



MAKÜ FEBED
ISSN Online: 1309-2243
<http://dergipark.gov.tr/makufebed>
DOI: 10.29048/makufebed.354022

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 8(Ek Sayı 1): 262-267 (2017)
The Journal of Graduate School of Natural and Applied Sciences of Mehmet Akif Ersoy University 8(Supplementary Issue 1): 262-267 (2017)

Araştırma Makalesi / Research Paper

Yoğurt Örneklerinden İzole Edilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması ve Ekzopolisakkarit Üretimlerinin Belirlenmesi

Ebru DEMİR¹, Evrim KAYGUSUZ², Gülden BAŞYİĞİT KILIÇ^{3*}, Sedef YÜCE¹, Ali SOYUÇOK⁴

¹ Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Burdur

² Sedaca Mutfak Sanatları, İzmir

³ Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Burdur

⁴ Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta

Geliş Tarihi (Received): 15.11.2017, Kabul Tarihi (Accepted): 10.12.2017

✉ Sorumlu Yazar (Corresponding author*): gkilig@mehmetakif.edu.tr

☎ +90 248 2132724 📠 +90 248 2132704

ÖZ

Laktik asit bakterileri (LAB) fermente gıda endüstrisinde önemli bir role sahiptir. Özellikle LAB yoğurt üretimi için önem arz ederler. Yoğurtta LAB yapısı, viskoziteyi ve su tutma kapasitesini geliştirir. Ekzopolisakkarit (EPS) üreten LAB fermente süt ürünlerinin kıvam ve reolojik özelliklerine katkıda bulunduğu için süt ürünleri endüstrisinde önemlidir. Bu çalışmada daha önceden Akdeniz bölgesindeki ev veya küçük ölçekli işletmelerde geleneksel yöntemlerle üretilmiş kırk adet yoğurt örneğinden izole edilmiş 55 adet laktik asit bakterisinin (LAB) genetik tanımlamaları yapılmıştır. 16S-ITS rRNA geni Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmıştır. TaqI ve HaeIII kesim enzimleri çoğaltılmış DNA'nın kesilmesinde kullanılmıştır. Tüm bakterilere DNA sekans analizi yapılmış ve elde edilen sekanslar BLAST programı kullanılarak Gen Bankasında kayıtlı dizilerle karşılaştırılmıştır. Bakterilerin ekzopolisakkarit (EPS) üretimleri belirlenmiştir. Bakterilerin 16S-ITS RFLP analizi tanı testi sonuçlarına göre ise; 6 adet bakteri *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) olarak tanımlanmıştır. Tanı testi sonuçlarına göre; bakterilerin 50 tanesi *L. bulgaricus*, 2'sher tanesi *Lactobacillus helveticus* ve *Enterococcus faecium*, 1 tanesi *Pediococcus acidilactici* olarak tanımlanmıştır. Bakterilerin EPS üretim miktarları 5,89 ile 134,60 mg/L arasında tespit edilmiştir. Araştırma neticesinde *L. bulgaricus* La24B, La38A, La4C, Lj40C, La14A ve Lj38A'nın en iyi EPS üreten suşlar olarak tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ekzopolisakkarit, 16S-ITS rRNA, yoğurt, başlatıcı kültür

Molecular Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Yoghurt Samples and Determination of Exopolysaccharide Production Properties

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) have an important role in fermented food industry. Especially, LAB is essential for yoghurt production. In yoghurt LAB improve structure, viscosity and water holding capacity. LAB that produce exopolysaccharides (EPS)s are important in the dairy industry because of their contribution to the consistency and rheology of fermented milk products. In this study, a 55 LAB previously isolated from forty yoghurt samples produced by traditional methods in homes or small scale dairy plants in Mediterranean region were used for genotyping characterization. The 16S-ITS rRNA gene was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR). TaqI and HaeIII restriction enzymes

were used for restriction digest of the amplified DNA. DNA sequencing was performed to all bacteria and the sequences obtained were then evaluated in GenBank using BLAST programme. EPS production properties of the bacteria were also investigated. According to 16S-ITS RFLP analyses 6 bacteria were identified as *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* (*L. bulgaricus*). According to sequence analyses of the isolates, it was found that the most common LAB species in yoghurt samples were 50 *L. bulgaricus* strains, 2 *Lactobacillus helveticus* strains, 2 *Enterococcus faecium* strains, 1 *Pediococcus acidilactici* strain and 1 *Enterococcus faecium* strain were also identified. The amount of EPS in bacteria was determined between 5,89 and 134,60 mg/L. The results showed that *L. bulgaricus* La24B, La38A, La4C, Lj40C, La14A ve Lj38A were the best EPS-producing strains.

