulunmuştur. Bu farklılıklar; enzim çalışmalarında kullanılan besiyeri, bakteri yoğunluğu ve enzim/substrat miktarı, enzim ekstraksiyon metodu, reaksiyon ortamının sıcaklığı, pH'ı ve enzim aktivite hesaplanma yöntemlerindeki farklılıklardan kaynaklanmış olabilir.

Enzimlerin hem pH'a hem de sıcaklığa duyarlı olduğundan enzimatik süreçlerde sıcaklık ve pH'ın optimize edilmesi önemlidir. pH, birçok fonksiyonel amino asit grubunun protonasyon (protonlanma veya protonlaşma; bir atom, molekül veya iyon proton eklenerek konjuge asidin oluşturulması) derecelerini ve dolayısıyla protein katlanmasını, aktif bölge işlevselliğini ve enzim stabilitesini etkiler. pH ayrıca bazı substratların protonasyonunu ve enzimlerin aktif bölgeleriyle iyonik etkileşimlerini de etkiler. Bu nedenle her enzimin belirli bir reaksiyon için optimal bir pH'ı vardır ve ilgili enzimatik süreç, optimal pH'ta veya buna yakın bir seviyede çalıştırılmalıdır. Enzim, kaynak organizmanın doğal ortamına bağlı olarak belirli sıcaklıkta optimum şekilde çalışır. Enzimlerin birçoğu çok hassastır ve optimum sıcaklık aralığının dışında ani aktivite düşüşü meydana gelebilir. Sıcaklığın artırılması enzim reaksiyon hızını artırabilir ancak bu durum enzimin termal stabilitesini, denatürasyonunu ve inaktivasyonunu etkiler (Arcus ve ark., 2020; Kabir ve Ju, 2023). Bu amaçla endüstriyel alanda kullanılacak enzimlerin farklı pH ve sıcaklıklarda aktivitelerinin belirlenmesi önemlidir. Çalışmamızda yüksek spesifik β -glukozidaz/ β -galaktozidaz enzim aktiviteleri gösteren ikişer

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktosidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

izolat seçilmiş (sırasıyla; ZD26 ve ZD37 / ZD22 ve ZD34) ve farklı pH ve sıcaklıklarda spesifik enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

Lactobacillus sp. ZD26 izolatında, farklı pH'lardaki (pH 5.5/6.2/7.5) β -glukozidaz spesifik enzim aktivitesinin sırasıyla, 5.84 U/mg, 7.40 U/mg ve 6.21 U/mg olduğu belirlenirken, ZD37 izolatında β -glukozidaz spesifik enzim aktivitesinin 4.06 U/mg, 6.32 U/mg ve 5.98 U/mg olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2). İzolatların her ikisinin de optimum gelişme gösterdikleri pH olan 6.2 de en yüksek β -glukozidaz spesifik enzim aktivitesi gösterdiği bulunmuştur. ZD26 izolatında, pH ve β -glukozidaz enzim aktivitesi arasında orta korelasyon (Pearson Correlation katsayısı 0.570) (Şekil 2a) tespit edilirken, ZD37 izolatında, pH ve β -glukozidaz enzim aktivitesi arasında orta korelasyon (Pearson Correlation katsayısı 0.671) olduğu belirlenmiştir (Şekil 2b). Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile laktobasillerle yapılan bazı çalışmalarla farklılık gösterirken bazılarında benzerlik göstermiştir: Cinar Acar ve Yuksekdag (2023), *L. rhamnosus* BAZ78 suşunun pH 7.5'te, Yuksekdag ve ark., (2017) *L. casei* SC1 ve *L. rhamnosus* EA1 suşlarının pH 7.5'te, Perez-Martín ve ark., (2012), 23 laktik asit bakterisinden üçünün pH 4.0'de geri kalanların ise optimum pH 6'da ve Michlmayr ve ark., (2010) *Lactobacillus brevis* SK3 suşunun pH 5.5'te en yüksek β -glukozidaz spesifik enzim aktivitesine sahip olduklarını rapor etmişlerdir.

β -glukozidaz spesifik enzim aktivitesine sıcaklığın etkisinin belirlenmesinde ise *Lactobacillus* sp. ZD26 ve ZD37 izolatlarının optimum 37°C'de (gelişme gösterdikleri sıcaklık) β -glukozidaz spesifik enzim aktiviteleri (sırasıyla 7.40 U/mg ve 6.32 U/mg) en yüksek bulunmuştur. ZD26 izolatında, sıcaklık ve β -glukozidaz enzim aktivitesi arasında zayıf korelasyon (Pearson Correlation katsayısı 0.210) (Şekil 2c) tespit edilirken, ZD37 izolatında, sıcaklık ve β -glukozidaz enzim aktivitesi arasında orta korelasyon (Pearson Correlation katsayısı 0.596) (Şekil 2d) olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile laktobasillerle yapılan bazı çalışmalarla farklılık gösterirken bazılarında benzerlik göstermiştir: *L. rhamnosus* BAZ78 suşu 37°C'de (Cinar Acar ve Yuksekdag 2023), *L. casei* SC1 ve *L. rhamnosus* EA1 suşları 30°C'de (Yuksekdag ve ark., 2018), 23 laktik asit bakterisinin optimum 45°C'de (Perez-Martín ve ark., 2012) ve *L. brevis* SK3 suşunun 45°C'de (Michlmayr ve ark., 2010) en yüksek β -glukozidaz spesifik enzim aktivitesine sahip oldukları bildirilmiştir.

