



T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**PROBİYOTİK *LACTOBACILLUS PLANTARUM* BHC03 SUŞUNUN
SİDEROFORLARININ SAFLAŞTIRILMASI, TANILANMASI VE
BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİ İLE İLİŞKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nazlıcan COŞGUN

Danışman: Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELİ

TOKAT-2023



**Tez çalışması;
Gaziosmanpaşa Üniversitesi tarafından 2020/108 numaralı proje ile
desteklenmiştir.**

TEZ KABUL EVRAĞI



ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELİ danışmanlığında hazırlamış olduğum “Probiyotik *Lactobacillus plantarum* BHC03 Suşunun Sideroforlarının Saflaştırılması, Tanılanması ve Bazı Probiyotik Özellikleri ile İlişkilerinin İncelenmesi” adlı Yüksek Lisans tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

12/01/2023

NAZLICAN COŞGUN

ÖZET

PROBİYOTİK *LACTOBACILLUS PLANTARUM* BHC03 SUŞUNUN SİDEROFORLARININ SAFLAŞTIRILMASI, TANILANMASI VE BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİ İLE İLİŞKİLERİNİN İNCELENMESİ

Nazlıcan COŞGUN

Yüksek Lisans, Biyomühendislik ABD.

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELİ

Ocak 2023, 130 sayfa

Bu çalışmada siderofor üreticisi mikroorganizmalar laboratuvar kültür koleksiyonundan kullanılmış %92 oranında en yüksek siderofor üretim verimi gösterdiği belirlenen suş, 16S rRNA dizi analizi ile *Lactobacillus plantarum* olduğu tanılanmış ve *L. plantarum* BHC03 olarak adlandırılmıştır. Ardından *L. plantarum* BHC03 suşu için siderofor üretim optimizasyonu yapılmıştır ve sırasıyla en yüksek siderofor üretimi; 37 C’de, pH 7’de, FeCl₃ ilavesinin yapılmadığı ortamda ve azot kaynağı olarak maya ekstresi, karbon kaynağı olarak ise maltoz kullanılarak tayin edilmiştir. Başlangıç siderofor üretimi %92 oranında olan *L. plantarum* BHC03 suşu için yapılan optimizasyon sonrası %5 oranında arttırılarak %97 olarak gerçekleştirilmiştir. Optimize edilen koşullar kullanarak büyük ölçekli siderofor üretimi gerçekleştirilmiş ve liyofilizasyon işlemi yapılarak saflaştırma işlemi için konsantre hale getirilmiştir. Ekstraselüler olarak üretilen siderofor sephadex LH-20 dolgu maddesi kullanılarak boyut dışlama kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma işleminin ardından toplanan fraksiyonlar siderofor varlığının tayin edilmesi ve karakterizasyonu için sırasıyla TLC kromatografisi, FT-IR, HPLC ve ¹H-NMR analizleri yapılmıştır. Yapılan analizlerin sonucunda toplanan fraksiyonlar içerisindeki 3 ve 5 numaralı fraksiyonun katekolat tipi siderofor içerdiği belirlenmiş ve katekolat tipi sideroforun *L. plantarum* BHC03 suşunun probiyotik özellikleri üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Yapılan in vitro testlerin sonucunda; *L. plantarum* BHC03 suşunun % 0.5 fenol toleransı, % 0.3 safra tuzu toleransı ve %8 NaCl toleransı olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte pH 2.5'a kadar direnç göstermiş ve hemolitik aktivitelerinin olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca % 92 oranında otoagregasyon ve %93 oranında hidrofobisite yeteneklerinin olduğu bulunmuştur. *L. plantarum* BHC03 suşunun streptomycin, gentamicin ve levoflovacin'e karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Sideroforların kolesterol asimilasyonu üzerinde pozitif etkisinin olduğu ve bakterinin kolesterol asimilasyon yeteneğini arttırdığı belirlenmiştir. Bununla birlikte sideroforların probiyotiklerin bakteriyosin aktivitesi üzerinde pozitif etkilerinin olduğu ve hemolitik aktiviteyi etkilemediği tespit edilmiştir. Yapılan in vitro testlerin sonucunda *L. plantarum* BHC03 suşunun probiyotik bakteri olarak kabul edilebilmesi için gerekli şartları taşıdığı ve katekolat sideroforların bakteriyosin aktivitesi ve hemolitik aktivite üzerine pozitif etkilerinin olduğu kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Probiyotik, Siderofor, Katekolat, FT-IR, NMR, Boyut Dışlama Kromatografisi

ABSTRACT

PURIFICATION, DIAGNOSIS OF THE SIDEROPHORUS OF THE PROBIOTIC *LACTOBACILLUS PLANTARUM* BHC03 STRAIN AND INVESTIGATION OF THEIR RELATIONSHIP WITH SOME PROBIOTIC PROPERTIES

Nazlıcan COŞGUN

Master's Thesis of Bioengineering

Advisor: Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELİ

January 2023, 130 pages

In this study, siderophore producing microorganisms were obtained from the laboratory culture collection and the strain determined to have the highest siderophore production efficiency of 92% identified by 16s rRNA sequencing as *Lactobacillus plantarum* and called the strain as *L. plantarum* BHC03. Then, siderophore production optimization of *L. plantarum* BHC03 strain was performed and the highest siderophore production, respectively; It was determined at 37 °C, pH 7, in the absence of FeCl₃ addition and using yeast extract as nitrogen source and maltose as carbon source. The initial siderophore production was increased by 5 % after the optimization of the *L. plantarum* BHC03 strain, which was 92 %, and reached 97 %. Large-scale production of siderophores was carried out using optimized conditions and concentrated for purification by lyophilization. The extracellularly produced siderophore was purified by size exclusion chromatography using sephadex LH-20 resin. TLC chromatography, FT-IR, HPLC and 1H-NMR analyzes were performed for the determination and characterization of the presence of siderophores in the collected fractions after purification. As a result of the analyzes, it was determined that the 3rd and 5th fractions in the collected fractions contained catecholate-type siderophores and the effect of the catecholate-type siderophore on the probiotic properties of *L. plantarum* BHC03 strain was investigated. As a result of in vitro tests; *L. plantarum* BHC03 strain was shown to have 0.5 % phenol tolerance, 0.3 % bile salt tolerance and 8 % NaCl tolerance. However, it showed resistance to life up to pH 2.5 and was found to have no hemolytic activities. In addition, they were found to have 92 % autoaggregation and 93 % hydrophobicity abilities. *L. plantarum* BHC03 strain was

found to be resistant to streptomycin, gentamicin and levofloxacin. It has been determined that siderophores have a positive effect on cholesterol assimilation and increase the cholesterol assimilation ability of the bacteria. However, it has been determined that siderophores have positive effects on the hemolysis and bacteriocin activity of probiotics. As a result of in vitro tests, it has been proved that *L. plantarum* BHC03 strain has the desired conditions to be accepted as probiotic bacteria and that catecholate siderophores have positive effects on bacteriocin activity and hemolytic activity.

Keywords: Probiotic, Siderophore, Catecholate, FTIR, NMR, Size Exclusion Chromatography

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesi ile bana her konuda yardımcı olan ve yol gösteren tez danışmanım Sayın Prof.Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELİ 'ye, deneylerimiz olumsuz sonuçlandığında bile bir daha deneriz deyip benimle laboratuvarı sabahlayan, lisans ve yüksek lisans arkadaşım, yoldaşım, NAZLICAN TOPTAŞ'a, her zaman bizi pozitif enerjiyle karşılayıp en çıkmaz deneylerde bile bize onlarca fikirle gelen sevgili doktoramız NİHAN SEMİZOĞLU'na, bu yolda benimle birlikte yürüyüp hiçbir zaman benden desteğini esirgemeyen eşim BİLAL COŞGUN'a, her dertlendiğimde arayıp benim kritiklerime eşlik eden sevgili arkadaşlarım DERYA TURKAY, REYHAN ALTUN ve KEVSER TAŞTEMEL'e , bana her türlü maddi manevi desteği sağlayan canım babam ERCAN YÜCESOY, canım annem GÜLÜSTAN YÜCESOY ve en değerlim olan dedem BAHRİ YÜCESOY'a, bana hem kardeş hem de arkadaşlık yapan canım ablalarım NİLGÜL TURHAN, BURÇİN ŞAHİN ve bana eniştelikten öte abilik yapan değerli abilerim ÜMİT ŞAHİN'e ve ÖZGÜR TURHAN'a ve olmazsa olmazım bir tanecik kardeşim BEDİRHAN YÜCESOY'a, teşekkürü bir borç bilir ve de şükranlarımı sunarım.

NAZLICAN COŞGUN

Ocak, 2023

İÇİNDEKİLER

Sayfa

1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. SİDEROFORLAR	3
2.1.1. Sideroforların Yapıları	4
2.1.2. Siderofor Üreten Mikroorganizmalar	7
2.1.3. Siderofor Biyosentezi	9
2.1.4. Siderofor Tayin Yöntemleri	12
2.1.5. Mikrobiyal Sideroforların Uygulama Alanları	18
2.2. PROBİYOTİKLER	20
2.2.1. Probiyotik mikroorganizmalarda bulunması gereken özellikler	20
2.2.2. Probiyotiklerin etki mekanizması	21
2.2.3. Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine etkileri	22
2.2.4. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar	23
2.2.5. Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmaların belirlenmesinde başvurulmuş in vitro testler	24
2.3. BAKTERİYOSİNLER	30
3. MATERYAL ve YÖNTEM	33
3.1. MATERYAL	33
3.1.1. Siderofor üretici probiyotik bakteriler	33
3.1.2. Ekipman	33
3.1.3. Kimyasallar	34
3.1.4. Besiyerleri ve çözeltiler	34
3.2. YÖNTEM	36
3.2.1. Siderofor üretici laktik asit bakterilerinin tespiti ve CAS yöntemi ile kantitatif olarak siderofor miktarının belirlenmesi	36
3.2.2. 16s rRNA gen dizi analizi yapılarak seçilen mikroorganizmanın tanımlanması	37
3.2.3. <i>Lactobacillus plantarum</i> BHC03 suşunun optimum siderofor üretim zamanının belirlenmesi	38
3.2.4. <i>Lactobacillus plantarum</i> BHC03 sideroforunun saflaştırılması ve karakterizasyonu	40
3.2.5. <i>Lactobacillus plantarum</i> BHC03 suşunun probiyotiklik özelliklerinin belirlenmesi ve sideroforların bazı probiyotik özellikleri üzerine etkisinin araştırılması	43

Hemolitik aktivite.....	46
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	49
4.1. <i>L. plantarum</i> BHC03 suşunun siderofor üretiminin optimizasyonu.....	52
4.1.1. Sıcaklık Optimizasyonu	53
4.1.2. pH Optimizasyonu	55
4.1.3. FeCl ₃ Optimizasyonu	57
4.1.4. Karbon ve Azot Kaynağı Optimizasyonu	59
4.2. <i>L. plantarum</i> BHC03 sideroforunun saflaştırılması.....	63
4.3. <i>L. plantarum</i> BHC03 sideroforunun karakterizasyonu.....	66
4.3.1. TLC sonuçları.....	66
4.3.2. FTIR Sonuçları.....	66
4.3.3. ¹ H-NMR sonuçları	68
4.4. <i>Lactobacillus plantarum</i> BHC03 suşunun probiyotiklik özelliklerinin belirlenmesi ve sideroforların bazı probiyotik özellikleri üzerine etkisinin araştırılması	74
4.4.1. Katalaz testi.....	74
4.4.2. Oksidaz Testi.....	75
4.4.3. Asit toleransı	76
4.4.4. Safra tuzu toleransı.....	78
4.4.5. Fenol toleransı	80
4.4.6. NaCl toleransı.....	82
4.4.7. Antibiyotik duyarlılık testi	83
4.4.8. Otoagregasyon deneyi.....	85
4.4.9. Suşların hidrofobikliği	86
4.4.10. Hemolitik aktivite.....	88
4.4.11. Kolesterol Asimilasyonu.....	89
4.4.12. Bakteriyosin Aktivite Testi	91
5. SONUÇ	93
6 .REFERANSLAR	97
6.EKLER.....	109
7.ÖZGEÇMİŞ	112

İMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
µl	Mikro litre
µM	Mikro molar
kDa	Kilo dalton
mM	Mili molar
nm	Nano metre
rpm	Dakikadaki devir sayısı

KISALTMALAR AÇIKLAMA

DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal RNA
NRPS	Nonribosomal Peptide Synthetase
CAS	Chrome Azurol S
HDTMA	Heksadesiltrimetilamonyum Bromür
CDLIM	Chemically Defined Low-İron Medium
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
FT-IR	Fouirer Transform Infrared
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
MIR	Orta Dalga Boylu Kızıl Ötesi Bölgesi
TMS	Tetrametilsilan
DFB	Desferrioksamin B
DD	Disk Difüzyon
KD	Kuyu Difüzyon
MİK	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
BSH	Safra Tuzu Hidrolaz
OD	Optik Dansite
MRS	De MAN, ROGOSA and SHARPE
LB	Luria Bertani
PBS	Phosphate-Buffered Saline
2,3-DHBA	3,2-Dihidroksibenzoik Asit
pH	Power of Hydrogen
RPM	Revolutions Per Minute

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Bakterilerde siderofor aracılı demir taşınmasının mekanizması	4
Şekil 2.2. Sideroforların sınıflandırılması	5
Şekil 2.3. Ferrikrom tipi sideroforun kimyasal yapısı	6
Şekil 2.4. Vibriobaktin tipi sideroforun kimyasal yapısı	6
Şekil 2.5. Mikobaktin tipi sideroforun kimyasal yapısı	7
Şekil 2.6. Yersiniabaktin tipi sideroforun kimyasal yapısı	7
Şekil 2.7 NRPS enzim sisteminin mekanizmasının gösterimi.	10
Şekil 2.8 Poliketid sentaz ile siderofor biyosentezi.	11
Şekil 2.9 Aerobactin biyosentetik yolu.....	12
Şekil 2.10 TLC Kromotogramı.....	13
Şekil 2.11 Orta dalga boylu kızıl ötesi bölgesi.....	14
Şekil 2.12 NMR spektroskopi enstrümantasyonu.	16
Şekil 2.13 NMR spektroskopisinde kullanılan çözücüler	16
Şekil 2.14 HPLC ünitesi	18
Şekil 2.15 Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar.....	24
Şekil 3. 1 Sephadex LH-20 saflaştırma kolonu hazırlanması.....	41
Şekil 4. 1 CAS Agar besiyerinde siderofor üretiminin mikroorganizma tarafından sağlanması	50
Şekil 4. 2 16s rRNA dizi analizi sonucu elde edilen nükleotid dizisi	51
Şekil 4. 3 <i>L. plantarum</i> BHC03 izolatının soy ağacı.....	52
Şekil 4. 4 OD (Optik Dansite) Optimizasyonu Sonuçları	53
Şekil 4. 5 Sıcaklığın bakteri büyümesi üzerine etkisi.....	53
Şekil 4. 6 Sıcaklığın siderofor üretimi üzerine etkisi	54
Şekil 4. 7 Sıcaklık optimizasyonunun siderofor üretim yüzdesi üzerine etkisi.....	55
Şekil 4. 8 Farklı pH değerlerinin siderofor üretim etkisi.....	56
Şekil 4. 9 pH optimizasyonunun siderofor üretim yüzdesi üzerine etkisi	56
Şekil 4. 10 Farklı FeCl ₃ konsantrasyonunun siderofor üretimi üzerine etkisi.....	58
Şekil 4. 11 FeCl ₃ optimizasyonunun siderofor üretim yüzdesi üzerine etkisi.....	58
Şekil 4. 12 Farklı azot kaynaklarının siderofor üretimi üzerine etkisi	59
Şekil 4. 13 Farklı azot kaynaklarının siderofor üretim yüzdesi üzerine etkisi	60
Şekil 4. 14 Farklı karbon kaynaklarının siderofor üretimine etkisi.....	61
Şekil 4. 15 Farklı karbon kaynaklarının siderofor üretim yüzdesi üzerine etkisi.....	61
Şekil 4. 16 Optimize edilen koşullarda siderofor üretiminin gerçekleştirilmesi	62
Şekil 4. 17 Optimize edilen koşullarda siderofor üretim yüzdesi.....	63
Şekil 4. 18 Toplanan fraksiyonların CAS metodu ile siderofor analizi.....	63
Şekil 4. 19 Fraksiyonların CAS Analizi sonuçları	64
Şekil 4. 20 TLC (İnce tabaka kromatografisi) kromotogramı.....	66
Şekil 4. 21 3 numaralı fraksiyon FT-IR Sonuçları	67
Şekil 4. 22 5 numaralı fraksiyon FT-IR sonuçları	68
Şekil 4. 23 ¹ H-NMR referans besiyeri spektrumu	68
Şekil 4. 24 1.fraksiyon ¹ H-NMR spektrum sonuçları.....	69
Şekil 4. 25 2.fraksiyon ¹ H-NMR spektrum sonuçları.....	70
Şekil 4. 26 3.fraksiyon ¹ H-NMR spektrum sonuçları.....	71
Şekil 4. 27 4.fraksiyon ¹ H-NMR spektrum sonuçları.....	71

Şekil 4. 28	5.fraksiyon ¹ H-NMR spektrum sonuçları.....	72
Şekil 4. 29	6.fraksiyon ¹ H-NMR spektrum sonuçları.....	72
Şekil 4. 30	Fraksiyonların ¹ H-NMR spektrum karşılaştırılması.....	74
Şekil 4. 31	<i>L. plantarum</i> BHC03 suşunun katalaz testi sonucu	74
Şekil 4. 32	<i>L. plantarum</i> BHC03 suşunun oksidaz test sonucu.....	75
Şekil 4. 33	Farklı pH değerlerinde büyütülen <i>L. plantarum</i> BHC03 suşunun sağ kalım yetenekleri.....	77
Şekil 4. 34	Farklı safra tuzu konsantrasyonlarında büyütülen <i>L. plantarum</i> BHC03 suşunun MRS agar besiyerleri üzerinde sağkalım yeteneklerinin belirlenmesi	80
Şekil 4. 35	Farklı fenol konsantrasyonlarında büyütülen <i>L.plantarum</i> BHC03 suşunun MRS agar besiyerleri üzerinde sağkalım yeteneklerinin belirlenmesi	82
Şekil 4. 36	<i>L. plantarum</i> BHC03 suşunun NaCl toleransı.....	83
Şekil 4. 37	<i>L. plantarum</i> BHC03 suşunun antibiyotik duyarlılık testi sonuçları.....	84
Şekil 4. 38	<i>L. plantarum</i> BHC03 suşunun hemolitik aktivitesi.....	89
Şekil 4. 39	<i>L.plantarum</i> BHC03 suşunun bakteriyosin aktivitesinin incelenmesi	92

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2. 1 Bazı bakteriyal inhibisyon değerleri	27
Tablo 2. 2 Laktik asit bakterileri tarafından üretilen antimikrobiyal maddeler ve etki spektrumları	29
Tablo 3. 1 Kullanılan ekipman ve markaları.....	33
Tablo 3. 2 Kolesterol asimilasyonu şeması.....	47
Tablo 3. 3 Bakteriyosin aktivitesi için kullanılan kodlamalar	48
Tablo 4. 1 Biyomühendislik Bölümü Endüstriyel Mikrobiyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda bulunan laktik asit bakterilerinin morfolojik yapısı	49
Tablo 4. 2 Farklı pH değerlerinde büyütülen <i>L. plantarum</i> BHC03 suşunun sağkalım yeteneği.....	77
Tablo 4. 3 Farklı safra tuzu konsantrasyonlarında büyütülen <i>L.plantarum</i> BHC03 suşunun sağkalım yeteneği	79
Tablo 4. 4 Farklı fenol konsantrasyonlarında büyütülen <i>L.plantarum</i> BHC03 suşunun sağkalım yeteneği	81
Tablo 4. 5 <i>L. plantarum</i> BHC03 suşunun antibiyotik direnç profili.....	84
Tablo 4. 6 <i>L.plantarum</i> BHC03 hidrofobisite sonuçları	87
Tablo 4. 7 <i>L. plantarum</i> BHC03 suşunun kolesterol asimilasyon sonuçları.....	90
Tablo 4. 8 <i>L.plantarum</i> BHC03 suşunun bakteriyosin aktivitesi sonuçları	91

1.GİRİŞ

Demir mikroorganizmaların büyüebilmesi için gerekli bir elementtir ve maksimum büyümenin gerçekleşmesi için besi ortamında 0.4-1.0 μM demire ihtiyaç duyulmaktadır (Neiland, 1981). Birçok organizma demire kofaktör olarak ihtiyaç duymaktadır ve hücresel düzeyde bakıldığında ise demir, fotosentez, nitrit hidroksilasyon, sitrik asit döngüsü, oksijen taşınımı, gen regülasyonu ve DNA biyosentezi gibi mikroorganizmanın yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmesi için gerekli olan biyolojik süreçlerde bulunmaktadır.

Yerkabuğunda en fazla bulunan elementlerden birisi demirin toprak veya deniz gibi birçok ekolojide Fe^{+3} (ferrik) iyonunun çok düşük çözünürlüğünden dolayı hücre içine alınımı düşük bir miktarda gerçekleşmektedir. Demir iki stabil oksidasyon değişimi basamağına sahiptir bunlar Fe^{+2} (ferröz) ve Fe^{+3} (ferrik) tür. Oksijenin bulunmadığı veya az bulunduğu ortamda demir Fe^{+2} yükseltgenme halindedir ve suda çözünmektedir. Oksijenin bol olduğu ortamda ise, demir genelde Fe^{+3} yükseltgenme halinde olmakta ve suda çözünmemektedir. Bununla birlikte Fe^{+3} iyonlarının nötral pH'da çözünürlükleri çok düşüktür ve dolayısıyla organizmalar tarafından kullanımı sınırlanmaktadır (Madigan ve Martinko, 2005).

Demir, canlı mikroorganizmaların fotosentez, oksijen salınımı, solunum, TCA (trikarboksilik asit) döngüsü, gen regülasyonu, azot fiksasyonu, ATP sentezi ve DNA sentezi gibi metabolik reaksiyonlarında rol oynayan, mikroorganizmaların önemli yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmeleri için gerekli olan bir elementtir (Ratledge ve Dover, 2000; Hammer ve Skaar, 2011).

Demir eksikliği lösemi, anemi ya da kronik kalp yetmezliği, böbrek ve bağırsak gibi ciddi enflamatuvar hastalıklara sebebiyet verebilirken, fazlalığı ise iskemik kalp hastalıkları, nörodojenaratif hastalıklar, karsinogenesis gibi hastalıklara neden olabilmektedir. (Uysal, 1999). Demir eksikliğinde bitkilerde klorofil biyosentezinin azalmakta ve dolayısıyla yapraklarda “demir eksikliği klorozu” olarak adlandırılan bir hastalığa neden olmaktadır.