Keywords: Exopolysaccharide, 16S-ITS rRNA, yoghurt, starterculture

GİRİŞ

Sağlığa yararlı etkileri ve fermantasyon reaksiyonlarında önemli fonksiyonları olan LAB'ler gıda endüstrisinde kullanılan bakterilerin en önemlileri arasındadır (Yerlikaya, 2014). Bu bakteriler hayvanlarda ve insanlarda, özellikle gençlerde, sindirim sisteminde önemli role sahiptirler. Bu bakterilerin fermantasyon, biyolojik işlemler, ziraat, gıda ve özellikle son zamanlarda tıp alanında önemlerinin anlaşılmasıyla birlikte yapılan çalışmalar yoğunlaşmıştır.

LAB'nin kesin olarak tanımlanmaları teknolojik, ekolojik ve güvenlik açısından büyük önem taşımaktadır (Yerlikaya, 2014). Laktobasillerin gıda üretiminde kullanılabilmesi için öncelikle tür düzeyinde tanımlamalarının yapılması gerekmektedir. LAB tanımlanmalarında geleneksel olarak kullanılan taksonomik sınıflandırmanın temeli fizyolojik, morfolojik ve farklı sıcaklıklarda, pH değerlerinde, tuz konsantrasyonlarında gelişme, arjinindegredasyonu ve karbonhidrat katabolizması gibi metabolik/biyokimyasal özelliklerin incelenmesini içeren fenotipik özelliklere dayanmaktadır (Kandler ve Weiss, 1986; Gobbetti ve ark., 2005). LAB'nin çoğu oldukça benzer besinsel ihtiyaçlara sahip olup, benzer çevresel şartlar altında gelişim gösterebildikleri için tür düzeyinde tanımlanmalarında kullanılan bazı geleneksel yöntemler oldukça zaman alıcı ve aynı zamanda ayırım gücü ve hassasiyetleri bakımından da kısmen güvenilirdir. Ayrıca gelişme koşulları hücre morfolojisini etkileyebilmekte ve bazı durumlarda cins düzeyinde dahi tanımlama işlemlerinde zorluk yaratmaktadırlar (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011). Bu sebeple, son yıllarda çalışmalar gıda kökenli LAB'nin mikrobiyal identifikasyonları için moleküler tekniklerin kullanılması üzerine yoğunlaşmıştır.

Moleküler tanımlama yöntemleri, gelişmekte olan teknolojinin mikrobiyoloji alanında sunduğu en önemli yeniliklerden biridir (Çetinkaya ve Ayhan, 2012). LAB'nin tanımlanmasında 16S rDNA veya 23S rDNA'yı hedef alan primerlerden yararlanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)'na dayalı yöntemler, araştırılan *Lactobacillus* türlerinin tanımlanmasında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Son dönemlerde tüketiciye katkı maddesi içermeyen sağlıklı ve kaliteli ürünler sunmak amacıyla bitkisel kökenli polisakkaritlere alternatif olarak EPS üreten LAB'den yararlanılmaktadır. LAB, hücre içerisinde polisakkarit oluşturmada ve bunlardan hücre dışına salgılananlara EPS denilmektedir (Ruas-Madiedo ve ark., 2002). EPS hem son ürünün tekstürünü ve reolojik özelliklerini geliştirerek, hem de su bağlayarak stabilizatör olarak sinerezisi sınırlandırır. EPS polimerlerinin; fiziksel ve teknolojik özellikleri kimyasal kompozisyonu, moleküler büyüklüğüne, miktarına, dallanmış yapılarına, molekül sertliğine ve üç boyutlu yapısına bağlı olarak değişmektedir. Fiziksel karakteristiklerine ilaveten EPS ve çeşitli yapılar arasındaki etkileşimler son ürünün gelişmesine katkı sağlarlar. LAB tarafından üretilen EPS'ler genellikle süt sanayisinde fermente ürünün teknolojik özelliklerinin geliştirilmesinde ve fonksiyonel ürünün üretilmesi için kullanılır (Werning ve ark., 2012). Bu yüzden yapılan çalışmalar, fermente süt ürünlerinin reolojik özellikleri ve bu bakterilerin ürettikleri EPS miktarı ile ilişkilendirilmiştir (de Vuyst ark., 2001; Duboc ve Mollet, 2001; Folkenberg ve ark., 2006).

