
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

LİGİLACTOBACİLLUS SALİVARİUS KC27L VE *LİMOSİLACTOBACİLLUS REUTERİ* KC21L BAKTERİLERİNDE FARKLI ORTAM KOŞULLARININ EKZOPOLİSAKKARİT (EPS) ÜRETİMİNDEN SORUMLU GENLERİN EKSPRESYON DÜZEYLERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

AYŞEGÜL AYBÜKE BAYBURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MART 2024

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Ayşegül Aybüke BAYBURT

05/03/2024

*Ligilactobacillus salivar*ius KC27L ve *Limosilactobacillus reuteri* KC21L BAKTERİLERİNDE FARKLI ORTAM KOŞULLARININ EKZOPOLİSAKKARİT (EPS) ÜRETİMİNDEN SORUMLU GENLERİN EKSPRESYON DÜZEYLERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Ayşegül Aybüke BAYBURT

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mart 2024

ÖZET

Bu çalışmada, ekzopolisakkarit (EPS) üretim yeteneğine sahip olan *Ligilactobacillus salivarius* KC27L (175±4 mg/mL) ve *Limosilactobacillus reuteri* KC21L (151±1 mg/L) suşlarında, farklı fiziksel parametrelerin (karbon kaynağı, azot kaynağı, besiyeri pH'ı, inkübasyon süresi ve sıcaklığı ve %CO_2 miktarı) EPS üretiminine etkisi belirlenmiştir. *L. salivarius* KC27L suşunda en yüksek EPS üretimi pH 4,5'te MRS besi ortamında (357±8 mg/L) tespit edilirken, *L. reuteri* KC21L suşunda sükroz içeren besi ortamında (419±18 mg/L) belirlenmiştir. Bakterilerin en iyi EPS üretimi gösterdiği kombine besi ortamında (*L. salivarius* KC27L için; %2 sükroz, %2 beef ekstract, 18 saat ve 35°C'de inkübasyon, pH 4,5, *L. reuteri* KC21L için; %2 sükroz, %2 pepton, 18 saat ve 35°C'de inkübasyon, pH 4,5) ise *L. salivarius* KC27L suşu 464±12 mg/L, *L. reuteri* KC21L suşu ise 433±3 mg/L EPS ürettiği tespit edilmiştir. Çalışmada ayrıca laktik asit bakterilerinde (LAB) EPS biyosentezinde görev yapan ve yüksek oranda korunduğu araştırmalarla desteklenen genlerin (*glukoziltransferaz, epsA, epsC, epsD, flippaz* ve *L. salivarius* KC27L için; *oligosakkarit flippaz, L. reuteri* KC21L için *sugar transferaz*) ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Normal besi ortamında geliştirilen (MRS-kontrol) bakterilerdeki EPS biyosentezinde görev yapan genlerin ekspresyon düzeyleri ile en yüksek EPS üretimi tespit edilen koşullardan oluşan kombine besi ortamda geliştirilen bakterilerin gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır. Melt curve analizi ile güvenilirliği doğrulanan RT-PCR sonuçlarına göre *L. salivarius* KC27L bakterisinde *epsC* ve *oligosakkarit* geninin ekspresyon düzeyinde artış gözlenirken, *glikoziltransferaz*, *epsA*, *epsD* ve *flippaz* geninin ekspresyonunda azalış gözlemlenmiştir. *L. reuteri* bakterisinde ise, *glikoziltransferaz*, *epsA*, *epsC*, *epsD*, *flippaz* ve *oligosakkarit flippaz* genlerinin ekspresyon seviyelerinde düşüş tespit edilmiştir.

Bilim Kodu : 20309
Anahtar Kelimeler : *Ligilactobacillus salivarius, Limosilactobacillus reuteri,* ekzopolisakkarit, fiziksel koşul, gen ekspresyonu
Sayfa Adedi : 75
Danışman : Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

DETERMINATION OF EPS PRODUCTION IN DIFFERENT PHYSICAL CONDITIONS BY *Ligilactobacillus salivarius* KC27L AND *Limosilactobacillus reuteri* KC21L BACTERIA

(M. Sc. Thesis)

Ayşegül Aybüke BAYBURT

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

March 2024

ABSTRACT

In this study, the effect of different physical parameters (carbon source, nitrogen source, medium pH, incubation time and temperature, and %CO_2 concentration) on EPS production was determined in *Ligilactobacillus salivarius* KC27L (175±4 mg/mL) and *Limosilactobacillus reuteri* KC21L (151±1 mg/L) strains, which have the ability to produce exopolysaccharide (EPS). The highest EPS production was detected in MRS medium (357±8 mg/L) at pH 4.5 for the *L. salivarius* KC27L strain, while it was determined in the sucrose-containing medium (419±18 mg/L) for the *L. reuteri* KC21L strain. In the combined medium where the bacteria showed the best EPS production (for *L. salivarius* KC27L: 2% sucrose, 2% beef extract, incubation at 35°C for 18 hours, pH 4.5; for *L. reuteri* KC21L: 2% sucrose, 2% peptone, incubation at 35°C for 18 hours, pH 4.5), the *L. salivarius* KC27L strain produced 464±12 mg/L EPS, while the *L. reuteri* KC21L strain produced 433±3 mg/L EPS. The study also investigated the expression levels of genes involved in EPS biosynthesis in lactic acid bacteria (LAB) and highly conserved in the literature (glucosyltransferase, epsA, epsC, epsD, flippase and for *L. salivarius* KC27L; oligosaccharide flippase, for *L. reuteri* KC21L; sugar transferase). The expression levels of genes involved in EPS biosynthesis in bacteria grown in a normal medium (MRS-control) were compared with those of bacteria grown in a combined medium consisting of the conditions where the highest EPS production was detected. According to the RT-PCR results, the expression levels of the *epsC* and *oligosaccharide* genes were found to be increased in *L. salivarius* KC27L, while the expression of the *glucosyltransferase*, *epsA*, *epsD*, and *flippase* genes was observed to be decreased, as confirmed by melt curve analysis. In *L. reuteri*, a decrease in the expression levels of the *glucosyltransferase*, *epsA*, *epsC*, *epsD*, *flippase*, and *oligosaccharide flippase* genes was detected.

Science Code : 20309
Key Words : *Ligilactobacillus salivarius*, *Limosilactobacillus reuteri*, exopolysaccharide, physical condition, gene expression
Page Number : 75
Supervisor : Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca sabırlı bir şekilde çalışmalarıma engin bilgileriyle yön veren, ilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, hayatıma dokunan Sayın Prof. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ'a, gerek laboratuvarda gerek sosyal hayatımda her daim varlığını yanımda hissettiren, çok sevdiğim ve çalışkanlığı ile örnek olan hocam Sayın Dr. Öğr. Gör. Berat ÇINAR ACAR'a, moleküler çalışmalarımda desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Mine TÜRKTAŞ'a saygılarımı sunarım. Gazi Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda beraber çalıştığım, tüm ekip arkadaşlarıma bu süreçte benim yanımda oldukları için teşekkür ederim. Lisans eğitimim boyunca İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde tanımış olduğum mesleğime yön veren hocalarıma minnettarım. Maddi ve manevi her konuda destekçim olan güzel arkadaşım ve meslektaşım Doğa Rüya GİRAY'a teşekkür ederim. AR-GE alanında sayısız projelerde yer alarak bana pek çok tecrübe kazandıran ve aile sıcaklığında çalışma fırsatı bulduğum, yuvam, BM LABOSİS ekibine minnettarım. İdealistliği, şefkati ve üretkenliğiyle bana yeni bakış açıları kazandıran Sayın İlkay Selver BÜYÜKTOPÇU başta olmak üzere, AR-GE departmanında keyifle birlikte çalıştığım ve tezimde yardımları dokunan hocam, değerli çalışma arkadaşım Sayın Dr. Humen CEBBARİ'ye ve BM LABOSİS ile yolumun kesişmesinde emeği olan arkadaşım, meslektaşım Buket ATASAYAR'a çok teşekkür ederim. En çok da beni sonsuz fedakârlıklarla bugünlere getiren, her daim ellerini omuzlarımda hissettiğim candan öte aile üyelerim, annem Ümmügülsüm BAYBURT, babam Hakan BAYBURT ve kardeşim Mehmet BAYBURT'a sonsuz minnetlerimi sunuyorum.

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından FYL-2022-7846 ve FGA-2022-7538 kodlu projeler ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Gazi Üniversitesi Rektörlüğüne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ ix

ŞEKİLLERİN LİSTESİ x

SİMGELER VE KISALTMALAR xv

1. GİRİŞ 1

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI 5

2.1. Laktik Asit Bakterileri 5

2.2. Ekzopolisakkaritler 7

2.2.1. Homopolisakkaritler (HoPS) 9

2.3. Laktik Asit Bakterilerinde Ekzopolisakkarit Üretimi 11

2.4. Fiziksel Şartların EPS Üretimi Üzerindeki Etkileri 13

2.5. EPS'nin Biyosentetik Yolakları 14

3. MATERYAL VE METOT 17

3.1. Materyal 17

3.1.1. Cihaz ve ekipmanlar 17

3.1.2. Mikroorganizmalar 17

3.1.3. Besiyerleri ve çözeltiler 17

3.2. Metot 21

3.2.1. Aktifleştirilme 21

3.2.2. Muhafaza 21

3.2.3. Bakterilerin optik yoğunluklarının ayarlanması 22

3.2.4. EPS 23

Sayfa

3.2.5. EPS miktarının hesaplanması 24

3.2.6. Protein tayini 26

3.2.7. EPS üretiminden sorumlu gen ifadelerinin kantitatif Real Time-PZR ile belirlenmesi 26

4. BULGULAR 31

4.1. Farklı Fiziksel Koşullarda EPS Üretim Miktarı 31

4.2. Kombine Fiziksel Koşullarda EPS Üretim Miktarı 33

4.3. Protein Tayini 36

4.4. EPS Üretiminden Sorumlu Gen İfadelerinin Kantitatif Real Time-PZR ile Belirlenmesi 37

4.5. qPCR Gen Ekspresyon Sonuçları 40

4.6. qPCR CT, ΔCT ve ΔΔCT Sonuçları 41

4.7. RQ Sonuçları 43

5. TARTIŞMA 45

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 57

KAYNAKLAR 61

EKLER 71

EK-1. FastPure ® Cell/Tissue Total RNA Isolation Kiti (Vazyme) 72

EK-2. smART First Strand cDNA Synthesis Kiti (EURx) 73

EK-3. HOT FIREpol Eva Green qPCR Supermix 5X (Solis BIODYNE) 74

ÖZGEÇMİŞ 75

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. Probiyotik bakterilerden elde edilen homopolisakkaritler ve uygulamaları (Angelin ve Kavitha, 2020'dan uyarlanmıştır) 10

Çizelge 2.2. Probiyotik bakterilerden elde edilen heteropolisakkaritler ve uygulamaları (Angelin ve Kavitha, 2020'dan uyarlanmıştır) 12

Çizelge 2.3. Bazı bakterilerde EPS üretimi için uygulanan optimal koşullar ve EPS üretim miktarları..... 13

Çizelge 2.4. EPS'nin biyosentetik yolu nda yer alan enzimler 16

Çizelge 3.1. De Man Rogosa Sharpe (MRS) besi yeri içeriği 18

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan farklı karbon ve azot kaynakları 18

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan farklı ortam koşulları 19

Çizelge 3.4. Her iki suş için kombine denemelerde kullanılan besiyeri içeriği..... 19

Çizelge 3.5. Kombine denemelere ait fiziksel şartlar 20

Çizelge 3.6. cDNA izolasyonunun birinci aşamasında kullanılan kit bileşenleri..... 27

Çizelge 3.7. cDNA izolasyonunun ikinci aşamasında kullanılan kit bileşenleri 27

Çizelge 3.8. cDNA sentezi için kullanılan bileşenler ve miktarları..... 28

Çizelge 3.9. Çalışmada kullanılan genler ve primerlerin dizileri, uzunlukları, Tm değerleri ve primerlerin bağlandığı bölgelerin uzunluğu (bp) 30

Çizelge 4.1. *L. salivarius* KC27L ve *L. reuteri* KC21L bakterilerinin farklı fiziksel koşullarda EPS üretim miktarları (mg/L)..... 31

Çizelge 4.2. Farklı pH'ların; KC27L için beef extract ve KC21L için pepton içeren besi yerlerinde ve MRS besiyerinde 18 saatlik inbübasyonda geliştirilen bakterilerde EPS üretim (mg/L) miktarlarına etkisi 34

Çizelge 4.3. Sükroz içeren besi yerlerinde farklı pH'larda ve farklı inkübasyon sıcaklıklarında geliştirilen bakterilerde EPS üretimi (mg/L) 36

Çizelge 4.4. *L. salivarius* örneklerine ait CT, ΔC_T ve $\Delta\Delta C_T$ sonuçları..... 42

Çizelge 4.5. L. reuteri örneklerine ait CT, ΔC_T ve $\Delta\Delta C_T$ sonuçları 42

Çizelge 4.6. *L. salivarius* örneklerine ait RQ Sonuçları 43

Çizelge 4.7. *L. reuteri* örneklerine ait RQ Sonuçları 44

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1 Homopolisakaritler (A) ve heteropolisakkaritler (B) (Bibi ve diğerleri, 2021)..... 9

Şekil 2.2. Bakteriyel ekzopolisakkaritlerin sınıflandırılması 9

Şekil 2.3. HoPS biyosentez yolu 14

Şekil 2.4. HePS biyosentez yolu. EPS: ekzopolisakkaritler; HePS: heteropolisakkaritler; P: fosfat PEP-PTS: fosfoenolpiruvat-fosfotransferaz sistemi; UDP: üridin difosfat (Guerin ve diğerleri, 2020'den uyarlanmıştır) 16

Şekil 3.1. *L. salivarius* KC27L suşunun Gram boyama sonucunda ışık mikroskobundaki görüntüsü (X100) 22

Şekil 3.2. EPS içeren örneklere fenol-sülfirik asit muamelesi 24

Şekil 3.3. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan glukoz standardı 25

Şekil 3.4. Glukoz standart eğrisi..... 25

Şekil 4.1. Farklı fiziksel koşullarda kontrol gruplarına göre KC7L ve KC21L suşlarında EPS üretimindeki yüzde (%) artış 32

Şekil 4.2. *L. salivarius* KC27L ve *L. reuteri* KC21L suşlarında kontrol grubu, karbon ve azot kaynağı, kombine koşullarıda EPS miktarı (mg/L) 33

Şekil 4.3. Farklı pH'ların; beef extract içeren besi yerinde ve MRS besiyerinde 18 saatlik inbübasyonda geliştirilen KC27L suşunda EPS üretimindeki yüzde (%) artış 35

Şekil 4.4. Farklı pH'ların; pepton içeren besi yerinde ve MRS besiyerinde 18 saatlik inbübasyonda geliştirilen KC21L suşunda EPS üretimindeki yüzde (%) artış 35

Şekil 4.5. KC27L ve KC21L suşlarında C kaynağı, pH seviyesi ve inkübasyon sıcaklıkları arasındaki korelasyon (% artış-azalış)..... 36

Şekil 4.6. *L. salivarius* KC27L suşuna ait erime eğrileri (melt curve)..... 37

Şekil 4.7. *L. reuteri* KC21L suşuna ait erime eğrileri (melt curve)..... 38

Şekil 4.8. *L. salivarius* KC27L suşuna ait erime eğrileri (melt curve)..... 38

Şekil 4.9. *L. reuteri* KC21L suşuna ait erime eğrileri (melt curve)..... 39

Şekil 4.10. *L. salivarius* KC27L suşuna ait erime eğrileri (melt curve) analiz linear grafiği 39

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.11. *L. reuteri* KC21L suşuna ait erime eğrileri (melt curve) analiz linear grafiği 39

Şekil 4.12. *L. salivarius* KC27L suşuna ait kontrol ve kombine örneklerine ait gen ekspresyon grafiği 40

Şekil 4.13. *L. reueri* KC21L suşuna ait kontrol ve kombine örneklerine ait gen ekspresyon grafiği 41

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	**Açıklamalar**
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
g	Gram
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
nm	Nanometre
pH	Asitlik bazlık birimi
ΔCT	Hedef ve referans bölge CT değerleri farkı
ΔΔCT	Hedef ve referans gen ΔCT değerleri farkı
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
ATCC	Amerikan Kültür Koleksiyonu
cfu/kob	Koloni Oluşturan Birim
CO_2	Karbondioksit
CT	Cycle Threshold/ Döngü Eşiği
dk.	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EPS	Ekzopolisakkarit
epsA	Ekzopolisakkarit Sentezinden Sorumlu Gen
epsB	Ekzopolisakkarit Sentezinden Sorumlu Gen
epsC	Ekzopolisakkarit Sentezinden Sorumlu Gen
epsD	Ekzopolisakkarit Sentezinden Sorumlu Gen
epsE	Ekzopolisakkarit Sentezinden Sorumlu Gen
FTF	Fruktozil Transferaz

Kısaltmalar	Açıklamalar
GRAS	Genel Olarak Güvenli
GTF	Glukozil Transferaz
LAB	Laktik Asit Bakterileri
L. reuteri	*Limosilactobacillus reuteri*
L. salivarius	*Ligilactobacillus salivarius*
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe
OD	Optik Yoğunluk
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ppm	Milyonda Bir Birim
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Dakikada Devir Sayısı
rRNA	Ribozomal RNA
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PCR	Gerçek Zamanlı PCR
SD	Standart Sapma
SF	Serum Fizyolojik
sn	Saniye
sp.	Tür
TCA	Triklorasetik Asit
wzy	Ekzopolisakkarit Sentezinden Sorumlu Gen
wzx	Ekzopolisakkarit Sentezinden Sorumlu Gen
qPCR	Kantitatif PCR
RQ	Relative Quantitation/ Bağıl Kantitasyon

1. GİRİŞ

Fermente gıdalardan elde edilen Laktik Asit Bakterileri (LAB), Genel Olarak Güvenli (GRAS) kabul edilmekle birlikte probiyotik özelliğe sahip mikroorganizmalardır. Ayrıca pek çok biyolojik ve kimyasal olayda rol oynamaktadır (Raman ve diğerleri, 2022). Gıda endüstrisinde, lezzet arttırıcı olarak veya probiyotik içeriklerin elde edilmesinde (Papagianni, 2012) ve kimya endüstrisinde çeşitli alkollerin, aldehitlerin, asitlerin, esterlerin ve kükürt bileşiklerinin üretiminde yararlanılmaktadır. Bununla birlikte çevre kirliliğine karşı geliştirilen içeriklerde, *Lactobacillus* cinsine ait mikroorganizmalar biyoteknolojik olarak üretilmekte ticari probiyotikler olarak kullanılmaktadırlar (*L. acidophilus, L. rhamnosus, L. reuteri, L. casei, L. plantarum* vb.) (Florou-Paneri ve diğerleri, 2013). Laktik asit bakterilerinin primer ve sekonder metabolitleri, kullanım açısından uzun ömürlü olduğu için, endüstrinin pek çok alanında kullanılmaktadır (Bintsis, 2018).

Ekzopolisakkaritler (EPS'ler), bazı mikroorganizmaların ürettiği ve mikroorganizmaların kendini korumak için çeşitli durumlarda kullandığı metabolitlerdir. Bakteri-bakteri veya bakteri-çevre etkileşimlerinde, ortamda stres faktörlerinin değiştiği veya bakterinin canlılığını tehdit eden toksik bileşenlere maruziyet durumlarında bu olumsuz etkilerin azaltılması için kullanılmaktadır. Mikroorganizma kaynaklı EPS'ler, sağlık açısından olumlu etkileri sebebiyle gıda ve farmasotik alanında değerli bir hammaddedir. Bu sebepten ötürü EPS'ler ve etki mekanizmaları hakkında pek çok çalışma yapılmıştır. EPS'lerin önemli antibakteriyel, antifungal, antibiyofilm ve antiviral etkileri olduğu bildirilmektedir (Abdalla ve diğerleri, 2021). EPS'ler, çeşitli karbonhidratların monomerlerinin ve polimerlerinin tekrar eden birimlerinden oluşmaktadırlar. LAB tarafından üretilen EPS'ler homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olarak iki farklı şekilde sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırmayı içerdikleri monosakkaritlerin türü ve monosakkaritlerin etkileşimlerine bağlı olarak dallanma yapıları etkilemektedir (Abarquero ve diğerleri, 2021). Bakteri türüne ve çevresel koşullara göre sentezlenen EPS miktarı değişiklik göstermektedir (Nguyen ve diğerleri, 2020). Besiyerindeki karbon kaynağının değişikliğine bağlı olarak yapılan bir çalışmada *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en fazla EPS üretimini glukoz veya laktoz içeren besi ortamlarında gerçekleştirmiştir. Fruktozun ise en düşük EPS sentezine neden olan karbon kaynağı olduğu görülmüştür (Sørensen ve diğerleri, 2022). *L. helveticus* bakterisi ile yapılan bir çalışmada ise De Man, Rogosa ve

Sharpe (MRS) besiyerinde %20 oranında sükroz kullanımının, EPS üretiminde 13,99 g/L'lik bir verime sebep olduğu görülmüştür (Hussein ve diğerleri, 2015). Besi ortamında farklı nitrojen kaynaklarının kullanıldığı çalışmalar diğer fiziksel parametrelerle yapılan çalışmalara nazaran daha kısıtlı sayıdadır (Prete ve diğerleri, 2021). Ancak nitrojen kaynağı konsantrasyonunun besiyerindeki artışı, bakterilerin ürettiği EPS miktarının artmasına neden olmuştur (Ayivi ve İbrahim, 2022; Wu ve diğerleri, 2022). Bakterilerin geliştiği besi ortamının pH seviyesi, EPS üretim miktarında farklılıklara sebep olmuştur. *L. fermentum* bakterisi için 5, 5,5, 6, ve 7 pH seviyeleri karşılaştırıldığında en fazla EPS üretiminin pH 6'da olduğu belirlenmiştir (Zhang ve diğerleri, 2011). *L. plantarum* bakterisi ile yapılan bir çalışmada pH 8'in EPS üretim için en iyi pH olduğu bildirilmiştir (Nguyen ve ark., 2021). LAB suşlarının gelişimini, pH 2 gibi düşük değerler ve 10 gibi yüksek değerler inhibe etmektedir. Büyüme koşullarında pH kontrollünün, kontrolsüz pH'lı ortamlara kıyasla EPS verimini üç kat arttığı gösterilmiştir (Wu ve diğerleri, 2022). Bununla birlikte inkübasyon sıcaklığı da EPS üretim miktarını oldukça etkilemektedir. Genel olarak LAB'nin optimum büyüme koşulları 35°C-37°C arasındadır. *L. helveticus, L. casei ve L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bakterileri ile yapılan bir çalışmada optimum sıcaklık değeri 37°C olarak belirlenerek 45°C'ye kadar artan sıcaklık parametreleri denendiğinde EPS üretim miktarında düşüş gözlenmiştir (Hussein ve diğerleri, 2015). İnkübasyon süreleri ile yapılan farklı çalışmalarda 24 saatten az veya fazla inkübasyon sürelerinin (18 saat ve 48 saat) EPS üretim miktarını arttırdığı rapor edilmiştir (Ermiş ve diğerleri, 2019; Benhadria ve diğerleri, 2017). Karbondioksit, glikolizde yer alan enzimleri düzenleyerek enerji metabolizmasında görev almaktadır. Ayrıca CO_2 stresinin EPS üretimini etkileyen önemli bir faktör olduğu ve bazı LAB suşlarının çoğalmasında karbon kaynağı olarak CO_2'i kullanıldığı gösterilmiştir (Nguyen ve diğerleri, 2020). Bu tez çalışmasında kullanılacak olan *L. salivarius* KC27L ve *L. reuteri* KC21L suşları üzerinde değişen fiziksel koşullara bağlı olarak EPS üretim düzeylerinin karşılaştırıldığı kapsamlı araştırmalara şu ana kadar rastlanılmamıştır.

EPS'lerin sentezlenmesinden sorumlu genlerin bakteriler hatta türler arasında farklılık gösterdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olarak sınıflandırılan bakterilerin metabolitleri olan EPS'lerin biyosentezşnde, UDP-glukoz-dehidrogenaz, glukozil-transferaz, galaktozil-transferaz 1 ve 2, polimeraz olarak adlandırılan bir takım moleküller görev almaktadır (Zivkovic ve diğerleri, 2015). Homopolisakkarit sınıf EPS'lerin sentezi için glukozil transferaz (*gtf*) veya fruktozil

transferaz (*ftf*) genleri gerekirken, heteropolisakkarit sınıf EPS'lerin sentezi için birden çok çeşit barındıran karmaşık bir EPS gen kümesi gerekmektedir (Dertli ve diğerleri, 2016). Genel olarak EPS biyosentezinde, 5 korunmuş gen (*epsA, epsB, epsC, epsD* ve *epsE*) bulunmaktadır (Zeidan ve diğerleri, 2021). Yapılan çalışmalar, yukarıda belirtilen gen kümeleri haricinde farklı bakterilerde, farklı gen kümelerin de bulunduğunu göstermiştir. Bu farklılığın temelinde, bakterilerin suşları arasındaki genetik yapının değişkenlik gösterdiği bulunmaktadır (Vuyst ve diğerleri, 2011). Bu çalışmalar ışığında, bakterilerde EPS biyosentezinde görevli genlerin benzer ve farklı işleyişinin olabileceği anlaşılmaktadır. Ancak moleküler süreçler tam anlamıyla anlaşılamamıştır (Zeidan ve diğerleri, 2017).

Probiyotik özellikte olan *Ligilactobacillus salivarius* ve *Limosilactobacillus reuteri* türleri üzerinde yapılan EPS üretim yetenekleri ve EPS üretim yeteneklerini etkileyen fiziksel koşullar ile ilgili çalışmaların kapsamlı olmaması, EPS sentezinden sorumlu genlerin gen ekspresyon seviyelerinin belirlendiği çalışmaların az olması ve bu genlerin etkileşimlerinin henüz tam anlamıyla anlaşılamamış olması nedeniyle bu tez çalışmasında bu türlere ait suşlar (KC27L ve KC21L) kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında,

1- LAB, EPS'lerinin prebiyotik olarak kullanılma potansiyelleri olduğundan, G. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı stok kültür koleksiyonunda bulunan ve Çelik (2018)'in Yüksek Lisans tezinde EPS üretim kapasitesine sahip olduğu belirlenmiş olan *Ligilactobacillus salivarius* KC27L ve *Limosilactobacillus reuteri* KC21L suşlarının kullanılarak EPS üretiminin sağlanması,
2- Her iki bakteri için, EPS üretim yeteneğini arttırmak için farklı fiziksel koşulların denenmesi,
3- Her iki bakteri için, yüksek EPS üretiminin belirlendiği koşullarla kombine bir koşulun oluşturulması ve en verimli EPS üretim koşulların oluşturulması,
4- Bakterilerde EPS üretiminde görevli genlerin kontrol ortamında ve kombine ortamda ekspresyon seviyelerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Fiziksel parametrelere bağlı olarak, *Ligilactobacillus salivarius* KC27L ve *Limosilactobacillus reuteri* KC21L suşlarında, EPS sentezinden sorumlu genlerin ekspresyon seviyelerinin araştırılması hakkında yapılan herhangi bir çalışmaya şu ana kadar rastlanılmamıştır.

Bu tez çalışması G. Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri FGA-2022-7538 ve FYL-2022-7846 kodlu projeleri tarafından desteklenmiş olup, henüz tam olarak anlaşılamayan biyokimyasal yolakların diğer bakteriler için de net bir şekilde ortaya konmasını sağlayacaktır. Elde edilen sonuçlar, yapılacak moleküler çalışmalar için temel oluşturacak nitelikte olup, bakterilerde EPS üretimin arttırılasında yardımcı olacak ve EPS'lerin farklı biyoteknolojik alanlarda kullanılmasının önünü açacaktır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Laktik Asit Bakterileri

Aerotolerant olan LAB, geliştirilmeleri ile ilgili olarak genel olarak pürinlere, pirimidinlere, vitaminlere, çeşitli amino asitlere ve zengin karbonhidratlı bileşiklere ihtiyaç duymaktadırlar (Sağlam ve Karahan, 2017). Genetik çeşitliliği ve habitat bakımından oldukça geniş spektruma sahiptirler. Bu sebeple gelişimleri içim optimum pH ve sıcaklık için kesin bir şey söylenememektedir. Ancak çoğu LAB, büyüme için 6 ila 7 arasındaki pH değerlerinde gelişmektedirler (Schillinger ve diğerleri, 2006).