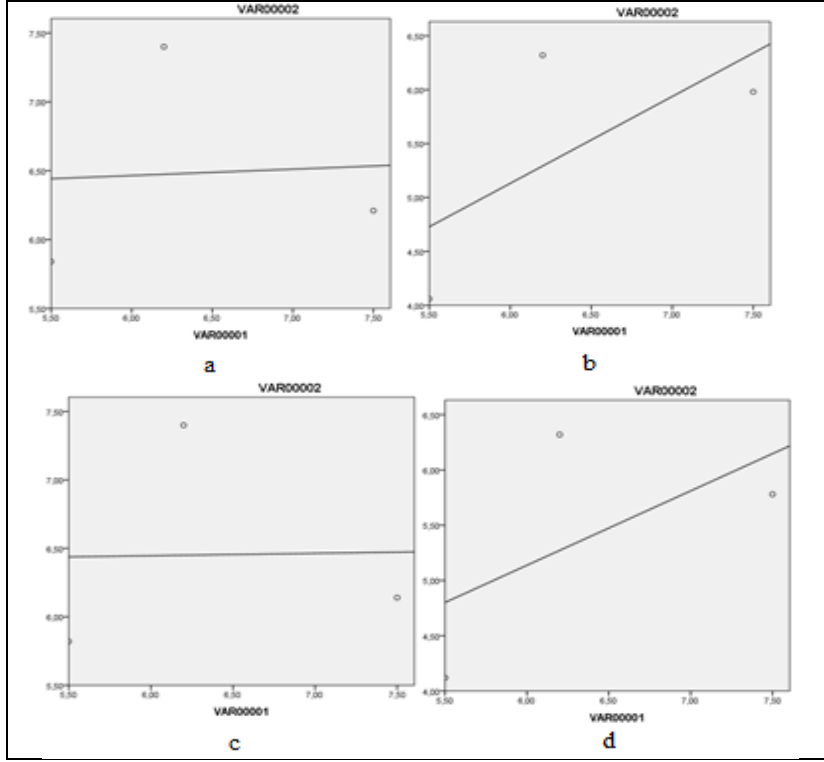
β -Galaktosidazların özellikleri kaynaklarına bağlı olarak değişebilir. Genel olarak, pH profillerine göre; mantar kaynaklarından gelen asidik β -galaktosidazlar ve maya ve bakterilerden gelen nötr β -galaktosidazlar olarak iki gruba ayrılabilirler (Carević ve ark., 2015).

Tablo 2. ZD 26 ve ZD 37 izolatlarının farklı sıcaklık ve pH'daki β -glukozidaz spesifik enzim aktivitesi

İzolat	pH	Spesifik Aktivite (U/mg)	Sıcaklık (°C)	Spesifik Aktivite (U/mg)
ZD 26	5.5	5.84±0.00	30	5.82±0.02
	6.2 (Kontrol)	7.40±0.00	37 (Kontrol)	7.40±0.00
	7.5	6.21±0.02	45	6.14±0.01
ZD 37	5.5	4.06±0.00	30	4.12±0.00
	6.2 (Kontrol)	6.32±0.00	37 (Kontrol)	6.32±0.00
	7.5	5.98±0.01	45	5.78±0.05

±: standart sapma şeklinde sunulmuştur.

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki



Şekil 2. ZD 26 ve ZD 37 izolatlarının β -glukozidaz spesifik enzim aktivitesinin farklı pH ve sıcaklık ile olan ilişkilerine ait korelasyon grafikleri

Beklenildiği gibi çalışmamızda kullanılan her iki izolat içinde optimum pH'ı nötr pH'a yakın (pH 6.2) bulunmuştur. ZD22 izolatında, farklı pH'lardaki (pH 5.5/6.2/7.5) β -galaktozidaz spesifik enzim aktivitesinin sırasıyla, 2.64 U/mg, 6.35 U/mg ve 5.56 U/mg olduğu belirlenirken, ZD34 izolatında β -galaktozidaz spesifik enzim aktivitesinin sırasıyla 3.50 U/mg, 6.07 U/mg ve 5.22 U/mg olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3). Benzer şekilde LAB türlerinin optimum pH'ının nötr pH aralıkları olduğu rapor edilmiştir (İsmail ve ark., 2010, Kılıc ve ark., 2014, Carević ve ark., 2015, Yüksekdağ ve Yüksekdağ, 2021). ZD22 izolatında, pH ve β -galaktozidaz enzim aktivitesi arasında orta korelasyon (Pearson Correlation katsayısı 0.623) (Şekil 3a) tespit edilirken, ZD34 izolatında, pH ve β -galaktozidaz enzim aktivitesi arasında orta düzeyde korelasyon (Pearson Correlation katsayısı 0.519) (Şekil 3b) olduğu belirlenmiştir. Sıcaklık enzim denatürasyonu ve dolayısıyla aktivite düşüşü için önem bir faktördür (Kabir ve Ju, 2023). Tablo 3'te iki izolatın farklı sıcaklıklardaki β -galaktozidaz spesifik enzim aktivitesi verilmiştir. Farklı sıcaklıklarda (30,