Demir elementin hücresel olarak alımını kolaylaştırmak için son dönemlerde hücre dışına salınan şelatlayıcı ajanlar olarak bilinen sideroforlar göze çarpmaktadır. Sideroforların birçok mikroorganizma (bakteri, mantar, aktinomicetes ve alg gibi.) tarafından biyosentezi gerçekleştirilebilmektedir. Son yıllarda sideroforların birçok alanda uygulanabilirliğinin olduğu görülmesi bu mikrobiyal demir şelatlayıcılarının biyoteknolojideki önemini de arttırmıştır. Modern moleküler araçların ortaya çıkması ile doğadaki sideroforların çok yönlü rolünün anlaşılmasında önemli gelişmeler olmuştur.

Süt, yoğurt ve kefirde izole elde edilen bakteri kültürlerinin siderofor üretim yeteneklerinin belirlendiği bir çalışmada, siderofor üreten *Enterococcus* ve *Bacillus* izolatlarının, yüksek asidik koşullar altında hayatta kaldıkları ve safra tuzuna, NaCl ve fenole karşı daha yüksek tolerans gösterdikleri belirlenmiştir. Probiyotiklik özellikleri olarak kabul edilen bu özelliklerin daha iyileşmesi neticesinde, siderofor üreten mikroorganizmaların daha güçlü probiyotik suşlar oldukları önerilmiştir. Bu da gıda biyoteknolojisinde sideroforların kullanılabilme potansiyelini göstermektedir (Panda ve ark. 2017).

Bu tez çalışmasında, siderofor üreticilerinin probiyotiklik özelliğinin artması hipotezi desteklenerek, ilave olarak ortama ilave edilecek siderofor karışımının bazı probiyotik özellikleri üzerine etkisi araştırılacaktır. Siderofor üretici probiyotikler ile siderofor karışım formülasyonunun bazı probiyotik özellikler üzerine etkisi araştırılması, projenin özgün değerini oluşturmaktadır. Bu çalışma sonrasında sideroforun bakteriyosin etkinliğini arttırdığının gösterilmesi, siderofor varlığında antimikrobiyal özelliklerin kullanım alanlarının daha geniş bir yelpazeye sahip olması beklenmektedir.

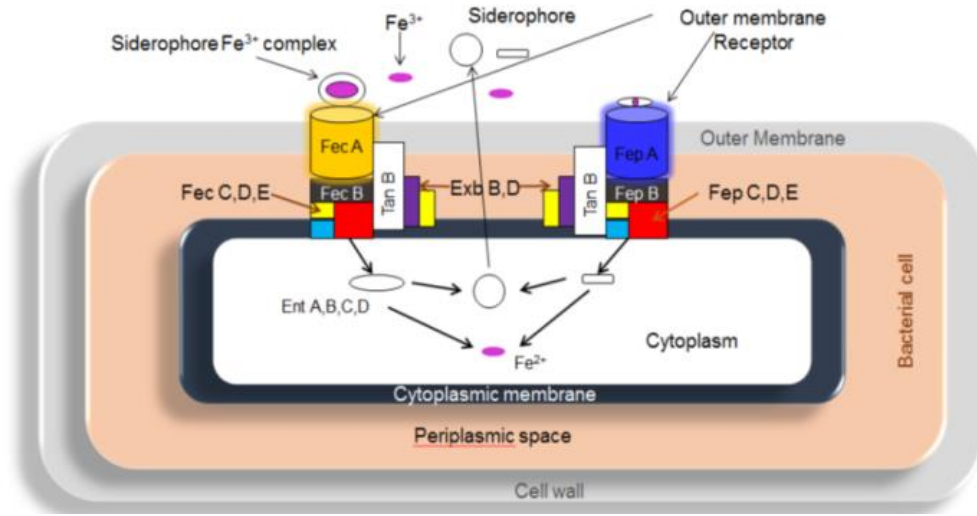
2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. SİDEROFORLAR

Biyolojik şelatlayıcı ajanlar mantar, alg, yüksek yapılı bitkiler ve birçok bakteri türü tarafından biyosentezi gerçekleştirilerek ortamdaki demir iyonlarını bağlamak amacı ile kullanılmaktadırlar. Sideroforlar bu ajanlar içerisinde en önemli alana sahiptir. Kimyasal anlamda, siderofor demirin yetersiz bulunduğu ortamda demiri bağlamak için organizmalar tarafından biyosentezi gerçekleştirilen düşük molekül ağırlıklı metal şelat bileşiklerdir (Miethke ve Marahiel, 2007). Siderofor ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda sideroforlar için (siderokrom, sideramin, sideromisin ve ionofor gibi) farklı isimlendirmeler kullanılmaktadır.

Günümüzde bu demir bu şelatlayıcı ajanlar Yunancada sideros: demir ve phores: taşıyıcı anlamına gelen ‘siderofor’ olarak kullanılmaya başlanmıştır. (Thomashow ve Weller, 1995). Sideroforlar doğadan başka yerde bulunmayan ve bünyesinde pek çok değişik amino asit bulunduran, demir eksikliğinde biyosentezi gerçekleştirilen 400-1500Da molekül ağırlığındaki demir şelatlayıcı organik bileşikler olup, düşük demir seviyesinde ($<10^{-5}$ mol/L) hücre dışı biyosentezleri gerçekleştirilmektedir (Neiland, 1981; Neilands, 1995).

Sideroforlar demire bağlanmadan önce kararlı bir formdayken, demir iyonları ile karşılaşan bir siderofor, demir ile kompleks bir yapı oluşturarak ona kuvvetli bir şekilde bağlanmaktadır (Miethke ve Marahiel, 2007). Hücre dışında bulunan sideroforların hücre içine tekrar geri alınması için hücre zarında özel reseptörler bulunur ve demir ile kompleks oluşturan sideroforlar bu reseptörler tarafından tanınır (Şekil 1.1). Bu reseptörlere bağlanarak hücre zarının içinden aktif taşıma mekanizması ile hücre içine taşınırlar (Martinez ve ark., 2003; Raymond ve ark., 2004). Fe^{3+} 'ün Fe^{+2} 'ye indirgenmesinin ardından sideroforun zayıf bir yapı kazanması, demirin hücre içine bırakılmasına yardımcı olur.



Şekil 2.1. Bakterilerde siderofor aracılı demir taşınmasının mekanizması (Ali ve Vidhale 2013)

Sideroforların aynı zamanda demirin yanı sıra diğer metallere de (alüminyum, galyum, krom, bakır, çinko, kurşun, manganez, kadmiyum gibi) bağlanma yeteneği bulunmaktadır (Neilands, 1995; Miller, 2008).

Günümüzde teknolojinin gelişmesiyle birlikte çok fazla siderofor türü olduğu tespit edilmiştir. Şimdiye kadar yüzlerce siderofor çeşitleri farklı mikroorganizmalardan izole edilmiştir (Boukhalfa ve Crumbliss, 2002).

Bazı fungus ve bakteriler tarafından üretilen sideroforlara örnek olarak ferrikrom (*Ustilago sphaerogena*), enterobaktin (veya enterokelin) (*Escherichia coli*), mikobaktin (*Mycobacterium sp.*), enterobaktin ve basillibaktin (*Bacillus subtilis*), ferrioksamin B (*Streptomyces pilosus*), fusarinin C (*Fusarium roseum*), yersiniabaktin (*Yersinia pestis*), vibriobaktin (*Vibrio cholerae*), azotobaktin (*Azotobacter vinelandii*), psödobaktin (*Pseudomonas sp. B10*), eritrobaktin (*Saccharopolyspora erythraea*) ve ornibaktin (*Burkholderia cepacia*) sayılabilir (Miethke ve Marahiel, 2007).

2.1.1. Sideroforların Yapıları

Mikroorganizmalar kimyasal özellikleri birbirinden farklı yüzlerce siderofor üretmektedir (Ratledge ve Dover, 2000).

Sideroforlar kimyasal yapılarına göre hidroksamat, katekolat (fenolat) ve karboksilat ve karışık ligantlar olmak üzere dört ana başlıkta toplanmıştır (Şekil 1.2).

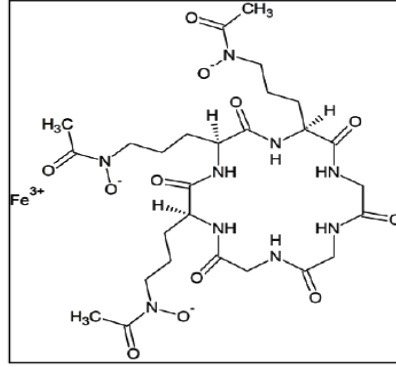
Sideroforun Kimyasal tipi	Siderofor	Mikroorganizma
Hidroksamat	Ferrikrom	<i>Ustilago sphaerogena</i>
	Desferrioksamin B	<i>Streptomyces pilosus</i>
	Desferrioksamin E	<i>Streptomyces coelicolor</i>
	Fusarinin C	<i>Fusarium roseum</i>
	Ornibaktin	<i>Burkholderia cepacia</i>
Katekolat	Enterobaktin	<i>Escherichia coli</i>
	Bacillibaktin	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus anthracis</i>
	Vibriobaktin	<i>Vibrio cholerae</i>
Karboksilat	Rhizobaktin	<i>Rhizobium meliloti</i>
	Rhizoferrin	<i>Rhizopus microspores</i>
	Staphyloferrin A	<i>Staphylococcus hyicus</i>
Karışık ligant	Azotobaktin	<i>Azotobacter vinelandii</i>
	Pyoverdin ve pyochelin	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Yersiniabaktin	<i>Yersinia pestis</i>
	Maduraferrin	<i>Acinomadura madurae</i>

Şekil 2. 1. Sideroforların sınıflandırılması (Modi ve ark., 2012).

Hidroksamat Sideroforlar

Bakteri ve mantarlar tarafından üretilen sideroforlardır. İlk olan Ferrikrom *U. sphaerogena* tarafından üretilmiştir. Bütün hidroksamatlar *N*-acyl-*N*-hydroxy-L-ornitin içerirler. Hidroksamat siderofor üç sekonder hidroksamat grup içerir ve her bir hidroksamat grup iki oksijen molekül sağlar.

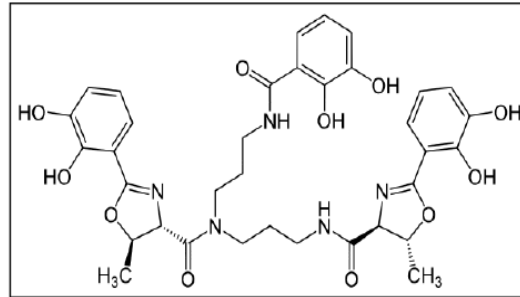
Hidroksamat sideroforlar demire bağlandığında 425 ile 500 nm arasında güçlü bir absorpsiyon gösterir (Messenger ve Ratledge, 1985). Desferrioksamin B (deferoksamin), desferrioksamin E, fusarinin C, ornibaktin, enterobaktin, ferrioksamin ve ferrikrom hidroksamat sideroforlara örnek olarak gösterilebilir (Crosa ve Walsh, 2002). Bu tür sideroforlara örnek olarak ferrikromu kimyasal yapısı Şekil 1.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2. 2. Ferrikrom tipi sideroforun kimyasal yapısı (Crosa ve Walsh, 2002)

Katekolat (Fenolat) Sideroforlar

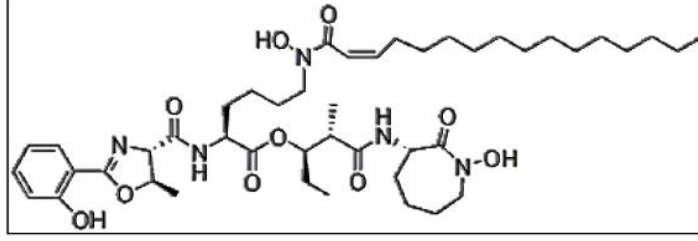
En yaygın ikinci grup olan katekolat sideroforlar yalnızca belli bakteriler tarafından üretilmektedir. Katekolat sideroforlar da bir hekzadentat oktahedral kompleksini oluşturmak için yapılarında iki oksijen atomu içerirler (Şekil 1.4). Bacillibaktin, enterobaktin, vibriobaktin, agrobaktin, pyochelin ve yersiniabaktin katekolat sideroforlar için en iyi örneklerdir (Neilands, 1981).