LAB çeşitli fermantasyon süreçlerinde önemli rol oynamaktadırlar. Gıda karbonhidratlarını fermente ederler ve fermantasyonun sonucunda laktik asit üretmektedirler. Ayrıca çeşitli alkollerin, aldehitlerin, asitlerin, esterlerin ve kükürt bileşiklerinin üretiminde katkıda bulunmaktadırlar. Laktik asit bakterilerinin ürünleri, kullanım açısından uzun ömürlü olduğu için, gıda alanında, bu bakteri grubuna duyulan ihtiyaç artmıştır. Ayrıca GRAS (Genel Olarak Güvenli) olarak kabul edilmektedirler. Bazı enterokoklar dışında herhangi bir klinik problem bulunmamaktadır (Bintsis, 2018). Buna ek olarak günümüzde LAB, kimyasalların, farmasötiklerin veya diğer faydalı ürünlerin sentezinde kullanılmaktadır. Çevre kirliliğine çözüm olabilmesi için petrokimya endüstrisinde laktik asidin biyoteknolojik üretimi yapılmaktadır. *Lactobacillus* cinsine ait mikroorganizmalar ticari probiyotikler olarak kullanılmaktadırlar (*L. acidophilus, L. rhamnosus, L. reuteri, L. casei, L. plantarum* vb.) (Florou-Paneri ve diğerleri, 2013). Genetik ve metabolik çalışmalar, genel olarak *Lactococcus lactis* ve *Lactobacillus plantarum* üzerinde yoğunlaşmıştır. Çünkü yüksek transformasyon verimlilikleri mevcuttur. Yapılan birçok çalışma diğer LAB suşlarının da bu alanda kullanılabilir olduğunu göstermiştir. Ama yapılan çalışmalar, *L. lactis* ve *L. plantarum*'un verimliliklerinden düşük olduğunu göstermiştir. *L. reuteri* ve *L. plantarum,* kromozomda hedeflenen mutasyonların gerçekleştirilmesinde son yıllarda CRISPR-Cas9 teknolojiler de kullanılmaktadırlar (Hatti-Kaul ve diğerleri, 2018).

Laktik asit bakterilerinden elde edilen ekzopolisakkaritler (EPS'ler) sağlık alanında da önem arz etmektedir (Welman ve Maddox, 2003). Sindirim sistemi rahatsızlıklarına karşı yaygın olarak kullanılan probiyotiklerin ve prebiyotiklerin, bağışıklık sistemini uyardığı da gösterilmiştir. LAB EPS'leri, gastrointestinal sistemin düzenlenmesinde ve bağışıklık

sisteminin iyileştirilmesinde önemli rol oynamaktadırlar (Oerlemans ve diğerleri, 2021). LAB EPS'leri ilaç endüstrisi, gıda, kozmetik gibi pek çok alanda da kullanılmaktadır (Zayed ve diğerleri, 2021).

Çalışmamızda kullanılan *L. salivarius* ve *L. reuteri* bakterileri, kuşlar da dahil olmak üzere birçok canlının sindirim sisteminde yaygın olarak bulunan Gram pozitif bir bakterilerdir. Eski adı *Lactobacillus salivarius* olan *Ligilactobacillus salivarius*, karbonhidrat metabolizmasından sadece laktik asit üreten homofermentatif, hareketsiz, spor oluşturmayan, katalaz negatif, aerotolerant anaerobik mikroorganizmalardır. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi [(EFSA) Biyolojik Tehlike Paneli (BIOHAZ)] tarafından Nitelikli Güvenlik Varsayımı (QPS) statüsüne sahip bir laktik asit bakterisi olan *L. salivarius* kaz, tavuk, hindi, güvercin, ördek, domuz ve sığır dahil olmak üzere kuşların ve memelilerin bağırsaklarından veya dışkılarından yaygın olarak izole edilmektedir (Guerrero Sanchez ve diğerleri, 2022). İnsan sütü, vajinası ve ağız boşluğunun yanı sıra bal arılarının bağırsakları, üzüm şarabı ve et diğer izolasyon kaynaklarını oluşturmaktadır (Dec ve diğerleri, 2021). *L. salivarius* laktik asitin yanı sıra, bakteriyosin ve hidrojen peroksit gibi başka antimikrobiyal maddeler de üretebilmektedir. *L. salivarius* bakterileri, olumsuz mikrobitanın gelişimini sınırlaması ve diğer sağlığı geliştirici etkileri nedeniyle, hayvan sağlığını ve dolayısıyla hayvansal üretim göstergelerini artırabilecek potansiyel probiyotikler olarak kabul edilmektedir. Laktik asit üreterek bağırsak florasını asitleştirmektedirler ve istenmeyen bağırsak mikrobiotasının gelişimini sınırlamaktadırlar. Antimikrobiyal ve antienflamatuar etkileri bulunmaktadır (Dec ve diğerleri, 2021). Bununla birlikte, *L. salivarius*, EPS üretiminden sorumlu genler (*glikozil transferaz, epsA, epsC, epsD, UDP* genleri vs.) içermektedir. Polisakkaritlerin sentezinden sorumlu olan bu genler, biyotik ve abiyotik çevresel faktörlerden etkilenmektedirler (Harris ve diğerleri, 2017).

L. reuteri, heterotipik laktik asit fermantasyonunun fakültatif anaerobik ve Gram-pozitif bir bakterisidir. Laktik asit, karbondioksit, formik asit, etanol, asetik asit, yüksek alkoller vb. metabolitler içermektedir. Çoğu omurgalı ve memelinin bağırsaklarındaki laktik asit bakterileriyle iyi bir biyouyumluluğa sahiptir ve insanlarda toksik etki oluşturup hastalığa neden olmazlar (Mu ve diğerleri, 2018; Jiang ve diğerleri, 2022). *L. reuteri* ilk olarak anne sütünde bulunmuştur. Genellikle hayvanların bağırsaklarında ve dışkısında dağılmakta ve bazı fermente ürünlerde bulunmaktadır. Farklı kaynaklardan elde edilen *L. reuteri*, güçlü yapışma

kapasitesi ile bölge rekabeti oluşturmak, zararlı bakteri kolonizasyonuna etkili bir şekilde direnmek, bağırsak biotasını düzenlemek ve bağırsak hastalıklarından kaçınmak için bağırsak mukozasını kolonize etmek gibi çeşitli fizyolojik özellikler sergileyebilmektedir (Jiang ve diğerleri, 2022). *L. reuteri'*nin probiyotik olarak kolik semptomların iyileştirilmesi, immünomodülasyon ve anti-inflamatuar aktiviteler gibi yararlı etkiler sağladığı da bildirilmiştir. *L. reuteri'*nin probiyotik olarak kolik semptomların iyileştirilmesi, immünomodülasyon ve anti-inflamatuar aktiviteler gibi yararlı etkileri gösterilmiştir (Ahmed ve diğerleri, 2021). *L. reuteri'*nin üretmiş olduğu reuteran ekzopolsakkariti, fırıncılık sektöründe sıklıkla kullanılmaktadır. Bitkisel kaynaklı inülin ise gıda endüstrisinde şeker ve yağ ikamesinde ve az yağlı süt ürünlerinde kremsi kıvamı arttırıcı olarak kullanılmaktadır (Prete ve diğerleri, 2021). *L. reuteri*, probiyotik özellikte bir bakteridir. Bağırsak mukoza hücrelerini beslemektedir ve patojenleri inhibe etmektedir. İçerdiği α-(1,3)-glikosidik bağlar ile EPS üretimi yapma yeteneğine sahiptir (Soumya ve Nampoothiri, 2021).

2.2. Ekzopolisakkaritler

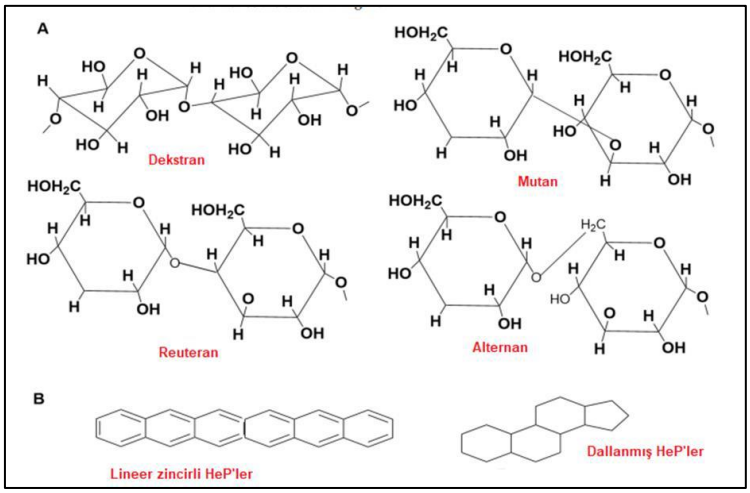
Ekzopolisakkaritler (EPS'ler) düz veya dallanmış tekrarlı şeker ve şeker türevlerini içeren uzun zincirli, yüksek molekül ağırlığına sahip ve temel olarak hücre çeperi dışında bulunacak şekilde üretilen polimerlerdir. Bu şeker birimleri farklı oranlarda ağırlıklı olarak ya glikoz, galaktoz, fruktoz ve ramnozdan ya da bunların kombinasyonlarından oluşmaktadır (Ismail ve Nampoothiri, 2010; Zehir Şentürk ve diğerleri, 2022). EPS'ler bakterilerin kapsül yapısını oluşturan, farklı şeker monomerlerinin glikozidik bağlarla bağlanarak polisakkarit yapısını oluşturduğu ve yapısal olarak 3 şekilde bulunabilen biyopolimerlerdir. Bu 3 yapıdan birincisi kapsüler polisakkarit olarak adlandırılır. Kapsüler polisakkaritler bakterilerde bulunan hücre yüzüne bağlanır. İkincisi bakterilerdeki hücre duvarının yapısına katılan lipopoliksakkaritlerdir. Üçüncüsü ise kapsüler polisakkaritler gibi hücre yüzeyine tutanmayarak salınan EPS'lerdir (Enkhtur, 2021).

(LAM). Bunlardan ilk ikisi hücrenin bir parçası olmaktadır. Bu polimerlerin canlılar için başlıca enerji depo materyali (örneğin glikojen) olması, özellikle bakteri hücre duvarı bileşenleri olan peptidoglikan, lipopolisakkarit, lipooligosakkarit, teikoik asit, lipoteikoik asit ve EPS'lerin yapısında yer alması gibi birçok hayati fonksiyonu bulunmaktadır. Birçok prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizma hücre duvarlarının bileşiminde bulunmayan

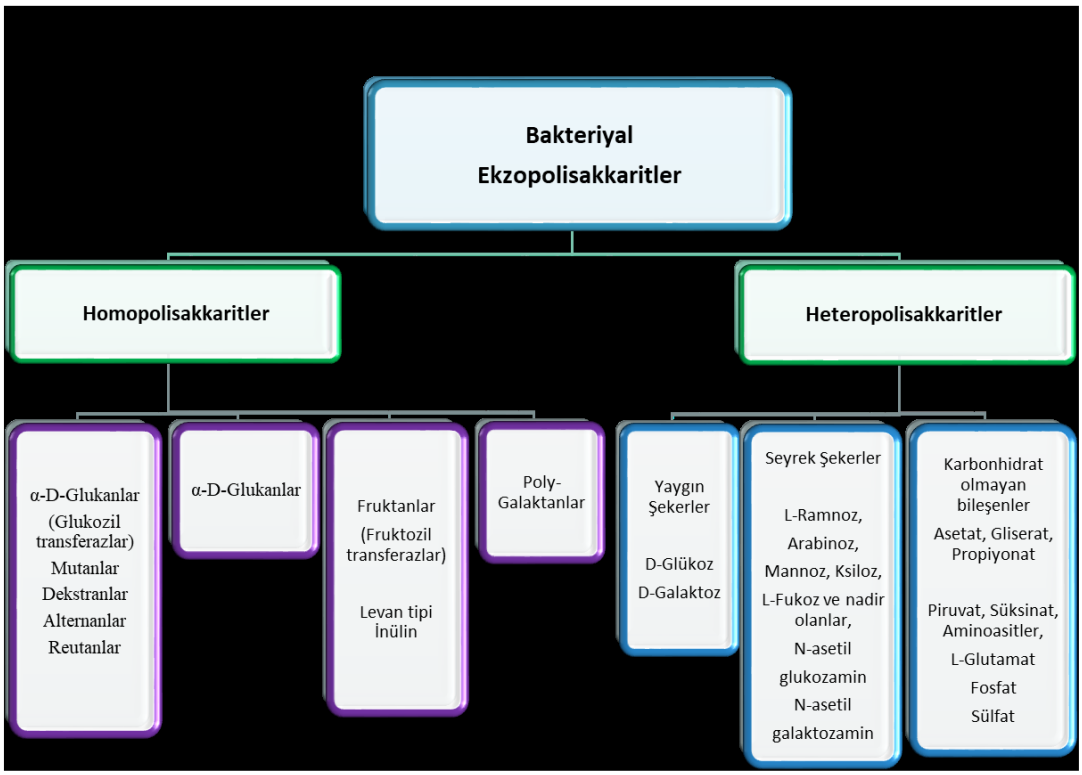
hücre dışı EPS olarak adlandırılan polisakkaritler üretme yeteneği gösterektedir (Sutherland, 2001). Probiyotik bakteriler EPS'yi hücre dışı olarak hücre zarfının üzerinde kapsüller veya balçık tabakası (Glikokaliks) olarak üretmektedir (Schmid ve diğerleri, 2015). Hücrelerin içinde biriken polisakkaritler, hücre içi polisakkaritler olarak bilinmektedir (Ruas-Madiedo ve De Los Reyes-Gavilán, 2005). Balçık tabakalar halinde üretilen EPS ise, hücrelere daha az yakındır ve kolayca çıkarılabilmektedir. EPS, logaritmik faz boyunca veya geç logaritmik faz ya da durağan fazda sentezlenmektedir. Maksimum üretim ise geç logaritmik faz evresinde gerçekleşmektedir (Freitas ve Alves, 2011).

Ekzopolisakkaritler birçok mikroorganizmanın ürettiği yan ürünlerdir. Fagositoz, kuruma, faj saldırısı ve toksik bileşenlere karşı bakteriyi korumaktadır. Hücre tanınmasında, antibiyotikler rol oynamakta ve ozmotik strese karşı dayanıklılık sağlamaktadır. Sadece bakteriyi değil insan sağlığını da korumaktadır. Probiyotik özellikteki mikroorganizmaların ürettiği EPS'ler, ilaçların üretilmesinde stabilizatör olarak kullanılmaktadır. Ayrıca tekstil, kozmetik, biyoremediasyon, gıda ve tedavi gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Angelin ve Kavitha, 2020). Bunların yanı sıra, biyouyumluluğu yüksek ve toksik olmayan bir bileşendir. Biyolojik olarak bozunabilir olduğu için farmakolojik ve nutrasötik uygulamalarda kullanılmaktadır. Antioksidan, kolesterol düşürücü, antimikrobiyal ve prebiyotik ajanlar olarak pek çok alanda bileşen olarak kullanılmaktadır (Prete ve diğerleri, 2021). Ekzopolisakkaritler, monosakkaritlerin glikozidik bağ ile bağlanmasıyla oluşmaktadır ve suda çözünebilir bir polimerdir. Genel olarak, D-glukoz, D-galaktoz, L-ramnoz veya nadir olarak N-asetilglikozamin, Heteropolimer yapılı EPS'ler, asetilgalaktozamin ve glukoronik asit birimlerinin birleşmesi ile oluşan ve içeriğinde DNA, protein, lipit gibi molekülleri barındıran polimerik moleküllerdir (Ergene ve Avcı, 2018).

Bazı mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve primer metabolit olarak kullanılan EPS'ler yapılarında bulunan şekerlere göre 2 çeşittir bunlar, homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritlerdir (Şekil 2.1). Homopolisakkaritler genelde glukan ve fruktanların tekrarlayan birimlerinden oluşmaktadır. Heteropolisakkaritler ise oligosakkaritlerin tekrarı halinde bulunmaktadır (Şekil 2.2) (Lynch ve diğerleri, 2018; Ripari, 2019; Silva ve diğerleri, 2019; Singh ve diğerleri, 2017; Xu ve diğerleri, 2019; Guerin ve diğerleri, 2020).



Şekil 2.1. Homopolisakaritler (A) ve heteropolisakkaritler (B) (Bibi ve diğerleri, 2021)



Şekil 2.2. Bakteriyel ekzopolisakkaritlerin sınıflandırılması (Angelin ve Kavitha 2020)

2.2.1. Homopolisakkaritler (HoPS)

HoPS, yapısını oluşturan monosakkarit tipine göre karakterize edilmektedir. Glukan (dekstran) sadece glikoz, fruktanlar (levan) ve inülin sadece fruktoz ve poligalaktan sadece galaktoz monomeri içermektedir (Ripari, 2019). HoPS tek bir monosakaritten oluştuğu için, glikosidik bağlarına, dallanmalarına, zincir uzunluklarına, moleküler ağırlıklarına ve polimer yapılarına göre ayrıca karakterize edilebilirler. *Lactobacillus, Streptococcus,*

Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus ve *Weissella* cinslerine ait LAB HoPS üretmektedirler. HoPS moleküler ağırlığı bakteri suşuna bağımlı olarak 10^4 Da ile 10^8 Da arasında değişmektedir (Guerin ve diğerleri, 2020). Homopolisakkaritler ve uygulama alanları Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Probiyotik bakterilerden elde edilen homopolisakkaritler ve uygulamaları (Angelin ve Kavitha, 2020'dan uyarlanmıştır)

EPS	Organizma	Monomer	Kimyasalmadde	Uygulamalar
Dekstran	*Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus casei, Lactobacillus sakei, Lactobacillus fermentum, L. parabuchneri*	Glikoz	B-1,6 glikosidik bağları: Ayrıca bazı dekstranlarda birkaç 1,2-1,3 veya 1,4-bağları mevcuttur.	Gıda adjuvan, emülgatör, taşıyıcıve stabilizatör olarak, ilaçendüstrileri, plazma ikamesi, matriks kromatografi kolonu,antikoagülan, kâğıt endüstrisi, gelişmiş yağ geri kazanımı için metal kaplama işleme ve biyomateryaller
Mutan	*Streptococcus mutans S. sobrinus, Lactobacillus* sp. *Leuconostoc* sp.	Glikoz	α-1,3-D-Glikan	-
Alternan	*Leuconostoc mesenteroides*	Glikoz	α-1,3 ve α-1,6 glikosidik bağları	Prebiyotikler, daha tatlı şekerlemeler, düşük viskozite, gıdalarda hacim arttırıcı ve genişletici
Kurdlan	*Alcaligenes faecalis*	Glikoz	α-1,3-D-glikanve α-1,3-β-D-glikan	Başlangıç kültürü
Levan	*Bacillus subtilis, Streptococcus salivarius,Streptococcus mutans*	Furuktoz	β-2,6 glikosidik bağları	Prebiyotikler, antitümör özelliği, hipokolesterolemik araç, gıda endüstrisinde yapıştırıcı, biyo-kıvam arttırıcı
İnülin	*Streptococcus mutans, Lactobacillus reuteri*	Furuktoz	β-2,1 glikosidik bağları	Prebiyotikler bağırsak mukozal hücrelerini besler ve inhibe eder, kolon kanserine karşı hedeflenen ilaç dağıtımıve gıda ürünlerindeki yağ ikameleri için kullanılır.
Poly-galaktanlar	*Lactococcus lactis*subsp. *lactis* H414 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	Galaktoz	Pentamerik yinelenen birim galaktoz	-

Heteropolisakkaritler (HePS)

HePS, HoPS'lere kıyasla çok daha karmaşıktır ve farklı monosakkaritlerden oluşur. HePS, farklı polimerizasyon derecelerine sahip tekrarlanan birimlerden oluşur ve iki ila sekiz tekrar eden glikoz, ramnoz, galaktoz, fruktoz veya mannoz gibi birimine sahiptir. Diğer bazı bileşenler (üronik asit, N -asetil- d -galaktozamin ve N -asetil- d- glikozamin) teknolojik ve fizyolojik fonksiyonlarda çok önemli roller oynamaktadır (Ale ve diğerleri, 2016, Hussein ve diğerleri, 2015). Ayrıca, pH, bulanıklık, bileşim, oksijen seviyesi,

sıcaklık, büyüme fazı, miktar, tip ve glikozidik bağlar dâhil olmak üzere bazı büyüme koşulları HePS'lerin salgılanmasını etkilemektedir. Hetero-polisakaritlerde tekrarlayan birimlerin hücre dışında meydana gelen bir zar aracılığıyla yer değiştirmesiyle bir polimerizasyon süreci devam eder (Bibi ve diğerleri, 2021).

HePS, *Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus* ve *Bifidobacterium* türleri tarafından üretilmektedir (Ripari 2019). HePS yapısı, monosakkaritlerin sayısına ve türüne ve ilgili bağlantıların türüne bağlıdır (Lynch ve diğerleri, 2018). Lineer veya α ve β bağlantıları ile dallanmış olabilirler. Lactobacillus türleri tarafından üretilen HePS, ana şekerler olarak glikoz, galaktoz ve ramnoz ile yedi monosakkaritin tekrarlanan birimlerinden oluşur. HePS'nin moleküler ağırlığı 10^4 ila 10^6 Da arasında değişmektedir (Singh ve Saini, 2017). HoPS'den farklı olarak HePS, tipik olarak 50 ila 200 mg/L'lık bakteri kültürü gibi küçük konsantrasyonlarda üretilir (Guerin ve diğerleri, 2020). Çizelge 2.2.'de heteropolisakkaritlerin şeker bileşimi, molekül ağırlıkları, molekül hızları ve uygulama alanları yer almaktadır.

2.3. Laktik Asit Bakterilerinde Ekzopolisakkarit Üretimi

EPS, LAB tarafından üretilen biyopolimerlerdir. Çoğu LAB, özellikle, *Lacticaseibacillus, Lactiplantibacillus, Lactobacillus, Lactococcus, Latilactobacillus, Lentilactobacillus, Leuconostoc* ve *Limosilactobacillus* cinsleri EPS sentezlemektedirler (Korcz ve Varga, 2021). Yapılan bir çalışmada bazı bakterilerin EPS üretim miktarları belirlenmiştir. *L. plantarum* 2,1 g/L, *Leuconostoc mesenteroides* 15,89-16,35 g/L, *L. sakei* 4,60 g/L, *L. fermentum* 44,50 g/L EPS üretmiştir (Sakr ve diğerleri, 2021). Ekstraksiyonu kefirden sağlanan bazı laktik asit bakterilerinin sentezlediği EPS miktarları karşılaştırıldığı başka bir çalışmadan elde edilen sonuçlara göre *L. acidophilus* 312 mg/L, *L. helveticus* 378 mg/L, *L. casei* 299 mg/L, *L. lactis* 205 mg/L ve *L. cremoris* 173 mg/L EPS üretmiştir. En fazla EPS üreten bakteri *L helveticus* olarak belirlenmiştir (Sabir ve diğerleri, 2010). *L. salivarius* ve *L. reuteri* bakterilerinin de EPS ürettikleri çeşitli kaynaklarda ispatlanmıştır (Ahmad ve diğerleri, 2021; Bikriç ve diğerleri, 2021; Tkáčiková ve diğerleri, 2020; Uzundağ ve diğerler, 2020).

Çizelge 2.2. Probiyotik bakterilerden elde edilen heteropolisakkaritler ve uygulamaları (Angelin ve Kavitha, 2020'dan uyarlanmıştır)

Organizma	Şeker bileşimi	Moleküler ağırlık	Molekülerhız	Uygulamalar
Lactobacillus plantarum JLK0142	Glikoz ve galaktoz	$1,34\times10^5$ Da	2,3:1,06	Gıda ilavesi veya klinik olarak kullanım için immünomodülatöraraç fonksiyonel gıdalar veya ilaçlarda faydalıdır
Lactobacillus johnsonii 142	D-glikoz ve D-galaktoz	$1,0\times10^5$ Da	1:4	-
Enterococcus faecium MC13	Galaktoz ve glikoz	$2,0\times10^5$ Da	-	Güçlü emülsifiye edici ve topaklaştırıcı madde
Streptococcus thermophilus CC30	Glikoz ve galaktoz	58-180 kDa	1:1	Gıda endüstrisinde bir emülgatör olarak kullanışlıdır
Lactobacillus helveticus MB2-1	Glikoz, mannoz, galaktoz, ramnoz, arabinoz	$1,83\times10^5$ Da	3,12:1,01:1, 00:0,18:0,16	-
Lactobacillus plantarum C70	Arabinoz, mannoz, glikoz ve galaktoz	$3,8\times10^5$ Da	-	Doku ve çeşitli gıda sistemlerinin reolojik özelliklerini geliştirme
Lactobacillus plantarum WLPL04	Ksiloz, glikoz ve galaktoz	$6,61\times10^4$ Da	3,4:1,8:1	Fonksiyonel gıdanıngeliştirilmesi
Bacillus tequilensis FR9	Glikoz, arabinoz, galaktoz, mannoz ve ksiloz	-	-	Gıdave süt ürünlerindedengeleyici ve koyulaştırıcı
Enterococcus faecium	Mannoz, glikoz ve Galaktoz	$2,50\times10^4$ Da	1,38:1,00:1,42	Terapötiklerin geliştirilmesi ve fonksiyonel gıda
Lactobacillus gasseri FR4	Glikoz, mannoz, galaktoz, ramnoz ve ufak bir bölüm fükoz	$1,86\times10^5$ Da	-	Gıda endüstrisinde antioksidan madde, viskozlaştırıcı madde ve antimikrobiyal madde olarak kullanımı
Lactobacillus plantarum JLAU103	Arabinoz, ramnoz, fükoz, ksiloz, mannoz, fruktoz, galaktoz ve glikoz	12,4 kDa	4,05:6,04:6, 29:5,22:1,47 :5,21:2,24:1, 83	Doğal bir antioksidan veya gıda endüstrisinde fonksiyonel katkı maddesi olarak kullanımı
Lactobacillus casei WXD030	Glikoz, glikozaminve mannoz	37,37 kDa	1,4:1,1:1	Adjuvan olarak ve aşıların alt biriminigeliştirmek içinkullanılır

Prebiyotik olan ekzopolisakkaritler (EPS), suşların epitel yüzeylere yapışmasında, otoagregasyonunda ve pıhtılaşmasında etkili olan sekonder metabolitlerdir. LAB'ler tarafından üretilen EPS'ler, hücreyi ozmotik stres, düşük su aktivitesi, fagositoz, bakteriyofajlar, toksik bileşikler ve makrofajlara karşı koruyucu işlevlere sahiptir (Aakef ve Yüksekdağ, 2023). EPS'ler probiyotikler gibi mikrobiyal ekosistemlerin bağırsak biotasında kolonizasyonunu kolaylaştıran biyofilmlerin oluşmasında kilit öneme sahip olmakla birlikte LAB tarafından enerji kaynağı olarak da kullanılabilmektedir (Dertli ve diğerleri, 2016; Zeidan ve diğerleri, 2017). Laktik asit bakterilerinden elde edilen EPS'ler gastrointestinal sistemin düzenlenmesinde ve bağışıklık sisteminin iyileştirilmesinde etkili olmalarının yanı sıra ilaç endüstrisi, tekstil, gıda, kozmetik gibi pek çok alanda da yaygın olarak kullanılmaktadır (Angelin ve Kavitha, 2020; Oerlemans ve diğerleri, 2021; Zayed ve diğerleri, 2021). Probiyotik ve prebiyotik özellikteki mikroorganizmaların ürettiği

EPS'ler, ilaçların üretilmesinde stabilizatör olarak kullanılmasının yanı sıra, antioksidan, kolesterol düşürücü, antimikrobiyal ve prebiyotik ajanlar olarak pek çok alanda bileşen olarak rol oynamaktadır (Prete ve diğerleri, 2021).