37, 45°C) ZD22 ve ZD34 izolatlarının spesifik β -galaktosidaz aktivite seviyelerinin 2.50 U/mg ila 6.35 U/mg arasında olduğu tespit edilmiştir. Her iki izolatın (ZD22, ZD34) en yüksek spesifik enzim aktivitesinin 37°C (sırasıyla; 6.35 U/mg ve 6.07 U/mg) olduğu ve en düşük spesifik enzim aktivitesinin ise 45°C de (sırasıyla; 2.50 U/mg ve 2.67 U/mg) olduğu belirlenmiştir. ZD22 izolatında, sıcaklık ve β -galaktozidaz enzim aktivitesi arasında negatif yönde orta düzeyde korelasyon (Pearson Correlation katsayısı -0.762) (Şekil 3c) tespit edilirken, ZD34 izolatında, sıcaklık ve β -galaktozidaz enzim aktivitesi arasında negatif yönde orta düzeyde korelasyon (Pearson Correlation katsayısı -0.506) (Şekil 3d) olduğu belirlenmiştir. Yüksekdağ ve Yüksekdağ (2021), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541 ve *S. thermophilus* Z1052 suşlarında 42°C, Kılıc ve ark. (2014), *L. fermentum* ZYN17 suşunda 37°C, Carević ve ark., (2015), *L. acidophilus* ATCC 4356 de optimum 45°C, Nguyen ve ark. (2007) *L. acidophilus* R22 suşunun 45°C de ve İsmail ve ark., (2010) *L. acidophilus* NRRL 4495 suşunun

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

45°C de en yüksek aktivite gösterdiklerini rapor etmişlerdir.

Çalışmalar sonucunda araştırmacıların, farklı ortamlardan izole edilen bakteriler tarafından üretilen farklı enzimlerin, mikroorganizmaların izole edildiği ortamdaki pH ve sıcaklıkların üzerinde ve/veya altındaki pH ve sıcaklıklarda

maksimum aktivite gösterdiklerini rapor etmişlerdir. Arcus ve ark. (2020). enzim. kaynak organizmanın doğal yaşam ortamıyla ilişkili olduğu sıcaklık ve pH'ta en iyi şekilde işlev gördüğünü bildirmişler ki buda bizim sonuçlarımızla uyumludur.

Tablo 3. ZD 22 ve ZD 34 izolatlarının farklı sıcaklık ve pH'daki β -galaktozidaz spesifik enzim aktivitesi

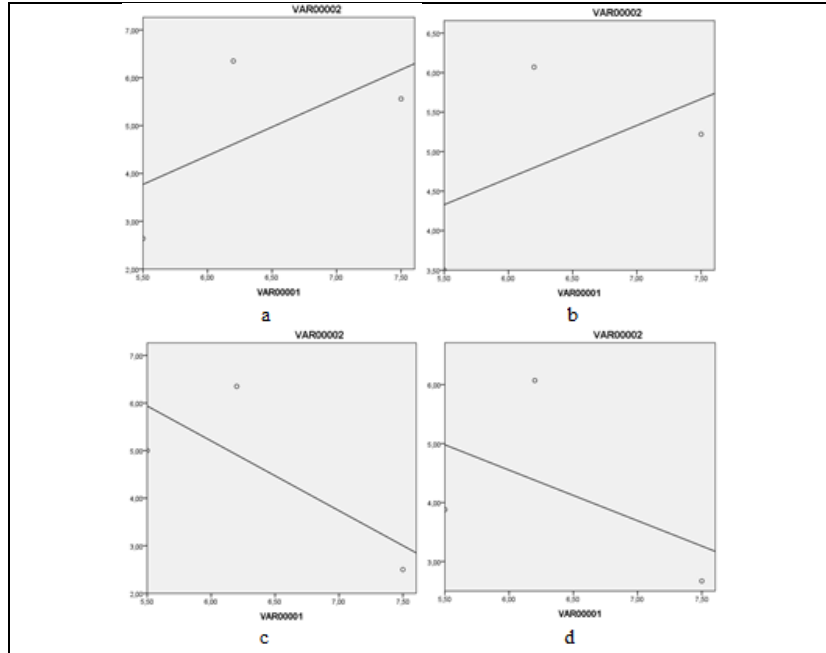
İzolat	pH	Spesifik Aktivite (U/mg)	Sıcaklık (°C)	Spesifik Aktivite (U/mg)
ZD 22	5.5	2.64±0.07	30	5.00±0.05
	6.2 (Kontrol)	6.35±0.00	37 (Kontrol)	6.35±0.00
	7.5	5.56±0.06	45	2.50±0.04
ZD 34	5.5	3.50±0.04	30	3.88±0.01
	6.2 (Kontrol)	6.07±0.02	37 (Kontrol)	6.07±0.02
	7.5	5.22±0.00	45	2.67±0.01

±: standart sapma şeklinde sunulmuştur.