Gıda reçetelerine giren bileşenler arasında fonksiyonel role sahip olan maddelerin ilavesi veya mevcut olanlarla yer değiştirmesi son derece önemlidir. Buna bağlı olarak da fermente süt ürünlerinin üretiminde EPS üreten LAB'nin kullanımı giderek artmaktadır. EPS'ler süt sanayisinde; gıda katkı maddesinin kullanımını azaltmak, yoğurdun viskozitesini geliştirmek, yapıyı ve aromayı iyileştirmek, fermantasyon süresi boyunca ve depolama sırasında sinerezisi önlemek ayrıca tekstürün oluşmasında, lezzetin algılanmasında ve istenilen yapının oluşmasında temel rol oynar (Patel ve Prajapati, 2013).Yapılan bu çalışmada ülkemizin farklı illerinden ancak çoğunlukla Burdur, Isparta ve Antalya piyasasından, özellikle halk pazarlarından toplanmış ev, mandıra veya küçük ölçekli işletmelerde geleneksel olarak üretilmiş olan yoğurt örneklerinden izole edilmiş LAB'i moleküler yöntemlerle tanımlanarak, EPS üretimleri belirlenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Farklı illerdeki halk pazarlarından toplanan, özellikle evlerde ve mandıralarda küçük ölçekli, geleneksel yöntemlerle üretilmiş farklı çeşitteki 40 adet yoğurt örneğinden farklı besiyerleri kullanılarak izole edilmiş kok ve çubuk şekilli, sporsuz, Gram pozitif, katalaz reaksiyonu negatif olan 55 adet LAB kullanılmıştır (Akpınar, 2013 basılmamış veri).

İzolatların Genetik Tanısının Yapılması

16S rRNA analizi izolatların genomik DNA'ları ticari DNA ekstraksiyon kiti (PureLinkGenomic DNA Kit, Invitrogen K) kullanılarak, kullanma kılavuzunda belirtildiği şekilde ekstrakte edilmiştir. Elde edilen DNA 75 µl yıkama çözeltisi içerisinde toplanıp -20 °C'de saklanmıştır. 16S-ITS bölgesi forward primer (Mora ve ark., 1998) ve revers primer (Jensen ve ark., 1993) kullanılarak 1800-2000 bp gen bölgesinde çoğaltılmıştır. PZR reaksiyonu için 1 örneğe toplamda 50 µl olacak şekilde 5 µl genomik DNA, 5 µl 10xKCl reaksiyon buffer (Fermentas, ThermoFisherScientific, ABD), 3 µl MgCl₂ (25mM) (Fermentas, ThermoFisherScientific, ABD), 30 µl steril dH₂O, 1 µl ileri primer (10 mM), 1 µl geri (10 mM), 5 µl dNTP karışımı (her biri 2 mM) (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, ABD), 0.24 µl Taq DNA polimeraz (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, ABD) hazırlanmıştır. Bu karışımın termal döngü cihazı (Bio-Rad T100, ABD) kullanılarak; 5 dakika boyunca 94°C'de, 1 dakika 40 döngüde 94°C'de denatürasyon, 1 dakika 42°C'de bağlanma, 1 dakika 72°C'de uzama ve 10 dakika 72°C'de son uzaması gerçekleştirilmiştir. PZR ürünleri %1'lik agaroz jelinde yürütülerek UV ışık altında görüntülenmiştir.