2.4. Fiziksel Şartların EPS Üretimi Üzerindeki Etkileri

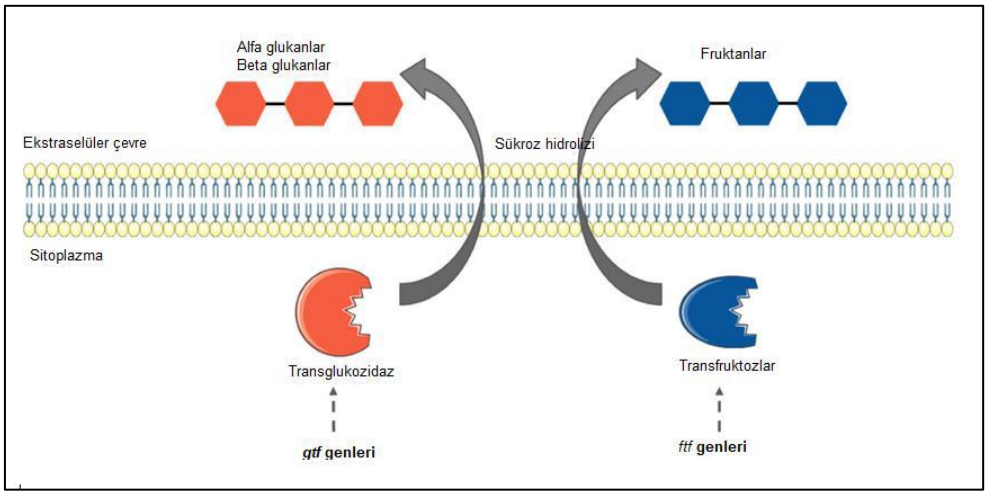
Bakteriler farklı fiziksel koşullara bağlı olarak EPS üretmektedirler. Bu fiziksel koşullar üretilen EPS miktarını etkilemektedir (Nguyen ve diğerleri, 2020). Üretilen EPS miktarı suşlara, besiyeri bileşimine ve pH, sıcaklık ve karbon/azot oranları gibi kültür koşullarına göre değişim gösterebilmektedir. Probiyotikler tarafından salgılanan EPS'ler, monosakkarit bileşimi, yükü, bağlantısı, tekrarlanan yan zincirlerin varlığına göre farklılık gösterebilmektedir (Ciszek-Lenda ve diğerleri, 2011; Sanalibaba ve Cakmak, 2016). Çizelge 2.3'de bakterilerin farklı fiziksel parametreler altında ürettikleri EPS miktarları gösterilmektedir.

Çizelge 2.3. Bazı bakterilerde EPS üretimi için uygulanan optimal koşullar ve EPS üretim miktarları

Kullanılan Bakteri	Uygulanan Koşullar	Üretim Miktarı	Kaynak
L. helveticus	Karbon kaynağı: laktoz glukoz	8,2 mg/L 5,5 mg/L	Torino ve diğerleri, 2005
L. fermentum	Karbon kaynağı: Glukoz laktoz sakkaroz	36,3 mg/L 112,84 mg/L 134,59 mg/L	Velikova ve diğerleri, 2018
L. rhamnosus	Karbon kaynağı: glukoz	140,37 mg/L	Velikova ve diğerleri, 2018
L. fermentum	pH: 6	10,11 mg/L	Zhang ve diğerleri, 2011
L. helveticus	pH: 4,5	6,5 mg/L	Torino ve diğerleri, 2005
Streptococcus thermophilus	Azot kaynağı: triptofan	29,131 mg/L	Karadeniz ve diğerleri, 2021
L. casei *L. helveticus* *L. delbrueckii bulgaricus*	Sıcaklık: 37°C	7,06 g/L 13,99 g/L 4,54 g/L	Hussein ve diğerleri, 2015
L. plantarum MF169	İnkübasyon süresi: 48 saat 72 saat 120 saat	239,95 mg/L 313,60 mg/L 287,48 mg/L	Mıdık ve diğerler, 2020
L. casei	CO_2 stresi: %20	2,9 g/L	Ninomiya ve diğerleri, 2009

2.5. EPS’nin Biyosentetik Yolakları

Probiyotik bakterilerde EPS'nin hücrelerdeki oluşumu, iki yolla gerçekleşmektedir. HoP'ler genellikle hücre dışı biyosentetik yolla üretilirken, HeP'ler hücre içi veya hücre dışı yollarla sentezlenmektedir. HoP'lerin hücre dışı biyosentezine, polimerizasyon işlemi sırasında spesifik hücre dışı glikosil transferazlar ve fruktosil transferazlar aracılık etmektedir (Şekil 2.3) (Li ve Wang, 2012). Şeker kalıntıları, hücre dışında monomerik birimlere bölünür ve glikosil transferazların yardımıyla hücre dışı olarak bir polimer halinde birleştirilmektedir. Sükroz; glikoz ve fruktoza ayrılan ve glukan sükraz ve fruktan sükraz tarafından glukan ve fruktana polimerize edilen spesifik bir substrat olarak kullanılmaktadır (Zannini ve diğerleri, 2016). Glukan sükrazlar ayrıca dekstran sükrazlar (dekstran), mutant sükrazlar (mutant), reuteran sükrazlar (reuteran) ve alternan sükrazlar (alternan) olarak sınıflandırılırken, fruktan sükrazlar sırasıyla levan sükrazlar (levan) ve inülin sükrazlar (inülin) olarak ayrılmaktadır (Patel ve diğerleri, 2012). Bu polimerize HoP'ler doğrudan hücre dışı ortama salınmaktadır (Zannini ve diğerleri, 2016).



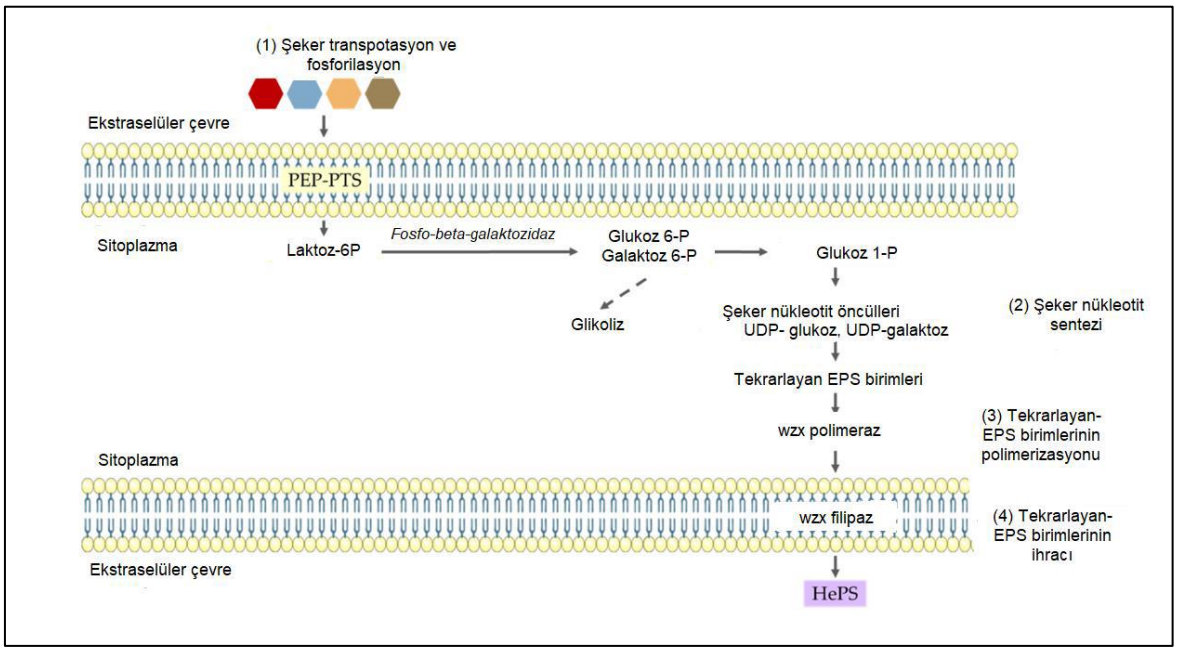
Şekil 2.3. HoPS biyosentez yolu (Guerin ve diğerleri, 2020)

Hücre içi biyosentetik yolda, şeker kalıntıları hücre içine taşınır, farklı monomerik birimlere dönüştürülerek, kısmen polimerize edilir ve zara bağlı bir izoprenoid lipit taşıyıcıya bağlanır (Madhuri ve Vidya Prabhakar, 2014). Bu aşamada, polimerin gerekli modifikasyonu gerçekleşmektedir. Polimer dışarı taşınır ve polisakkaritler olarak birleştirilmektedir. Hücre içi yolla HePs sentezi, kromozomal veya plazmid kökenli genler tarafından kodlanan çeşitli enzimleri, taşıyıcıları ve taşıyıcı proteinleri içermesi nedeniyle nispeten daha karmaşıktır (Patten ve Laws, 2015). Bakteriyel EPS'nin biyosentezinde yer

alan dört enzim grubu Çizelge 2.4'te yer almaktadır. HePs sentezi, Wzx/Wzy yoluna dayanmaktadır (Şekil 2.4). Burada polimerizasyon hariç diğer tüm işlemler sitoplazma içinde gerçekleşmektedir. Şeker taşınması, şeker nükleotit sentezi, tekrar eden birim sentezi ve sitoplazmada oluşan tekrar eden birimlerin polimerizasyonu, HeP'lerin sentezinin dört ana basamağını oluşturmaktadır. Substratların girişi, şekerlerin tipine bağlıdır ve aktif veya pasif taşıma veya bir fosfoenol piruvat-fosfotransferaz taşıma sistemi yoluyla gerçekleşmektedir (Badel ve diğerleri, 2011; Freitas ve diğerleri, 2011). Sitoplazmaya giren glikoz molekülü, hekzokinaz (Grup 1 enzimi) tarafından glikoz-6-fosfata fosforile edilmektedir ve daha sonra fosfoglukomutazın etkisiyle glikoz-1-fosfata dönüştürülmektedir. Üridin-5'-di-fosfat (UDP)-glikoz pirofosforilaz (Grup 2'ye ait enzim), glikoz-1-fosfatın UDP-glikoza (EPS sentezindeki anahtar molekül) dönüşümünü katalize etmektedir (Laura ve diğerleri, 2012). Bakteriyel EPS biyosentezi için doğrudan öncüler, hücre içi olarak merkezi karbon metabolizmasının ara maddelerinden oluşturulmaktadır. Tekrar eden birimlerin çoğunun biyosentezi için öncüler ve donör monomerler, nükleosit di-fosfat şekerler, nükleosit di-fosfat şeker asitleri ve nükleosit difosfat şeker türevleri gibi şeker nükleotitleridir (Barreto ve diğerleri, 2005). Wzx/Wzy'ye bağımlı yolakta, bireysel tekrar eden birimler olarak kabul edilen bu şeker nükleotidleri, glikosil transferazlar (Grup 3 enzimi) tarafından iç zarda bulunan undekaprenil di-fosfat ankoruna (C55 lipid taşıyıcı) bağlanır ve bir Wzx proteini tarafından sitoplazmik zar boyunca yer değiştirmektedir (Rehm ve diğerleri, 2010). Taşıyıcı lipid, izoprenoid alkol olarak tanımlanır ve terminal alkol grubu, bir pirofosfat köprüsü yoluyla bir monosakkarit kalıntısına bağlanır. Bu aşamada polisakkaritler, asetilasyon, sülfasyon ve metilasyon gibi farklı enzimatik aktivitelerle modifiye edilebilmektedir. Böylece, bu modifiye edilmiş polimerler, bakteri hücresinin dış yüzeyinde ya kapsüler polisakkaritler olarak ya da flippaz, permeaz veya ABC taşıyıcıları gibi grup dört hidrofobik enzimlerin etkisiyle balçık tabakası (EPS) olarak salınmaktadır (De Vuyst ve diğerleri, 2001).

Çizelge 2.4. EPS'nin biyosentetik yolunda yer alan enzimler (Angelin ve Kavitha, 2020)

Grup	Enzim	Faaliyet	Referans
1	Heksokinaz	Hücre içi enzimler glikozu glikoz-6-fosfata dönüştürür	Torino ve diğerleri, 2015
2	Üridin-5'difosfat (UDP)-glikozpirofosforilaz	Glikoz-1-fosfatın UDP-glikoza (EPS sentezinin anahtar molekülü)dönüşümünü katalize eder	Cuthbertson vediğerleri, 2009
3	Glikosil transferazlar (GTF'ler)	Şeker nükleotitlerini bir glikosiltaşıyıcı lipide aktarır	Zannini ve diğerleri,2016
4	Wzx proteini (flippaz), permeazve ABC taşıyıcıları	Makromoleküllerin polimerizasyonunda yer alır vehücre zarı ile hücre duvarının dışında yer alır. Sitoplazmik zar boyunca UDP- C55 lipid taşıyıcısına bağlı tekrar eden bireysel birimlerin yerini değiştirir	Islam ve Lam, 2014



Şekil 2.4. HePS biyosentez yolu. EPS: ekzopolisakkaritler; HePS: heteropolisakkaritler; P: fosfat PEP-PTS: fosfoenolpiruvat-fosfotransferaz sistemi; UDP: üridin difosfat (Guerin ve diğerleri, 2020'den uyarlanmıştır)

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Cihaz ve ekipmanlar

Çalışma süresince kullanılan cihazlar: Manyetik Karıştırıcı (Velp), Soğutmalı Santrifüj (Sigma 2-16KC), -80 ve -30 °C Derin Dondurucu (Sanyo), Otoklav (Tomy-Sx 700E), Hassas Terazi (0,1-10 Mg), Çeker Ocak (Vortice), Santrifüj (Nüve), Otomatik Pipetler (Ependorf), Mini Santrifüj (Selecta), McFarland Densitometre (Biosan Den-1), Buzdolabı (Beko), Etüv (Raypa/Incuterm/Dıgıt), Spektrofotometre (Digilab Hitachi U-1800), CO_2'li etüv (Sanyo), Su Banyosu (GFL), Vorteks (Dragonlab), pH Metre (Jenco 6173), Işık Mikroskobu (Leica), Distile Su Cihazı (Mes/MES06), PCR Cihazı (KyraTech) ve RT-PCR Cihazı (Applied Biosystem)'dır.

3.1.2. Mikroorganizmalar

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı Stok Kültür Koleksiyonunda bulunan, 16S rRNA analizi ile moleküler olarak tanımlanmış ve prebiyotik özellikleri belirlenmiş ve ekzopolisakkarit sentezi yaptığı Çelik (2018) tarafından gösterilmiş iki farklı tür *Lactobacillus* suşu (*Ligilactobacillus salivarius* KC27L ve *Limosilactobacillus reuteri* KC21L) kullanılmıştır.

3.1.3. Besiyerleri ve çözeltiler

L. salivarius KC27L ve *L. reuteri* KC21L bakteri kültürünün geliştirilmesinde MRS (Man Rogosa and Sharp, pH 6,5±0,2, Merck, Darmstadt, Germany) besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri içeriği Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Çizelgede yer alan besiyeri içerikleri belirtilen miktarlarda terazide tartılmış, gerekli miktarda distile su ile manyetik karıştırıcıda homojen hale gelinceye kadar karıştırılmış ve son hacim 1000 mL olmak üzere pH 6,5'e ayarlanmıştır. Besiyeri otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edilerek hazırlanmıştır. MRS Agar besiyeri hazırlamak için ise pH ayarı yapıldıktan sonra 1000 mL besiyeri içerisinde 15 g Agar (Merck) olacak şekilde tartılmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dk. steril edilmiştir. Oda koşullarında sıcaklık yaklaşık 50 °C'ye düştüğünde petri

kaplarına aktarılmıştır. Agarlar donduktan sonra 37 °C'lik etüve kaldırılıp 1 gece etüvde bekletildikten sonra kontaminasyon kontrolü yapılmış ve petriler +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.1. De Man Rogosa Sharpe (MRS) besi yeri içeriği

Maddeler	Miktar (g/L)
Pepton	10
Yeast ekstrakt	5
Beef ekstrakt	10
Glukoz	20
Dipotasyum hidrojen fosfat	2
Sodyum asetat.$3H_2O$	5
Magnezyum sülfat.$7H_2O$	0,2
Amonyum sitrat	2
Mangenez II sülfat.$4H_2O$	0,05
Tween 80	1,08 mL

L. salivarius KC27L ve L. *reuteri* KC21L suşlarında farklı besiyeri ve ortam koşulları Çizelge 3.2. ve 3.3'te gösterilmektedir. Bu çalışmada hazırlanan farklı besiyerlerindeki karbon ve azot kaynaklarının miktarları, kontrol besi ortamındaki (MRS) miktar ile aynı hazırlanmıştır. *L. salivarus* KC27L ve *L. reuteri* KC21L suşlarının EPS üretimine farklı karbon kaynaklarının etkisinin belirlenmesi amacıyla, Çizelge 3.1'de verilen MRS besi ortamında %2 oranında bulunan glukoz çıkarılarak aynı oranda laktoz ve sükroz konulmuştur. Suşların EPS üretimine farklı azot kaynaklarının etkisinin belirlenmesi amacıyla, MRS besi ortamında bulunan azot kaynaklarının hepsi (pepton, yeast extract, beef extract) çıkarılarak besiyerine %2 oranında ayrı ayrı tripton, pepton, yeast extract ve beef extract eklenmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan farklı karbon ve azot kaynakları

Besiyeri Değişimi	Konsantrasyon	Kaynak
Karbon Kaynağı	%2	Glukoz Galaktoz Sükroz
Azot Kaynağı	%2	Yeast Extract Beef Extract Tripton Pepton

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan farklı ortam koşulları

Ortam Koşullarının Değişimi	Değer
pH	4,5 5,0 5,5 6,0 6,5 7,0
İnkübasyon Süresi (saat)	18 24 48
CO_2 Miktarı (%)	5

EPS miktar tayini sonucunda suşlar arasında en fazla EPS üretiminin olduğu parametreler belirlenmiştir. Tek tek denenen bu parametrelerin arasından en fazla EPS sentezini sağlayan fiziksel şartlar seçilerek, kombine şartlar oluşturulmuştur. Bu kapsamda KC27L suşu için fiziksel parametreler; besiyerindeki karbon kaynağı için sükroz, azot kaynağı için beef extract olarak belirlenmiştir. KC21L suşu için ise besiyerindeki karbon kaynağı sükroz ve azot kaynağı ise pepton olarak belirlenmiştir. İnkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı ve besiyeri pH değeri için yapılan deneylerde ise hem *L. salivarius* KC27L suşu hem de *L. reuteri* KC21L suşu için sırasıyla 18 saat, 35^{o}C ve pH 4,5 değeri en fazla EPS sentezine sebep olan fiziksel şartlar olarak belirlenmiştir. Çalışmada kombine denemelerin EPS üretimine etkisi belirlenmesi için Çizelge 3.5'de verilen MRS besi ortamı oluşturulmuştur. Kontrol besi ortamı olarak ise Çizelge 3.1'deki içerikler kullanılarak pH değeri 6,5 olarak ayarlanmış ve bakteri kültürleri, 37^{o}C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.4. Her iki suş için kombine denemelerde kullanılan besiyeri içeriği

L. salivarius KC27L		*L. reuteri* KC21L	
Maddeler	Miktar (g/L)	Maddeler	Miktar (g/L)
Beef ekstrat	20,0 g	Pepton	20,0 g
Sükroz	20,0 g	Sükroz	20,0 g
Dipotasyum fosfat	2,0 g	Dipotasyum fosfat	2,0 g
Sodyum asetat	5,0 g	Sodyum asetat	5,0 g
Magnezyum sülfat	0,2 g	Magnezyum sülfat	0,2 g
Tween 80	1,08 L	Tween 80	1,08 L
Amonyum sitrat	2 g	Amonyum sitrat	2 g
Manganez sülfat	0,05 g	Manganez sülfat	0,05 g

Kombine denemelerin sonucuna istinaden, besi ortamı içindeki karbon ve azot kaynaklarının ve diğer fiziksel parametrelerin birbirine etkisini daha detaylı bir şekilde belirleyebilmek amacıyla suşlar üzerinde farklı kombine denemeler de yapılmıştır.

İlk kombine deneme deneylerinin sonucunda elde edilen verilere göre EPS üretimini arttıran fiziksel koşulların birlikte denenmesi, suşların EPS üretimini daha fazla arttırmıştır. Bu sonuç doğrultusunda, fiziksel koşulların birbirlerine ve EPS üretimine etkilerini araştırmak amacıyla ikinci kombine denemeleri yapılmıştır:

- ✓ KC27L ve KC21L suşları için; karbon kaynağı sükroz ve pH değeri 4,5, 5,5 ve 6,5 olan besiyerlerinde her pH değeri için ayrı ayrı 35^{o}C, 37^{o}C, 40^{o}C ve 42^{o}C'de 24 saat boyunca inkübe edilerek EPS üretimleri belirlenmiştir.
- ✓ KC27L ve KC21L suşları için; karbon kaynağı glukoz (MRS) ve pH değeri 4,5, 5,5 ve 6,5 olan besiyerlerinde her pH değeri için ayrı ayrı 35^{o}C, 37^{o}C, 40^{o}C ve 42^{o}C'de 18 saat boyunca inkübe edilerek EPS üretimleri belirlenmiştir.
- ✓ KC27L suşu için; azot kaynağı beef extract ve pH değeri 4,5, 5,5 ve 6,5 olan besiyerlerinde her pH değeri için ayrı ayrı 35^{o}C, 37^{o}C, 40^{o}C ve 42^{o}C'de 18 saat boyunca inkübe edilerek EPS üretimleri belirlenmiştir.
- ✓ KC21L suşları için; azot kaynağı pepton ve pH değeri 4,5, 5,5 ve 6,5 olan besiyerlerinde her pH değeri için ayrı ayrı 35^{o}C, 37^{o}C, 40^{o}C ve 42^{o}C'de 24 saat boyunca inkübe edilerek EPS üretimleri belirlenmiştir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Kombine denemelere ait fiziksel şartlar

Bakteri	Karbon Kaynağı	pH	İnkübasyon sıcaklığı	İnkübasyon zamanı	Azot Kaynağı
KC27L	Glukoz (MRS)	4,5 5,5 6,5	35^{o}C, 37^{o}C, 40^{o}C, 42^{o}C 35^{o}C, 37^{o}C, 40^{o}C, 42^{o}C 35^{o}C, 37^{o}C, 40^{o}C, 42^{o}C	18 saat	Beef extract
KC21L	Glukoz (MRS)	4,5 5,5 6,5	35^{o}C, 37^{o}C, 40^{o}C, 42^{o}C 35^{o}C, 37^{o}C, 40^{o}C, 42^{o}C 35^{o}C, 37^{o}C, 40^{o}C, 42^{o}C	24 saat	Pepton
KC27L KC21L	Sükroz	4,5 5,5 6,5	35^{o}C, 37^{o}C, 40^{o}C, 42^{o}C 35^{o}C, 37^{o}C, 40^{o}C, 42^{o}C 35^{o}C, 37^{o}C, 40^{o}C, 42^{o}C	24 saat	-
KC27L KC21L	Glukoz (MRS)	4,5 5,5 6,5	35^{o}C, 37^{o}C, 40^{o}C, 42^{o}C 35^{o}C, 37^{o}C, 40^{o}C, 42^{o}C 35^{o}C, 37^{o}C, 40^{o}C, 42^{o}C	18 saat	-

Böylece karbon kaynağı, azot kaynağı, inkübasyon sıcaklıkları, inkübasyon süreleri ve pH değerlerinin birbirleri arasındaki etkileşiminin EPS üretimine etkisi araştırılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Aktifleştirilme

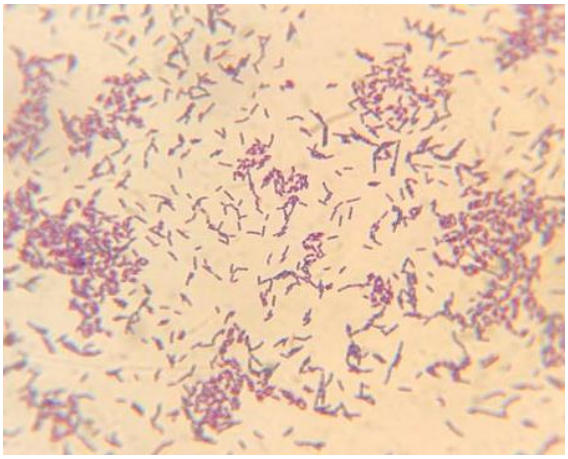
Bakteri kültür stokları MRS agar ve broth besiyerlerinde geliştirilmiştir. MRS broth besiyerine ekim, bakteri kültürlerinin inokülasyon miktarları %2 olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu için 37 °C'de 24 saat boyunca geliştirilen kültürler en az iki kez aktifleştirildikten sonra diğer çalışmalarda kullanılmıştır.

3.2.2. Muhafaza

Bakteri kültürleri ard arda akftifleştirildikten sonra Gram boyamaları yapılmıştır. Böylece bakterilerde oluşabilecek herhangi bir kontaminasyonun önüne geçilmiştir. Bakteri kültürleri gliserol ve uygun besiyeri içinde stok olarak -80 °C'lik dondurucu içerisinde uzun süreli muhafaza edilmiştir.

Gliserol ile kültür stoklama

Bakteri kültürlerinin uzun süre boyunca muhafaza edilmesi için kullanılacak gliserol ve cryo tüpler otoklav içerisinde steril edilmiştir. Sonra stoklanacak bakteri kültürleri ve steril gliserol 1:1 oranda olacak şekilde steril cryo tüplere aktarılmıştır. -80 °C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Stokların kontaminasyonunun engellenmesi ve yapılacak deneylerin doğruluğu açısından 3-4 ayda bir stoklar yenilenmiş ve ışık mikroskobunda Gram boyama ile konrolleri sağlanmıştır (Strasser ve diğerleri, 2009) (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *L. salivarius* KC27L suşunun Gram boyama sonucunda ışık mikroskobundaki görüntüsü (X100)

3.2.3. Bakterilerin optik yoğunluklarının ayarlanması

Bu tez kapsamında yapılan çalışmaların standart şekilde gerçekleştirilebilmesi amacıyla, çalışmada kullanılan mikroorganizmaların 10^8 kob/mL canlılık oranını verdiği optik yoğunluklar belirlenmiştir. Öncelikle mikroorganizmalar McFarland densitometre cihazında farklı optik yoğunluklara ayarlanmış ve sonrasında MRS katı besiyerlerine alınarak canlılık sayımları yapılmıştır. Her mikroorganizma için 10^8 kob/mL canlılık oranını veren optik yoğunluklar belirlenmiş ve bu çalışmada uygulanan yöntem de çalışmamızda belirlenen standart değerler üzerinden açıklanarak aşağıda sunulmuştur.

Mikroorganizmaların optik yoğunluklarının ayarlanması

Çalışmada kullanılan suşlar ilk aşamada 5 mL besiyerinde, ikinci aşamada 8 mL besiyerinde inokülasyon miktarı %2 olacak şekilde ard arda 2 kez aktifleştirilmiştir. Sonrasında kültürler, 3000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve pellet 5 mL steril serum fizyolojik (SF-%0,9 NaCl) ile çözülerek tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılmış SF ile 2 kez yıkama işlemi gerçekleştirilerek pellet elde edilmiştir. Optik yoğunluğun ayarlanmasında mikroorganizmaların için McFarland densitometre cihazı kullanılmıştır. Santrifüj ile çöktürülmüş bakteri pelleti az hacimlerde steril SF içine karıştırılarak mikroorganizma yoğunluğu McFarland 7'ye ayarlanmıştır. Bu şekilde optik yoğunlukları ayarlanan mikroorganizmaların canlı hücre sayımının yapılabilmesi için katı besi ortamlarına ekilmiştir.