Tablo 4. ZD 20 ve ZD 28 izolatlarının farklı pH ve sıcaklıklarda hücre içi/hücre dışı folat üretimi (μ g/L)

Bakteri	pH	Folat Üretimi (μ g/L)					
		Hücre içi			Hücre dışı		
		30°C	37°C	45°C	30°C	37°C	45°C
ZD 20	5.5	71.5±0.5	110±0.0	68.4±0.2	94.8±0.09	92.8±1.2	40.9±1.1
	6.2 (Kontrol)	108.9±0.0	124.2±1.2	70.7±1.1	91.1±0.1	104.4±0.0	77.6±0.6
	7.5	54.4±1.2	84.2±0.3	62.0±0.0	71.0±0.0	78.4±0.0	28.7±0.0
ZD 28	5.5	88.3±0.0	98.3±1.0	60.7±0.7	100.7±0.0	119.9±0.0	95.1±0.1
	6.2 (Kontrol)	96.2±0.2	104.1±0.2	58.7±1.2	104.8±0.0	121.0±0.0	86.4±0.2
	7.5	68.8±0.0	72.3±1.1	49.9±1.0	62.8±0.4	74.0±0.0	20.4±0.4

±: standart sapma şeklinde sunulmuştur.



Şekil 3. ZD 22 ve ZD 34 izolatlarının β -galaktozidaz spesifik enzim aktivitesinin farklı pH ve sıcaklık ile olan ilişkilerine ait korelasyon grafikleri

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

Probiyotik ve starter kültür olarak kullanılmaya potansiyeli olan LAB'nin folat üretim (özellikle ekstrasellüler) yeteneğine de sahip olması durumunda, bakteriler bağırsak mikrobiotasında avantajlı hale getirebilir. Hücre içi folat üretiminin yüksek olması bakterinin metabolik aktivitesi hakkında bilgi verirken, hücre dışı folat miktarının artması tüketilen gıdaların folat içeriğinin zenginliği hakkında fikir verecektir. Bu çalışmada, tavuk gastrointestinal sisteminden elde edilen 25 laktobasil bakterisinin folat üretim miktarları tespit edilmiş ve ZD20 izolatının 124.2 $\mu\text{g/L}$ ile en yüksek hücre içi folat üretimine, ZD34 suşunun ise 10.1 $\mu\text{g/L}$ ile düşük folat üretim kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. ZD28 (121.0 $\mu\text{g/L}$) ve ZD29 (4.2 $\mu\text{g/L}$) izolatları ise sırasıyla en yüksek ve en düşük hücre dışı folat üretim yeteneği sergilemişlerdir (Tablo 1). Çalışmada, laktobasil izolatlarının hücre içi ve hücre dışı folat üretimleri istatistiksel olarak $p < 0.01$ düzeyinde anlamlı bir ilişki (Pearson Correlation katsayısı 0.979) bulunmuştur. Albano ve ark. (2020) 35 *Lactobacillus* suşunun hücre dışı ve hücre içi folat üretimini incelemişler ve en yüksek hücre dışı folat üretiminin *L. plantarum* VS513'te (72.99 ng/mL), en yüksek hücre içi folat üretiminin ise olarak *L. plantarum* VS166 (36.11 ng/mL) suşlarında gözlemlendiğini bildirmiştir. Başka bir çalışmada, araştırmacılar 12 LAB suşunun folat üretimini incelemişler ve yalnızca *L. plantarum* GSLP-7 (1.31 $\mu\text{g/mL}$) ile *L. plantarum* SKT109 (0.51 $\mu\text{g/mL}$) suşlarının folat üretme yeteneği gösterdiklerini rapor etmişlerdir (Zhang ve ark., 2020). Cucick ve ark. (2020) Brezilya keçi süt ürünlerinden izole ettikleri *L. plantarum* (16 cv) bakterisinin folat üretim miktarını 128 ng/mL olarak tespit etmişlerdir.