Şekil 2.3. Vibriobaktin tipi sideroforun kimyasal yapısı (Neilands, 1981).

Karboksilat Sideroforlar

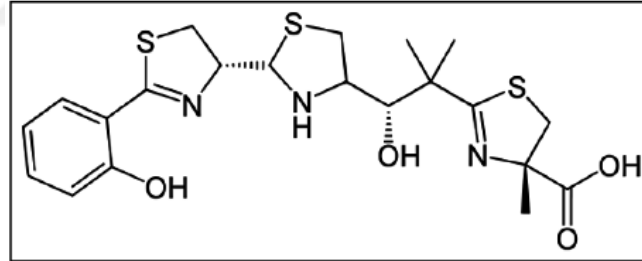
Bu gruptaki sideroforlar hidroksamat ve katekolat sideroforlarındaki ligandlara sahip değildir. α -hidroksikarboksilat ve karboksilat tarafından Fe^{+3} ü bağlamak için özel olarak elde edilirler. Staphyloferrin A, mikobaktin, rhizoferrin, petrobaktin, piyoverdin, azotobaktin ve ferribaktin karbosilat sideroforlara örnek olarak gösterilebilir (Dave ve Dube, 2000; Jimenez ve ark., 2010). Karboksilat sideroforlardan olan Mikobaktinin kimyasal yapısı Şekil 1.5’de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Mikobaktin tipi sideroforun kimyasal yapısı (Dave ve Dube, 2000).

Karışık Ligant Sideroforlar

Karboksilat ve hidroksil gruplarını içeren siderofor grubudur. Bu tip sideroforlar heterosiklik şelatlama grupları da ihtiva edebilirler (Şekil 1.6). İlk siderofor 55 yıl önce alüminyum kompleksinin kristalizasyonu ile izole edilmiş olan mikobaktindir (Francis ve ark., 1949). Nokobaktin ise Nocardia'lar tarafından üretilen bir olan karışık ligant siderofor türüdür, yapıları mikobaktinler ile oldukça benzer özellikler taşınmaktadır. Mikobaktin, petrobaktin, azotobaktin, pyoverdin, yersiniabaktin ve maduraferin karışık sideroforlara örnek olarak gösterilebilmektedir (Modi, 2012; Ratul, 2012).



Şekil 2.5. Yersiniabaktin tipi sideroforun kimyasal yapısı (Ratul, 2012).

2.1.2. Siderofor Üreten Mikroorganizmalar

Bakteri, aktinomiset, mantar ve alglerin farklı siderofor türlerini ürettiği bildirilmiştir. Bu mikroorganizmaların çoğuna ait sideroforların yapıları bilimsel araştırmalarla aydınlatılmıştır (Winkelmann, 2002).

Aktinomisetler

Aerobik gram pozitif olan aktinomisetler, aseksüel spor formunda bulunurlar. Doğada saprofit olarak görülmektedir ve yoğunluğu fazla olan metalleri tolere edebilirler.

Aktinomisetlerin bilimsel araştırmalar sonucunda hidroksamat ve karışık tipte siderofor ürettiği görülmüştür. *Actinomadura madurae*, *Nocardia asteroides* ve *S. griseus* siderofor üreten aktinomisetler arasındadır (Bergeron ve Burne, 2001).

Mantarlar

Siderofor üretiminde mantarlarda bakteriler kadar önemli bir rol oynamaktadır. Katekolat (Capon, 2007) ve karboksilat tipte sideroforlara sahip olduğu bilinen mantarların, esas olarak hidroksamat siderofor ürettiği görülmüştür (Holinsworth ve Martin, 2009). *Aspergillus nidulans*, *Penicillium chrysogenum*, *T. versicolor*, *U. sphaerogina*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula minuta* siderofor üreten mantarlar arasında yer almaktadır. *S. cerevisiae*, siderofor üretmez fakat siderofor demir sistemine sahiptir, bu nedenle diğer mikroorganizmalar tarafından üretilen sideroforu kullanıp hücre içi demir alımını gerçekleştirebilirler (Eisendle ve., 2006; Philpott ve Protchenko, 2008; Ozan ve Maden, 2010).

Algler

Bazı araştırmacılar birkaç alg türünün siderofor biyosentezi gerçekleştirebildiğini gözlemlemişlerdir. *Anabaena* sp. tarafından üretilen Schizokinen, hidroksamat tipi bir siderofor türüdür ve demir alımını kolaylaştırır. (Lesuisse ve ark., 2001).

Bakteriler

Bakteriler ağır metallere tutunarak birikirler. Gram pozitif bakterilerin hücre duvarları metal bağlama özelliğine sahiptir. Demir yoksunluğunda bakteriler ferrik demiri bağlayan ve taşıyan siderofor üretirler ve bu siderofor demirle oluşturduğu kompleks yapı hücre duvarındaki reseptörler tarafında tanınır ve aktif transport mekanizması ile hücre içine alımı gerçekleştirilir.

Siderofor üreten bazı önemli bakteriler *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *V. cholerae*, *V. anguillarum*, *Enterobacter aerogenes* ve *M. tuberculosis*'dir (Crosa ve Walsh, 2002).

2.1.3. Siderofor Biyosentezi

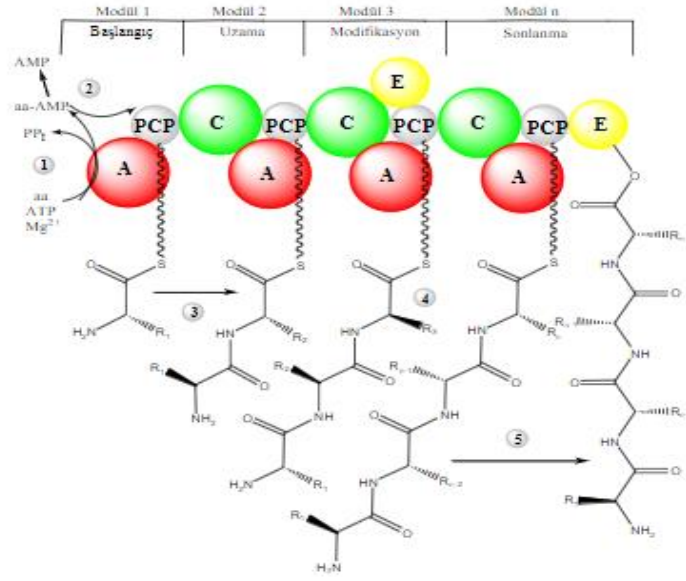
Bakterilerde siderofor biyosentezi birkaç enzim tarafından gerçekleştirilir. Bunlar, ribozomal olmayan peptid sentetaz (NRPS), poliketit sentaz (PKS) ve NRPS'den bağımsız siderofor sentetazlardır (NIS) (Timofeeva ve ark., 2022).

NRPS ile Siderofor Biyosentezi

NRPS tarafından sentezlenen sideroforlar esas olarak peptid bağları ile birbirine bağlanan proteinojenik olmayan amino asitler de dahil olmak üzere amino asitlerden oluşur. NRPS, proteinojenik olmayan amino asitler ve hidroksi asitler dahil olmak üzere büyüyen bir peptit zincirine bir amino asit bağlamaktan sorumlu olan büyük çok alanlı ve çok enzimli komplekslerdir. Standart NRPS mimarisi, modüler adenilasyon (A), kondensasyon (C), peptidil taşıyıcı protein (PCP) ve tıyoesteraz (T) dizilerinin yanı sıra epimerizasyon (E), oksidasyon (Ox), metilasyon (Mt) ve siklizasyon (Cy) dahil olmak üzere diğer spesifik fonksiyonel alanları içerir (Timofeeva ve ark., 2022).

Bu sistemlerde aminoasitler herhangi bir RNA kalıbına ihtiyaç duymadan direk olarak aminoasitlerden peptit bağları kurarlar. Bu bağlar nonribozomal peptid sentetazlar (NRPSs) tarafından gerçekleştirilir (Crosa ve Walsh, 2002). NRPS-bağımlı yollar mikروorganizmalar tarafından enterobaktin, yersiniabaktin, pyochelin, pyoverdin, vibriobaktin ve mycobaktin gibi sideroforların biyosentezinde kullanılmaktadır (Crosa ve Walsh, 2002; Quadri, 2000; Ackerley, 2003).

Bu yollarda; kondensasyon (C), adenilasyon (A) ve peptidil-taşıyıcı (PCP) bölgeleri birlikte çalışırlar (Crosa ve Walsh, 2002; Fischbach, 2006).

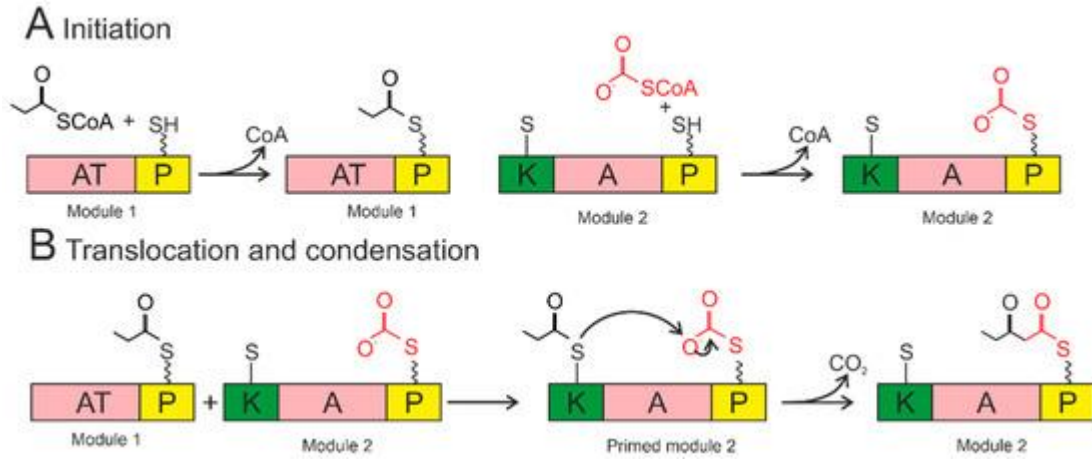


Şekil 2.6 NRPS enzim sisteminin mekanizmasının gösterimi. 1-A domaini tarafından aminoasitin aktivasyonu. 2-Aminoasitin peptidil taşıyıcı proteine (PCP) aktarılması. 3-PCP'ye aminoasit ilavesi. 4-Aminoasit modifikasyonu. 5-Terminal PCP domainin peptid bağı esterifikasyonla taşınması. 6-Oluşan ürünün TE domaini tarafından hidroliz ile salıverilmesi (Current Opinion in Structural Biology 2010, 20:234–240).

Adenilasyon domaini (A domain), 55 kDa ağırlığında olup substrat seçimini gerçekleştirir. Aynı zamanda ATP hidrolizi ile substratın aktivasyonundan sorumludur (Turgay ve ark., 1992, Stachelhaus ve ark., 1995). Peptidil taşıyıcı protein domain (PCP), 10 kDa ağırlığında olup tiyoester oluşumunu gerçekleştirir (Stachelhaus ve ark., 1996). Kondensasyon domain (C), 50 kDa ağırlığında olup peptid bağının oluşumunu katalizler. Bunun sonucunda zincir uzaması gerçekleşir. Ayrıca ürünlerin çeşitliliğine katkı sağlamak için epimerizasyon domain (E) tarafından modifikasyon gerçekleştirilmektedir (Konz ve Marahiel, 1999). Son domainde genellikle bir TE (tiyoesteraz) alanı bulunmaktadır. TE domaininden hidroliz veya siklizasyon sonucunda toplanan zincir NRPS'den salınır.