Canlı hücre sayımı ve hesaplaması

Optik yoğunlukları McFarland 7 olarak ayarlanmış olan bakteri kültürleri, seri dilüsyon yöntemiyle dilüe edilmiştir. Elde edilen altı farklı dilüsyonun her birinden 100 µL alınarak, MRS katı besi yerine drigalski ile yayma ekim yapılmıştır. Çalışmaların doğruluğu için 3 paralelli olacak şekilde yapılmıştır. 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılan petri kutularında oluşan koloniler sayılmış ve canlı bakteri sayıları belirlenmiştir (Gürgün ve Halkman, 1990: 7-20). Her bakteri için 10^8 kob/mL canlı yoğunluğunu veren dalga boyu bu şekilde belirlenmiştir. Canlı bakteri sayıları hesaplanırken aşağıdaki formül kullanılmıştır;

$$\text{kob/mL} = \frac{\text{Ortalama Koloni sayısı} \times \text{Dilüsyon faktörü})}{\text{Petri kutularına aktarılan inokulum miktarı (0,1 mL)}}$$

3.2.4. EPS

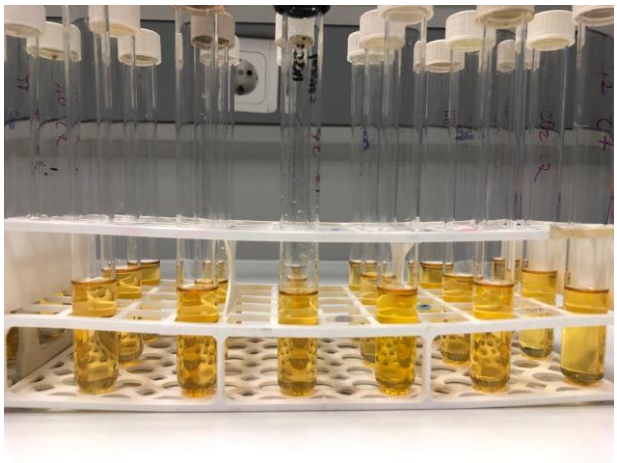
Bakterilerin EPS üretim miktarları Marshall ve Rawson (1999) ve Yi ve diğerleri (2008)'nin kullandığı metotlarda bazı değişiklikler yapılarak aşağıda verilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

Ard arda iki kez aktifleştirilen suşların optik yoğunlukları McFarland densitometre cihazında 7'ye ayarlanarak, analiz edilecek fiziksel parametrelere göre hazırlanan MRS ve kombine besi ortamlarına %2 oranında inoküle edilmiştir. Kontrol grubu örnekleri 37°C'de 24 saat; analiz edilecek örnekler ise Çizelge 3.4'te gösterilen şartlara bağlı olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonlanmasının ardından bakteri kültürleri santrifüj edilerek EPS içeren süpernatantlardan 1'er mL ependorf tüplerine alınarak 95°C'de 10- 15 dk. sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Ardından oda sıcaklığına getirilmiş ve üzerlerine %85'lik (v/v) trikloroasetik asit (TCA, Sigma) çözeltisinden 1,7 µL eklenerek, yarım saat boyunca protein içeren maddelerin çökmesi sağlanmıştır. Sonrasında +4°C'de 13000 rpm'de 25 dk. boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda ependorfların dibinde kalan protein içeren pellet atılarak, süpernatant yeni ependorf tüplerine aktarılmıştır. Süpernatantların üzerine 1(süpernatant):3(alkol) oranında olmak üzere soğuk ve %96'lık etanol eklenmiştir. Örneklerin içerdikleri EPS'nin presipite olmasını sağlamak amacıyla +4°C'de 13000 rpm'de 25 dk. santrifüj edilmiş ve çöken EPS'nin üzerindeki etanol pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Pelletin üzerine 1 mL %96'lık etanol eklenmiş, tekrar +4°C'de 13000

rpm'de 25 dk. santrifüj edilmiş ve etanol örneklerden uzaklaştırılmıştır. Bu işlemin 2 kez yapılmasıyla EPS'nin presipite olması sağlanmıştır. EPS içeren pellette bulunan karbonhidratın tayin edilebilmesi için, fenol-sülfirik asit yöntemine hazırlık olarak, örnekler 1 mL distile suda çözüldükten sonra, 490 nm dalga boyunda okuma (OD mg/L) işlemi ile EPS miktarı belirlenmiştir.

3.2.5. EPS miktarının hesaplanması

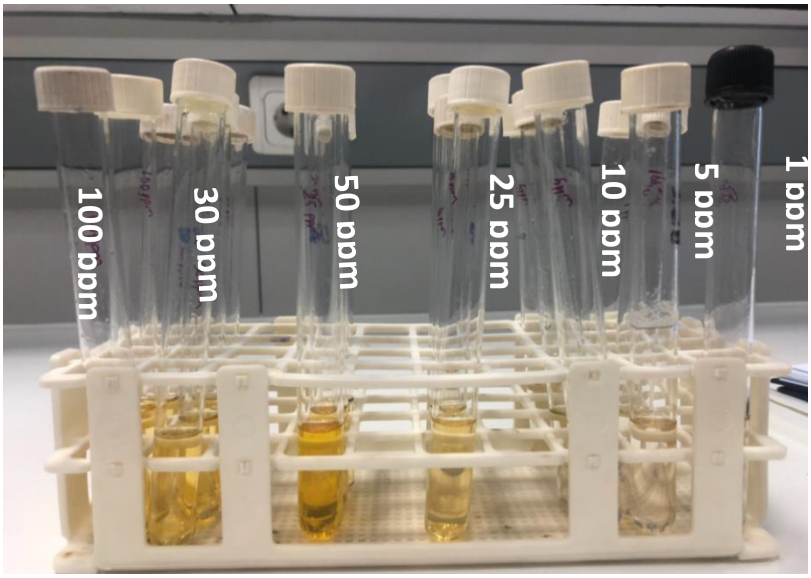
Toplam karbonhdidrat tayini için DuBois ve diğerleri (1956)'in fenol-sülfürik asit metodu kullanılmıştır. Bir mL distile suda çözülen örneklere çeker ocak altında, cam tüplere 0,5 mL fenol (Sigma) ve 5 mL sülfürik asit (Merck) eklendikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiş ve vortekslenerek karışım homojen hale getirilmiştir (Şekil 3.2). Ardından cam tüpler 37°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübe edilen örnekler uygun spektrofotometrik ölçüm için mikroküvetlerine alınarak 490 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Çalışmada, kör olarak bir mL saf su kullanılmıştır. Örneklerin EPS miktarları, çıkarılan glukoz standart eğrisi grafiğine göre, mg/L olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.2. EPS içeren örneklere fenol-sülfirik asit muamelesi

Glukoz standardının hazırlanması

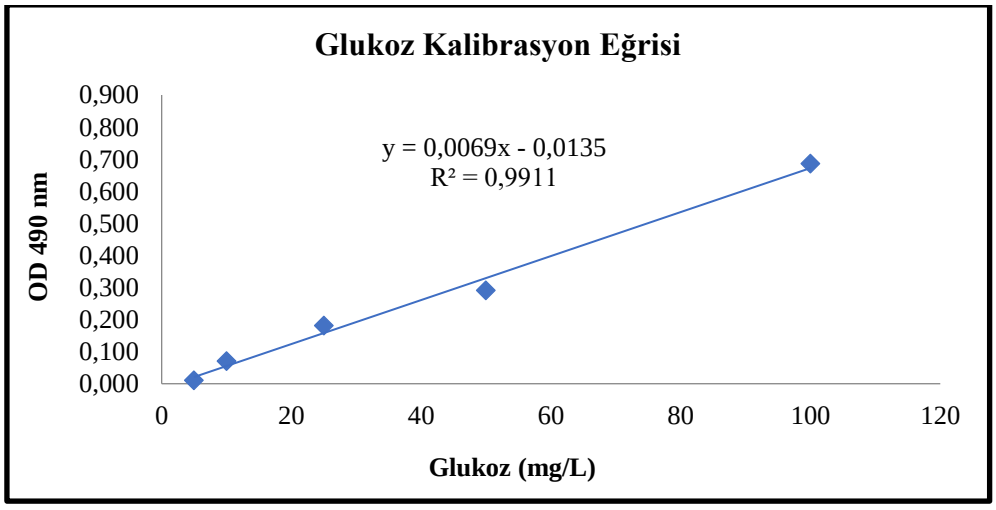
Suşların sentezledikleri EPS miktarının hesaplanabilmesi için glukoz standardı hazırlanmıştır. Bu standardın hazırlanmasında 1-100 ppm (milyonda bir birim) arasında değişen konsantrasyonlarda glukoz çözeltileri kullanılmıştır. Glukoz çözeltileri cam tüplere alınmış ve yukarıda belirtilen metoda göre fenol-sülfürik asit uygulaması yapılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan glukoz standardı

Fenol-sülfürik asit muamelesi uygulanan tüpler oda sıcaklığında 10 dk. bekletildikten sonra, vorteks yardımıyla homojen hale getirilmiş ve 37°C'lik etüv içerisinde 20 dk. inkübe edilmiştir. Sonrasında uygun mikroküvetlere alınarak spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüş ve bu değerlere göre grafik oluşturularak grafikte oluşan eğri yardımıyla konsantrasyon hesaplamak amacıyla kullanılacak formül elde edilmiştir (Şekil 3.4).

Elde edilen formül (y = 0,0069x – 0,0135) kullanılarak *L. salivarius* KC27L ve *L. reuteri* KC21L bakterileri tarafından farklı fiziksel şartlarda ve kombine besi yerlerinde üretilen EPS miktarları mg/L cinsinden hesaplanmıştır.



Şekil 3.4. Glukoz standart eğrisi

3.2.6. Protein tayini

Farklı ortamlarda bakteriler tarafından üretilen EPS'lerdeki protein konsantrasyonu, Bradford Reagent Kit (Amresco) kullanılarak belirlenmiştir. Bovine serum albumin (BSA) standart olarak kullanılmıştır. Bradford belirteci (ayıraç, reagent) 1:4 oranında seyreltilmiştir (1 ayırac, 4 dd su). Daha sonra Whatman filtre kâğıdı ile filtre edilerek partiküllerden arındırılmıştır. BSA'dan 250, 500, 750 ve 1000µg/mL'lik arasında değişen konsantrasyonlarda standartlar hazırlanmıştır. Standart temiz tüpe 100 µL örnek ve 4,9 mL seyreltilmiş ayıraç eklenerek vorteks ile iyice karıştırılmıştır (kör için ddsu ya da proteinin çözüldüğü tampon kullanılmıştır). 5 dakika süresince oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından spektrofotometrede 595 nm'de 3 tekrarlı olacak şekilde ölçümler yapılmıştır.

3.2.7. EPS üretiminden sorumlu gen ifadelerinin kantitatif Real Time-PZR ile belirlenmesi

LAB'de EPS biyosentezinde görevli olan ve yüksek oranda korunan genlerin (*glukoziltransferaz, epsA, epsC, epsD, flippaz* ve *L. salivarius* KC27L için *oligosakkarit flippaz* ve *L. reuteri* KC21L için *sugar transferaz*) ifadeleri kantitatif gerçek zamanlı-PZR (qRT-PCR) ile belirlenmiştir.

Total RNA izolasyonu

15 mL'lik falkon tüplerinde toplam hacim 5 mL olacak şekilde *L. salivarius* KC27L suşu; %2 sükroz ve %2 beef ekstract içeren MRS besiyeri (pH 4,5), *L. reuteri* KC21L suşu ise; %2 sükroz ve %2 pepton içeren MRS besiyeri (pH 4,5) hazırlanmış ve 18 saat 35°C'de inkübasyonda bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 4 ºC'de 16.000 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemini takiben elde edilen hücreler RNA izolasyonunda kullanılmıştır. RNA izole için, ticari olarak temin edilen FastPure ® Cell/Tissue Total RNA Isolation Kiti (Vazyme) kullanılmış ve çalışma kit protokolüne göre yapılmıştır. Hücreler, 500 µL Buffer RL ile çözdürülmüştür. Buffer RL ve örnek karışımı FastPure gDNA-Filter Column II'e alınmış ve 13.400 rpm'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Kolonda DNA bulunduğu için kolon atılmış ve süpernatantın 0,5 katı kadar etanol eklenerek pipetlenmiştir. Karışım FastPure RNA Column III'e alınarak 13.400 rpm'de 30 saniye santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Kolona 700 µL Buffer RW1 eklenmiş ve 13.400 rpm'de 30 saniye santrifüj edilenerek süpernatant atılmıştır. Kolona 700 µL Buffer RW2 eklenmiş ve 13.400

rpm'de 30 saniye santrifüjlenerek süpernatant atılmıştır. Kolona 500 µL Buffer RW2 eklenerek iki dakika santrifüjden (13.400 rpm) sonra süpernatant atılmıştır. Bir kez tüp boş şekilde santrifüj edilmiştir. Kolon alınıp RNase-free CollectionTube'e aktarılmıştır. Kolona 40 µL RNase-free ddH_2O eklenmiş ve bir dk beklenmiştir. 13.400 rpm'de bir dakika santrifüjden sonra kolon atılmıştır ve RNA elde edilmiştir. Saflık ve miktar (ng/µL) tayini spektrofotometrik okulamalarda (Thermo Scientific, Nanodrop 200 spectrophotometer) 0,2 ng olarak belirlenen RNA'lar kalıp olarak kullanılmıştır. RNA'lar çalışılana kadar -80 ℃'de muhafaza edilmiştir.

cDNA (komplementer DNA) sentezi

Komplementer DNA (cDNA) sentezi, ticari olarak temin edilen smART First Strand cDNA Synthesis Kiti (EURx) ile kit protokolüne göre iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. İzolasyonun ilk aşamasında Çizelge 4.7'de verilen malzemeler PCR tüpünde birleştirildikten sonra (toplam hacim 20 µL olacak) 5 dk boyunca 65 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübe edilen PCR ürününe Çizelge 3.8'de yer alan malzemeler de eklenerek PCR cihazına konulmuştur. 50°C'de 45 dk ve 85°C'de 5 dk PCR koşulları kullanılmıştır.

Çizelge 3.6. cDNA izolasyonunun birinci aşamasında kullanılan kit bileşenleri

Bileşenler	KC27L		KC21L	
	Kontrol	Kombine	Kontrol	Kombine
RNA	3 µL	6 µL	7 µL	4 µL
Oligo DT	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
10 mM d NTP mix	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
RNAase free su	7,5 µL	4,5 µL	3,5 µL	5,5 µL

Çizelge 3.7. cDNA izolasyonunun ikinci aşamasında kullanılan kit bileşenleri

İ Bileşenler	KC27L		KC21L	
	Kontrol	Kombine	Kontrol	Kombine
5x c DNA Buffer	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL
DTT	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
RNAase inhibitör	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
sm ART	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL

cDNA sentezinin yapılmasının ardından kontrol grubu ve en fazla EPS üreten kombine koşullar her iki suş için karşılaştırılmak üzere denenmiştir. Çizelge 3.9'da verilen bileşenlerden her örnek için tüplere 18 µL mix dağıtılıp 2 µL cDNA eklenmiştir. Deneylerde, elde edilen cDNA'lar, HOT FIREpol Eva Green qPCR Supermix 5X (Solis

BIODYNE) ve EPS genleri ile referans genlere ait primerler kullanılmıştır. Her iki tür için bir kontrol grubu, bir kombine deneme grubu ve bir negatif kontrol kullanılmış olup reaksiyon iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. PCR döngüleri ise 95ºC'de 12 dk'da 1 döngü, 94ºC'de 20 dk. denatürasyon, 59ºC'de 2dk. primer bağlanması ve 72ºC'de 3 dk. zincir uzatımı olmak üzere 40 döngüden oluşmaktadır. Eva Green boyası aracılığıyla Ct değerleri ölçülmüştür. Kontrol grubu ve en fazla EPS üreten fiziksel koşullarda geliştirilen bakterilerde gen ekspresyonlarındaki değişim kantitatif olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.8. cDNA sentezi için kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	1 RXN (µL)
Forward primer (10 pmol)	0,8
Reverse primer (10 pmol)	0,8
HOT FIREpol Eva Green qPCR Supermix (5x)	4
cDNA	2
su	12,4
Toplam hacim	20

Çalışma sonucunda amplifikasyon eğrilerine ait CT değerleri karşılaştırılarak, hedef genlerin mRNA transkripsiyon düzeylerindeki nisbi değişiklikler 2- ΔΔCt ile hesaplanmıştır (Pfaffl ve Hageleit, 2001). Hesaplama yöntemi aşağıda formül olarak belirtilmiştir.

ΔΔCt = (CTHedef gen – CT Housekeeping gen) deney grubu – (CTHedef gen – CT Housekeeping gen) kontrol grubu

2- ΔΔCt değerinin 1'den büyük olması gen ifadesinin arttığını, küçük olması ise gen ifadesinin azaldığını göstermektedir. Elde edilen sonuçlarda, gruplar arasındaki farklar relatif misli değişimler olarak gösterilmiştir.

Erime eğrisi (melting curve) analizi

qRT-PCR sonucunda, amplifikasyonu yapılan bölgenin hedef bölge olup olmadığını belirleyebilmek için "melting curve" (erime eğrisi) analizleri yapılmıştır. Yüksek Çözünürlüklü Erime (High Resolution Melting (HRM) yöntemi 1997 yılında Real Time PCR yönteminin kullanıma girmesiyle geliştirilmiş bir yöntemdir. Kullanılan problar veya floresan özellikteki boyalar sayesinde çift zincirli DNA'nın oluşumu eş zamanlı olarak

izlenmektedir. Çift zincirli DNA örnekleri, sıcaklığın artmasıyla ayrışır, boya salınır ve floresan azalır. Bu floresandaki azalış, DNA'nın %50'sinin denatüre (Tm) olmasıyla giderek daha hızla artar. Floresans ölçümü, erime eğrisi (melt curve) olarak kaydedilmektedir ve bu eğriler "denatürasyon eğrileri" olarak da ifade edilmektedir. Bu veri, belli zaman aralıklarında, sıcaklık artışına karşılık floresans sinyal şiddetindeki değişim olarak tanımlanmaktadır. Bu erime eğrileri 65 °C'den 95 °C'ye kadar olan her 0,5 °C'lik sıcaklık artışlarını kapsamaktadır (Ririe, Rasmussen ve Wittwer, 1997).

qRT-PCR primerleri tasarlanırken primer uzunluğunun 18-24 bp aralığında olmasına, primerlerin Tm değerlerinin 55 ºC ve 60 ºC' aralığında olmasına, primerler arasındaki Tm değerleri farklarının çok fazla olmamasına ve primerlerde nükleotitlerin tekrar etmemesine dikkat edilmiştir. *L. salivarius* ve *L. reuteri* türleri için EPS genleri hakkındaki bilgiler literatürlerde yeteri kadar işlenmemiştir. Ancak kaynak araştırması bölümünde elde edilen bilgiler ile yapılan araştırmalar sonucunda EPS sentezinden sorumlu bazı genlerin dizilimine ulaşılmıştır. Primerler tasarlanırken Primer3plus (sourceforge.net/projects/primer3) programı ve NCBI primer blast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) programı kullanılmıştır. Çizelge 3.9'de EPS üretiminden sorumlu genler ve 16S rRNA genlerine ait primerler, primerlerin sekansı, uzunlukları, Tm değerleri ve bu gen bölgelerine ait primerlerin bağlandığı bölgelerin uzunlukları verilmiştir.

Çizelge 3.9. Çalışmada kullanılan genler ve primerlerin dizileri, uzunlukları, Tm değerleri ve primerlerin bağlandığı bölgelerin uzunluğu (bp)

L. salivarius KC27L				
Gen ismi	Sekans (5'→ 3')	Uzunluk (bp)	Tm (°C)	Primerlerin bağlandığı bölgelerin uzunluğu (bp)
L. salivarius KC27L için				
Glukoziltransferaz	F: CGAAGATGGAACTGTTGCGT R: AGGCCCAATATCTGTTGCTCT	20 21	58 59	172
epsA	F: TGTTTCACTTCCGCGAGATGA R: AAGCCGCCCATGTTAACTGT	21 20	59 58	171
epsC	F: GGCACAACAGGCTGATTTACA R: GCCACATCTACTGCTACATATGC	21 23	59 63	219
epsD	F: GCTGGTCCTGTCCCTCCTAA R: CTACAGCTTGACGGACACCC	20 20	63 63	217
Flippaz	F: TATGGTCCTGGTTTTGGCCC R: TGACAACACGGTTGCCCATA	20 20	60 58	228
Oligosakkarit flippaz	F: GGCTTTGTATACTACCCCAGCA R: TTCTCGTGCCGCTTCTTCAT	22 20	62 58	190
16S rRNA (Housekeeping)	F: ACAAAGTGACAGGTGGTGCA R: CGACTCGTTGTACCGTCCAT	20 20	58 60	222
L. reuteri KC21L için				
Glukoziltransferaz 2	F: GCGCCCTGTTACCAATGTTG R: TCTTCGGCCGTGCAATTTTG	20 20	60 58	250
*epsA*2	F: ACCGGAACATCACCATCACC R: GCACCCGCGCTACTATACAT	20 20	60 60	165
*epsC*2	F: CGGTGACACGTGATGATCTTG R: CAGAGCCTGGTTGAACTTTTGG	21 22	61 62	168
*epsD*2	F: AACGTGGCAGTAGTATGGGC R: TAACTCTGCTGGATTGGGCG	20 20	60 60	231
*Flippaz*2	F: CTGGGACGGTTATGTTGCCA R: CCAGTCGGGCCATATTCACT	20 20	60 60	187
*Sugar transferaz*2	F: AGCTGAATATGGTGACCGGG R: TCAAAAGCAAGTGACGCCTC	20 20	60 58	150
16s rRNA (Housekeeping)	F: GGAGAAGAACGTGCGTGAGA R: ACCGCTACACATGGAGTTCC	20 20	60 60	249

4. BULGULAR

4.1. Farklı Fiziksel Koşullarda EPS Üretim Miktarı

L. salivarius KC27L ve *L. reuteri* KC21L bakterilerinin kontrol olarak kullanılan MRS besi ortamında (pH 6,5), 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları sırasıyla; 175 mg/L ve 151 mg/L olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Fiziksel şartların EPS üretim kapasitelerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemelerin sonuçları da Çizelge 4.1'de verilmiştir. KC27L ve KC21L suşlarında karbon kaynağı olarak sükroz (sırasıyla; 205 mg/L ve 419 mg/L) ve KC27L suşunda azot kaynağı olarak beef extract (291 mg/L) ve KC21L suşunda pepton (358 mg/L) kullanıldığında EPS üretim miktarının kontrol grubuna göre arttığı görülmüştür.

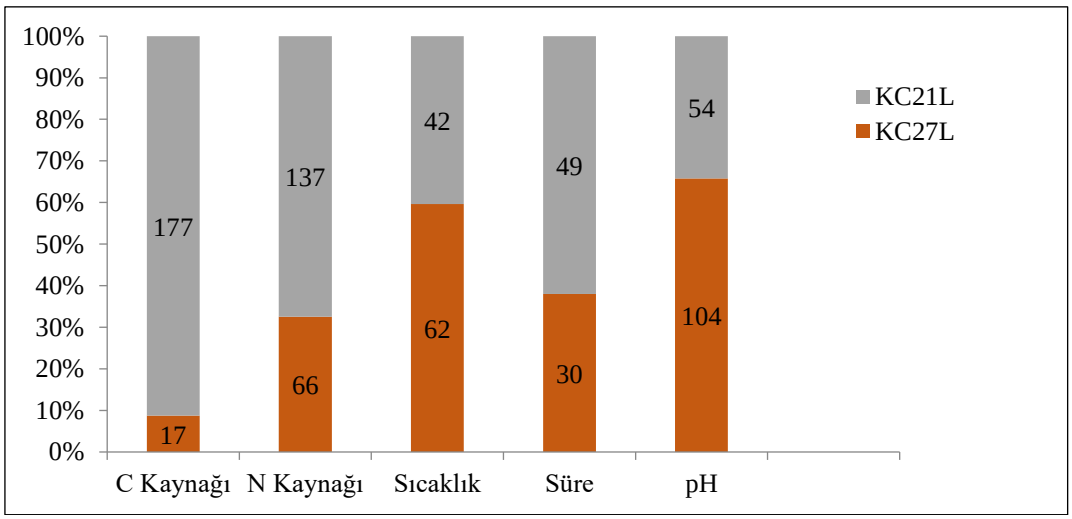
Çizelge 4.1. *L. salivarius* KC27L ve *L. reuteri* KC21L bakterilerinin farklı fiziksel koşullarda EPS üretim miktarları (mg/L)

Fiziksel Koşullar		Bakteriler	
		L. salivarius KC27L	*L. reuteri* KC21L
		EPS (mg/L)	EPS (mg/L)
Karbon Kaynağı (%2)	Glukoz	112±7	235±18
	Sükroz	205±33	419±18
	Galaktoz	145±12	115±5
	Kontrol	175±4	151±1
Azot Kaynağı (%2)	Yeast Ekstrakt	225±3	224±4
	Beef Ekstrakt	291±17	241±3
	Tripton	166±19	224±3
	Pepton	282±8	358±11
	Kontrol	175±4	151±1
pH	4,5	357±8	233±11
	5	342±7	202±10
	5,5	275±26	215±6
	6	225±1	138±1
	6,5 (Kontrol)	175±4	151±1
	7	211±5	140±22
İnkübasyon süresi (saat)	18	228±5	225±20
	24 (Kontrol)	175±4	151±1
	48	219±2	202±26
İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	35	285±1	215±23
	37 (Kontrol)	175±4	151±1
	40	275±2	183±4
	42	229±4	186±1
CO_2 Miktarı (%)	5	186±6	125±7

L. salivarius KC27L bakterisinin kontrol grubuna (175±1 mg/L) göre en yüksek EPS üretimini; karbon kaynağı olarak sükroz (205±33 mg/L), azot kaynağı olarak beef extract

(291±17 mg/L), pH 4,5 (357±8 mg/L), 18 saat (228±5 mg/L) ve 35°C sıcaklık (285±1 mg/L) inkübasyonda gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. *Limosilactobacillus reuteri* KC21L bakterisi ise karbon kaynağının sükroz (419±18 mg/L), azot kaynağının pepton (358±11 mg/L), pH 4,5 (233±11 mg/L), 18 saat (225±20 mg/L) ve 35°C'de (215±23 mg/L) inkübasyonda kontrol ortamına göre (151±1 mg/L) daha fazla EPS üretim kapasitesinin olduğu görülmüştür.

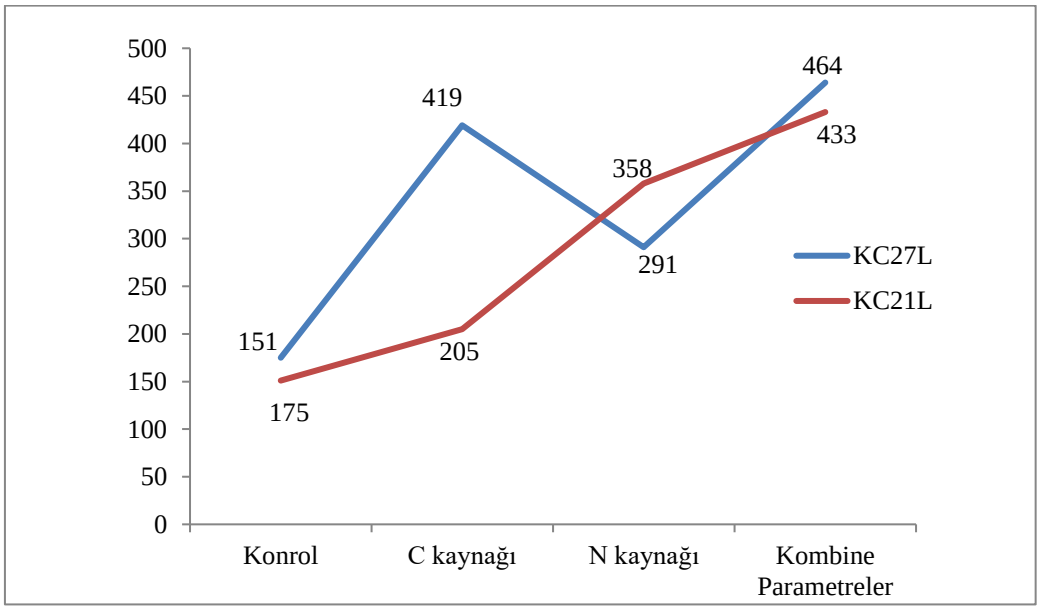
KC27L ve KC21L suşlarında EPS üretim miktarlarının arttırılması amacıyla denenmiş olan farklı fiziksel koşullar, kontrol gruplarına göre farklı oranlarda yüzde (%) artış sergilemişlerdir (Şekil 4.1) Bu karşılaştırma ile suşlar arasında EPS üretimindeki artış farklılığı ortaya konulmuştur. C kaynağı, KC27L suşunda, KC21L suşuna göre EPS üretimini daha fazla arttırmıştır. N kaynağı, sıcaklık ve pH değeri için de aynı durum söyleyebilirken, inkübasyon süresinde tam tersi bir durum söz konusudur. İnkübasyon süresi KC21L suşunun EPS üretimini daha çok etkilemiştir. C kaynağı, KC27L ve KC21L suşlarında EPS üretimini yakın oranlarda etkilerken, N kaynağı, 2 suşu oldukça farklı oranlarda etkilemiştir. Bu durumda, KC27L suşu için; EPS üretimini en fazla etkileyen fiziksel koşulların sırasıyla, N kaynağı, pH seviyesi, inkübasyon sıcaklığı, karbon kaynağı ve inkübasyon süresi olduğunu söyleyebiliriz. KC21L suşu içinse EPS sentezini en fazla etkileyen koşullar sırasıyla inkübasyon süresi, karbon kaynağı, inkübasyon sıcaklığı, pH ve N kaynağı olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1. Farklı fiziksel koşullarda kontrol gruplarına göre KC7L ve KC21L suşlarında EPS üretimindeki yüzde (%) artış

4.2. Kombine Fiziksel Koşullarda EPS Üretim Miktarı

Çalışmada ayrı ayrı denenen fiziksel koşulların (*L. salivarius* KC27L bakterisi için; sükroz, beef extract, pH 4,5, 18 saat ve 35°C inkübasyon ve *L. reuteri* KC21L için; sükroz, pepton, pH 4,5, 18 saat ve 35°C inkübasyon) EPS üretimini kontrol grubuna (*L. salivarius* KC27L için; 175±1 mg/L, *L. reuteri* KC21L için; 151±1 mg/L) göre arttırdığı tespit edilmiştir. Çalışmada ayrıca ayrı ayrı denenen fiziksel koşulların birarada (kombine) olarak kullanılmasının EPS üretim miktarına etkisi de belirlenmiştir. Kombine besiyerlerinde *L. salivarius* KC27L suşu 464±12 mg/L, *L. reuteri* KC21L suşu ise 433±3 mg/L miktarında EPS ürettiği görülmüştür. Kombine olarak hazırlanan besiyerinde geliştirilen her iki bakterideki EPS üretim miktarı, tek tek denenen koşullara ve kontrol grubuna göre daha fazla oranda artmıştır (Şekil 4.2). İki bakteri birbiri ile karşılaştırıldığında ise, KC21L suşunda EPS üretim miktarı yaklaşık 4 kat artarken, KC27L suşunda ise EPS üretim miktarı yaklaşık 5 kat artmıştır.