Folat üretimi büyüme kinetiği, kültür koşulları, besiyeri bileşimi gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişim gösterebilmektedir (Saubade ve ark. 2017). Bu çalışmada, farklı sıcaklık (30, 37, 45) ve pH (5.5, 6.2, 7.0) koşullarının folat üretimi üzerindeki etkisini belirlemek için hem hücre içi hem de hücre dışı yüksek folat üretimine sahip iki izolat (ZD20 ve ZD28) seçilmiştir. Her iki suş için yapılan istatistiksel analiz sonucunda farklı pH ve sıcaklıklarda hem

hücre içi hem de hücre dışı folat üretimleri arasında kayda değer bir korelasyon tespit edilememiştir. Her iki izolatta optimum gelişme koşullarında (pH 6.2 ve 37°C) geliştirildiğinde hem hücre içi hem de hücre dışı folat üretim miktarlarının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç

Bu çalışma kapsamında diğer çalışmalardan farklı olarak tavuk gastrointestinal sisteminden izole edilen laktobasilin hücre içi/hücre dışı folat üretimleri ile β -glukozidaz ve β -galaktozidaz enzim aktivitesi arasındaki ilişki incelenmiştir. İzolatların β -glukozidaz enzim aktiviteleri ile hücre içi folat üretimi (Pearson Correlation katsayısı 0.149) ve hücre dışı folat üretimi (Pearson Correlation katsayısı 0.189) arasında, ayrıca β -galaktozidaz enzim aktiviteleri ile hücre içi folat üretimi (Pearson Correlation katsayısı 0.168) ve hücre dışı folat üretimi (Pearson Correlation katsayısı 0.221) arasında korelasyon olmadığı tespit edilmiştir. Yüksek enzim aktivitelerine ve folat üretimine sahip olan izolatların fermente ürünlerin geliştirilmesinde starter kültür ve potansiyel probiyotik olarak kullanılabilme potansiyelleri de belirlendikten sonra endüstriyel üretimlerde kullanımları mümkün olabilecektir.

Kaynaklar

- Arcus, V. L., van der Kamp, M. W., Pudney, C. R., Mulholland, A. J. (2020) Enzyme evolution and the temperature dependence of enzyme catalysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 65:96-101. doi:10.1016/j.sbi.2020.06.001.
- Asanuma, D., Sakabe, M., Kamiya, M., Yamamoto, K., Hiratake, J., Ogawa, M., Kosaka, N., Choyke, P.L., Nagano, T., Kobayashi, H., Urano, Y. (2015) Sensitive beta-galactosidase-targeting fluorescence probe for visualizing small peritoneal metastatic tumours *in vivo*. *Nat. Commun* 6:6463. doi: 10.1038/ncomms7463.
- Aswathy, R. G., Ismail, B., John, R. P., Nampoothiri, K. M. (2008) Evaluation of the probiotic characteristics of newly isolated lactic acid bacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 151:244-255. doi:10.1007/s12010-008-8183-6.
- Bailey, L. B., Stover, P. J., McNulty, H., Fenech, M. F., Gregory, J. F., Mills, J. L., Pfeiffer, C. M., Fazili, Z., Zhang, M., Ueland, P. M., Molloy,