PZR ürünlerinin temizlenmesi amacıyla PZR ürünlerinin hacmi 1x Tris-EDTA (TE) tamponu ile 100 µl'ye tamamlanmıştır. Örnekler steril eppendorf tüplerine aktararak üzerlerine iki hacim kadar (200 µl) kloroform-izoamil alkol (24 kloroform:1 izoamil alkol) eklendikten sonra 15-20 saniye vortex ile karıştırılmış ve 10,000 rpm'de 2 dakika santrifüjlenmiştir. Kloroform fazı (alt faz) uzaklaştırıldıktan sonra, kloroform, karıştırma ve santrifüj aşamaları tekrarlanmıştır. Örnek fazı (üst faz) yeni eppendorf tüplerine toplanmıştır. 1/10 örnek hacmi (10 µl) kadar 3M sodyum asetat (pH 5.2) eklenip karıştırılmıştır. Üzerine 2.5 örnek hacmi (275 µl) %100 etanol (moleküler biyoloji saflıkta) eklenerek, 15-20 saniye karıştırılmıştır. 15 dakika 14,000 rpm'de santrifüjlenip, sıvı kısım pelletin yapıştığı duvarın ters tarafından toplanmıştır. Tüplere 300 µl %70 etanol eklenip 20 saniye karıştırılmıştır. 5 dakika 14,000 rpm'de santrifüjledikten sonra sıvı kısım dikkatlice uzaklaştırılıp, pelletler 37°C'lik inkübatörde 15-20 dakika kurutulmuştur. Pel-

letler 20 µl 1xTE içerisinde çözündürülerek -20°C'de muhafaza edilmiştir.

PZR ürünlerinin kesilmesi için 10 µl temizlenen PZR ürünü, 5 µl 10x restriksiyon enzimi tamponu, 34.5µl steril dH₂O, 5 U (0.5µl) TaqI eklenerek hacim 50 µl'ye tamamlanmıştır. Tüplerin üzerlerine 2 damla mineral yağ damlatılıp, tüplerin kapakları parafilm ile sarılarak 65°C'de 1 gece su banyosunda inkübe edilmiştir. Aynı reaksiyon 5 U HaeIII için de uygulanmıştır. Bu reaksiyon için inkübasyon 37°C'de gerçekleştirilmiştir. Kesim örnekleri PZR ürünlerinin temizlenmesi bölümünde anlatıldığı şekilde temizlenmiş, örnekler son olarak 10 µl 1x TE içerisinde çözündürülmüştür (Sudağidan, 2007; Udomsil ve ark., 2010).

Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Kesilen ve temizlenen PZR ürünleri %2'lik Tris-asetat-EDTA (TAE) agaroz jeli hazırlanarak 10 µl kesim ürünü ve 2 µl 6X Dye yükleme boyası eklenerek yürütülmüştür. İlk aşamada 1 saat 40 mA bunu takiben 3 saat 60 mA sabit akım uygulanmıştır. Jel'e 5 µl 100 bp DNA marker'ı (500 ng DNA) (Fermentas) yüklenmiştir. DNA'ların yürütmesi tamamlandığında agaroz jeli bir kaba alınmış ve etidyum bromür ile boyanmıştır. Bu amaçla 200 µl etidyum bromür (10 mg/ml) 1 litre deiyonize su ile karıştırılarak 30 dakika çalkalayıcıda düşük devirde karıştırılmıştır. 30 dakika sonunda etidyum bromür solüsyonu boşaltılarak jeli kaplayacak kadar deiyonize su eklenip 30 dakika çalkalanmıştır. Elde edilen bant paterni UV ışık altında görüntülenip jel dökümantasyon sistemi kullanılarak band patternleri referans suşlar ile karşılaştırılmış Image Lab3.0, EZDoc Image Analyser (Bio-Rad) ile analiz edilmiştir.

Dizi Analizi

Çalışmada 55 bakterinin tamamına dizi analizi yapılmıştır. Bakterilerin dizi analizi İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yaptırılmıştır. Bu amaçla çoğaltılmış 16S rRNA PZR ürünleri (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ve 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3') primerleri kullanılarak Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazı ile çalışılmıştır. Elde edilen elektroferogramlar FinchTV ve BioEdit software programı kullanılarak analiz edilmiş ve DNA dizileri NucleotideBlast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) kullanılarak karşılaştırılmıştır.