Şekil 4.2. *L. salivarius* KC27L ve *L. reuteri* KC21L suşlarında kontrol grubu, karbon ve azot kaynağı, kombine koşullarıda EPS miktarı (mg/L)

Kombine olarak denenen fiziksel koşulların birbirlerine olan etkilerini belirlemek amacıyla her iki bakteride en fazla EPS üretiminin elde edildiği azot/karbon kaynaklarına; inkübasyon sürelerinin, pH'ın ve inkübasyon sıcaklıklarının etkileri belirlenmiştir. Uygulanan farklı koşullarda bakterilerin EPS üretim miktarları Çizelge 4.2 ve 4.3'de ve EPS üretim miktarlarındaki yüzde artışlar ise Şekil 4.3-4.5'te gösterilmiştir.

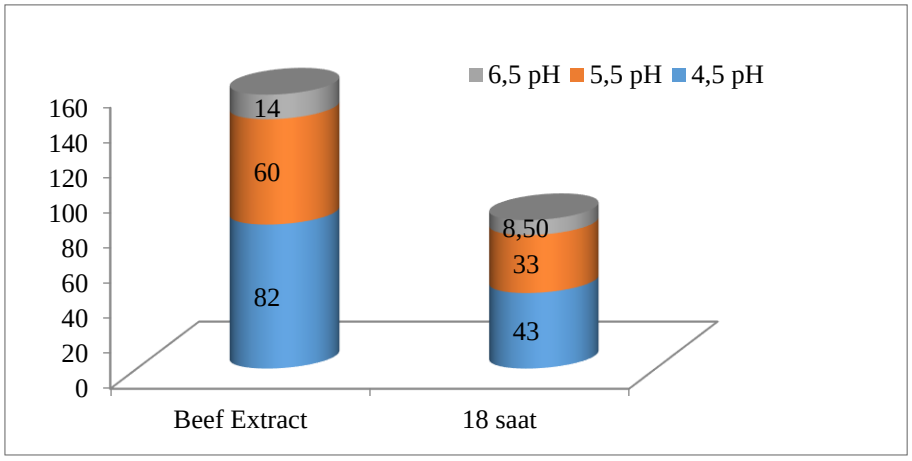
Bakterilerde EPS üretim miktarını etkileren önemli faktörlerden biri azot kaynağıdır. KC27L ve KC21L suşları kontrol grubuna göre (MRS, sırasıyla 175±4 mg/L ve 151±1 mg/L) denenen azot kaynakları arasından *L. salivarius* KC27L suşu en iyi EPS üretimini beef ekstrakt içeren besiyerinde (291±17 mg/L) ve *L. reuteri* KC21L suşu ise pepton içeren besiyerinde (358±11 mg/L) göstermiştir. Çalışmada, beef extrakt/pepton içeren besiyerinde farklı pH'larda farklı inkübasyon sıcaklıklarının EPS üretimine etkisi belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

L. salivarius KC27L suşu azot kaynağı olarak beef extract içeren besiyerinde ve farklı pH'larda (4,5/5,5/6,5) 24 saat geliştirilmiş ve EPS üretim miktarları tespit edilmiştir. En yüksek EPS üretimini pH 4,5'te (320 mg/L) göstermiş ve pH arttıkça EPS üretimi ve üretimdeki yüzde artış düşmüştür. KC27L suşu, MRS besiyerinde ve farklı pH'larda (4,5/5,5/6,5) 18 saat geliştirildiğinde EPS üretimini pH 4,5'te (251 mg/L) göstermiş ve pH arttıkça EPS üretimi (Çizelge 4.2) ve üretimdeki yüzde artış azalmıştır (Şekil 4.3).

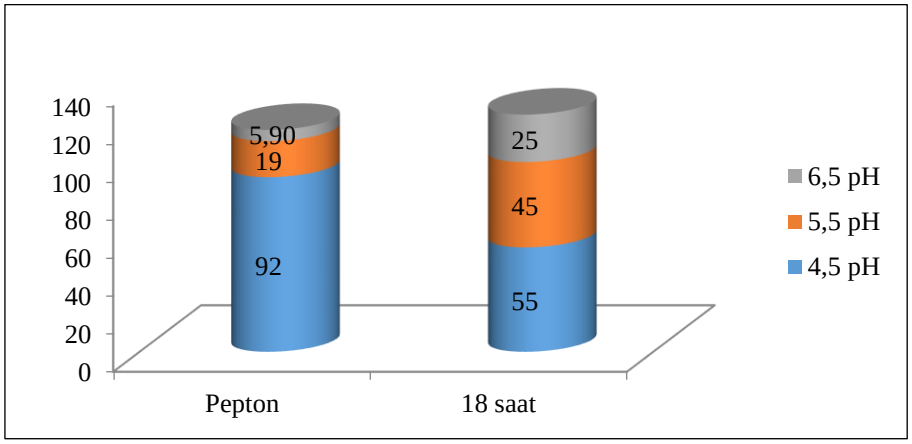
L. reuteri KC21L suşu azot kaynağı olarak pepton içeren besiyerinde ve farklı pH'larda (4,5/5,5/6,5) 24 saat geliştirilmiş ve EPS üretim miktarları tespit edilmiştir. En yüksek EPS üretimini pH 4,5'te (290 mg/L) göstermiş ve pH arttıkça EPS üretimi ve üretimdeki yüzde artış düşmüştür. KC21L suşu, MRS besiyerinde ve farklı pH'larda (4,5/5,5/6,5) 18 saat geliştirildiğinde EPS üretimini pH 4,5'te (235 mg/L) göstermiş ve pH arttıkça EPS üretimi (Çizelge 4.2) ve üretimdeki yüzde artış azalmıştır (Şekil 4.4).

Çizelge 4.2. Farklı pH'ların; KC27L için beef extract ve KC21L için pepton içeren besi yerlerinde ve MRS besiyerinde 18 saatlik inbübasyonda geliştirilen bakterilerde EPS üretim (mg/L) miktarlarına etkisi

Koşul	pH		
	4,5	5,5	6,5
	KC27L		
Beef Extract	320±8	280±11	200±5
MRS-18 saat inkübasyon	251±12	234±5	190±7
Kontrol (MRS, pH 6,5, 37 °C'de 24 saat inkübasyon)	175±4		
KC21L			
Pepton	290±7	180±3	160±9
MRS-18 saat inkübasyon	235±10	219±4	190±8
Kontrol (MRS, pH 6,5, 37 °C'de 24 saat inkübasyon)	151±1		



Şekil 4.3. Farklı pH'ların; beef extract içeren besi yerinde ve MRS besiyerinde 18 saatlik inbübasyonda geliştirilen KC27L suşunda EPS üretimindeki yüzde (%) artış



Şekil 4.4. Farklı pH'ların; pepton içeren besi yerinde ve MRS besiyerinde 18 saatlik inbübasyonda geliştirilen KC21L suşunda EPS üretimindeki yüzde (%) artış

Sonuçlara göre; kontrol ile karşılaştırıldığında (aynı pH'ta-6,5), KC21L suşunda N kaynağının değiştirilmesi (%5), EPS üretimini KC27L suşuna göre (%14) daha az arttırmıştır. Bakterilerin aynı pH'ta (6,5) MRS besiyerinde 18 saatlik inkübasyondaki EPS üretim miktarları kontrole göre aynı oranda (%8) kalmıştır.

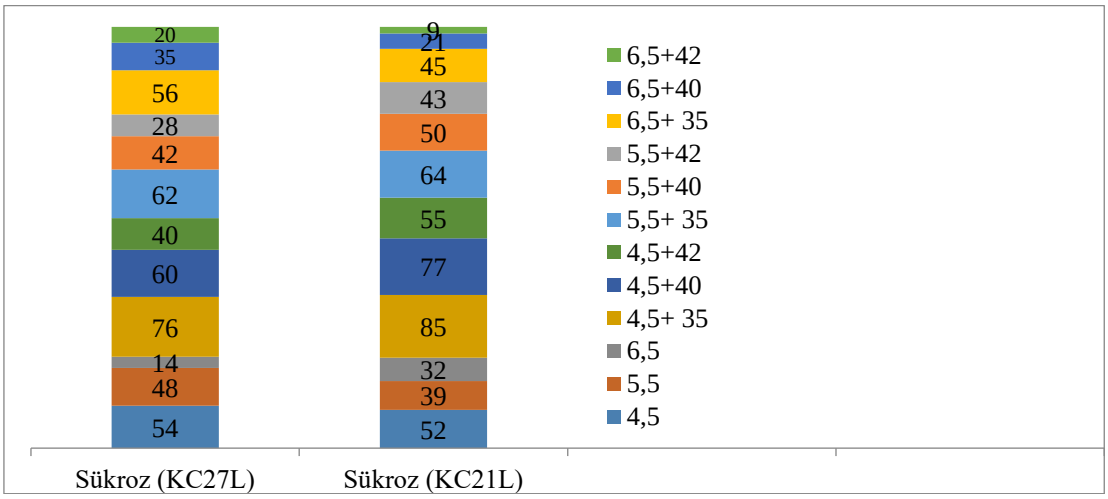
Bakterilerde EPS üretim miktarını etkileren önemli faktörlerden biri diğeri de karbon kaynağıdır. KC27L ve KC21L suşları kontrol grubuna göre (MRS, sırasıyla 175±4 mg/L ve 151±1 mg/L) denenen karbon kaynakları arasından en iyi EPS üretimini sükroz içeren besiyerinde (sırasıyla 205±33 mg/L ve 419±18 mg/L) göstermişlerdir. Çalışmada, sükroz içeren besiyerinde farklı pH'larda ve farklı inkübasyon sürelerinde EPS üretimleri (Çizelge 4.3) ve EPS üretimindeki yüzde (%) artış/azalış (Şekil 4.5) belirlenmiştir.

L. salivarius KC27L ve *L. reuteri* KC21L suşlarında sükroz içeren besiyerinde en yüksek EPS üretim miktarı pH 4,5'te 35 °C'de tespit edilmiştir. Genel olarak her iki bakteride de aynı pH'da farklı inkübasyon sıcaklıklarındaki EPS üretim miktarlarında anlamlı bir artış veya azalış belirlenmemiştir.

LAB suşlarında büyüme için karbon kaynağı olarak CO_2 kullanılabildiklerinden, CO_2 miktarı (%) EPS üretim miktarını etkilemektedir. Bakteriler, %5'lik CO_2'li inkübatörde geliştirildiklerinde *L. salivarius* KC27L suşunda EPS üretiminin 186±6 mg/L, *L. reuteri* KC21L suşunda ise 125±7 mg/L olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. Sükroz içeren besi yerlerinde farklı pH'larda ve farklı inkübasyon sıcaklıklarında geliştirilen bakterilerde EPS üretimi (mg/L)

pH											
4,5				5,5				6,5			
35ºC	37ºC	40ºC	42ºC	35ºC	37ºC	40ºC	42ºC	35ºC	37ºC	40ºC	42ºC
L. salivarius KC27L											
308±8	270±1	280±3	245±11	284±14	260±4	249±9	225±7	274±12	200±2	264±12	254±10
L. reuteri KC21L											
280±14	230±10	268±13	234±4	248±7	210±19	227±1	217±3	219±11	200±15	184±18	165±20



Şekil 4.5. KC27L ve KC21L suşlarında C kaynağı, pH seviyesi ve inkübasyon sıcaklıkları arasındaki korelasyon (% artış-azalış)

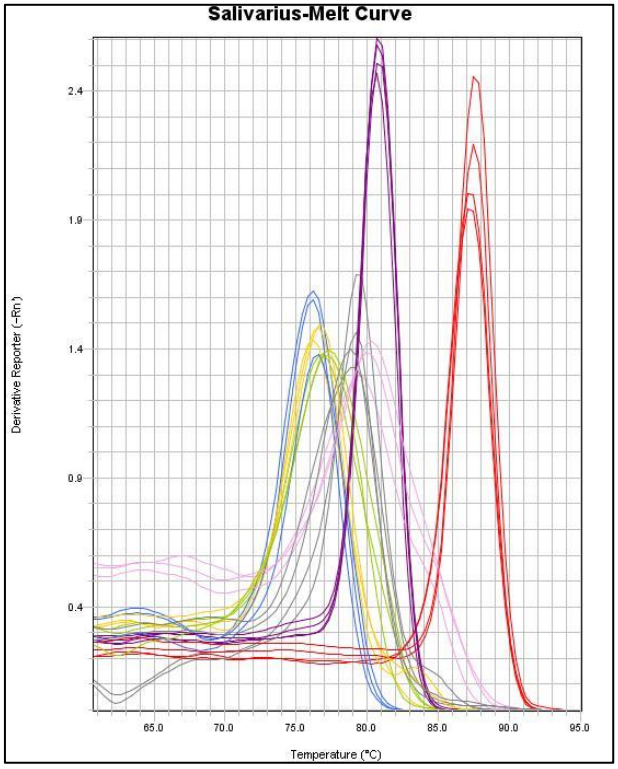
4.3. Protein Tayini

Tüm çalışmalarda elde edilen EPS'lerdeki suda çözünebilir protein içeriği Bradford metoduyla belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre; toplam protein miktarları *L. salivarius*

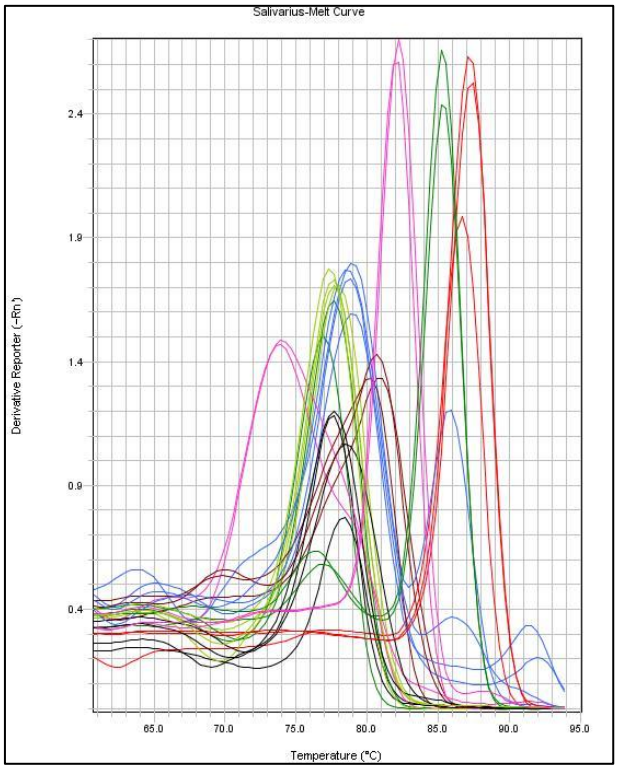
KC27L ile yapılan tüm çalışmalarda 0,039-0,145 mg/mL, *L. reuteri* KC21L suşunda 0,027-0,078 mg/mL aralığında tespit edilmiştir.

4.4. EPS Üretiminden Sorumlu Gen İfadelerinin Kantitatif Real Time-PZR ile Belirlenmesi

Yapılan qPCR deneyinde *L. salivarus* kontrol ve kombine, *L. reuteri* kontrol ve kombine örnekleri ve negatif kontrol örnekleri ve bu örneklere ait spesifik olarak tasarlanan genlere ait erime eğrileri (melt curve) analizi sonuçları Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de grafik şeklinde gösterilmektedir. Tasarlanan genlerin spesifikliğinin gösterilmesi açısından erime eğrileri (melt curve) analizi önem teşkil etmektedir. Her iki tür ve bu iki türün kontrol-kombine örneklerinde spesifik primerler ile çoğaltılan bölgelere ve bakterilerin türlerine göre değişiklik gösteren erime eğrileri (melt curve) eğrileri gözlemlenmiştir. Ek olarak negatif kontroldeki melt curve eğrisinin, genlerde görülen eğriden farklı bir noktada olduğu görülmektedir.

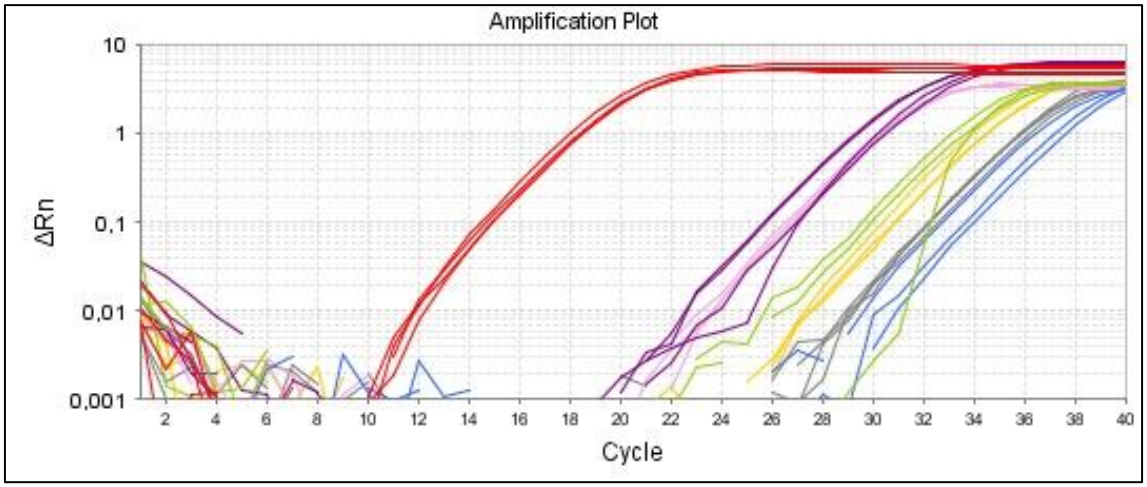


Şekil 4.6. *L. salivarius* KC27L suşuna ait erime eğrileri (melt curve)

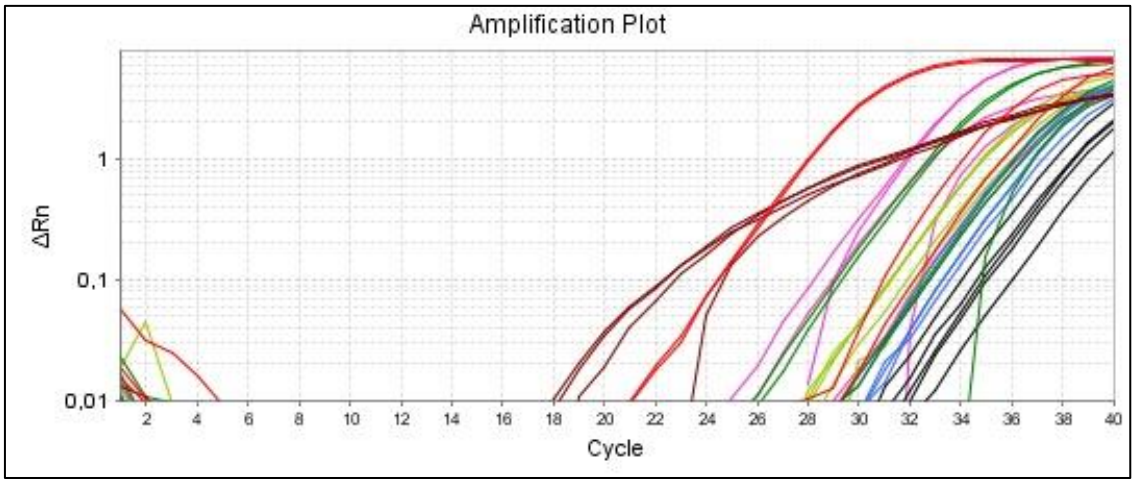


Şekil 4.7. *L. reuteri* KC21L suşuna ait erime eğrileri (melt curve)

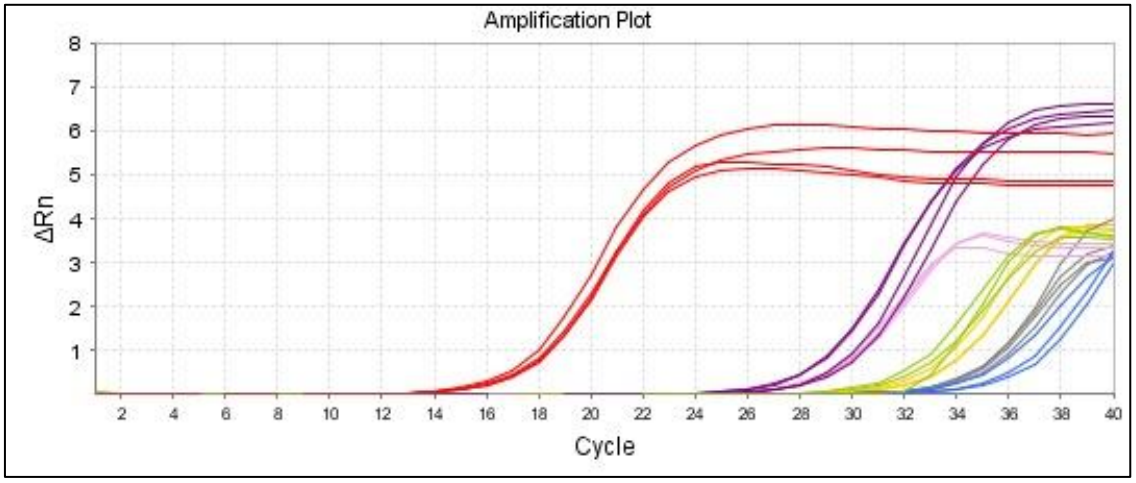
Yapılan qPCR deneyinde *L. salivarus* kontrol ve kombine, *L. reuteri* kontrol ve kombine örnekleri ve negatif kontrol örneklerine ait amplifikasyon plot sonuçları Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Amplifikasyon plot sonuçlarının linear grafik sonuçları ise Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Her iki bakteri için de 16S rRNA geni kırmızı renk ile gösterilmiştir. Referans olarak kullanılan 16S rRNA geni ve diğer genler her örnek için farklı miktarda eksprese olmuştur.



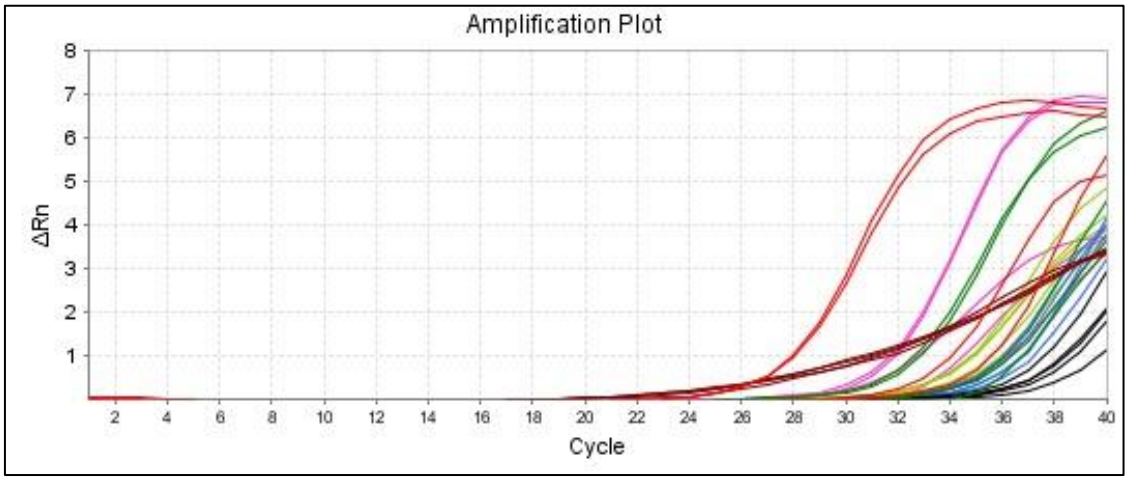
Şekil 4.8. *L. salivarius* KC27L suşuna ait erime eğrileri (melt curve)



Şekil 4.9. *L. reuteri* KC21L suşuna ait erime eğrileri (melt curve)



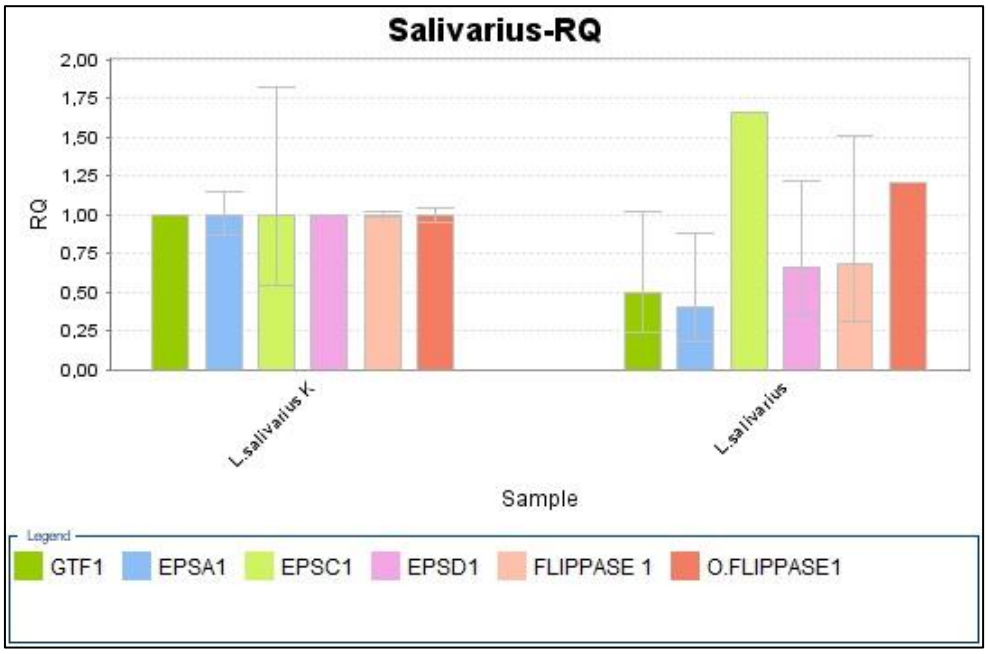
Şekil 4.10. *L. salivarius* KC27L suşuna ait erime eğrileri (melt curve) analiz linear grafiği



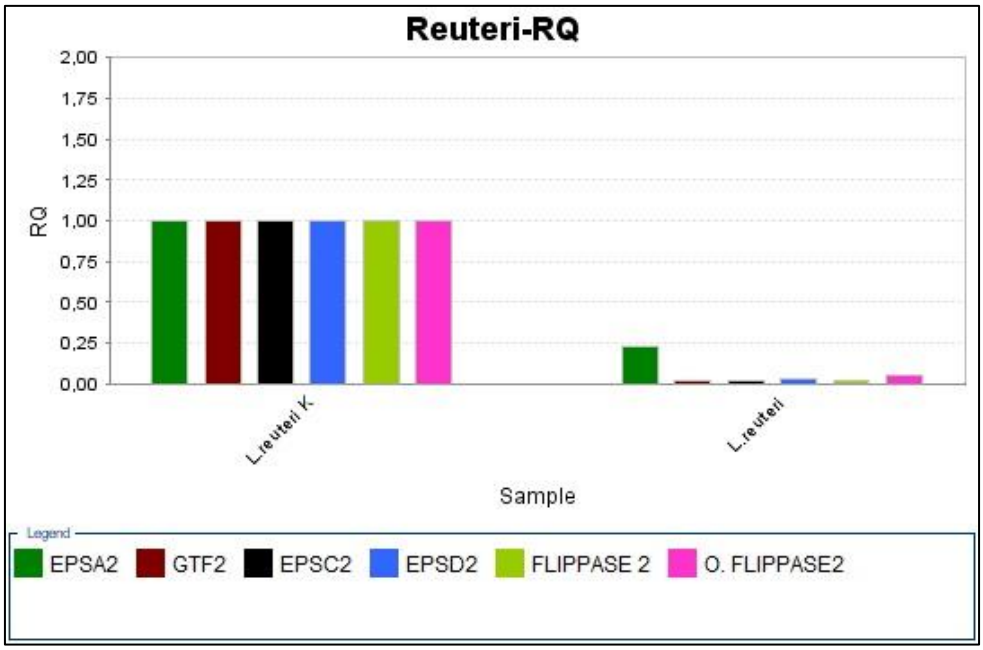
Şekil 4.11. *L. reuteri* KC21L suşuna ait erime eğrileri (melt curve) analiz linear grafiği

4.5. qPCR Gen Ekspresyon Sonuçları

Analiz sonuçlarına göre türe spesfik genlerin Relative quantification (bağıl nicelik RQ= $2^{-\Delta\Delta Ct}$) sonuçları her iki bakteri için ayrı ayrı incelenmiştir. Her tür kendi içinde kontrol ve kombine grup olarak ayrılmıştır. Kombine olarak adlandırılan farklı fiziksel şartlarda çoğaltılan bakteriler, kontrol grubuna göre daha fazla EPS üreten bakterilerdir. Bu doğrultuda analiz sonuçlarında da EPS sentezinden sorumlu genlerin ekspresyon seviyelerindeki farklılık gözlemlenmiştir. Şekil 4.12'de *L. salivarius* türünde kombine ve kontrol grubunun karşılaştırmalı gen ekspresyon sonuç grafiği gösterilmektedir. Şekil 4.13'te *L. reuteri* türünde kombine ve kontrol grubunun karşılaştırmalı gen ekspresyon sonuç grafiği gösterilmektedir. Bu 2 analiz sonucu için de standard deviation değeri düşük çıkmıştır.