Poliketid Sentazlar ile Siderofor Biyosentezi

Bazı sideroforlar poliketid sentazlar tarafından sentezlenir. PKS modülü bir ketosentaz etki alanı, bir asiltransferaz etki alanı ve bir taşıyıcı etki alanı içerir.

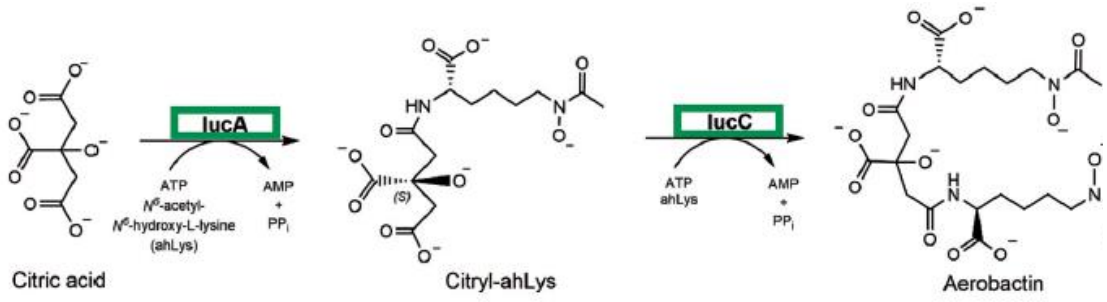


Şekil 2.7 Poliketid sentaz ile siderofor biyosentezi. Asiltransferaz etki alanları, Modül 1'in P etki alanlarına açıl grupları yükler. Yükleme modülünden gelen açıl grubu, Modül 1'in ketosentaz alanına aktarılır, böylece modül başlatılır (sol altta). Ketosentaz alanı yoğunlaşma reaksiyonunu katalize eder. Büyüyen zincir, senteze devam etmek için bir sonraki modülün ketosentaz alanına aktarılır. AT—asiltransferaz; P—açıl taşıyıcı protein; K-ketosentaz. Dalgalı çizgi, P'nin çeviri sonrası modifikasyonunu işaretler.solumak. KS alanındaki kısa düz çizgi, aktif merkezin sistein kalıntısını gösterir (Timofeeva ve ark., 2022).

NIS Sentetaz ile Siderofor Biyosentezi

Bazı sideroforlar NRSP veya PKS tarafından değil, NRPS'den bağımsız siderofor sentezleri tarafından sentezlenir. NIS sentezleri, sitrik asit, α -ketoglutarat veya süksinik asit içeren sideroforlar oluşturur. NIS sentetaz, örneğin sitrat-AMP oluşturan ve bir amino asit veya poliamin ile yoğunlaşma reaksiyonu için enerji açısından zengin bir bağ sağlayan bir asiladenilasyon alanı içerir. NIS ile inşa edilen sideroforlar arasında achromobactin (*P. syringae*), desferioxamine (*S. griseus*), baumannoferrin (*Acinetobacter baumannii*), putrefaktinler (*Shewanella putrefaciens*) bulunur (Timofeeva ve ark., 2022).

Aerobaktin, alcaligin, stafilobaktin ve petrobaktin gibi hidroksamat ve karboksilat sideroforların biyosentezinde kullanılan bu sistemde amid, amino-alkol veya diamin yapıtaşları ve dikarboksilik asitler bulunmaktadır (Challis, 2005; Miethke ve ark., 2007).



Şekil 2.8 Aerobactin biyosentetik yolu NIS enzimleri, IucA (Tip A) ve IucC (Tip C ') tarafından gerçekleştirilen reaksiyonlar belirtilmiştir. IucA, IucC tarafından bir achiral sitril-omurgalı aerobactin üretmek için substrat olarak kullanılan 3S-sitril ahLys oluşturur (Bailey ve ark., 2018).

2.1.4. Siderefor Tayin Yöntemleri

Bu çalışmada kullanılacak olan siderofor tayin yöntemleri aşağıda açıklanmıştır.

Chrome Azurol Sulfonate (CAS) Agar

Chorome Azurol Sulfonate (CAS) agar deneyi, sideroforun ferrik demire yüksek afinite ile bağlanmasını sağlayan ve sideroforun varlığının tespitinde kullanılan evrensel bir testtir. Chrome Azurol Sulfonate ile Fe⁺³ birleştiğinde kompleks bir yapı oluşturur ve sonucunda mavi renkli bir boya solüsyonu ortaya çıkmaktadır. Mikroorganizma siderofor üretmeye başladığında serbest boya açığa çıkar ve renk turuncuya dönüşür.



Mikroorganizma siderofor üretimini gerçekleştirdiğinde koloni etrafında turuncu renkli zon oluşumu görülür ve CAS agar deneyi için siderofor varlığı pozitif olarak kabul edilmektedir (Payne, 1994). Her bir bakteri örneğinin oluşturduğu turuncu zonların yarıçapı 24 saat aralıklarla ölçülerek siderofor üretimi derecelendirilmektedir.

Chrome Azurol S Sıvı

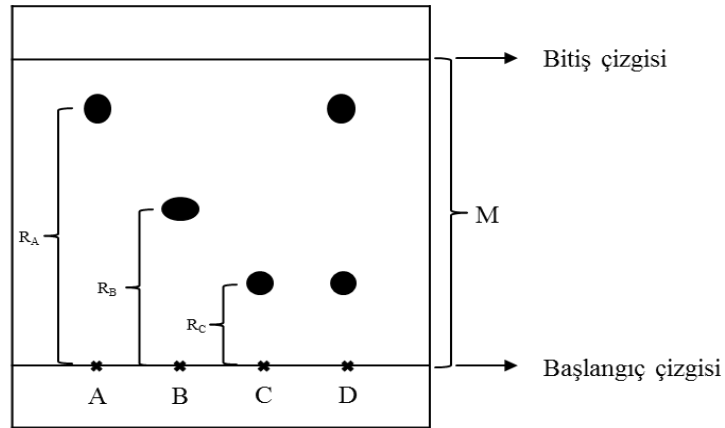
Sideroforlar ekstrasellüler moleküllerdir, bu nedenle santrifüj işlemi ile hücreler uzaklaştırılır. Her bir örnek için süpernatant ve CAS solüsyonu ile karıştırılır, ardından CAS solüsyonunun renk değişimini belirginleştirmesi için shuttle solüsyonu (sülfosalisilik asit) ilave edilir.

Mavi renkte olan CAS solüsyonu siderofor ile etkileşimi sonucunda siderofor türlerine göre turuncu, pembe veya menekşe mor gibi renk değişimleri gösterir ve CAS sıvı deneyi pozitif olarak kabul edilir (Payne, 1994). Ayrıca ortaya çıkan renk değişimleri ve oluşan renklerin konsantrasyonları derecelendirilecektir.

İnce tabaka kromatografisinde (TLC) kromatografi

İnce tabaka kromatografisinde (TLC) sabit faz olarak düzgün bir yüzeye ince bir tabaka halinde kaplanmış silika kullanılmaktadır. Bu sabit faz düzeneği TLC plakası olarak adlandırılır.

Bu plakalar genellikle cam, plastik ya da metal bir yüzeye silika kaplanması ile elde edilir. İnce tabaka kromatografisinde numuneler plakanın bir yüzeyine incelenmek istenilen örnek ve standart madde nokta şeklinde ilave edilir ve numunenin kuruması beklenir. Ardından plak hareketli çözücü numunelerin ilave edildiği kısmın altında kalmak şartı ile TLC tankına konulur. Hareketli fazdaki kapiller etki ile plakanın üst ucuna doğru hareket etmeye başlarlar. Örneğin içerisinde bulunana maddelerin hareketli faza ilgisi birbirinden farklı olacağı için örnekler farklı hızlarda plakanın üst kısmına doğru ilerleyecektir. Bu nedenle hareketli faza ilgisi yüksek olan örnekler hızlı ilerlerken ilgisi az olan örnekler yavaş ilerlemektedir.



Şekil 2.9 TLC Kromatogramı

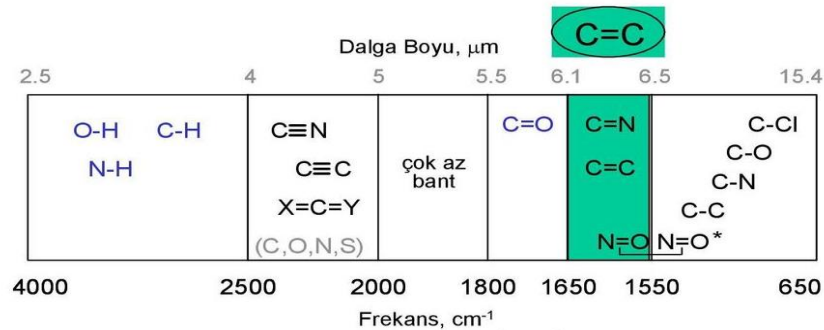
Örneklerin hareketli faz içerisinde yürüyüşünü tamamlama işleminin ardından bu plakaya artık kromatogram adı verilir. Bu kromatograma bir numunenin saflığını ve numunenin içerisinde bulunan diğer maddelerin varlığı görsel olarak tespit edilebilir.

Bununla birlikte kullanılan standardın oluşturduğu bantlar ile numunenin oluşturduğu bantlar karşılaştırılarak kullanılan numunenin içerisindeki maddeler bulunabilmektedir. Ardından numune içerisindeki maddelerin alıkonma faktörleri karşılaştırılarak bu maddelerin kimliği hakkında bize bilgi vermektedir. İnce tabaka kromatografisinde bir maddenin alıkonma faktörü (R_f), maddenin katettiği mesafenin hareketli fazın başlangıç çizgisinden itibaren katettiği mesafeye oranıdır.

$$R_f = \text{Bileşiğin aldığı yol} / \text{Çözücünün aldığı yol}$$

Fourier Transform Infrared Spektrofotometre (FT-IR) Analizi

FTIR; Fourier dönüşümü yöntemi ile ışığın infrared yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen bir kimyasal analitik yöntemdir. Elektromanyetik ışık dizisinin kızıl ötesi bölgesi 14000 cm^{-1} ile 10 cm^{-1} arasındadır. Üç ana bölgeden oluşmakta olan bu ışık dizisinin birincisi yakın dalga boylu kızıl ötesi yani, NIR; $4000\sim14000 \text{ cm}^{-1}$ bölgesidir, ikinci bölge olan orta dalga boylu kızıl ötesi bölgesine MIR; $400\sim4000 \text{ cm}^{-1}$ bölgesi adı verilmektedir. Uzak dalga boylu kızıl ötesi ise FIR; $4\sim400 \text{ cm}^{-1}$ bölgesi olarak adlandırılmıştır (Skoog ve ark. 1998). MIR bölgesindeki görülen pikler ile hücre duvarı bileşenleri, proteinler ve nükleik asitler gibi hücre sel yapılar analiz edilmektedir (De Voort, 1992, Koca ve ark 2007). Bir organik madde incelendiğine $3600\text{--}1200 \text{ cm}^{-1}$ aralığında kalan kısma ‘fonksiyonel gruplar bölgesi’ adı verilir. İkinci bölge olan $1200\text{--}700 \text{ cm}^{-1}$ arasında kalan kısım ise parmak izi bölgesi olarak tanımlanmaktadır (Erkahveci ve ark. 1996).