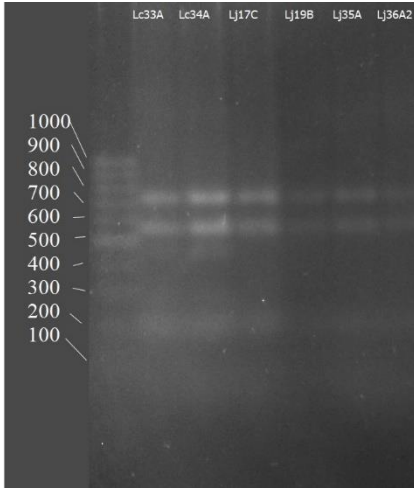
Bakterilerde EPS Üretimini Belirlenmesi

EPS miktarının belirlenmesi amacıyla MRS besiyerinde 37°C'de geliştirilmiş 18 saatlik kültür su banyosunda 15

dakika kaynatılmıştır. Kültür oda sıcaklığına soğutulduktan sonra 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne 1 ml örnek alınıp, üzerine 900 µl %85'lik TCA (Triklorasetik asit, Molekula, İngiltere) ilave edilmiştir. 13000 x g'de 25 dakika santrifüleme işleminden sonra, süpernatant uzaklaştırılmış ve etil alkol (Merck, Almanya) ilave edilip tekrar santrifüjlenmiştir. Bu işlem 2 kere tekrarlanmıştır. Santrifüleme sonunda etanol hızlıca ve dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Pellet 1 ml ultra saf su içerisinde çözündürülmüştür. EPS miktarını belirlemek için glukoz (Merck, Almanya) standart kurvesi ile fenol-sülfirik asit yöntemi kullanılmıştır. 0,1 g glukoz 1 L ultra saf su içerisinde çözündürülmüştür. Kurve çizmek için glukoz-su karışımından 1 ml alınıp 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Örneğin üzerine önce 0,5 ml %5'lik fenol çözeltisi ilave edildikten sonra dikkatlice 5 ml sülfirik asit (Merck, Almanya) ilave edilmiştir. Tüpler 30 °C'de 20 dakika bekletildikten sonra, 490 nm'de absorbans değeri ölçülmüş (T8+ UV/VIS Spectrometer, PG Instruments Ltd. İngiltere), EPS miktarı glukoz cinsinden (mg/L) hesaplanmıştır (Dubois ve ark., 1956).

BULGULAR VE TARTIŞMA

16S-ITS RFLP analizi tanı testi sonuçlarına göre; Lc33A, Lc34A, Lj17C, Lj19B, Lj35A ve Lj36A2 kodlu bakteriler *L. bulgaricus* olarak tanımlanmış (Şekil1), diğer bakteriler tam olarak gruplandırılmamıştır. Bu sebeple bakterilerin tamamına sekans analizi yaptırılmıştır. Bakteriler 16S rRNA dizi analizinden elde edilen baz sıralarının NCBI BLAST veri tabanındaki sonuçlarına göre; 50 adet *L. bulgaricus*, 2'ser adet *L. helveticus* ve *E. faecium*, 1 adet *P. acidilactici* olarak tanımlanmıştır (Tablo 1).



Şekil 1. PZR ürünlerinin HaeIII kesim enzimi uygulaması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü

LAB'nin endüstriyel uygulamaları düşünüldüğünde, araştırmaların en temel amacı kullanılabilecek olan LAB suşlarının seçimidir. Bu nedenle, herhangi bir suşun spesifik ve belirgin olarak ayırımını sağlayan güvenilir yöntemlerin uygulanması oldukça önemlidir (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011). Kok ve Venema (1998), istenilen kalitede süt ürünlerinin elde edilebilmesi için, proteolitik aktivitesi yüksek, hızlı asit üreten LAB'ye gerek duyulduğunu ve bu bakterilerle yapılan genetik çalışmaların artırılması, ayrıca klonlama sistemlerinin geliştirilmesinin gerektiğini savunmuşlardır. Lee ve Kim (1986), kefir tanelerinden izole ettikleri 90 adet bakteriyel suşun karakterizasyonunu çalışmışlar ve suşların %40-60'ının *L. brevis* ve *L. buchneri* olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar laktokok izole edememişlerdir. Söz konusu çalışmamızda incelenen izolatlar arasında laktokok tespit edilmemiştir. Yüksekdağ ve Beyatlı (2009)'nın yapmış olduğu bir çalışmada ise, Türkiye orijinli kefirlerden 13 adet LAB izole edilmiştir. Biyokimyasal testler ve API CH 50 kitlerinin kullanılmaları sonucunda izolatlar, *L. helveticus* (3 adet), *L. brevis* (1 adet), *L. casei* (1 adet), *L. lactis* (1 adet), *Str. thermophilus* (2 adet), *E. durans* (1 adet), *L. cremoris* (3 adet) ve *L. lactis* (1 adet) olarak tanımlanmıştır.