Şekil 4.12. *L. salivarius* KC27L suşuna ait kontrol ve kombine örneklerine ait gen ekspresyon grafiği



Şekil 4.13. *L. reueri* KC21L suşuna ait kontrol ve kombine örneklerine ait gen ekspresyon grafiği

L. salivarius KC27L suşunda EPS sentezinden sorumlu olduğu düşünülen altı için ekspresyon analizi yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre kombine örneğinde EPSC ve Oligosakkarit Flippaz genlerine ait ekspresyon seviyeleri, kontrol grubuna göre artış göstermiştir. *Glikoziltransferaz, epsA, epsD* ve *flippaz* genlerinin ekspresyon seviyeleri ise kontrol grubuna göre azalmaktadır (Şekil 4.12). *L. salivarius* bakterisi için en fazla ekspresyonu artan gen *epsC* geni olmuştur. *L. reuteri* KC21L suşunda EPS sentezinden sorumlu olduğu düşünülen altı gen çalışılmıştır. Bu altı gen için ekspresyon seviyeleri incelendiğinde *glukoziltransferaz, epsA, epsC, epsD, flippaz* ve *sugar transferaz* genlerinin ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre azalmıştır (Şekil 4.13).

4.6. qPCR CT, ΔCT ve ΔΔCT Sonuçları

Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5'te dört örnek ve toplam 14 gene ait CT, ΔCT ve ΔΔCT sonuçları gösterilmiştir. 14 hedef bölge konsantrasyonunun, PCR reaksiyonunda relative olarak ölçülmesiyle elde edilen CT verileri aracılığıyla ΔCT değerleri hesaplanmıştır. Erime eğrileri (melt curve) ve amplification plot verilerine göre dört örnek için referans genlere ait sonuçlar güvenilirlik sağlamıştır. Bununla birlikte normalizasyon için örneklerin Cq değerleri, referans örnekleriyle karşılaştırılırak ΔΔCT değeri elde edilmiştir. Hesaplamalarda kullanılan formüller;

$\Delta CT = CT\ (hedef\ gen) - CT\ (referans\ gen)$

$\Delta\Delta CT = \Delta CT\ (hedef\ örnek) - \Delta CT\ (referans\ örnek)$

Çizelge 4.4. *L. salivarius* örneklerine ait CT, ΔC_T ve $\Delta\Delta C_T$ sonuçları

Örnek	Gen	C_T	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$
Kontrol	16S rRNA	18,75456		
	16S rRNA	18,75456		
Kombine	16S rRNA	18,40022		
	16S rRNA	18,40022		
Kontrol	GTF1	32,92749	14,17293	0
Kombine	GTF1	33,57488	15,17466	1,001731
	GTF1	33,57488	15,17466	1,001731
Kontrol	EPSA1	29,81693	11,06236	0
	EPSA1	29,81693	11,06236	0
Kombine	EPSA1	30,76853	12,36831	1,305944
	EPSA1	30,76853	12,36831	1,305944
Kontrol	EPSC1	36,02857	17,27401	0
	EPSC1	36,02857	17,27401	0
Kombine	EPSC1	34,9408	16,54058	-0,73344
Kontrol	EPSD1	29,75131	10,99675	0
Kombine	EPSD1	29,98902	11,58879	0,59204
	EPSD1	29,98902	11,58879	0,59204
Kontrol	FLIPPASE 1	34,9129	16,15833	0
	FLIPPASE 1	34,9129	16,15833	0
Kombine	FLIPPASE 1	35,10141	16,70119	0,542853
	FLIPPASE 1	35,10141	16,70119	0,542853
Kontrol	O.FLIPPASE1	34,53549	15,78093	0
	O.FLIPPASE1	34,53549	15,78093	0
Kombine	O.FLIPPASE1	33,91466	15,51444	-0,2665

Çizelge 4.5. L. reuteri örneklerine ait CT, ΔC_T ve $\Delta\Delta C_T$ sonuçları

Örnek	Gen	C_T	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$
Kontrol	16S rRNA	34,40031		
Kombine	16S rRNA	28,4087		
Kontrol	GTF2	33,46322	-0,93709	0
	GTF2	33,0899	4,6812	5,618292
Kombine	GTF2	33,0899	4,6812	5,618292
Kontrol	EPSA2	35,63859	1,238277	0
	EPSA2	35,63859	1,238277	0
Kombine	EPSA2	31,7863	3,377601	2,139323
	EPSA2	31,7863	3,377601	2,139323
Kontrol	EPSC2	36,4452	2,044888	0
	EPSC2	36,4452	2,044888	0
Kombine	EPSC2	35,90351	7,494808	5,449921
	EPSC2	35,90351	7,494808	5,449921
Kontrol	EPSD2	36,63389	2,23358	0
	EPSD2	36,63389	2,23358	0
Kombine	EPSD2	35,80235	7,393644	5,160065
	EPSD2	35,80235	7,393644	5,160065
Kontrol	FLIPPASE 2	35,41517	1,014858	0
	FLIPPASE 2	35,41517	1,014858	0
Kombine	FLIPPASE 2	35,23316	6,824461	5,809603
	FLIPPASE 2	35,23316	6,824461	5,809603
Kontrol	O. FLIPPASE2	33,05805	-1,34226	0
	O. FLIPPASE2	33,05805	-1,34226	0
Kombine	O. FLIPPASE2	31,24092	2,83222	4,174479
	O. FLIPPASE2	31,24092	2,83222	4,174479

4.7. RQ Sonuçları

Çizelge 4.5 ve 4.6'da örneklere ait RQ değerleri gösterilmiştir. Bu değer, hedef örnekteki genin referans örnekteki gene oranla ekspresyonunun kaç kat arttığını ifade etmektedir. RQ değeri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

RQ = Relative quantification = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Kontrol örneğinde spesifik bölgelere ait RQ değerleri 1 olarak kabul edilmiştir. Kontrol örneğine göreceli olarak yapılan RQ analizinde EPS biyosentezinde görev aldığı düşünülen bu genlerin, hedef örneklerde kaç kat ekspresyonunun azaldığı veya arttığı gösterilmektedir. Bu değerler elde edilirken 4.6'da ifade edilen CT, ΔC_T ve $\Delta\Delta C_T$ değerleri kullanılmaktadır. Sonuçlara göre Şekil 4.12 ve 4.13'te görülen değişimler RQ analizi ile istatiksel olarak incelenmiştir.

Çizelge 4.6. *L. salivarius* örneklerine ait RQ Sonuçları

Örnek	Hedef gen	RQ
Kontrol	16S rRNA	
	16S rRNA	
Kombine	16S rRNA	
	16S rRNA	
Kontrol	GTF1	1
Kombine	GTF1	0,4994
	GTF1	0,4994
Kontrol	EPSA1	1
	EPSA1	1
Kombine	EPSA1	0,404456
	EPSA1	0,404456
Kontrol	EPSC1	1
	EPSC1	1
Kombine	EPSC1	1,662594
Kontrol	EPSD1	1
Kombine	EPSD1	0,663404
	EPSD1	0,663404
Kontrol	FLIPPASE 1	1
	FLIPPASE 1	1
Kombine	FLIPPASE 1	0,686412
	FLIPPASE 1	0,686412
Kontrol	O.FLIPPASE1	1
	O.FLIPPASE1	1
Kombine	O.FLIPPASE1	1,202883

Çizelge 4.7. *L. reuteri* örneklerine ait RQ Sonuçları

Örnek	Hedef gen	RQ
Kontrol	16S rRNA	
Kombine	16S rRNA	
Kontrol	GTF2	1
Kombine	GTF2	0,020358
	GTF2	0,020358
Kontrol	EPSA2	1
	EPSA2	1
Kombine	EPSA2	0,226986
	EPSA2	0,226986
Kontrol	EPSC2	1
	EPSC2	1
Kombine	EPSC2	0,022878
	EPSC2	0,022878
Kontrol	EPSD2	1
	EPSD2	1
Kombine	EPSD2	0,027968
	EPSD2	0,027968
Kontrol	FLIPPASE 2	1
	FLIPPASE 2	1
Kombine	FLIPPASE 2	0,017829
	FLIPPASE 2	0,017829
Kontrol	O. FLIPPASE2	1
	O. FLIPPASE2	1
Kombine	O. FLIPPASE2	0,05538
	O. FLIPPASE2	0,05538

5. TARTIŞMA

EPS, birçok mikroorganzmaların ürettiği ve genelde hücre duvarının dışına salınan, suda çözünebilen ve karbonhidrat yapılı polimerlerdir (Wu ve diğerleri, 2022). Probiyotik özelliklere sahip LAB'lerin ürettikleri EPS; özellikle gıda alanında yaygın olarak kullanılmakta ve immünomodülatör, antioksidan, kolesterol düşürücü, anti-biyofilm, antimikrobiyal, antikanser ve stabilitazör özellikleri bulunmaktadır. Ayrıca, LAB tarafından üretilen EPS, bağırsak mikrobiyatısını da düzenlemektedir (Jurášková ve diğerleri, 2022). Bakterilerin EPS üretim miktarı, çeşitli fiziksel koşullara bağlı olarak değişmektedir. Besiyerindeki karbon kaynakları, inkübasyon sıcaklığı, besiyeri pH miktarı, CO_2 gibi koşullar EPS üretiminde rol oynayan fiziksel parametrelerdir (Nguyen ve diğerleri, 2020).

Çalışmamızda, *L. salivarius* KC27L (175±4 mg/L) ve *L. reuteri* KC21L (151±1 mg/L) gelişim gösterdikleri MRS besiortamı içeriğinde bulunan karbon kaynağının EPS üretimine etkisini belirlemek amacıyla aynı oranda (%2) 3 farklı karbon kaynağında (glukoz, galaktoz ve sükroz) ayrı ayrı denemeler yapılmıştır. Buna göre; her iki suşunda en yüksek EPS üretimini sükroz içeren ortamda sergiledikleri (*L. salivarius* KC27L; 205±33 mg/L ve *L. reuteri* KC21L; 419±18 mg/L) tespit edilmiştir. Buna karşın en düşük üretim her iki suş için de galaktoz (145±12 mg/L, 115±5 mg/L, sırasıyla) içeren ortamda belirlenmiştir. Torino ve diğerleri (2005) çalışmalarında *L. helveticus* bakterisinin EPS üretimine farklı karbon kaynaklarının etkisini araştırmış ve %1 laktoz içeren ortamda EPS üretiminin 8,2 mg/L, %1 glukoz içeren ortamda ise 5,5 mg/L olduğunu bildirmişlerdir. *L. helveticus* suşunun kullanıldığı başka bir çalışmada, karbon kaynağı olarak sükroz (%20) kullanılmış ve EPS üretimi 13,99 g/L olarak rapor edilmiştir (Hussein ve diğerleri, 2015). Velikova ve diğerleri, (2018) *L. fermentum, L. helveticus* ve *L. rhamnosus*'un EPS üretimine glukoz, laktoz ve sakkarozun etkisini incelemişler. *L. fermentum* ve *L. helveticus*'un EPS üretiminin en yüksek sakkaroz içeren ortamda sırasıyla 134,59 mg/L ve 139,47 mg/L, *L. rhamnosus* için ise glukoz içeren ortamda 140,37 mg/L olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada farklı karbon kaynakları kullanılarak (glukoz, sükroz, laktoz, maltoz, nişasta, fruktoz ve şeker kamışı melası) *Bacillus velezensis* KY471306 suşunun EPS üretim kapasitesi incelenmiş ve en yüksek üretim miktarı 4,2 g/L olarak melas ortamında gözlenirken, en düşük üretim 1,88 g/L olarak nisaşta içeren ortamda tespit edilmiştir (Mogannem ve diğerleri, 2018). Diğer çalışma sonuçları ile kendi sonuçlarımızı

karşılaştırdığımızda her iki suşunda sükrozlu ortamda yapılan diğer çalışmalardan daha yüksek miktarda EPS üretme yeteneğine sahip oldukları görülmektedir.

Azot kaynağı olarak yeast ekstrakt, beef ekstrakt, tripton ve peptonun kullanımının EPS üretimine etkisinin incelendiği çalışmamızda, *L. salivarius* KC27L suşunun 291±17 mg/L ile beef ekstrakt içeren besi ortamında ve *L. reuteri* KC21L suşunun ise 358±11 mg/L ile pepton içeren besi ortamında en yüksek EPS üretim kapasitesine sahip oldukları belirlenmiştir. Nitrojen kaynağı olarak triptofanın kullanıldığı bir çalışmada *Streptococcus thermophilus* bakterisinin EPS üretim miktarında artış olduğu ve en yüksek EPS üretiminin 29,131 mg/L olduğu bildirilmiştir (Karadeniz ve diğerleri, 2021). Li ve diğerleri (2016) farklı nitrojen kaynaklarının EPS üretimi üzerindeki etkisini değerlendirmek için %1 oranında beş farklı azot kaynağı (tripton, soya pepton, pepton, sığır özütü ve peynir altı suyu proteini) kullanmışlar ve en yüksek EPS üretiminin soya peptonunda (150 mg/L) olduğunu rapor etmişlerdir. Prete ve diğerleri (2021) organik azot kaynaklarının, inorganik azot kaynaklarına göre EPS üretimini daha fazla arttırdığını bildirmişleerdir. Başka bir çalışmada, altı nitrojen kaynağı kullanılarak (yeast ekstraktı, pepton, üre, amonyum sülfat, amonyum klorid ve potasyum nitrat) *B. velezensis* KY471306 suşunun EPS üretim kapasitesi incelenmiş ve en yüksek üretim düzeyinin 4,4 g/L olarak yeast ekstrakt ortamında gözlendiği bildirilmiştir (Mogannem ve diğerleri, 2018). Diğer çalışma sonuçları ile kendi sonuçlarımızı karşılaştırdığımızda KC27L suşunun beef ekstraklı, KC21L suşunun peptonlu besi ortamında diğer çalışmalara kıyasla daha yüksek miktarda EPS üretme yeteneğine sahip oldukları görülmektedir.

Çalışmamızda pH 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 ve 7,0 koşullarında *L. salivarius* KC27L ve *L. reuteri* KC21L suşlarının EPS üretim miktarları incelenmiş ve her iki suşun da pH 4,5 koşullarında en yüksek (sırasıyla, 357±8 mg/L ve 233±1 mg/L) EPS üretimi gerçekleştirdikleri tespit edilmiştir. Buna karşın, hem *L. salivarius* KC27L suşunun besiyeri pH'sı olan pH 6,5'te (kontrol) (175±1 mg/L) hem de *L. reuteri* KC21L suşunun besiyeri pH'sı olan pH 6,5'te (kontrol) (138±1 mg/L) en düşük EPS üretim kapasitesi sergiledikleri belirlenmiştir. Zhang ve diğerleri (2011) *L. fermentum* suşunun 5,0; 5,5; 6,0 ve 7,0 pH seviyelerinde EPS üretimini incelemişler ve pH 6,0 seviyesinde en yüksek değeri (10,11 mg/L) gösterdiğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada *L. plantarum* suşunun pH 3,5 koşullarında yüksek EPS üretim kapasitesi sergilediği ve kontrol grubuna kıyasla EPS üretiminde 2,3 katlık artışa neden olduğu rapor edilmiştir (Nguyen ve

diğerleri, 2021). *L. helveticus, L. casei* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bakterlerinin kullanıldığı bir çalışmada pH 5,5 ile 8,0 arasında denemeler yapılmış ve pH 7,0'de L. *helveticus*'un EPS üretiminin (13,99 g/L) en yüksek değerde olduğu bildirilmiştir (Hussein ve diğerleri, 2015). Diğer çalışma sonuçları ile kendi sonuçlarımızı karşılaştırdığımızda her iki suşunda pH 4,5 da yüksek miktarda EPS üretme yeteneğine sahip oldukları görülmektedir.

Sıcaklığın EPS üretimine etkisini belirlemek amacıyla 35, 37 (kontrol), 40 ve 42°C'de denemeler yapılmış ve suşların 35°C'de en yüksek (285±1 mg/L ve 215±23 mg/L) üretim kapasitesi sergiledikleri tespit edilmiştir. Hussein ve diğerleri çalışmalarında 30, 37, 40 veya 45°C sıcaklık uygulamalarında denemeler yapmışlar ve EPS üretimi için optimum sıcaklık değerini 37°C olarak belirlemişlerdir. Ayrıca, artan sıcaklık parametrelerinde EPS üretim miktarında düşüş gözlendiğini bildirmişlerdir (Hussein ve diğerleri, 2015). Başka bir çalışmada 12 *Bacillus* suşunun 35°C sıcaklık koşullarında EPS üretim miktarlarının 0-143,1 mg/L aralığında olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar en yüksek EPS üretim kapasitesine sahip *Bacillus* sp. ZBP4 suşunun EPS üretimine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla inkübasyon sıcaklığını 30, 33, 35, 37, 40, 43 ve 45°C ayarlanmış ve sıcaklık artışına bağlı olarak EPS üretimininde artış gözlendiğini ve en yüksek değerin 45°C'de yaklaşık 500 mg/L olduğunu bildirilmişlerdir (Ergene ve Avcı, 2018). Wang ve diğerleri (2011) *Paenibacillus* sp. TKU023 için en yüksek EPS miktarının 37°C'de elde edildiğini bildirirken, Lui ve diğerleri (2009) *Paenibacillus polymyxa* için EPS üretim sıcaklığının 24°C olduğunu rapor etmişlerdir. Mıdık ve diğerleri (2020) çalışmalarında *L. plantarum, L. namurensis* ve *Pediococcus ethanolidurans* bakterilerinin 20, 30, 37°C'deki EPS üretimleri araştırmışlar ve en yüksek üretim kapasitesinin *L. plantarum* MF460 tarafından 30°C'de 515,48 mg/L olduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan çalışmalar inkübasyon sıcaklığının EPS üretimine etkisinin bakterilerin optimum gelişme sıcaklıklarında ya da bu sıcaklıklara yakın olduğunu göstermektedir.

İnkübasyon sürelerinin (18, 24, 48 saat) EPS üretimine etkisinin incelendiği çalışmamızda, *L. salivarius* KC27L ve *L. reuteri* KC21L suşlarının 18 saatlik inkübasyon süresi sonunda sırasıyla, 228±5 mg/L ve 225±20 mg/L olarak en yüksek EPS üretim yeteneği gösterdikleri belirlenmiştir. Ancak süre artışına bağlı olarak EPS üretiminde bir dalgalanmada görülmüştür. Mıdık ve diğerleri (2020) çalışmalarında *L. plantarum'*un 48, 72, 120 saat süresince EPS üretimini incelemişler ve en yüksek EPS üretiminin (515,48 mg/L) 48 saat

inkübasyon süresinde elde edildiğini bildirmişlerdir. Farklı inkübasyon sürelerinin (24, 48, 72 ve 96 saat) etkisinin incelendiği başka bir çalışmada, en yüksek EPS üretimi (13,99 g/L) için belirlenen optimum sürenin 72 saat olduğu bildirilmiştir (Hussein ve diğerleri, 2015). Başka bir çalışmada *L. brevis* E25 suşunun EPS üretim miktarı 10-35 g/L olarak bulunmuş ve en yüksek EPS üretim kapasitesinin 18 saat inkübasyon süresi sonunda gerçekleştiği bildirilmiştir (Ermiş ve diğerleri, 2019). Diğer çalışma sonuçları ile kendi sonuçlarımızı karşılaştırdığımızda her iki suşun üretmiş olduğu EPS miktarının 18 saatlik inkübasyon süresinde Ermiş ve diğerleri, (2019)'nin aynı saatte yapmış oldukları çalışmadan yüksek değerde olduğu görülmektedir. İnkübasyon süresinin suşların EPS üretimlerine etkisinin net olarak belirlenebilmesi için, suşların üreme eğrilerinin çıkartılarak üreme eğrisindeki fazlarındaki (lag, log ve durgunluk fazı) EPS üretim miktarlarının tespit edilmesi gerekmektedir. Bu şekilde daha net sonuçlar elde edileceği için daha kesin yorum yapılabilecektir.

Karbondioksitin karbamoil fosfat sentezinde ve LAB'deki diğer metabolik reaksiyonlarda substrat olarak kullanılabilmesi nedeniyle, bazı LAB suşlarında büyüme için karbon kaynağı olarak CO_2 kullanılabilmektedir. Karbondioksit, glikolizde yer alan enzimleri düzenlemekte ve enerji metabolizmasında görev almaktadır. Dolayısıyla CO_2 miktarı EPS üretimini etkileyen bir faktördür (Nguyen ve ark., 2020). Çalışmamızda, *L. salivarius* KC27L ve *L. reuteri* KC21L suşları %5'lik CO_2'li ortamda geliştirilmiş ve EPS üretimine etkisi incelenmiştir. Analiz sonuçlarına göre*; L. salivarius* KC27L suşunda EPS üretiminde 175±4 mg/L'den 186±6 mg/L'ye %6'lık bir artış gözlenirken, *L. reuteri* KC21L suşunda 151±1 mg/L'den 125±7 mg/L'ye %18'lik azalma olduğu gözlenmiştir. Ninomiya ve diğerleri (2009) çalışmalarında *Bifidobacterium longum* JBL05 kullanmışlar ve anaerobik (çözünmüş oksijen konsantrasyonları 0,05 ppm'nin altında) ve CO_2 takviyesi (≥%20) koşullarında bakterinin 2,9 g/L EPS ürettiğini bildirmişlerdir. Karbondiosit takviyesinin deney sonuçları üzerinde kayda değer bir artışa neden olmadığı tespit edilmiştir.

EPS üretimine etki eden farklı fiziksel parametrelerin tekli etkilerinin yanı sıra EPS üretim miktarlarını arttırmak amacıyla kombinasyon denemeleri de gerçekleştirilmiştir. *L. salivarius* KC27L için; sükroz, beef ekstrakt, pH 4,5, 35°C, 18 saat, *L. reuteri* KC21L için ise; sükroz, pepton, pH 4,5, 35°C, 18 saat koşullarında yapılan denemeler sonucunda bakterilerin EPS üretimleri sırasıyla 464±12 mg/L ve 433±3 mg/L olarak tespit edilmiştir. Her iki bakteride kombine besi ortamında geliştirildiklerinde EPS üretimlerinde kontrol

grubuna göre (MRS besi ortamı) yaklaşık 3 katlık bir artış görülmüştür. Sonuç olarak; probiyotik özellikteki *L. salivarius* KC27L ve *L. reuteri* KC21L suşlarının EPS üretim yeteneklerinin arttırılması amacıyla farklı fiziksel koşullarda (besiyerinde kullanılan karbon ve azot kaynakları, pH, inkübasyon sıcaklıkları ve süresi, %5 CO_2'li ortam) denemeler yapılmış ve bakterilerin EPS üretim yeteneklerini arttırdıkları optimum koşullar belirlenmiştir. Bu ortamların tekli etkilerinin yanı sıra birlikte kombine denemelerinin de EPS üretim düzeyindeki artışları tespit edilmiştir. Yapılan literatür taramaları sonucu farklı fiziksel koşullara bağlı olarak *L. salivarius* ve *L. reuteri* türlerinin EPS üretim yeteneklerinin arttırılmasına yönelik bir çalışmaya rastlanılmamışır.

Bakterilerin ürettiği EPS'ler içerdikleri basit şekerlere göre sınıflandırılmaktadır: Homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler. Homopolisakkaritler genelde glukan ve fruktanların tekrarlayan birimlerinden oluşmaktadır. Heteropolisakkaritler ise oligosakkaritlerin tekrarı halinde bulunmaktadır. Literatür çalışmalarına göre homopolisakkaritlerin ve heteropolisakkaritlerin sentezlenmesi için farklı gen gruplarının gerekli olduğu anlaşılmaktadır. Homopolimerik EPS'lerin sentezi için *gtf* veya *ftf* olarak belirlenen sadece bir gen gerekirken, heteropolimerik EPS üretimi için birkaç geni barındıran karmaşık bir eps gen kümesi bulunmaktadır (Dertli ve diğerleri, 2016). EPS'lerin oluşumunda; UDP-glukoz-dehidrogenaz, glukozil-transferaz, galaktozil-transferaz 1 ve 2, polimeraz gibi polisakkarit sentezine özgü olmayan birçok enzim görev almaktadır (Zivkovic ve diğerleri, 2015). EPS'nin biyosentezine dair birçok çalışma olmasına rağmen moleküler süreçler tam anlamıyla anlaşılamamıştır (Zeidan ve diğerleri, 2017). EPS sentezi ile ilgili genler, plazmitlerde veya kromozom üzerinde yer almaktadır. Örneğin *Lactococcus lactis* NIZO B40'ta EPS'nin biyosentezi için gerekli olan temel genler, 40 kb'lik bir plazmit üzerinde yer almaktadır. *Streptococcus thermophilus* Sfi6'da ise EPS sentez genleri, kromozom üzerinde bulunmaktadır (Song ve diğerleri, 2018). EPS genleri görevlerine göre genel olarak EPS üretiminin düzenlenmesi ile ilgili bölgeler, zincir uzunluğu tayini, EPS biyosentezi ve EPS polimerizasyonu ve taşınması olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır. Bu dört grubun haricinde EPS'den sorumlu gen grupları; olisakkarit oluşumu (glikosiltranferazlar, Wzx veya flippase, Wzy veya polimeraz ve EpsA), polisakkarit oluşumu için fosfor düzenleyici sistem (EpsB, EpsC ve EpsD) şekilde sınıflandırılmıştır (Dan ve diğerleri, 2009).