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

- A. M., Caudill. M. A., Shane. B., Berry. R. J., Bailey. R. L., Hausman. D. B., Raghavan. R., Raiten. D. J. (2015) Biomarkers of nutrition for development-folate review. *J Nutr.* 145:7.1636-1680. doi: <https://doi.org/10.3945/jn.114.206599>.
- Bationo. F., Humblot. C., Songré-Ouattara. L. T., Hama-Ba. F., Merrer. M. L., Chapron. M., Kariluoto. S., Hemery. Y. M. (2020) Total folate in West African cereal-based fermented foods: Bioaccessibility and influence of processing. *J Food Compos Anal.* 85:103309. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103309>.
- Bentahar. J., Doyen. A., Beaulieu. L., Deschênes. J. S. (2019) Acid whey permeate: An alternative growth medium for microalgae *Tetrademus obliquus* and production of β -galactosidase. *Algal Res.* 41:101559. doi: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101559>.
- Bi Y., Zhu C., Wang Z., Luo H., Fu R., Zhao X., Zhao X., Jiang L. (2019) Purification and characterization of a glucose-tolerant β -glucosidase from black plum seed and its structural changes in ionic liquids. *Food Chem.* 274. 422-428 8. doi: [10.1016/j.foodchem.2018.09.007](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.007).
- Carević. M., Vukašinović-Sekulić. M., Grbavčić. S., Stojanović. M., Mihailović. M., Dimitrijević. A., Bezbradica. D. (2015) Optimization of β -galactosidase production from lactic acid bacteria. *Hem. Ind.* 69(3):305-312. doi: [10.2298/HEMIND140303044C](https://doi.org/10.2298/HEMIND140303044C).
- Chanalia. P., Gandhi. D., Attri. P., Dhanda. S. (2018) Purification and characterization of β -galactosidase from probiotic *Pediococcus acidilactici* and its use in milk lactose hydrolysis and galactooligosaccharide synthesis. *Bioorg. Chem.* 77:176-189. doi: [10.1016/j.bioorg.2018.01.006](https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.01.006).
- Chen. G. Y., Zhang. H., Yang. F. Q. (2021) A simple and portable method for β -Glucosidase activity assay and its inhibitor screening based on a personal glucose meter. *Anal Chim Acta.* 1142:19-27. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1021390120400>.
- Cinar Acar. B., Yuksekdag. Z. (2023) Beta-glycosidase activities of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. and the effect of different physiological conditions on enzyme activity. *NEsciences.* 8(1):1-17. doi: [10.28978/nesciences.1223571](https://doi.org/10.28978/nesciences.1223571).
- Cucick. A. C. C., Gianni. K., Todorov. S. D., LeBlanc. A. M., LeBlanc. J., Franco. B. D. G. M. (2020) Evaluation of the bioavailability and intestinal effects of milk fermented by folate producing lactic acid bacteria in a depletion/repletion mice model. *J. Funct. Foods.* 66:103785. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103785>.
- de Ovalle. S., Brena. B., González-Pombo. P. (2021) Influence of beta glucosidases from native yeast on the aroma of Muscat and Tannat wines. *Food Chem.* 346:128899.
- Donnelly. J. G. (2001) Folic acid. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 38(3):183-223. doi: <https://doi.org/10.1080/20014091084209>.
- Gu. K., Xu. Y., Li. H., Guo. Z., Zhu. S., Zhu. S., Shi. P., James. T. D., Tian. H., Zhu. W. H. (2016) Real-time tracking and *in vivo* visualization of beta-galactosidase activity in colorectal tumor with a ratiometric near-infrared fluorescent probe. *J. Am. Chem. Soc.* 138:5334-5340. doi: [10.1021/jacs.6b01705](https://doi.org/10.1021/jacs.6b01705).
- Gül Güven. R. (2011) Termofilik bakteriler ve biyoteknolojik açıdan önemli bazı enzimleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi.* 9(1): 1-10.
- Han X., Qing X., Yang S., Li R., Zhan J., You Y., Huang W. (2021) Study on the diversity of non-*Saccharomyces* yeasts in Chinese wine regions and their potential in improving wine aroma by β -glucosidase activity analyses. *Food Chem.* 360:129886 9. doi: [10.1016/j.foodchem.2021.129886](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129886).
- Horne. D. W., Patterson. D. (1988) *Lactobacillus casei* microbiological assay of folic acid derivatives in 96-well microtiter plates. *Clin Chem.* 34(11): 2357-9.
- Ismail. S. A. A., El-Mohamady. Y., Helmy. W. A., Abou-Romia. R., Hashem. A. M. (2010) Cultural condition affecting the growth and production of a β -galactosidase by *Lactobacillus acidophilus* NRRL 4495. *J. Basic Appl. Sci.* 4(10):5051-5058.
- Juers. D. H., Matthews. B. W., Huber. R. E. (2012) LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *The Protein Society.* 21:1792-1807. doi: <https://doi.org/10.1002/pro.2165>.
- Kabir. M. F., Ju. L. K. (2023) On optimization of enzymatic processes: Temperature effects on activity and long-term deactivation kinetics. *Process Biochem.* 130:734-746.