Bakterilerin EPS üretim miktarları 5,89 ile 134,60 mg/L arasında tespit edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda en yüksek EPS üretimi glukoz cinsinden (mg/L) *L. bulgaricus* La24B (134,60), La38A (116,23), La4C (111,78 mg/L), Lj40C (107,03), La14A (101,29) ve Lj38A (97,55)'da, en düşük EPS üretimi ise *L. bulgaricus* Lc7E (5,89)'de belirlenmiştir. Van Geel-Schutten ve ark. (1998) tarafından yapılan çalışmada EPS üretimleri incelenen 182 adet *Lactobacillus* suşundan 60 tanesinin EPS ürettiği, bunlardan 17 suşun EPS üretiminin 100 mg/L'den fazla olduğu belirtilirken, EPS üretimi için en uygun bileşenin sakkaroz olduğu kaydedilmiştir. Faber ve ark. (1998) *Str. thermophilus*Rs ve *Str. thermophilus*St suşları tarafından 135 mg/L ve 127 mg/L EPS ürettiğini belirtmiştir. Yaptığımız çalışma sonucunda yoğurtlardan izole edilen 55 adet *Lactobacillus* suşunun tamamının glukoz cinsinden EPS ürettiği ve 5 suşun EPS üretiminin 100 mg/L'den fazla olduğu belirlenmiştir.

Yoğurt Örneklerinden İzole Edilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması ve Ekzopolisakkarit Üretimlerinin Belirlenmesi

Tablo 1. 16S rRNA dizi analizine göre bakterilerin tanı testi sonuçları

16S rRNA dizi analizine göre tanı testi sonuçları	Suş No:
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	La3C, La4C, La7C, La14A, La15A, La17B, La21C, La24B, La25A, La26A, La30A, La32A, La33B, La34B, La38A, La39B, La40A, Lb24C, Lb25B, Lc7e, Lc14B, Lc18C, Lc25A, Lc28A, Lc33A, Lc34A, Lr14A, Lr14B, Lr17D, Lr20C, Lr21B, Lr28A, Lr28B, Lr34A, Lr39A, Lr41, Lr47A, Lr48, Lj17C, Lj18B, Lj19B, Lj23C, Lj24A, Lj30A, Lj35A, Lj36A2, Lj37B, Lj38A, Lj40C, St17D
<i>Lactobacillus helveticus</i>	St22B, St27CB
<i>Pediococcus acidilactici</i>	La19B
<i>Enterococcus faecium</i>	Lr13A, Lc13B

Tablo 2. Bakterilerin EPS üretim miktarları

16S rRNA dizi analizine göre tanı testi sonuçları örnek adı	EPS Miktarı Glukoz Cinsinden (mg/L)	16S rRNA dizi analizine göre tanı testi sonuçları örnek adı	EPS Miktarı Glukoz Cinsinden (mg/L)	16S rRNA dizi analizine göre tanı testi sonuçları örnek adı	EPS Miktarı Glukoz Cinsinden (mg/L)
LbLa3C	71,98	LbLc7E	5,89	LbLj17C	35,12
LbLa4C	111,78	LbLc14B	38,40	LbLj18B	17,18
LbLa7C	36,38	LbLc18C	16,18	LbLj19B	64,98
LbLa14A	101,29	LbLc25A	15,60	LbLj23C	39,76
LbLa15A	14,49	LbLc28A	88,51	LbLj24A	54,83
LbLa17B	25,75	Lb Lc33A	29,54	LbLj30A	70,56
LbLa21C	77,48	Lb Lc34A	19,12	LbLj35A	72,46
LbLa24B	134,60	LbLr14A	42,98	LbLj36A2	87,96
LbLa25A	23,49	LbLr14B	62,80	LbLj37B	34,32
LbLa26A	21,07	LbLr17D	35,12	LbLj38A	97,55
LbLa30A	30,03	LbLr20C	56,68	LbLj40C	107,03
LbLa32A	18,52	LbLr21B	53,25	LbSt17D	39,06
LbLa33B	29,90	LbLr28A	58,99	Lh St22B	27,12
LbLa34B	70,09	LbLr28B	73,64	Lh St27CB	87,34
LbLa38A	116,23	LbLr34A	25,92	PaLa19B	42,29
LbLa39B	36,73	LbLr39A	53,24	EfLr13A	79,48
LbLa40A	77,99	LbLr41	64,56	EfLc13B	60,75
LbLb24C	20,22	LbLr47A	64,74		
LbLb25B	18,80	LbLr48	76,42		