L. lactis bakterisinde EPS sentezinden sorumlu genler plazmitlerde yer almaktadır. En iyi karakterize edilen EPS sentezinden sorumlu olan genleri içeren plazmitlerinden biri olan, NIZO B40, glikosiltransferazları içermektedir. Glikoziltransferazlar, polimerizasyon ve taşıma görevi için kullanılan proteinleri kodlamaktadır. EPS genleriyle ilgili çalışmalar, şeker kaynağının veya polisakkaritlerin üretimini sağlayan spesifik genlerin modifikasyona uğratılmasına odaklanmaktadır (Kleerebezem ve Hugenholtz, 2003). EPS'lerin kimyasal oluşumunda yer alan asetiltransferaz ve piruvil transferazı kodlayan genler de bulunmaktadır. Bunlar haricinde EPS sentezinde, çevresel streslerden etkilenen, genler de EPS üretiminde rol oynamaktadır. Çevresel stres, LAB'nin EPS biyosentezini kontrol etmek için önemli bir faktör olarak düşünülmektedir (Nguyen ve diğerleri, 2021). LAB genomlarında, Wzy'ye bağlı yol ile HoPS'nin hücre dışı sentezi için gen kümeleri mevcuttur. Wzy'ye bağlı EPS gen kümeleri üzerindeki çalışmalar neredeyse yalnızca üç cinse odaklanmıştır: *Lactococcus, Lactobacillus* ve *Streptococcus*. Genel olarak, EPS gen kümeleri oldukça çeşitlidir ve bunların nükleotid dizileri, en değişken diziler arasında yer almaktadır. Ayıca genel olarak EPS gen kümesi, korunmuş beş genden oluşmaktadır: *epsA, epsB, epsC, epsD* ve *epsE* (Zeidan ve diğerleri, 2021). *Lactobacillus johnsonii* bakterisi ile yapılan bir çalışmada pek çok LAB türünde olduğu gibi EPS üretiminin Wzx/Wzy gen kümesi ile yapıldığı ifade edilmiştir (Mayer ve diğerleri, 2020). Yapılan bir çalışmada *Lactobacillus bulgaricus*'ta EPS sentezinde rol alan *epsA* geninin yüksek miktarda korunmuş olduğu gösterilmiştir (Ryan ve diğerleri, 2015). Farklı *Lactobacillus* bakterilerinde birçok gen kümesi (*epsA, B, C, D, E, polimeraz wzy, flippaz wzx* ve *glukosiltransferazlar*) karşılaştırıldığında, *epsA, B, C, D* ve *E* genlerinin daha yüksek korunma gösterdiği görülmüştür (Prete ve diğerleri, 2021). Genel olarak LAB türleri için EPS sentezinde görev yapan genlerden, *epsA* geni transkripsiyonel bir regülatör olarak görev yapmaktadır ve EPS gen kümelerinin başlangıcı olarak kabul edilmektedir (Cieslewicz ve diğerleri, 2001). *epsA* genini başka bir gen kompleksi olan *epsB,C,D* takip etmektedir ve bu gen kompleksi EPS zincirinin uzamasını kontrol etmektedir (Palaniraj ve Jayaraman, 2011). *epsE* geni ile başlayan glukoziltransferazlar ise tekrar eden EPS birimlerini oluşturmaktadır (Broadbent ve diğerleri, 2003). Yukarıda belirtilen gen kümeleri bakterilerde genel olarak bulunsa da farklı gen kümeleri de bulunmaktadır. Örneğin heteropolisakkarit (HePS) üreten *Streptococcus thermophilus* bakterisinde EPS gen kümeleri klonlanmıştır ve dizileme ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda farklı bir gen kümesinin de EPS üretiminde görevli olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, bakterilerin

suşları arasındaki genetik yapının farklılığının da EPS üretim yolaklarını ve yolaklardan sorumlu gen kümelerini etkilediklerini göstermektedir (Vuyst ve ark., 2011).

LAB tarafından EPS üretiminin arttırılması için metabolik mühendislik stratejileri kullanılmaktadır. Bunun için öncül maddelerin sentezine odaklanılmıştır. Odaklanılan öncül maddeler arasında şeker nükleotidleri olan UDP-glukoz, UDP-galaktoz ve TDP-ramnoz ve glukoz-1-fosfat (G1P) bulunmaktadır. Bu öncül maddeler dışında ara ürünlere odaklanılarak G6P'nin fosfoglukomutaz (PGM) tarafından G1P'ye dönüştürülmesi ve UDP-glukoz fosforilaz (GalU) tarafından katalize edilen G1P'den UDP-glukoz sentezi de gerçekleştirilmiştir. Kullanılan metabolik mühendislik stratejlerine örnek olarak nisin ile indüklenebilir bir promotörün kontrolü altında GalU'nun aşırı ekspresyonu sağlanarak, *L. lactis*'te enzim aktivitesi arttırılmış ancak EPS'nin sentezi önemli ölçüde artmamıştır. Buna rağmen hem UDP-glukoz hem de UDP-galaktoz sentezi sekiz kat artmıştır. *S. thermophillus*'ta yapılan bir çalışmada da PGM ve GalU'nun aşırı ekspresyonu, EPS sentezinde iki kat artışa neden olmuştur (Papagianni, 2012). Literatürde EPS biyosentez yolakları ve bu yolaklarda görev alan genlerin işlevleriyle ilgili bazı çalışmalar bulunmaktadır. *Lacticaseibacillus rhamnosus* bakterisinin dört suşu ile yapılan bir çalışmada bakteriler geliştirildikten sonra EPS ekstraksiyonu yapılarak bakterilerden üretilen EPS miktarı tayin edilmiştir. DNA izolasyonu ve dizi analizinden sonra transkripsiyon analizi yapılmıştır. EPS gen kümeleri dört suş için karşılaştırıldığında EPS sentezini sağlayan genlerin yüksek oranda benzer olduğu görülmüştür. *Glukoziltransferaz* genleri suşlar arasında benzerlik göstermiş, *wzy* genleri ise dört suşta da %100 homoloji göstermiştir (Péant ve diğerleri, 2005). *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi ile yapılan bir çalışmada aljinat sentezinde *alg8* ve *alg44* genlerinin iç zarda bulunan proteinleri kodladığı, *algK* geninin ise bir dış zar lipoproteinini kodladığı belirtilmiştir (Sun ve Zhang, 2021). EPS sentezi yapan genlerin, *Streptococcus thermophilus'*un suşlarında araştırıldığı bir çalışmada, *epsA, B* ve *C* genleri tespit edilmiş ve suşlar arasında oldukça korunduğu gösterilmiştir (Zhou ve diğerleri, 2019). *Limosilactobacillus fermentum, Enterococcus faecalis, E. durans ve L. helveticus* bakteri ile yapılan bir çalışmada bakterilerden RAPD-PCR yapıldıktan sonra 16S rRNA dizi analizi uygulanarak EPS genlerinin moleküler tespiti yapılmıştır. Sonuçlara göre bakterilerin *glukoziltransferaz* geninini barındırdığı, *L. fermentum'*da *epsA* genine ait gen ifadesi bulunmadığı ve bakterilerin homopolisakkarit veya heteropolisakkarit üretiminin farklılık gösterdiği anlaşılmıştır (İspirli ve Dertli, 2017). Yapılan literatür taramasında, EPS üretimi yapan *Ligilactobacillus salivarius* ve

Limosilactobacillus reuteri türlerinde RNA izole edip, EPS sentezinde görevli genlerin, daha pratik ve kesin bir sonuç elde etmemizi sağlayan RT-PCR yöntemi ile analiz edilmesi yönünde herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak, *Streptococcus mutans* bakterisinde biyofilm oluşumu hakkında bir çalışma yapılmış ve izole edilen RNA'da karbonhidratların analizi RT-PCR kullanarak yapılmıştır (Cury ve diğerleri, 2008). EPS sentezinde görevli genler hakkında yapılan çalışmalarda *Streptococcus thermophilus* LY03 bakterisinde UDP-glikoz pirofosforilaz geni ve fosfoglukomutaz geninin ekspresyonunun birlikte arttığı durumda EPS sentezinin de yoğun olarak arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca *Lactobacillus fermentum* bakterisinde %5 glukoz ve %1 amonyum sitrat içeren besiyerinde EPSB, EPSE , ve EPSG genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri artış göstermiştir (Shi ve diğerleri, 2014).

Yapılan literatür taramaları sonucunda birçok bakteri için farklı fiziksel parametrelerin EPS üretim düzeyini de farklı şekilde etkilediği anlaşılmıştır. Ayrıca her bakteri için farklı gen aileleri EPS üretimini etkilemektedir ve biyokimyasal süreçler tam olarak anlaşılamamıştır. Bu tez çalışması için seçilen *L. salivarius* ve *L. reuteri* bakterileri için fiziksel parametrelerin dahil edilmesi ve EPS üretiminde görevli genlerin ekspresyon seviyelerinin analizi ile ilgili kapsamlı bir araştırma yapılmadığı görülmektedir. Ancak kapsamlı araştırmalarla birlikte, probiyotik özellikteki bu iki suş için moleküler süreçlerin aydınlatılması, bu suşlardan elde edilecek EPS'lerin prebiyotik olarak kullanılmasının yanında farklı biyoteknolojik ürünler olarak çalışmalarına olanak sağlayabilecektir.

Tez kapsamında gerçekleştirilen RT-PCR deneylerin doğruluğundan emin olmak için melt curve analizine ihtiyaç duyulmaktadır. Melt curve analizi ile bir döngü için bir defa floresan ışımalarını incelemek yerine reaksiyon boyunca gerçekleşen floresan ışımalarını incelemeye olanak sunmaktadır (Farrar ve Wittwer, 2017). Melt curve sonuçları belirlenen gen bölgeleri ve primerlerin spesifikliğinin anlaşılması için gerekmektedir. Özellikle referans gene ait melt curve eğrisinin bulunduğu nokta, negatif kontrole ait melt curve eğrisinin bulunduğu noktadan farklı bir yerde olmalıdır (Nicholson ve diğerileri, 2018; Niederau ve diğerleri, 2020). Bu tez kapsamında hem referans hem hedef gen bölgelerinin melt curve eğrilerinin bulunduğu bölge negatif kontrole ait melt curve eğrisinden farklı olarak analiz edilmiştir. Bu sonuç, genlerin türlere spesifik olduğu, nonspesifik çoğalmaların olmadığını, kontaminasyon olmadığını ve çalışmanın güvenilir olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak melt curve eğrileri türden türe ve çalışılan genlere göre

farklılık göstermektedir. Sonuçlar, bu tezi ispatlar nitelikte olup, 4 örnek ve 14 gen için farklı melt curve eğrileri gözlenmiştir.

RT-PCR analizi dört örnek iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen analizler, çalışmanın güvenlirliği konusunda fikir oluşturmaktadır. Gen ekspresyon analizi yapılırken standart sapma değerleri önem arz etmektedir. Bu değer, her örnek ve her gene ait elde edilen CT değerlerinden hesaplanmaktadır. Büyük sapmaların olmaması çalışmanın güvenilirliği ile alakalı fikir vermektedir (Karlen ve diğerleri, 2007). Deneyleri yaparken el hataları, yanlış gen veya örnek kullanımı, deneylerde kullanılan malzemelerden kaynaklı hatalar ve başlangıç örneğinin gerekli şartlara uyum sağlamaması ve RT-PCR deneyine başlamadan önce eşit miktarlarda RNA örneğinin kullanılmaması standart sapmayı etkilemektedir (Heckmann ve diğerleri, 2011). Buna ek olarak en önemli faktörlerden biri olan referans genin ekspresyon seviyelerindeki stabiliteyi sağlamak için de standart sapma değerinin az olması gerekmektedir. Bunun için Hruz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada standart sapma değerinin düşürülmesi adına uygun referans geni belirlemek için optimizayon için belirli koşullar sağlanmıştır (Hruz ve diğerleri, 2011). Yine Adeola'nın yaptığı bir çalışmada referans genin normalizasyonu, standart sapmayı düşürmek amacıyla kullanması dikkat çekmektedir (Adeola, 2018). Tez çalışmamızda standart sapma değeri minimum düzeyde tutulmuş olup çalışma sonuçlarının kayda değer veriler olması, gen ve örnekler arasında karşılaştırmalı ekspresyon miktarı hususunda karşılaştırmalı yorum yapmamıza imkan tanımıştır. Bu kapsamda hem *L. salivarius* KC27L hem de *L. reuteri* KC21L suşlarına spesifik tasarlanan EPS sentezinde rol oynadığı düşünülen genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimde yer alan standart sapma çizgileri hem de CT grafiğinde yer alan CT değerleri arasındaki farkın büyük olmaması, çalışmalarda standart sapmanın az olduğunu ve güvenilir bir çalışma yapıldığının göstergesidir.

Bu çalışmanın temel amacı, henüz mekanizması tam olarak çözülemeyen EPS biyosentezinde rol aldığı düşünülen genlerin iki suş için incelenmesidir. Bu kapsamda *L. salvarius* KC27L ve *L. reuteri* KC21L suşları kullanılmıştır. *L. salivarius* ve *L. reuteri* bakterilerinin optimum koşullara göre en fazla EPS ürettikleri fiziksel koşullar belirlendikten sonra çalışmaların moleküler açıdan incelenmesi için bazı genlerin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. *L. salivarius* KC27L suşu için *glikoziltransferaz, epsA, epsC epsD, flippaz* ve *oligosakkarit flippaz* genleri; *L. reuteri* KC21L suşu için

glikoziltransferaz, epsA, epsC epsD, flippaz ve *sugar transferaz* genleri seçilerek analiz gerçekleştirilmiştir. EPS biyosentezinde görevli olduğu düşünülen bu genlerin, iki tür için birbirinden farklı ekspresyon seviyelerine sahip olduğu görülmüştür.

Kontrol grubuna göre kıyaslanarak ölçülen ekspresyon seviyelerine iki bakteride farklı şekilde yorumlanmıştır. Buna göre;

L. salivarius KC27L bakterisi için, kontrol grubu (MRS besiyerinde EPS üretimi) ve hedef örnek (kombine besiyerinde EPS üretimi) için yapılan deneylerde referans gen için normalizasyon sağlanmıştır. Kontrol grubuna göre hedef örnekte *epsA, epsD, glikoziltransferaz* ve *flippaz* genlerinin ekspresyon seviyelerinin azaldığı; *epsC* ve *oligosakkarit flippaz* genlerinin ekspresyon seviyelerinin arttığı gözlenmiştir. Özellikle *epsC* geninin ekspresyon seviyesinin ciddi artışı dikkat çekmektedir. Bu bağlamda *L. salivarius* KC27L bakterisinde EPS biyosentezinde *epsC* ve *oligosakkarit flippaz* genlerinin önemli bir rol oynadığı anlaşılmaktadır. EPS biyosentezinde rol oynadığı düşünülen iki gen kümesi bulunmaktadır. Polisakkarit oluşumunu destekleyen (glikosiltranferazlar, Wzx veya flippase, Wzy veya polimeraz ve EpsA) genlerden oligosakkarit flippaz bu gen kümesine aittir. Diğer gen kümesi ise polisakkarit oluşumu için fosfor düzenleyici sistem (EpsB, EpsC ve EpsD) ile gerçekleştirmektedir. *epsC* geni ise bu gruba dahil olmaktadır. *L. salivarius* için bu iki gen kümesine ait diğer genler de incelenmiştir. Fakat ekspresyon seviyelerinde herhangi bir artış görülememiştir. Bu durum, daha önce üstünde durulduğu gibi, bakteriden bakteriye ve suştan suşa bu biyosentez yolağının farklılığını destekler niteliktedir. Bu genlerin KC27L bakterisinde bulunduğu fakat EPS biyosentez yolağında fiziksel faktörlerden farklı bir şekilde rol oynadığı düşünülmektedir.

L. reuteri bakterisi için, kontrol grubu (MRS besiyerinde EPS üretimi) ve hedef örnek (kombine besiyerinde EPS üretimi) için yapılan deneylerde referans gen için normalizasyon sağlanmıştır. Kontrol grubuna göre hedef örnekte *epsA, epsC, epsD, glikoziltransferaz, flippaz* ve *oligosakkarit flippaz* genlerinin ekspresyon seviyelerinin azaldığı gözlenmiştir. Analiz sonucunda *L. reuteri* KC21L bakterisinde bu genlerin varlığını gösterilmesine rağmen ekspresyon seviyesinin düşmesi, bakterinin EPS ürettiği zamanda bu genlerin ekspresyonunun artmadığı düşünülmüştür. Bakteri EPS biyosentezi yaparken, belirtilen iki temel gen ailesi üyelerinden diğer genleri veya heteropolimerik ve

karmaşık bir gen kümesine ait olan diğer genleri kullanma olasılığı olabilir. EPS biyosentezi için aktif rol oynayan ve gen ekspresyonunu arttırıcı bölgelerin belirlenmesi amacıyla daha kapsamlı gen ekspresyon analizi veya transkriptomik çalışmaları yapılmalıdır.

Bu çalışmada kullanılan genlerden glukoziltransferaz geni, homopolisakkaritlerin sentezi için gereklidir. Kaynak araştırması bölümünde belirtildiği üzere EPSA, EPSC, EPSD ve flippaz genleri ise heteropolisakkaritlerin sentezi için gereklidir. Aynı zamanda heteropolisakkaritlerin sentezinde kullanılan bazı sentez yolları (örneğin Wzy'ye bağlı biyosentez yolu) ile homopolisakkaritlerin hücre dışı sentezi için gerekli gen kümeleri (UDP glikoz) koordineli olarak çalışmaktadır. Dolayısıyla pek çok gen birbiri üzerinde etkili olmaktadır. Pek çok çalışmada genler için mRNA düzeyinde ekspresyon seviyelerinde oldukça farklı sonuçlar elde edilmektedir. Bu farklılığın temelinde, bakterilerin suşları arasındaki genetik yapının değişkenliği bulunmaktadır. Örneğin bakterinin izole edildiği kaynağın vücut sıcaklığı o bakterinin optimal büyüme koşullarını işaret etmektedir. Bu optimal koşullardan uzaklaşılması ile bakteri kendini korumaya alarak biyofilm yapısını oluşturmaktadır (Salas-Jara ve diğerleri, 2016). Bakteriler bu olumsuz fiziksel koşullarda kendini korumak amacıyla biyofilm aktivitelerinden yararlanarak EPS içeren kapsül yapısını oluşturmaktadır (Werning ve diğerleri, 2022). Dolayısıyla bakterinin kendi optimal koşullarından uzaklaşması ile EPS sentez düzeyinde farklılıklar oluşmuştur. *Lactobacillus* cinsi bakterilerin besiyerlerinde pek çok bileşen bulunmaktadır. Çoğaldıkları besiyeri olan MRS, içeriğinde pek çok organik ve inorganik bileşen bulundurmaktadır. Dolayısıyla *Lactobacillus* cinsi bakterilerin gelişimi bazı bakterilere göre daha zordur. Bu da beraberinde fiziksel koşullardaki değişimin, bakterilerdeki gelişim fazlarına etkilerini getirmektedir. Örneğin karbon kaynağındaki değişim bakterinin şeker metabolizmasını etkiler. Böylece EPS'nin sentezi için gerekli gen kümeleri bundan direkt olarak etkilenir. Bunun haricinde inkübasyon süresindeki değişiklik bakterilerin gelişimindeki lag fazı, log fazı, durgunluk ve ölüm fazını doğrudan etkilemektedir. Bakteri için EPS sentezinin gerçekleştiği log fazı ve inkübasyon süresi arasındaki farklılığın bakterilerde EPS sentezinden sorumlu genlerin ekspresyon düzeyinde farklılığa sebep olduğu düşünülmektedir.

Referans örneğin Relative quantification (RQ-bağıl nicelik) değeri 1 olarak kabul edilmektedir. RQ değeri hedef örneğin gen ifadesinin referans örneğinin gen ifadesine göre

kaç kat arttığını veya azaldığını ifade etmektedir (Livak ve diğerleri, 2001). *L. salivarius* bakterisinde *epsC* genini ekspresyonu kontrol örneğine göre 1,6 kat artış göstermiştir. *Oligosakkarit flippaz* geninin ekspresyonu ise kontrol örneğine göre 1,2 kat artış göstermiştir. *epsA* geninin ekspresyonu 0,4 kat, *epsD* geninin ekspresyonu 0,6 kat, *glikoziltransferaz* geninin ekspresyonu 0,4 kat ve *flippaz* geninin ekspresyonu 0,6 kat azalmıştır. *L. reuteri* bakterisinde *glikoziltransferaz* geninin ekspresyonu referans örneğe göre 0,02 kat, *epsA* geninin ekspresyonu 0,2 kat, *epsC* geni ekspresyonu 0,02 kat, *epsD* geni ekspresyonu 0,02 kat, *flippaz* geni ekspresonu 0,01 kat ve *sugar transferaz* geni ekspresyonu 0,05 kat azalmıştır. Elde edilen RQ verileri göreceli şekilde ve güvenilir verilerle analiz yapılmasını sağlamaktadır (Bustin ve diğerleri, 2009).

Bu iki bakteri türü için moleküler düzeyde gen ifadeleri çalışmalarının az yapılmasının ve EPS biyosentez yolağının bakterilerde farklılık göstermesinin dezavantajlı durumları bulunmaktadır. Ancak moleküler olarak çözümlenmesi pek çok avantajı da beraberinde getirebilir. Bu şekilde pek çok alanda kullanılan EPS'lerin henüz bilinmeyen faydalı yönleri keşfedilebilir ve üretimi açısından kolaylık sağlanabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Laktik Asit Bakterileri (LAB) tarafından üretilen ürünler Genel Olarak Güvenli (GRAS) olarak kabul edilmektedirler. Bununla birlikte, LAB tarafından üretilen ekzopolisakkaritler (EPS) prebiyotik olarak değerlendirilmekte ve endüstrinin pek çok alanında, özellikle toksik olmaması nedeniyle, sık kullanılan bir bileşik haline gelmiştir. EPS ile ilgili çalışmalar, EPS sentezini etkileyen faktörlerin, her bakteri suşunda farklı olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla LAB'de EPS üretimi için optimal fiziksel şartların oluşturulması oldukça önemlidir. EPS ile ilgili birçok çalışma yapılmasına rağmen, EPS biyosentezinden sorumlu birçok yolak olmasından dolayı sentez mekanizması tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Moleküler süreçlerin daha iyi anlaşılması için gen ekspresyonu ve ifadelerinin iyi analiz edilmesi gerekmektedir.

Özellikle gıda sektöründe sağlık ve çevresel sürdürülebilirlik açısından probiyotik mikroorganizmaların kullanımı giderek artmıştır. Probiyotik mikroorganizmalar arasında yer alan *L. salivarius* ve *L. reuteri* türleri ürettikleri EPS'ler açısından önem arz etmektedir. Yapılan literatür çalışmalarında farklı bakterilerde farklı fiziksel koşullara bağlı olarak EPS üretim düzeylerinde değişiklik görülmektedir. *L. salivarius* ve *L. reuteri* türleri ile ilgili fiziksel koşulların EPS üretimine etkisi ile ilgili kapsamlı bir çalışma olmaması ve EPS'nin biyolojik yolakları ile ilgili kesin bilgiler olmaması, bakterilerde EPS üretiminden sorumlu genlerle ilgili çalışmalara yoğunlaşılmasına sebep olmuştur. Ayrıca, çeşitli moleküler tekniklerle EPS üretiminin arttırılmasının, endüstriyel ölçekte EPS'nin biyoteknolojik bir ürün olarak hızlı üretiminin yapılmasını sağlayabilecektir.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilen veriler ele alındığında yapılan çıkarımlar aşağıda açıklanmıştır;

1. Bakterilerde fiziksel şartların farklılığı EPS üretim kapasitelerini etkilemektedir.
2. Bakteriler aynı tür bile olsa farklı suşlarda farklı EPS üretim seviyeleri gözlenmektedir.
3. Probiyotik özellikteki KC27L ve KC21L bakterilerinde EPS üretimini arttıran birden fazla fiziksel şartların kombine olarak kullanılması, bakterilerdeki EPS üretimini daha fazla arttırmıştır. Bu farklılık her koşulda aynı korelasyonu göstermemekle birlikte, kullanılan mikroorganizmaya göre farklılık gösterebilmektedir. Optimal değerlerden

uzaklaşılan şartlarda, EPS üretiminin artmasının, bakterinin EPS'yi, kendini korumak amacıyla sentezlediğini düşündürmüştür.

4. KC27L suşunda EPS sentezini daha fazla etkileyen ve sentez miktarını arttıran fiziksel şarlar sırasıyla karbon kaynağı, pH, azot kaynağı, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresi olarak gözlenirken, KC21L suşunda azot kaynağı, pH, inkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı, karbon kaynağı olarak belirlenmiştir.
5. *L. salivarius* KC27L suşunda karbon kaynağı olarak kullanılan galaktoz ve azot kaynağı olarak kullanılan tripton dışındaki tüm parametrelerde konrol grubuna kıyasla daha yüksek miktarda EPS üretilirken, *L. reuteri* KC21L suşunda karbon kaynağı galaktoz, pH 6 ve 7 koşulları dışındaki ortamlarda kontrol grubundan daha yüksek miktarda EPS üretimi tespit edilmiştir. EPS üretimindeki artış ve azalışlar fiziksel koşulların farklılığından kaynaklanmaktadır.
6. Bakterileri geliştirmek amacıyla uygulanan optimum koşullar, bakterinin yaşamsal faaliyetlerinin devam etmesini ve çoğalmasını sağlamaktadır. Bu standart koşullardan uzaklaştıkça bakteriler, hayatta kalmak ve kendisini korumak için çeşitli mekanizmalar oluşturmaktadır. EPS biyosentezi de bunlardan biridir.
7. Farklı fiziksel koşulların tekli ve kombine denemelerinin yapıldığı çalışmamızda, bakterilerin optimum gelişme koşullarının dışındaki ortamlarda EPS üretimlerini arttırdıkları görülmektedir. Bu durumun, farklı otam koşullarında bakterilerin hayatta kalabilmek amacıyla savunma mekanizma oluşturmalarından kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır.
8. Birçok alanda ham madde olarak kullanılma potansiyeline sahip EPS'lerin fiziksel şartlara bağlı olarak oluşturulan şartlarda, endüstriyel olarak daha fazla üretimi yapılabilir. Ancak, mikroorganizma seçimine göre bu parametreler farklılık gösterebileceği için detaylı bir çalışmaların yapılması gerekmektedir.
9. EPS ile ilgili henüz tam olarak açıklanamamış biyokimyasal yolaklarda yer alan genlerin, RT-PCR deneyleri ile ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. Bu analiz doğrultusunda tam olarak ortaya konulamamış olan biyolojik yolakların detaylı çalışmalarla birlikte açıklanabileceği öngörülmüştür.
10. Gen ekspresyon sonuçlarına göre *L. salivarius* kombine örneğinde *epsC* ve *oligosakkarit flippaz* genlerine ait ekspresyon seviyeleri, kontrol grubuna göre artış göstermiştir. *Glikoziltransferaz*, *epsA*, *epsD* ve *flippaz* genlerinin ekspresyon seviyeleri ise kontrol grubuna göre azalmıştır. *L. salivarius* bakterisi için en fazla ekspresyonu artan gen *epsC* geni olmuştur. Çalışmamızda araştırılan genler

haricindeki diğer genlerin de araştırılması, EPS biyosentez yolaklarının anlaşılması bakımından önemli olacaktır.

11. *L. reuteri* KC21L suşunda altı gen için ekspresyon seviyeleri incelendiğinde *glukoziltransferaz, epsA, epsC, epsD, flippaz* ve *sugar transferaz* genlerinin ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre azalmıştır. Bu bakteri için EPS biyosentezinden sorumlu olduğu düşünülen farklı gen gruplarının çalışılması gerekmektedir.
12. EPS ile ilgili henüz tam olarak açıklanamamış biyokimyasal yolaklarda yer alan genlerin belirlenebilmesi amacıyla, bu çalışmanın temel niteliğinde olabileceği düşünülmektedir. Çeşitli transkriptomik analizlerle belirlenen genler, qPCR deneyleri ile test edilerek CRISPR metodu gibi moleküler tekniklerle daha hızlı ve kolay şekilde üretimleri arttırılabilir ve endüstriyel kullanıma açılabilir.
13. Üretim kapasitesi arttırılan EPS'lerin ticari açıdan önemli bir biyoteknolojik ürün (prebiyotik katkı gibi) haline getirilebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abarquero, D., Renes, E., Fresno, J.M. and Tornadijo, M.E. (2021). Study of exopolysaccharides from lactic acid bacteria and theirindustrial applications: A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 2022(57), 16–26.