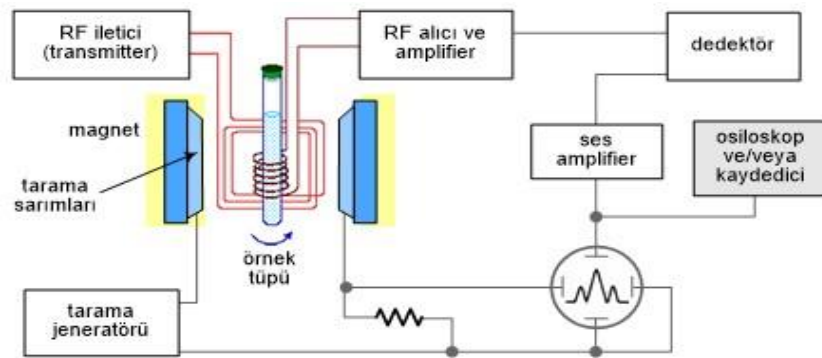


Şekil 2.10 Orta dalga boylu kızıl ötesi bölgesi (MIR; $400\sim4000 \text{ cm}^{-1}$)

Molekölün yapısında meydana gelen en küçük değişiklikler bile, bu bölgedeki absorpsiyon piklerinin büyük ölçüde kaymasına veya yer değiştirmesine neden olur. Bu sebeple, bu bölgede bulunan iki adet ışık dizisinin üst üste gelmesi bu ışık dizilerinin aynı maddeye ait olduğunu göstermektedir. Tekli bağlarının çoğunluğu MIR bölgesinde görölmektedir. Bu nedenle MIR bölgesinde görölen pikler yorumlanırken tekli bağları rahatlıkla tanımlanabilir. MIR bölgesinin frekans alanı dar olmasından dolayı bu alandaki titreşim frekansları birbirine çok yakındır ve bu nedenle birbirlerinden etkilenirler. Bu nedenle görölen pikler sadece bir frekanstan elde edilen saf bir pik olmayabilir. MIR bölgesi FTIR'ın en karmaşık kısmıdır ve ancak diğer bölgelerden elde edilen bilgiler de dikkate alınarak bir sonuca varılabilir (Gündüz T. 2002).

NMR Spektroskopisi

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi moleküldeki bazı çekirdeklerin spin kuantum düzeyleri arasındaki geçişleri inceler. Bazı elementlerin çekirdekleri elektromanyetik ışınların absorpsiyonuyla 4-900 MHz (75m -0,33m) arasında güçlü bir manyetik alana maruz kaldığında, dönme enerji seviyelerine uyarılır. Oluşan bu yeni düzeyler arasındaki enerji farkı çok küçük olduğu için bu düzeyler arasındaki geçişler, sadece düşük frekanslı ışın absorpsiyonu ile sağlanabilir. Çekirdek ve elektronların uğradıkları bu manyetik alan absorpsiyonu ise Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) ve Elektron Spin Rezonans (ESR) spektroskopisi ile iletkenlik edilmektedir. NMR spektroskopisi kovalent bileşiklerin yapılarının aydınlatılmasında kullanılır. ^1H , ^{11}B , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{19}F vb. gibi farklı elementler için özel NMR' lar bulunmaktadır.



Şekil 2.11 NMR spektroskopisi enstrümantasyonu.

NMR spektroskopisi kısaca anlatılacak olursa analiz akışı şu şekilde gerçekleşmektedir; numune sabit ve homojen bir magnetik alan içerisine yerleştirilir ardından radyo dalgaları gönderilir. Rezonans için uygun frekans yakalandığında radyo dalgaları protonlar tarafından soğurulur ve protonlar alt enerji seviyesinden üst enerji seviyesine geçer. Bu absorpsiyon işleminin ardından sinyal olarak kaydedilir. Günümüzde yapı aydınlatmalarında yaygın olarak iki çeşit NMR yöntemi kullanılmaktadır.

¹H Çekirdek Magnetik Rezonans Spektroskopisi (¹H-NMR)

Bir çalışmada kullanılan ¹H-NMR spektroskopisi çalışmaya ait 3 temel bilgiyi bizlere vermektedir. Bunlardan birincisi ortamda farklı kimyasal çevreye sahip olan kaç adet hidrojen olduğu, ikincisi farklı tür hidrojenlerin bağıl oranları, üçüncüsü ise komşu atomlardaki hidrojen sayıları hakkında bilgi vermektedir

Hidrojenler arası manyetik alan farkı çok düşük olduğundan hem kolay ifade edilebilmesi hem de anlaşılır olabilmesi için sayılar ppm cinsinden ifade edilmektedir. Bağıl referans olarak ise hem karalı oluşundan hem de kolaylıkla ayrılabilmesinden ve tüm kayma değerleri sıfır kabul edilmesinden dolayı tetrametilsilan (TMS) tercih edilmektedir. ¹H-NMR spektrum bölgesi genel olarak 0 ile 10 ppm arasında görülmektedir. Bazı durumlarda ise 14-15 ppm kadar genişleyebilmektedir. Çözücü olarak ise maddenin çözünürlüğüne bağlı olarak döteryumlu çözücüler kullanılır. Bunlardan bazıları dötero kloroform, dötero DMSO, döterobenzen gibi yapısında hidrojen bulunmayan çözücülerdir (Namlı, 2017).

Çözücü	Protonun kimyasal kayma	Çözücü	Protonun kimyasal kayma
Aseton-d ₆	2,05	Döteryumoksit	4,80
Asetonitril-d ₃	1,94	DMSO-d ₆	2,50
Benzen- d ₆	7,16	Metanol-d ₆	4,78 - 3,31
Kloroform-d	7,24	Piridin- d ₅	8,74 - 7,58 -7,22

Şekil 2.12 NMR spektroskopisinde kullanılan çözücüler

^1H -NMR spektrumlarında hidrojen içermeyen karbon atomları gözlenememektedir. ^{13}C -NMR spektroskopisi ile karbon atomları kolaylıkla gözlenebilmekte ve grup karbonlarına özel absorpsiyonlar vermektedir. Bu sebeple araştırılan maddenin yapısının daha net aydınlatılması için ^{13}C -NMR kullanılmaktadır. ^1H - ve ^{13}C -NMR arasındaki en temel fark absorpsiyon şiddetidir. Bunun sebebi şu şekilde açıklanabilir; ^1H 'in doğada bulunma oranı ^{13}C 'ün doğada bulunma oranına göre çok fazladır. Bu sebeple ^1H -NMR spektroskopisi yapıldığında tüm hidrojen atomları sinyalin oluşmasını sağlarken, ^{13}C -NMR spektroskopisinde ise karbon atomlarının çoğu rezonans olayını gerçekleştirmez ve bu nedenle ^{13}C -NMR spektroskopisinde daha derişik madde ile çalışılması gerekmektedir.

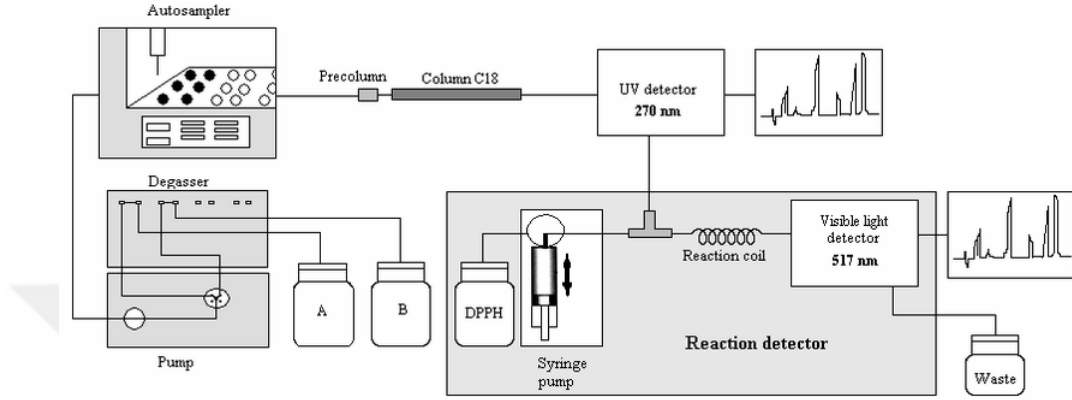
^1H atomları için kimyasal kayma aralığı 0-17 ppm olduğu halde, ^{13}C atomları için 0-250 ppm arasındadır. ^1H 'in kimyasal kayma değerlerini etkileyen etkenler ^{13}C kimyasal kaymalarını da etkiler. Diğer bir fark ise; ^{13}C NMR piklerinin alanı ile karbon sayılarının orantılı olmamasıdır. ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları arasındaki en önemli fark, spektrumların görünüşündedir. ^1H -NMR spektrumları, pik çokluklarından oluştuğu halde ^{13}C -NMR spektrumları ^{13}C -H ve ^{13}C -C-H eşleşmeleri önleendiği için keskin tek piklerden (eşleşmemiş ^{13}C -NMR spektrumları) ibarettir.

Elde edilen spektrumların yapıları kimyasal kayma değerleri, pik gruplarındaki yarılmalar ve piklerin altındaki integral değerleri dikkate alınarak yorumlanacaktır. Böylece molekülün yapısındaki fonksiyonel gruplar tahmin edilerek bir açık yapı önerisi yapılmaktadır.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analizi

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi olarak adlandırılır. HPLC yöntemi bir çözelti içerisinde bulunan bileşiklerin, bir kolon içerisinde bulunan sabit faz ile değişik etkileşimlere girmesi ve ardından kolon içerisinde boyutlarına göre ayrılmasını temel alan bir metottur. Kolon içerisinde bulunan bileşiklerin farklı zamanlarda kolondan ayrılması ile sonuçlanmaktadır. HPLC genellikle ayırma mekanizmasına veya durgun fazın tipine göre sınıflandırılır.

Bunlar, sıvı-sıvı kromatografi, katı-sıvı kromatografi, iyon-değişimi kromatografi, boyut ayırıcı kromatografi ve afinite kromatografi olarak sınıflandırılmaktadır. HPLC günümüzde çeşitli organik, inorganik ve biyolojik numunelerdeki türleri ayırmak ve tayin etmek gibi birçok alanda tercih edilmektedir.



Şekil 2.13 HPLC ünitesi (Mılaşiené ve ark, 2001)

2.1.5. Mikrobiyal Sideroforların Uygulama Alanları

Mikrobiyal sideroforlar biyoteknoloji alanında kullanımı son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Bununla birlikte sideroforların birçok alanda kullanılabilmesi bilim insanları tarafından yeni araştırma ve geliştirme alanlarında büyük yelpazeler açmıştır (Mohandass 2004; Chincholkar ve ark., 2005; Chaudhari ve ark., 2007). Bunlara örnek olarak araştırmacılar tarafından, sideroforların hastalıklar üzerindeki biyokontrol yetenekleri çalışılmıştır (Whipps, 2001).

Bununla birlikte sideroforların antifungal, biyogübre ve biyokontrol ajanı olarak da kullanılabileceği gözlemlenmiştir (Walsh ve ark., 2001; Montesinos ve ark., 2002; Nagarajkumar ve ark., 2004; Mark ve ark., 2006).

Sideroforların Tıbbi Uygulamaları

Tüm canlıların yaşamsal faaliyetlerine devam etmeleri ve fizyolojik aktivitelerini tamamlamaları için demir gereklidir. Bununla birlikte vücutta demir fazlalığı veya eksikliğinin değişik hastalıklara sebep olması, sideroforların tıbbi uygulamalarda da kullanımını yaygınlaştırmaktadır (Eisendle ve ark., 2006). Sideroforların bilinen en

büyük Fe^{+3} şelatlayıcıları olması özellikle metal şelat tedavisinde önem kazanmıştır. Örneğin, siderofor desferrioksamin B (DFB), malariya, romatoid artrit, alzheimer, talasemi, yaralanma, demir zehirlenmesi, tümör, böbrek yetmezliği gibi hastalıkların tedavisinde geniş kullanıma sahiptir (Krewulak ve Vogel, 2008; Del Olmo ve ark., 2003). Bunlara örnek olarak vücuttaki fazla demirin dışarı atılması için günümüzde kullanılan Desferal isimli ilaç örnek olarak verilebilir. Desferal temel etken maddesi olarak siderofor türlerinden biri olan desferrioksamini içeren bir ilaç türüdür.