Lb (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), Lh (*Lactobacillus helveticus*), Pa (*Pediococcus acidilactici*), Ef (*Enterococcus faecium*)

L. bulgaricus ve *Str. thermophilus* bakterilerinin EPS oluşturma yetenekleri Kılıç ve ark. (2003) tarafından belirlenmiştir. Her iki mikroorganizma tarafından oluşturulan EPS kalitatif ve kantitatif açıdan incelenmiştir. Besiyerinde 10^8 - 10^9 KOB/ml düzeyinde gelişen *L. bulgaricus* IFR 2772 suşunun 268 mg/L, *Str. thermophilus* IFR 859 suşunun ise 374 mg/L EPS ürettiği araştırmalar sonucunda tespit edilmiştir. Ancak araştırmada incelenen söz konusu bakteri türünün mukoz yapı oluşturma özelliği, bakterilerin gelişme ve çoğalmalarında uygulanan inkübasyon sıcaklığı ve süresi, gelişme ortamındaki besin maddelerinin zenginliği ile mutasyon oluşturabilecek etkenlere bağlı olarak değiştiği ve ortadan kalktığı, EPS oluşturmayan bir bakterinin ise koşullar uygun olduğunda bu polimeri sentezleyebildiği ortaya konmuştur. Salazar ark. (2009) yaptıkları çalışmada intestinal mikrofloradan izole ettikleri EPS üreticisi 21 adet suşu genetik olarak tanımlamışlardır. 16S rRNA dizi analizi sonucunda 11 adet *Bifidobacterium* türü ve 10 adet *Lactobacillus* türü tanımlanmıştır. En yüksek EPS miktarının ise 51,4 mg/100 mL olduğu rapor edilmiştir. Tarafımızdan yapılan çalışmada ise glukoz cinsinden en yüksek EPS üretiminin 134,60 mg/L ile *L. bulgaricus*

(La24B) suşunda olduğu belirlenmiştir. EPS'ler viskoziteyi artırıcı, yapıyı düzenleyici ve su bağlayıcı gibi fonksiyonel özelliklerinden dolayı süt ürünlerinde ticari stabilizatörlerin yerine alternatif olarak kullanılabilir. Oldukça düşük konsantrasyonlarda üretilen EPS'nin bile yapıyı geliştirici etkisi olduğu belirlenmiştir (Soyuçok ve ark., 2016). Bu nedenle de yoğurt üretiminde EPS üreten bakterilerin kullanılmasına önem verilmelidir. Böylece hiçbir katkı maddesi kullanılmadan son ürünün tekstürel özelliğini arzu edilen şekilde değiştirilerek tüketicilerin ihtiyaç ve taleplerini karşılamak mümkün olabilir. Aynı zamanda EPS üreten LAB'nin kullanımı ile tüketicilerin sağlığı doğal yöntemlerle korunmuş olacaktır. EPS üretiminin genetik açıdan dayanıksızlığı endüstriyel uygulamalarda önemli bir problem oluştursa da, optimum fermantasyon koşullarının sağlanması ile bu sorunun önüne geçilebilmektedir. EPS'nin viskoziteyi artırma derecesi kültür türleri arasındaki farklara, inkübasyon koşullarına, besiyerindeki katı madde miktarına ve viskozite ölçümlerine bağlıdır.