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

- doi:https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.05.031.
- Kara, F. (2004) Release and characterization of beta-galactosidase from *Lactobacillus plantarum*. M.C. Thesis. Department of Biotechnology. Middle East Technical University. 89p.
- Kayukawa, C. T. M., Oliveira, M. A. S., Kaspchak, E., Sanchuki, H.B.S., Lucigarashi-Mafra, L., Mafra, M. R. (2020) Quillaja bark saponin effects on *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase activity and structure. *Food Chem.* 303:125388. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125388.
- Kılıc, Y., Yuksekdog, Z., Yuksekdog, H. (2014) Beta galactosidase enzyme activities of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genus. *The Journal of Food.* 39(4):211-218. doi:10.5505/gida.29491.
- Kim, E. J., Kumar, R., Sharma, A., Yoon, B., Kim, H. M., Lee, H., Hong, K. S., Kim, J. S. (2017) In vivo imaging of beta-galactosidase stimulated activity in hepatocellular carcinoma using ligand-targeted fluorescent probe. *Biomater.* 122:83-90. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.01.009.
- Kolev, P., Rocha-Mendoza, D., Ruiz-Ramírez, S., Ortega-Anaya, J., Jiménez-Flores, R., García-Cano, I. (2022) Screening and characterization of β -galactosidase activity in lactic acid bacteria for the valorization of acid whey. *JDS Communications.* 3(1):1-6. doi:https://doi.org/10.3168/jdsc.2021-0145.
- Lee, H. W., Juvekar, V., Lee, D. J., Kim, S. M., Kim, H. M. (2021) Highly stable red-emissive ratiometric probe for monitoring β -galactosidase activity using fluorescence microscopy and flow cytometry. *Anal. Chem.* 93:44. 14778-14783. doi:https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c03453.
- Lian Y., Yuan X., Wang Y., Wei L (2022) Highly sensitive visual colorimetric sensor for xanthine oxidase detection by using MnO₂-nanosheet-modified gold nanoparticles. *Spectrochim Acta A.* 276:121219.
- Liu, Z., Liu, S., Gao, D., Li, Y., Tian, Y., Bai, E. (2022) An optical sensing platform for beta-glucosidase activity using protein-inorganic hybrid nanoflowers. *J. Fluoresc.* 32:669-680. doi:10.1007/s10895-021-02859-1.
- Lorn, D., Nguyen, T. K. C., Ho, P. H., Tan, R., Licandro, H., Waché, Y. (2021) Screening of lactic acid bacteria for their potential use as aromatic starters in fermented vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 350:109242. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109242.
- Mahara, F. A., Nuraida, L., Lioe, H. N. (2019) Fermentation of milk using folate-producing lactic acid bacteria to increase natural folate content: A Review. *JABR.* 6(4):129-136. doi:10.29252/JABR.06.04.01.
- Mattarelli, P., Biavati, B., Holzapfel, W. H., Wood, B. J. B. (2018) The Bifidobacteria and related organisms: Biology, taxonomy, applications. Elsevier, London, United Kingdom Academic Press.
- Matsuda, S., Norimoto, F., Matsumoto, Y., Ohba, R., Teramoto, Y., Ohta, N., Ueda, S. (1994) Solubilization of a novel isoflavone glucoside-hydrolyzing β -glucosidase from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *J. Biosci. Bioeng.* 77:439-441. doi:10.1016/0922-338X(94)90021-3.
- Marazza, J. A., Garro, M. S., Giori, G. S. (2009) Aglycone production by *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 during soymilk fermentation. *Food Microbiol.* 26:333-339. doi:10.1016/j.fm.2008.11.004.
- Michlmayr, H., Schumann, C., Barreira Braz da Silva, N. M., Kulbe, K. D., del Hierro, A. M. (2010) Isolation and basic characterization of a β -glucosidase from a strain of *Lactobacillus brevis* isolated from a malolactic starter culture. *J. Appl. Microbiol.* 108:500-559.
- Ningtyas, D. W., Hati, S., Prakash, S. (2021) Bioconversion and bioaccessibility of isoflavones from sogurt during *in vitro* digestion. *Food Chem.* 343:128553.
- Nguyen, T. H., Splechna, B., Krasteva, S., Kneifel, W., Kulbe, K. D., Divne, C., Haltrich, D. (2007) Characterization and molecular cloning of a heterodimeric β -galactosidase from the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* R22. *FEMS Microbiol. Lett.* 269:136-144.
- Palmer, T., Bonner, P. L. (2007) Enzymes Biochemistry. Biotechnology. Clinical Chemistry Book Second Edition. Woodhead Publishing Limited. ISBN: 978-1-904275-27-5
- Pereira, L. M. S., Bernardi, A. V., Gerolamo, L. E., Pedersoli, W. R., Carraro, C. B., Silva, R. N., Uyemura, S. A., Dinamarco, T. M. (2023) Characterization of a new glucose-tolerant gh1 β -glycosidase from *Aspergillus fumigatus* with transglycosylation Activity. *Int. J. Mol. Sci.* 24(5):4489. doi:https://doi.org/10.3390/ijms24054489.