Sideroforların Tarımsal Uygulamaları

Bakteriler tarafından üretilen bazı sideroforların bitki patojenleri üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (Vessey, 2003). Demir eksikliğinde çeşitli bazı yolaklar ile biyosentezi gerçekleştirilen sideroforlar ortamda bulunan demir ile kompleks bir yapı oluşturur. Bu kompleks yapılar hücre zarındaki reseptörler tarafından tanınır ve hücre içine aktif transport mekanizmasıyla alınımı gerçekleştirilir. Rizosferik bakteriler tarafından üretilen sideroforlar bitkiler tarafından farklı fonksiyonel işlevler için kullanılmaktadır (Carrillo-Castañeda ve ark., 2002). Özellikle *Azotobacter* ve *Pseudomonas* bakterileri; tarım uygulamalarında ürünün kalite ve veriminin artırılmasında, endüstriyel kaynaklı kirlenmiş verimli olmayan toprakların tarıma daha elverişli hale getirilmesinde ve bazı bitki patojenlerine karşı biyolojik mücadele gibi biyoteknolojik çalışmalarda kullanılabileceği bildirilmiştir (Cornelis ve Matthijs, 2007; Couillerot ve ark., 2009).

Sideroforların Çevresel Uygulamaları

Sideroforlar çevresel sorunları çözme yeteneğine sahiptirler. Bunlara örnek olarak ağır metal giderimi, pas giderimi ve atık su arıtımı verilebilir. Siderofor üretici mikroorganizmalar ağır metaller ile kontamine olan su veya topraklarda ağır metallerin fitoekstraksiyonunda tercih edilmektedir (Sunita ve ark., 1994; Bezbaruah , 1998).

Bir çalışmada Prof. Dr. Peter M. Kunz sideroforların pas giderimi üzerine etkisini incelemiştir. Yapılan çalışmada birçok bakteri türü bir araya getirilerek bu bakterilerden alınan desferoksamin tipi sideroforlar demir içeren sanayi materyalleri

üzerinde uygulanmıştır. Sonuç olarak sideroforların pas gideriminde pozitif yönde etki gösterdiği ve önemli bir rol oynadığı ortaya konulmuştur. (Kunz, 2005).

Sideroforların Gıda Sektöründe Uygulamaları

Probiyotikler, yem takviyeleri ve terapötik uygulamalar da dahil olmak üzere çeşitli yönlerde incelenmiştir, fakat sideroforlar ile demir beslenmesi ile ilgili incelenmemiştir. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*'un sideroforojenik olmadığı bildirildiğinden, Panda ve arkadaşlarının 2017 yılında bu çalışma esas olarak *Enterococcus* ve *Bacillus* izolatları tarafından siderofor üretimine odaklanmıştır. Bu, in vivo koşullar altında demirin biyoyararlanımı mümkün kılar. İki suşun, yüksek asidik koşullar altında hayatta kalmaları, safra tuzuna, NaCl ve fenole karşı daha yüksek toleranslar nedeniyle güçlü probiyotik suşlar oldukları kanıtlanmıştır. Bu sebeple siderofor üretici mikroorganizmaların gıda sektöründe daha güçlü probiyotik suşları olabilmesi potansiyelini ortaya çıkarmıştır ve birlikte siderofor üretici laktik asit bakterileri üzerine ilgi artmıştır.

2.2. PROBİYOTİKLER

Son yıllarda gıda tüketicileri ‘fonksiyonel gıdalar’ şeklinde adlandırılan ürünlerle daha fazla karşılaşmaktadırlar. Vücudundaki biyolojik fonksiyonları olumlu yönde etkileyen, iyi yönde geliştirdiği ve hastalıkların ortaya çıkması riskini azalttığı kesinleşen gıdalar “fonksiyonel gıdalar” olarak adlandırılmaktadır.

Günümüzde fonksiyonel gıdalar olarak adlandırılan gıdaların yaklaşık %40’nı fonksiyonel süt ürünleri oluşturmaktadır ve bunların büyük çoğunluğu probiyotik mikroorganizma içeren fermente ürünlerdir (Turkmen ve ark., 2019). Probiyotik terimi ilk kez 19. yüzyılın başlarında Nobel ödülü sahibi Elie Metchnikoff tarafından ortaya atılmıştır (Sanders, 2003). Probiyotikler vücuda alındığında sindirim sistemi yoluyla bağırsağa ulaşan ve orada koloni oluşturan konakçıya çeşitli yararlı etkiler sağlayan mikroorganizmalardır (Gomes ve Malcata, 1999; FAO/WHO, 2002).

2.2.1. Probiyotik mikroorganizmalarda bulunması gereken özellikler

Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak kabul edilebilmesi için bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bunlar;

1. Güvenilir olmalı yani probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmanın kendisi ya da ürettiği metabolitler konakçı için toksik etki yaratmamalıdır.
2. Konakçıda hastalık yapacak hiçbir aktivite sergilememeli ve patojen olmamalıdır.
3. Probiyotik olarak kullanılacak olan suşlar insan kaynaklı tercih edilebilir.
4. Bağırsağa ulaşabilmesi için kullanılan in vitro testlerden olumlu sonuçlar alması gerekmektedir.
5. Probiyotik suşların en önemli şartlarından biri bağırsak epitel hücrelerine tutunarak kolonize olması ve çoğalarak patojen suşların üretimini engellemesidir.
6. Antimikrobiyal maddeler sentezleyerek bağırsakta yaşayan patojen mikroorganizmaları inhibe etmelidir.
7. Stabil olmalıdır. Olumsuz koşullara karşı dirençli olmalıdır.
8. Konakçıya yarar sağlamalıdır (Salminen, 1998; Gismondo, 1999; Gülbandılar ve ark., 2017).
9. En önemli şart ise probiyotik suşların seçilmesi için kullanılan in vitro testleri başarı ile tamamlamasıdır.

2.2.2. Probiyotiklerin etki mekanizması

Probiyotiklerin etki mekanizması üzerine yapılan çalışmalar genellikle sindirim sistemi üzerine olan etkileri üzerinedir. Fakat yapılan son çalışmalarda sindirim sistemi harici birçok yararlı işlevlerinin olduğu ve bu işlevlerin mekanizması aydınlatılmıştır. Probiyotik bakteriler, Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı antagonistik aktivite göstererek bakterilerin fonksiyonel etkinliğini sonlandıran metabolitler üretebilmektedirler. Probiyotiklerin ürettikleri organik asitler (laktik asit ve asetik asit vb.), ortam pH 'sının düşmesine, üreme için selektif bir ortam oluşturmasını sağlar ve bu neden ile diğer patojen bakterilerin yaşamsal faaliyetlerini durdurmasına sebep olmaktadır. Aynı zamanda laktik asit, patojenlerinin membran geçirgenliğini arttırmakta ve onları inhibe edebilmektedir (Doğan, 2017; Yaşlı 2010).

Protein yapısında olan bakteriyosinlerin, duyarlı bakterilerin sitoplazmik zarında olumsuz etki göstererek bakterilerin fonksiyonel etkinliğini sonlandırdığı ve bakterisidal etkisi olduğu bilinmektedir (Kavas, 2007).

Probiyotikler, bağırsak mikrobiyotasında patojenlerin üremesini ve kolonize olmasını engellemek için bir rekabet ortamı oluşturmaktadırlar. Bağırsak mikrobiyotasında bir patojen üremeye başladığında, patojenin üremesine engel olmak için bağırsak epiteline mukoza uyarımını gerçekleştirirler ve patojen bakterilerin üremesi için gerekli olan besin maddelerini tüketerek, onların üremesini ve bağırsak yüzeyine tutunmasını engellerler (Doğan, 2017). Sindirim sistemin dengesi birçok faktörden etkilenerek (stres, çevre koşulları, yaşlılık, hastalık ve antibiyotik kullanımı vb.) bozulabilmektedir. Bu dengenin korunmasında görev alan en önemli yapı taşlarından biri probiyotiklerdir (Ceyhan ve Alıç, 2012).

2.2.3. Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine etkileri

Probiyotikler, sindirim sisteminde ürettikleri metabolitler sayesinde patojen bakterileri inhibe ederek insan sağlığını olumlu yönde etkileyecek özellikler göstermektedirler. Örneğin, sentezledikleri bazı metabolitler ile bağırsak pH'sını düşürerek mikroorganizmaları yaşamsal faaliyetlerini durdurmaktadırlar (Ogawa ve ark., 2001).

Salgıladıkları bakteriyosinler, duyarlı bakterilerin sitoplazmik zar geçirgenliği arttırarak onları inhibe etmekte ve hidrojen peroksit üreterek bağırsakta yaşayan patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedirler (Hwanhlem ve ark., 2017; Pridmore ve ark., 2008).

Probiyotikler bağırsak mikrobiyotasını olumlu yönde değiştirerek; mutajenik, karsinojenik ve genotoksik gibi insan sağlığına zararı bileşiklerini inaktive ederek koruyucu etki göstermektedir. Bazı probiyotik mikroorganizmalar, sahip oldukları laktaz enzim aktivitesi ile laktoz intoleransı tedavisinde kullanılmaktadır (Vonk ve ark., 2012).

Probiyotikler konakçı vücudunda rekabet ortamı oluşturarak bağışıklık sistemini geliştirir ve rota virüse bağlı gelişen akut diyare, antibiyotik kullanımından dolayı

ortaya çıkan diyare veya Crohn gibi kronik bağırsak hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Hord, 2008; Sudha ve Bhonagiri, 2012).

Probiyotik olarak kullanılan bazı laktobasil suşları antimikrobiyal maddeler sentezleyerek gastrit, ülser gibi mide asitliğini arttıran hastalıklara sebep olan *Helicobacter pylori*'nin çoğalmasını durdurarak mide koruyucu etkileri bulunmaktadır (Reid ve ark., 2003).

Probiyotikler; antienflamatuvar sitokinlerin salınımını ve ekspresyonunu artırılması, apoptozun düzenlenmesi ve daha birçok mekanizma ile konakçının bağışıklık sistemini geliştirerek patojenlerin oluşturdukları hastalıklara karşı konakçı direncinin arttırmaktadır (Coşkun, 2006). Bunların yanı sıra probiyotikler konakçıdaki kolesterol düzeyini düşürerek kalp damar rahatsızlıklarını engellemektedir (Yeşilova ve ark., 2010).

Probiyotiklerin insan sağlığı üzerinde oluşturduğu yararlı etkilerin yanı sıra kolonda bulunan bağırsak mikrobiyotasının düzenlenmesine bağlı olarak gelişen rahatsız edici bağırsak sendromunun iyileştirilmesi, vitamin metabolizmasının geliştirilmesi, vajinal mikrobiyotanın düzenlenmesi, ortam pH'sının düşük tutularak patojenlerin inhibe edilmesi ile ürogenital hastalıkların engellenmesi ve diş çürüklerinin önlenmesi gibi etkileri de bulunmaktadır (Pandey ve ark., 2015; Gülbandılar ve ark., 2017).