Abdalla, A.K., Ayyash, M.M., Olaimat,.N., Osaili, T.M., Al-Nabusi, A.A., Shah, N.P. and Holley, R. (2021). Exopolysaccharides as Antimicrobial Agents: Mechanism and Spectrum of Activity. *Frontiers in Microbiology*, 12,664395.

Adeola F. (2018) Normalization of Gene Expression by Quantitative RT-PCR in Human Cell Line: comparison of 12 Endogenous Reference Genes. *Ethiopian Journal of Health Sciences*., 28(6), 741-748.

Aakef, J. N. A. and Yüksekdağ, Z. (2023). Determination of some biological activities of yeast derived synbiotic and postbiotic+prebiotic applications. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 8(1), 51-61.

Ahmad, W., Nasir, A., Sattar, F., Ashfaq, I., Chen, M. H., Hayat, A., Rehman, M. U., Zhao, S., Khaliq, S., Ghauri, M. A., and Anwar, M. A. (2021). Production of bimodal molecular weight levan by a *Lactobacillus reuteri* isolate from fish gut. *Folia Microbiologica*. 67(1), 21-31.

Ale, E. C., Batistela, V. A., Olivar, C. G., Ferrado, J. B., Sadiq, S., Ahmed, H. I., Reinheimer, J. A., Vera-Candioti, L., Laws, A. P., Binetti, A. G. (2020). Statistical optimisation of the exopolysaccharide production by *Lactobacillus fermentum* Lf2 and analysis of its chemical composition. *International Journal of Dairy Technology*, 73, 76-87.

Angelin, J. and Kavitha, M. (2020). Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162,853–865.

Ayivi, R.D., Ibrahim, S.A. (2022). Lactic acid bacteria: An essential probiotic and starter culture for the production of yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, 57, 7008–7025.

Badel, S., Bernardi, T., and Michaud, P. (2011). New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29, 54-66.

Barreto, M., Jedlicki, E., and Holmes, D.S. (2005). Identification of a gene cluster for the formation of extracellular polysaccharide precursors in the chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 8.

Benhadria, M.K., Touil, M.A.T. and Meddah, B. (2017). Optimization of production of Microbial Exopolysaccharides (EPS) with essential oils from two medicinal plants. *Journal of Applied Biosciences*, 111, 10925-10933.

Bibi, A., Xiong, Y., Rajoka, M. S. R., Mehwish, H. M., Radicetti, E., Umair, M., Shoukat, M., Khan, M. K. I., Aadil, R. M. (2021). Recent advances in the production of exopolysaccharide (EPS) from *Lactobacillus* spp. and its application in the food ındustry: A Review. *Sustainability*, 13, 12429.

Bikric, S., Aslim, B., Dincer, İ., Yuksekdag, Z., Ulusoy, S., and Yavuz, S. (2021). Characterization of Exopolysaccharides (EPSs) obtained from *Ligilactobacillus salivarius* strains and ınvestigation at the prebiotic potential as an alternative to plant prebiotics at poultry. *Probiotics Antimicrobial Proteins*, 14(1),49-59.

Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria: Their applications in foods. *Journal of Bacteriology and Mycology*, 5(2),1-5.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-22.

Celik, K. (2018). *Tavuk Dışkısından İzole Edilen Laktik Asit Bakterileri Ekzopolisakkaritlerinin Antioksidan Ve Antibiyofilm Aktiviteleri*. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

Ciszek-lenda, M., Nowak, B., and Małgorzata, S. (2011). Immunoregulatory potential of exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* KL37. *Effects on the Production of Inflammatory Mediators by Mouse Macrophages*, 382-391.

Cury, J.A., Seils, J., Koo, H. (2008). Isolation and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* in suspension cultures and biofilms, *SciElo Brazil*, 22(3), 216-222.

Dan, T., Fukuda, K., Sugaı-Bannaı, M., Takakuwa, N., Motoshıma, H., Urashıma, T. (2009). Characterization and expression analysis of the exopolysaccharide gene cluster in *Lactobacillus fermentum* TDS030603. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(12),2656–2664.

Dec, M., Stępień-Pyśniak, D., Puchalski, A., Hauschild, T., Pietras-Ożga, D., Ignaciuk, S., & Urban-Chmiel, R. (2021). Biodiversity of *Ligilactobacillus salivarius* strains from poultry and domestic pigeons. *Animals (Basel)*, 11(4), 972.

Dertli, E., Mercan, E., Arıcı, M., Yılmaz, M.T., Sağdıç, O. (2016). Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 116-124.

De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgem, F., and Degeest, B. (2001). Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 687-707.

DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.

Enkhtur, B. (2021). *Fermente Gıdalardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritlerin Karakterizasyonu*. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun.

Ergene, E. and Avcı, A. (2018). Effects of cultural conditions on exopolysaccharide production by *Bacillus* sp. ZBP4. *Journal of Agricultural Sciences*, 24 (3), 386-393.

Ermiş, E., Poyraz, E. Dertli, E. and Yılmaz, M.T. (2019). Optimization of exopolysaccharide production of *Lactobacillus brevis* E25 using RSM and characterization. *Sakarya University Journal of Science*, 24(1), 151-160.

Farrar, J.S., Wittwer, C.T. (2017). High-Resolution melting curve analysis for molecular diagnostics. *Academic Press*, 6, 79-102.

Florou-Paneri, P., Christaki, E. and Bonos, E., (2013). Lactic acid bacteria as source of functional ingredients. *R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, 25, 589-614.

Freitas, F., Alves, V.D., and Reis, M.A.M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 29, 388-398.

Guerin, M., Silva, C. R. D., Garcia, C., Remize, F. (2020). Lactic acid bacterial production of exopolysaccharides from fruit and vegetables and associated benefits. *Fermentation*, 6(4), 115.

Guerrero Sanchez, M., Passot, S., Campoy, S., Olivares, M., and Fonseca, F. (2022). *Ligilactobacillus salivarius* functionalities, applications, and manufacturing challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106, 57-80.

Gürgün, H. ve Halkman, A. K. (1990). *Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri* (İkinci Baskı). Türkiye: Gıda Teknolojisi Derneği, 7-20.

Harris, H.M.B., Bourin, M.J.B., Claesson, M.J. and O'Toole, P.W. (2017). Phylogenomics and comparative genomics of *Lactobacillus salivarius*, a mammalian gut commensal. *Microbial Genomics*, 3, 1-16.

Hatti-Kaul, R., Chen, L., Dishisha, T., and Enshasy, H. E. (2018). Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals. *FEMS Microbiology Letters*, 365,20.

Heckmann, LH., Sørensen, PB, Krogh, PH ve Sorensen, J.G. (2011). NORMA-Gene: A simple and robust method for qPCR normalization based on target gene data. *BMC Bioinformatics*, 12,250.

Hussein, M.D.M., Ghaly, M.F., Osman, M.Y., Shalaby, A.G. and Helal, M.M. (2015). Production and prebiotic activity of exopolysaccharides derived from some probiotics. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 14,1-9.

Hruz, T., Wyss, M., Docquier, M., Pfaffl, M.W., Masanetz, S., Borghi, L., Verbrugghe, P., Kalaydjieva, L., Bleuler, S., Laule, O., Descombes, P., Gruissem W. & Zimmermann P. (2011). RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization. *BMC Genomics*, 12, 156.

Islam, S. T., and Lam, J. S. (2014). Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway. *Canadian Journal of Microbiology*, 60(11),697–716.

Ismail, B., and Nampoothiri, K. M. (2010). Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. *Archives of Microbiology*, 192(12), 1049-1057.

İspirli, H. and Dertli, E. (2017). Isolation and characterisation of lactic acid bacteria from traditional koumiss and kurut. *International Journal of Food Properties*, 20(3), 2441-2449.

Jiang, J., Li, K., Xiao, Y., Zhong, A., Tang, J., Duan, Y., and Li, Z. (2022). *Limosilactobacillus reuteri* regulating intestinal function: A review. Fermentation, 9(1), 19.

Jurášková, D., Ribeiro, S.C. Silva, C.C.G. (2022). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: From biosynthesis to health-promoting properties. *Foods*, 11, 156.

Karadeniz, D. G., Kaskatepe, B., Kiymaci, M. E., Tok, K. C., Gumustas, M., and Karaaslan, C. (2021). Microbial exopolysaccharide production of *Streptococcus thermophilus* and its antiquorum sensing activity. *Archives of Microbiology*, 203(6),3331–3339.

Karlen, Y., McNair, A., Perseguers, S., Mazza, C., Mermod, N. (2007). Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*. 2, 08-131.

Kleerebezem, M. and Hugenholtz, J. (2003). Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(2), 232-237.

Korcz, E., Varga, L. (2021). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food ındustry. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 375–384.

Laura, M., Notararigo, S., Ncher, M., de Palencia, P.F., Aznar, R., and Lpez, P. (2012). Biosynthesis, purification and biotechnological use of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Food Additive*. https://doi.org/10.5772/32412.

Li, J. and Wang, N. (2012). The gpsX gene encoding a glycosyltransferase is important for polysaccharide production and required for full virulence in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *BMC Microbiology*, 12, 31.

Livak, K., Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitation PCR and the 2-CT Method. *Methods*, 25, 402-408.

Lynch, K. M., Zannini, E., Coffey, A., Arendt, E. K. (2018). Lactic acid bacteria exopolysaccharides in foods and beverages: Isolation, properties, characterization, and health benefits. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9, 155-176.

Madhuri, K.V. and Vidya Prabhakar, K. (2014). Microbial exopolysaccharides: Biosynthesis and potential applications. *Oriental Journal of Chemistry*, 30, 1401-1410,

Marshall, V. M., and Rawson, H. L. (1999). Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, 34(2), 138-139.

Mıdık, F., Tokatlı, M., Bağder Elmacı, S. and Ozcelik, F. (2020). Influence of different culture conditions on exopolysaccharide production by indigenous lactic acid bacteria isolated from pickles. *Archives of Microbiology*, 202,875-885.

Moghannem, S. A. M., Farag, M. M. S., Shehab, A. M., and Azab, M. S. (2018). Exopolysaccharide production from *Bacillus velezensis* KY471306 using statistical experimental design. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(3), 452-462.

Mu, Q., Tavella, V. J., and Luo, X. M. (2018). Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases. *Frontiers in Microbiology*, 19(9), 757.

Nguyen, P. T., Nguyen, T. T., Bui, D. C., Hong, P. T., Hoang, Q. K. and Nguyen, H. T. (2020). Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: The manipulation of environmental stresses for industrial applications. *AIMS Microbiology*, 6(4),451–469.

Nguyen, P.T., Nguyen, T.T., Nguyen, T.T.U., Hoang, Q.K. and Nguyen, H.T. (2021). Improve the viability and extracellular polymeric substances bioactivity of *Lactiplantibacillus plantarum* VAL6 using the environmental adaptation. *Food and Bioproducts Processing*. 131,149-155.

Nicholson, P., Rawiwan, P., Surachetpong, W. (2018). Detection of tilapia lake virus using conventional RT-PCR and SYBR Green RT-qPCR. *Journal of Visualized Experiments, 10*(141).

Niederau, C., Craveiro, R.B., Azraq, I. & Brockhaus, J., & Bastian, A., & Kirschneck, C., Michael, W. (2020). Selection and validation of reference genes by RT-qPCR for murine cementoblasts in mechanical loading experiments simulating orthodontic forces *in vitro*. *Scientific Reports*. 10(1).

Ninomiya, K., Matsuda, K., Kawahata, T., Kanaya, T., Kohno, M., Katakura, Y., Asada, M., and Shioya, S. (2009). Effect of CO_2 concentration on the growth and exopolysaccharide production of *Bifidobacterium longum* cultivated under anaerobic conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(5),535–537.

Oerlemans, M.M.P., Akkermann, R., Ferrari, M., Walvoort, M.T.C., Vos, P. (2021). Benefits of bacteria-derived exopolysaccharides on gastrointestinal microbiota, immunity and health. *Journal of Functional Foods*, 76, 104289.

Palaniraj, A. and Jayaraman, V. (2011). Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Food Engineering*, 106(1), 1-12.

Papagianni, M. (2012). Metabolic engineering of lactic acıd bacteria for the production of industrially important compounds, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 3(4).

Patel, S., Majumder, A., and Goyal, A. (2012). Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Indian Journal of Microbiology*, 52, 3-12.

Patten, D.A., and Laws, A.P. (2015). *Lactobacillus*-produced exopolysaccharides and their potential health benefits: A review. *Beneficial Microbes*, 6, 457-471,

Péant, B., LaPointe, G., Gilbert, C., Atlan, D., Ward, P., Roy, D. (2005). Comparative analysis of the exopolysaccharide biosynthesis gene clusters from four strains of *Lactobacillus rhamnosus*. *Microbiology*, 151(6),1839-1851.

Pfaffl, M. W., and Hageleit, M. (2001). Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters*, 23(4), 275-282.

Prete, R., Alam, M.K., Perpetuini, G., Perla, C., Pittia, P., and Corsetti, A. (2021). Lactic acid bacteria exopolysaccharides producers: A sustainable tool for functional foods. *Foods*, 10(7), 1653.

Raman, J., Kim, J.-S., Choi, K.R., Eun, H., Yang, D., Ko, Y.-J., Kim, S.-J. (2022). Application of lactic acid bacteria (LAB) in sustainable agriculture: Advantages and limitations. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7784.

Rehm, B.H.A. (2010). Bacterial polymers: Biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 578-592.

Ripari, V. (2019). Techno-functional role of exopolysaccharides in cereal-based, yogurt-like beverages. *Beverages*, 5(1), 16.

Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., and Wittwer, C. T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 245(2), 154-160.

Ruas-Madiedo, P., and De Los Reyes-Gavilán, C.G. (2005). Invited review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 88, 843-856.

Sabir, F., Beyatli, Y., Cokmus, C., and Onal-Darilmaz, D. (2010). Assessment of potential probiotic properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., and *Pediococcus* spp. strains isolated from kefir. *Journal of Food Science*, 75(9),568–573.

Sağlam, H. ve Karahan, A.G. (2017). Laktik Asit Bakterilerinin Plazmidleri ve Bunların Özellikleri. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(2), 252-285.

Sakr, E.A.E., Massoud, I.M. and Ragaee, S. (2021). Food wastes as natural sources of lactic acid bacterial exopolysaccharides for the functional food industry: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 189, 232-241.

Salas-Jara MJ, Ilabaca A, Vega M, García A. (2016). Biofilm Forming *Lactobacillus*: New Challenges for the Development of Probiotics. *Microorganisms*, 4(3), 35.

Sanalibaba, P., and Cakmak, G.A. (2016). Exopolysaccharides production by lactic acid bacteria. *Applied Microbiology*, 2,2.

Sanhueza, E., Paredes-Osses, E., González, C. L., and García, A. (2015). Effectof pH in the survival of *Lactobacillus salivarius* strain UCO_979C wild typeand the pH acid acclimated variant. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5,343–346.

Schillinger, U., Holzapfel, W. H. and Björkroth, K. J. (2006). Lactic acid bacteria. Food spoilage microorganisms. *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, 122, 541-578.

Schmid, J., Sieber, V., and Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: Biosynthesis pathways and engineering strategies. *Frontiers in Microbiology*, 6.

Shi T, Aryantini NP, Uchida K, Urashima T, Fukuda K. (2014). Enhancement of Exopolysaccharide Production of *Lactobacillus fermentum* TDS030603 by Modifying Culture Conditions. *Biosci Microbiota Food Health*, 33(2), 85-90.

Silva, L.A., Lopes Neto, J.H.P., and Cardarelli, H.R. (2019). Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*: Technological properties, biological activity, and potential application in the food industry. *Annals of Microbiology*, 69, 321–328,

Singh, P., Saini, P. (2017). Food and health potentials of exopolysaccharides derived from Lactobacilli. *Microbiology Research Journal International*, 22(2), 1–14.

Soumya, M. P., and Nampoothiri, K. M. (2021). An overview of functional genomics and relevance of glycosyltransferases in exopolysaccharide production by lactic acid bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 184, 1014-1025.

Sørensen, H.M., Rochfort, K.D., Maye, S., MacLeod, G., Brabazon, D., Loscher, C., Freeland, B. (2022). Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Production, purification and health benefits towards functional food. *Nutrients*, 14, 2938.

Strasser, S., Neureiter, M., Geppl, M., Braun, R., and Danner, H. (2009). Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1), 168.

Sun, X. and Zhang, J. (2021). Bacterial exopolysaccharides: Chemical structures, gene clusters and genetic engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 173, 481-490.

Sutherland, I.W. (2001). Microbial polysaccharides from gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 663-674.

Tkáčiková, Ľ., Mochnáčová, E., Tyagi, P., Kiššová, Z., and Bhide, M. (2020). Comprehensive mapping of the cell response to *E. coli* infection in porcine intestinal epithelial cells pretreated with exopolysaccharide derived from *Lactobacillus reuteri*. *Veterinary Research*, 51(1), 49.

Torino, M. I., Hébert, E. M., Mozzi, F., and Font de Valdez, G. (2005). Growth and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in an adenine-supplemented chemically defined medium. *Journal of Applied Microbiology*, 99(5), 1123–1129.

Uzundağ, D., Yuksekdag, Z. and Uludağ, M. (2020). *Lactobacillus* cinsi bakterilerin liyofilize ekzopolisakkaritlerinin bifidobakterilerin gelişimini düzenleyici etkisinin belirlenmesi. *The Journal of Food*, 45(3), 496-505.

Velikova, P., Petrov, K., Lozanov, V., Tsvetanova, F., Stoyanov, A., Wu, Z., Liu, Z. and Petrova P. (2018). Microbial diversity and health-promoting properties of the traditional Bulgarian yogurt. *Biotechnology and Biotechnological Equipments*, 32(3),1-13.

Vuyst, L.D., Weckx, S., Ravyts, F., Herman, L.M., and Leroy, F. (2011). New insights into the exopolysaccharide production of *Streptococcus thermophilus*, *International Dairy Journal*, 21, 586-591.

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

Werning ML, Hernández-Alcántara AM, Ruiz MJ, Soto LP, Dueñas MT, López P, Frizzo LS. (2022). Biological Functions of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria and Their Potential Benefits for Humans and Farmed Animals. *Foods*, 11(9), 1284.

Wu, J., Han, X., Ye, M., Li, Y., Wang, X. and Zhong, Q. (2022). Exopolysaccharides synthesized by lactic acid bacteria: Biosynthesis pathway, structure-function relationship, structural modification and applicability, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 25, 1-22.

Xu, Y., Cui, Y., Yue, F., Liu, L., Shan, Y., Liu, B., Zhou, Y., Lü, X. (2019). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and Bifidobacteria: Structures, physiochemical functions and applications in the food industry. *Food Hydrocolloids*, 94, 475–499.

Yi, Y., Huang, W. and Ge, Y. (2008). Exopolysaccharide: A novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 1061.

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

Zayed, A., Mansour, M. K., Sedeek, M. S., Habib, M. H., Ulber, R., & Farag, M. A. (2021). Rediscovering bacterial exopolysaccharides of terrestrial and marine origins: novel insights on their distribution, biosynthesis, biotechnological production, and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29,1-21.

Zehir Şentürk, D., Uçar, T., Şimşek, Ö. (2022). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and their therapeutic effects. *Akademik Gıda*, 20(4), 412-429.

Zeidan, A. A., Poulsen, V. K., Janzen, T., Buldo, P., Derkx, P., Øregaard, G., & Neves, A. R. (2017). Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 1(41), 168–200.

Zhang, Y., S. Li, C. Zhang, Y. Luo, H. Zhang, and Z. Yang. (2011). Growth and exopolysaccharide production by *Lactobacillus fermentum* F6 in skim milk. *African Journal of Biotechnology*, 10(11), 2080-2090.

Zeidan, A. A., Poulsen, V. K., Janzen, T., Buldo, P., Derkx, P., Øregaard, G., & Neves, A. R. (2017). Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 1(41), 168–200.

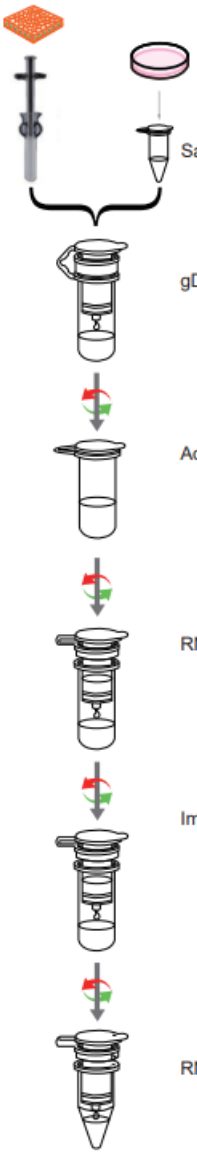
Zhou, Y., Cui, Y., Qu, X. (2019). Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review. *Carbohydrate Polymers*, 207, 317-332.

Zivkovic, M., Miljkovic, M., Ruas-Madiedo, P., Strahinic, I., Tolinacki, M., Golic, N., and Kojic, M. (2015). Exopolysaccharide production and ropy phenotype are determined by two gene clusters in putative probiotic strain *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(4), 1387–1396.

EKLER

EK-1. FastPure ® Cell/Tissue Total RNA Isolation Kiti (Vazyme)

07/Mechanism & Workflow



Sample lysis: Add 500 µl Buffer RL

gDNA removal: Transfer the lysate to a FastPure gDNA-Filter Columns III and centrifuge at 12,000 rpm (13,400 × g) for 30 sec. **Collect the filtrate**.

Adjust the binding environment: Add absolute ethanol (0.5 × the volume of filtrate) to the filtrate and mix thoroughly.

RNA adsorption: Transfer the mixture into FastPure RNA Columns III and centrifuge at 12,000 rpm (13,400 × g) for 30 sec. **Discard the filtrate**.

Impurities removal: Add 700 µl Buffer RW1 to the FastPure RNA Columns III and centrifuge at 12,000 rpm (13,400 × g) for 30 sec. Discard the filtrate.
Add 700 µl Buffer RW2 (with absolute ethanol added) to the FastPure RNA Columns III and centrifuge at 12,000 rpm (13,400 × g) for 30 sec. Discard the filtrate.
Add 500 µl Buffer RW2 (with absolute ethanol added) to the FastPure RNA Columns III and centrifuge at 12,000 rpm (13,400 × g) for 30 sec. Discard the collection tube.

RNA elution: Add 50 - 200 µl RNase-free ddH_2O to the FastPure RNA Columns III and centrifuge at 12,000 rpm (13,400 × g) for 1 min.

EK-2. smART First Strand cDNA Synthesis Kiti (EURx)

EURx® MOLECULAR BIOLOGY PRODUCTS

smART First Strand cDNA Synthesis Kit

Cat. No.	size
E0804-01	2 000 U (10 reactions)
E0804-02	10 000 U (50 reactions)
E0804-03	4 x 10 000 U (200 reactions)

smART Unit Definition:

One unit incorporates 1 nmol of TTP into acid precipitable material in 10 min at 37°C using poly(A): oligo dT as a template: primer (1).

Storage Conditions: Store at -20°C.

Concentration: 200 U/µl

Quality Control:

All preparations are assayed for contaminating endonucleases, exonucleases, nonspecific RNases, single- and double-stranded DNase activities.

References:

1. *Houts, G.E., Masakau, M., Ellis, C., Beard, D. and Beard,J.W. (1979) J. Virol. 29, 517-522.*

smART First Strand cDNA Synthesis Kit is a complete system for efficient synthesis of first strand cDNA. Kit consists of smART Reverse Transcriptase with reduced RNase H activity, increased thermostability and processivity. smART Reverse Transcriptase acts as a DNA polymerase that uses single-stranded RNA, DNA, or an RNA-DNA hybrid (using a primer) to synthesize a complementary DNA strand. smART is used for the preparation of cDNA libraries or for first strand cDNA synthesis for use in RT-PCR and RT-qPCR reactions.

Description:

- Reduced RNase H activity.
- Increased thermal stability in the range of 37°C to 65°C.
- Downstream application: PCR and qPCR.
- Ideal for cloning and diagnostic purposes targets up to 7kb.

COMPONENT:	E0804-01	E0804-02
smART (200 U/µl)	10 µl	50 µl
5 x cDNA Buffer	100 µl	500 µl
0.1 M DTT	50 µl	250 µl
Oligo $(dT)_{20}$ (50 µM)	10 µl	50 µl
Random hexamers (200 ng/µl)	10 µl	50 µl
10 mM dNTPs Mix	10 µl	50 µl
RNase Inhibitor (50 U/µl)	5 µl	25 µl
RNase-free Water	200 µl	1 ml

EK-3. HOT FIREpol Eva Green qPCR Supermix 5X (Solis BIODYNE)

SOLIS BIODYNE

Data Sheet

HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix, 5x

Cat. No.	Pack Size	20 µl rxn
08-36-0000S	0.2 ml	50
08-36-00001	1 ml	250
08-36-00001-5	5 x 1 ml	1250
08-36-00001-10	10 x 1 ml	2500
08-36-00020	20 ml	5000

For *in vitro* use only

Description:
HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix is a 5x-concentrated ready-to-use solution for real time quantitative PCR assays, incorporating EvaGreen® dye. It comprises all the components necessary, excluding the template and primers, to perform highly sensitive qPCR.
HOT FIREPol® DNA Polymerase is activated by a 12 min incubation step at 95°C. The hot-start mechanism prevents the extension of non-specifically annealed primers and primer-dimers formed at low temperatures during qPCR setup.

Applications:
- Detection and quantification of DNA and cDNA targets
- Profiling gene expression
- Microbial detection
- Viral load determination

Mix Composition:
- **HOT FIREPol® DNA Polymerase**
- **Optimized buffer**
- **12.5 mM $MgCl_2$**
  1x PCR solution – 2.5 mM $MgCl_2$
- **dNTPs, including dUTP**
  The mix allows UNG treatment to prevent carryover contamination from previous PCR runs.
  IMPORTANT: UNG is not included in the HOT FIREPol® EvaGreen® Supermix and should be purchased separately.
- **EvaGreen® dye***
- **Internal reference based on ROX dye****
- **GC-enhancer**
- **Blue visualisation dye**

Shipping and Storage conditions:
Routine storage: -18°C to -28°C
Shipping and temporary storage for up to 1 month at room temperature has no detrimental effects on the quality of the product.

Manufactured by Solis BioDyne in compliance with the ISO 9001 and ISO 13485 certified Quality Management System.

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

Benefits:
- Highly specific and reproducible real time PCR
- Superior performance with GC-rich templates
- Blue visualisation dye for easy pipetting
- Excellent efficiency in case of low copy number targets
- UNG treatment capability due to dNTP blend of dUTP/dTTP
- Reaction set-up at room temperature
- Wide instrument compatibility independent of ROX requirement (except capillary)***.

Recommended qPCR reaction mix:

Component	Volume	Final conc.
HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (5x)	4 µl	1x
Forward primer (10 µM)	0.2–0.4 µl	100–200 nM
Reverse primer (10 µM)	0.2–0.4 µl	100–200 nM
OPTIONAL: UNG[1] (Uracil-N-glycosylase)	Variable	Variable[1]
DNA template	Variable	Variable[2]
H_2O PCR grade	up to 20 µl	
Total	**20 µl**	

[1] Please add UNG according to manufacturer's specification.

[2] Conc. of cDNA 0.1 pg/µl–10 ng/µl; gDNA 10 pg/µl–4 ng/µl

Recommended qPCR cycling protocol:

Cycle step	Temp.	Time	Cycles
OPTIONAL: UNG treatment[3]	Variable[3]	Variable[3]	1
Initial activation[4]	**95°C**	**12 min**	1
Denaturation	95°C	15 s	40
Annealing[5]	60°–65°C	20–30 s[6]	
Extension	72°C	20–30 s[6]	

[3] **OPTIONAL!** Add UNG treatment step ONLY if UNG enzyme is added in the reaction mix for carryover contamination removal. Use UNG according to manufacturer's specification.

[4] To activate the polymerase, include an incubation step **at 95°C for 12 minutes** at the beginning of the qPCR cycle.

[5] The annealing temperature (Ta) depends on the melting temperature (Tm) of the primers. A Ta that is about 2 to 5°C lower than the Tm of the primers is generally suitable. Performing temperature gradient is recommended.

[6] Use 20 sec for annealing and extension for templates shorter than 150 bp. For templates longer than 150 bp, the annealing and extension time may be increased to 30 sec.

Solis BioDyne
Teaduspargi 9, 50411 Tartu, Estonia, tel: +372 740 9960, fax: +372 740 2079, e-mail: info@solisbiodyne.com, www.solisbiodyne.com



Gazili olmak ayrıcalıktır