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

- Preedy, V. R. (2013) B Vitamins and Folate. The Royal Society of Chemistry (ed). Food and Nutritional Components in Focus. Cambridge. UK. 10.1039/9781849734714.
- Perez-Martín, F., Sesena, S., Izquierdo, P. M., Martín, R., Palop, M. L. (2012) Screening for glycosidase activities of lactic acid bacteria as a biotechnological tool in oenology. *World J Microbiol Biotechnol.* 28(4):1423-1432. doi:10.1007/s11274-011-0942-9.
- Saqib, S., Akram, A., Halim, S.A., Tassaduq, R. (2017) Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. *3 Biotech.* 7:79. doi:10.1007/s13205-017-0645-5.
- Saubade, F., Hemery, Y. M., Guyot, J. P., Humblot, C. (2017) Lactic acid fermentation as a tool for increasing the folate content of foods. *Crit Rev Food Sci.* 57(18):3894-3910. doi:10.1080/10408398.2016.1192986.
- Shaikhan, B. A., Güven, K., Bekler, F. M., Acer, Ö., Güven, R. G. (2020) A highly inducible β -galactosidase from *Enterobacter* sp. *J. Serb. Chem. Soc.* 85(5):609-622. doi:https://doi.org/10.2298/JSC190711141S.
- Sheldon, R. A., Brady, D. (2022) Green chemistry, biocatalysis, and the chemical industry of the future. *ChemSusChem.* 15(9): e202102628. doi:https://doi.org/10.1002/cssc.202102628.
- Singh, G., Verma, A. K., Kumar, V. (2016) Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases. *3 Biotech.* 6:3. doi: 10.1007/s13205-015-0328-z.
- Sinha, S., Datta, M., Datta, S. (2021) A glucose tolerant β -glucosidase from *Thermomicrobium roseum* that can hydrolyze biomass in seawater. *Green Chem.* 23:7299-7311.
- Son, S. H., Jeon, H. L., Yang, S. J., Sim, M. H., Kim, Y. J., Lee, N. K., Paik, H. D. (2018) Probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional Korean fermented foods based on β -glucosidase activity. *Food Sci. Biotechnol.* 27(1):123-129. doi:https://doi.org/10.1007/s10068-017-0212-1.
- Srivastava, N., Rathour, R., Jha, S., Pandey, K., Srivastava, M., Thakur, V. J., Sengar, R. S., Gupta, V. K., Mazumder, P. B., Khan, A. F., Mishra, P. K. (2019) Microbial beta glucosidase enzymes: Recent advances in biomass conversion for biofuels application. *Biomol.* 9:220. doi:10.3390/biom9060220.
- Strahsburger, E., Lacey, M. L., Marotti, I., DiGioia, D., Biavati, B., Dinelli, G. (2017) *In vivo* assay to identify bacteria with β -glucosidase activity. *Electron. J. Biotechnol.* 30:83-87. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.08.010
- Sumengen, M., Dincer, S., Aysenur Kaya, A. (2013) Production and Characterization of Phytase from *Lactobacillus plantarum*. *Food Biotechnol.* 27:105-118.
- Sybesma, W., Starrenburg, M., Tijsseling, L., Hoefnagel, M. H. N., Hugenholtz, J. (2003a) Effect of cultivation conditions on folate production by lactic acid bacteria. *AEM.* 69(8):4542-4548. doi:10.1128/AEM.69.8.4542-4548.2003.
- Sybesma, W., Starrenburg, M., Kleerebezem, M., Mierau, I., de Vos W. M., Hugenholtz, J. (2003b). Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis*. *AEM.* 69(6):3069-3076. doi:10.1128/AEM.69.6.3069-3076.2003.
- Temizkan, G., Yılmaz, S., Öztürk, M., Arı, Ş., Ertan, H., Sarıkaya, A.T., Arda, N. (2008) *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (Biyogem) Yayın, Nobel Tıp Kitapevleri, 345s.
- Tsangalis, D., Ashton, J. F., McGill, A. E. J., Shah, N. P. (2002) Enzymic transformation of isoflavone phytoestrogens in soymilk by β -glucosidase producing Bifidobacteria. *Food Microbiol. Saf.* 67:8.
- Vasudha, M., Prashantkumar, C. S., Bellurkar, M., Kaveeshwar, V., Devaraja Gayathri, D. (2023) Probiotic potential of β -galactosidase-producing lactic acid bacteria from fermented milk and their molecular characterization. *Biomed. Rep.* 18(3):23. doi:10.3892/br.2023.1605.
- Wang, F., Li, Y., Han, Y., Ye, Z., Wei, L., Luo, H., Xiao, L. (2019) Single-particle enzyme activity assay with spectral-resolved dark-field optical microscopy. *Anal Chem.* 91:6329-6339 2.
- Wu Y, Li Z, Shi M, Yuan K, Meng H, Qu L, Li Z (2021) Programmable DNzyme computing for specific *in vivo* imaging: intracellular stimulus-unlocked target sensing and signal amplification. *Anal Chem* 93:12456-12463.
- Yañez-Neco, C. V., Cervantes, F. V., Amaya-Delgado, L., Ballesteros, A. O., Plou, F. J., Arrizon, J. (2021) Synthesis of $\beta(1 \rightarrow 3)$ and $\beta(1 \rightarrow 6)$ galactooligosaccharides from lactose and whey using a recombinant β -galactosidase from *Pantoea anthophila*. *Electron. J.*

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

- Biotechnol.* 49:14-21. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.10.004>
- Yao. B., Zhao. J., Ding. S., Giel. M. G., Zhang. G., Ding. D., Tang. Y., Weng. Z. H., Hong. Y. (2023) A novel red-emitting aggregation-induced emission probe for determination of β -glucosidase activity. *Biomater.* 295:122046.
- Yuan. X., Zhang. H., Cao. H., Mao. G., Wei. L. (2022) Determination of β -glucosidase activity using single-particle enumeration with Au@CeO₂ nanoparticles. *Microchim. Acta.* 189:480. doi:<https://doi.org/10.1007/s00604-022-05580-3>.
- Yuksekdag. Z., Cinar Acar. B., Aslim. B., Tukenmez. U. (2018) β -Glucosidase activity and bioconversion of isoflavone glycosides to aglycones by potential probiotic bacteria. *Int. J. Food Prop.* 20:S3.2878-2886. doi:<https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1382506>.
- Yuksekdag. H., Yuksekdag. Z. (2021) Beta galactosidase activity in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541 and *Streptococcus thermophilus* Z1052 strains and optimization. *The Journal of Food.* 46(6):1331-1342. doi:10.15237/gida.GD21059.
- Zacharof. M. P., Lovitt. R. W., Ratanapongleka. K. (2010) The importance of Lactobacilli in contemporary food and pharmaceutical industry A review article. Proceedings of 2010 International Conference on Chemical Engineering and Applications. 3-18 ISBN: 978-1-84626-023-0.
- Zhang. W., Wang. C., Huang. C. Y., Yu. Q., Liu. H. C., Zhang. C. W., Pei. X. F., Xu. X., Wang. G. Q. (2012) Analysis of β -galactosidase production and their genes of two strains of *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnol. Lett.* 34(6):1067-1071.