SONUÇ

Gıda endüstrisinde LAB'nin kullanımı oldukça yaygındır. Ancak her suşun verimliliği ve kullanıldığı alan kendine özgüdür. Bu çalışmada, doğal floramıza ait genetik tanısı yapılmış bir kültür koleksiyonu elde edilerek, tanımlanmış bu bakterilerin EPS üretim özellikleri belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda en yüksek EPS üretimine sahip olan *L. bulgaricus* La24B, La38A, La4C, Lj40C, La14A ve Lj38A'nın yoğurt üretiminde başlatıcı/destek kültür olarak kullanılma potansiyellerinin bulunduğu ortaya konmuştur.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma 2015 yılı TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Akpınar, D., (2013). Fonksiyonel keçi yoğurdu üretiminde farklı başlatıcı kültürlerin kullanım imkanlarının araştırılması", MAKÜ-0149-YL-12, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi (Basılmamış Yüksek Lisans Tezi).
- Çetinkaya, E., Ayhan, K. (2012). Mikrobiyolojide kullanılan bazı moleküler teknikler. Karaelmas Fen Ve Mühendislik Dergisi, 2(1): 53-62.
- De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgem, F., Degeest, B. (2001). Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. International Dairy Journal, 11(9): 687-707.
- Duboc, P., Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. International Dairy Journal, 11(9): 759-768.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical chemistry, 28(3): 350-356.
- Faber, E. J., Zoon, P., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. (1998). The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures. Carbohydrate research, 310(4): 269-276.
- Folkenberg, D. M., Dejmek, P., Skriver, A., Guldager, H. S., Ipsen, R. (2006). Sensory and rheological screening of exopolysaccharide producing strains of bacterial yoghurt cultures. International Dairy Journal, 16(2): 111-118.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A., DiCagno, R. (2005). Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. Trends in Food Science & Technology, 16(1): 57-69.
- Jensen, M. A., Webster, J. A., Straus, N. (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. Applied and Environmental Microbiology, 59(4): 945-952.
- Kandler, O. (1986). Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, Bergey's manual of systematic bacteriology, 2: 1209-1234.
- Kılıç, S., Karagözlü, C., Akbulut, N., Mater, Y. (2003). *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*'un eksopolisakkarit oluşturma özellikleri. Dünya Gıda, 8: 64-68.
- Kıran, F., Osmanagaoglu, O. (2011). Laktik asit bakterilerinin (LAB) identifikasyonunda /tiplendirilmesinde kullanılan moleküler yöntemler. Erciyes University Journal of Institute of Science and Technology, 27(1): 62-74.
- Kok, J., Venema, G. (1988). Genetics of proteinases of lactic acid bacteria. Biochimie, 70(4), 475-488.
- Lee, K.S., Kim, D.S. (1986). Microbiological characteristics of kefir cultures. Korean Journal of Dairy Science, 8(4): 266-274.
- Mora, D., Fortina, M. G., Nicastro, G., Parini, C., Manachini, P. L. (1998). Genotypic characterization of thermophilic bacilli: a study on new soil isolates and several reference strains. Research in Microbiology, 149(10): 711-722.
- Patel, A., Prajapat, J. B. (2013). Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Advances in Dairy Research, 1-8.
- Ruas-Madiedo, P., Tuinier, R., Kanning, M., Zoon, P. (2002). Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity of fermented milks. International Dairy Journal, 12(8): 689-695.
- Salazar, N., Prieto, A., Leal, J. A., Mayo, B., Bada-Gancedo, J. C., de Los Reyes-Gavilán, C. G., Ruas-Madiedo, P. (2009). Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains of human origin, and metabolic activity of the producing bacteria in milk. Journal of Dairy Science, 92(9): 4158-4168.
- Soyuçok, A., Ekiz, T., Başyigit Kılıç, G. (2016). Ekzopolisakkaritlerin özellikleri ve gıda sanayindeki önemi. Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi, 332-344.
- Sudağidan, M. 2007. 16S Internally transcribed spacer (ITS) polimeraz zincir reaksiyon- restriction fragment length polymorphism (16S-ITS PZR-RFLP) ile stafilkokların tür düzeyinde tanımlanması. 4. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu, İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi.
- Udomsil, N., Rodtong, S., Tanasupawat, S., Yongsawatdigul, J. (2010). Proteinase-producing halophilic lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation and their ability to produce volatile compounds. International Journal of Food Microbiology, 141: 186-194.
- Werning, M. L., Notararigo, S., Nacher, M., de Palencia, P. F., Aznar, R., López, P. (2012). Biosynthesis, purification and biotechnological use of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. In Food additive. In Tech.
- Yerlikaya, O. (2014). Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan başlıca fenotipik yöntemler. Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi, 14: 9-22.
- Yüksekdağ, Z. N., & Beyatlı, Y. (2009). Bazı laktik asit bakterilerinin fizyolojik, biyokimyasal, plazmit DNA ve protein profil özelliklerinin incelenmesi. Gıda Dergisi, 34(2): 91-98.