2.2.4. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar

Probiyotik bakteri suşları, yıllardır fonksiyonel fermente gıdaların üretiminde, çeşitli gıdalarda katkı maddesi olarak kullanımı gibi gıda sektöründe kullanılırken aynı zamanda sağlık sektöründe de çeşitli hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılmıştır (Pandey ve ark., 2015; Türkmen ve ark., 2019). Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların büyük çoğunluğunu laktik asit bakterileri oluşturmaktadır (Ouwehand ve ark., 2002; Jan ve ark., 2002). Probiyotik mikroorganizmaları oluşturan bakterilerin çoğunluğunu ise *Lactobacillus* sp. ve *Bifidobacterium* sp. suşları oluşturmaktadır. Bunların dışında günümüzde mayalar ve küfler de probiyotik olarak

kullanılmaktadır (Garssen ve ark., 2004; Parvez ve ark., 2006; Kerry ve ark., 2018; Melo Pereira ve ark., 2018)

<i>Lactobacillus</i> türü	<i>Bifidobacterium</i> türü	Diğer türler
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> *	<i>B. longum</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i> *
<i>L. gasseri</i>	<i>B. animalis</i>	<i>S. cremoris</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>S. diacetylactis</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>B. essensis</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. laterosporus</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>L. reuteri</i>		<i>Enterococcus faecium</i> ^b
<i>L. rhamnosus</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. helveticus</i>		<i>P. freudenreichii subsp. shermanii</i>
<i>L. lactis</i>		<i>P. jensenii</i>
<i>L. sporogenes</i>		<i>Pediococcus</i>
		<i>Leuconostoc lactis subsp. cremoris</i>
		<i>L. lactis subsp. lactis</i>
		<i>Bacillus cereus</i>
		<i>Clostridium butyricum</i>

Şekil 2.14 Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar (Kaur ve ark., 2002; Senok ve ark., 2005; Shah, 2007; Ranadheera ve ark., 2017)

2.2.5. Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmaların belirlenmesinde başvurulmuş in vitro testler

Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizma suşlarının belirlenmesi için bir takım in vitro ve in vitro testlerin yapılması gerekmektedir. Bu amaçla yapılan in vitro testler;(Hummel, 2007; Elcioglu ve Kunduhoglu 2014; Çomak-Göçer 2016).

Mide ortamına direnç, hidrofobisite, NaCl toleransı, safra tuzlarına tolerans, fenol toleransı, hemolitik aktivite, otoagregasyon, antimikrobiyal maddelerin üretimi, antibiyotik direnci ve kolesterol asimilasyonudur. Probiyotikler tarafından üretilen bazı metabolik bileşikler antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Antimikrobiyal etkileri

sayesinde probiyotikler, bağırsakta patojen mikroorganizmaların çoğalmasını kontrol altına alabilmektedir (Paul ve Jakki 2008).

Antibiyotik direnci probiyotik mikroorganizmalarda istenen bir özellik değildir. Çünkü antibiyotik direnç genleri bir mikroorganizmadan diğerine aktarılabilmektedir.

Yapılan çalışmalar probiyotiklerin kandaki kolesterol seviyesini düşürdüğünü kanıtlamıştır. Kolesterol asimilasyonu testide muhtemel probiyotik mikroorganizmanın bu özelliğini belirlemek için yapılmaktadır (Walker ve Gilliland 1993; Alp ve Ertürkmen 2017). Literatürde bulunan çoğu çalışmada probiyotik suşların seçiminde kolesterol asimilasyon testleri yapılmaktadır. Bu testler probiyotik suşlar için kullanılan selektif testlerdir.

Bağırsak florasında, mikroorganizmalar tarafından ortama salgılanan fenolik bileşikler bulunmaktadır. Bu nedenle bir mikroorganizmanın probiyotik suş olarak tanımlanması için fenolik bileşiklere karşı direnç göstermesi gerekmektedir. Bu nedenle probiyotik suş seçiminde fenol tolerans testleri kullanılmaktadır. Bununla birlikte probiyotik bakterilerin kan hemolizi aktivesinin bulunmaması gerekmektedir. Bu sebeple bir mikroorganizmanın probiyotik olarak kabul edilmesi için birçok in vitro testten geçirilmesi gerekmektedir.

Mide ortamına direnç

Probiyotiklerin asit toleransının belirlenmesindeki amaç, midenin pH değerinin ortalama 2 civarında olmasıdır. Mide asit değerleri açıklık durumunda 1 civarındayken tokluk durumunda ise 4 civarlarında olmaktadır. Probiyotik suşların bağırsak sistemine ulaşabilmeleri için mideden geçmeleri gerekmektedir ve bu sebeple midedeki yüksek asidik koşulları tolerans gösterip canlılıklarını korumak zorundadırlar.

Yapılan bazı çalışmalarda mide ortamındaki pH değeri 2 olduğunda bu durum mikroorganizmalar için çok seçici bir ortam sağlarken pH değeri 3 olduğunda ise farklı bakterilerin gelişim gösterebildiği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle pH değeri 2.5 olan şartlar daha uygun ortam olarak belirlenmiş ve kültürlerin bu pH'daki 0. 2. ve 4.

saatlerdeki canlılıkları takip edilmiştir (Dunne ve ark., 2001; Özden, 2004; Yavuzdurmaz, 2007; Akman, 2009).

Asidik ortama direnç incelenirken asıl yapılmak istenen, probiyotik olup olmadığı incelenen mikroorganizmanın mideyi geçebilme yeteneğinin ortaya koyulmasıdır.

Bu özellik incelenirken, mide pH'sında ki solüsyonlar hazırlanmakta ve bu solüsyonlara mikroorganizmalar inkübe edilmektedir. Ardından belirli sürelerin sonunda agar besiyerine ekim yapılarak mikroorganizmaların farklı asidik koşullardaki sağ kalım miktarı ölçülmektedir. Sindirim modellerinde ise en çok sindirim enzimleri, safra tuzu ve müsin vb. kullanılmaktadır. Sindirim süresi olarak mide, ince bağırsak ve kalın bağırsak bölümlerinin her biri için çoğunlukla ikişer saat kullanılmaktadır. Bu nedenle mikroorganizmanın sağ kalım miktarı ölçülürken genel olarak ilk 6 saat dikkate alınmaktadır (Dunne ve ark., 2001; Argyri ve ark., 2013; Elcioglu ve Kunduhoglu, 2014; Çomak-Göçer ve ark., 2016).

Safra tuzuna tolerans

Sindirim sisteminde antimikrobiyal ekti gösteren etkenlerde bir de safra tuzlarıdır. Safra asidi, karaciğerde kolesterolden sentezlenir. Safra asitleri mikrobiyal aktivitelerin ardından kolonda kimyasal modifikasyonlara uğramaktadırlar. Modifikasyona uğrayan safra asitleri hücre membranlarına zarar vererek inhibitör etkisi yapmaktadırlar. Bu nedenle probiyotik suşlar için safra tuzu tolerans testleri kullanılmaktadır.

Mikroorganizmaların hücre membranlarına zarar veren bu durum, probiyotik suşlarının bağırsaklarda fonksiyonlarını sürdürebilmeleri için safraya karşı gerekli direnci göstermek zorundadırlar. Genellikle probiyotik adayı mikroorganizmaların safra tuzlarına karşı toleransı incelenirken %0,3, %0,5 ve %1 konsantrasyonunda safra tuzu içeren besiyerindeki gelişimi belli saat aralıklarla takip edilmektedir (Dunne ve ark., 2001; Akman, 2009; Önal Darılmaz, 2010; Zago, 2011).

Dunne ve arkadaşlarının 2001'de sığır ve domuz safrası üzerinde yaptıkları bir çalışmada, deneyde kullandıkları *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarının, sığır

safrasına direnç gösterirken domuz safrasına direnç göstermediklerini tespit etmişlerdir.

Antibiyotik direnci

Laktik asit bakterileri farklı yapıdaki antibiyotiklere karşı duyarlı veya dirençli yapıda olabilmektedirler (Gad, 2014). Laktik asit bakteri için bu durum olumlu bir özellikmiş gibi görülse de aslında laktik asit bakterilerinde antibiyotiğe duyarlılık olumsuz bir sonuçtur.

Çünkü laktik asit bakterileri diğer bakteriler gibi antibiyotik direnç genlerini diğer mikroorganizmalara transfer etmektedirler. Antibiyotiğe direnç genleri olası bir patojen mikroorganizmaya transfer edildiğinde bu patojen mikroorganizma antibiyotiğe karşı dirençli olur ve dolayısıyla hastalık durumunu ile karşılaşıldığında antibiyotik ile tedavi süreci zorlaşmaktadır. Probiyotik kültürleri içeren laktik asit bakterileri gıdalarımızda ve çevremizde oldukça yüksek sayılarda kullanılmaktadır. Bu sebeple kullanılan probiyotik suşlar antibiyotik direnç genlerinin aslında birer taşıyıcısıdır (Hummel, 2007; Meral ve Korukluoğlu, 2014).

Günümüzde probiyotik suşlar antibiyotik direnç genlerinin potansiyel birer taşıyıcısı olarak görüldüğü için gıdalarda kullanılacak mikroorganizmaların antibiyotik genlerini içermesi istenilmemektedir. Bu nedenle probiyotik adayı organizmanın antibiyotik direnci için test edilmesi gerekmektedir. Günümüzde mikroorganizmanın antibiyotik direnci iki farklı metot ile tayin edilebilmektedir.

Birinci metot klasik metottur ve bu testler; disk difüzyon testi, minimal inhibisyon konsantrasyonu testi ve otomatik antimikrobiyal hassasiyet testi uygulanmaktadır. İkinci metot ise moleküler temelli testlerde ise ilgili genin PCR metotları kullanılarak taraması gerçekleştirilmektedir (Hummel, 2007; Anonymous, 2018; De Melo Pereira, 2018). Tablo 2.1’de bazı bakterilere ait EFSA (European Food Safety Authority)’nın bildirdiği antimikrobiyal duyarlılık değerleri görülmektedir.

Tablo 2. 1 Bazı bakteriyal inhibisyon değerleri (mg/L) (EFSA, 2012)

	Ampisilin	Vankomisin	Gentamisin	Kanamisin	Streptomisin	Eritromisin	Klindamisin	Tetrasiklin	Kloramfenikol
<i>L. reuteri</i>	2	-	8	64	64	1	1	16	4
<i>L. plantarum/pentosus</i>	2	-	16	64	-	1	2	32	8
<i>L. rhamnosus</i>	4	-	16	64	32	1	1	8	4
<i>L. casei/paracasei</i>	4	-	32	64	64	1	1	4	4
<i>L. lactis</i>	2	4	32	64	32	1	1	4	8
<i>Bifidobacterium</i>	2	2	64	-	128	8	1	1	4
<i>Pediococcus</i>	4	-	16	64	64	1	1	8	4
<i>Leuconostoc</i>	2	-	16	16	64	1	1	8	4
<i>Propionibacterium</i>	2	4	64	64	64	0,5	0,25	2	2

Kolesterol asimilasyonu

İnsan vücudu tarafından ihtiyaç duyulan kolesterolün belirli bir kısmı vücut tarafından üretilirken diğer bir kısmı tüketilen gıdalar tarafından karşılanmaktadır. Kolesterol seviyesi yükseldiğinde ise insan sağlığını olumsuz yönde etkileyecek kalp damar hastalıklarına neden olabilmektedir. Dolayısıyla probiyotik suşların bağırsak florasında kolesterolü asimile etmesi ve kolesterol seviyesini düşürmesi probiyotik suşların yoğun ilgi görmesine neden olmuştur (Walker ve Gilliland, 1993).

Bazı probiyotik suşların kolesterolü asimile ettikleri ve pH değerini düşürmeleri sonucunda safra tuzlarının ve kolesterolün presipitasyonuna neden oldukları şeklinde hipotezler mevcuttur.

Yapılan çalışmalar doğrultusunda ise; probiyotik Laktobasiller ile Bifidobakterilerin safra tuzlarını safra tuzu hidrolaz enzimi (BSH) ile parçaladıklarını ve böylece kolesterolü asimile ederek kolesterol seviyesini düşürdükleri tespit edilmiştir. Çalışmalarda, kolesterolün farklı şekillerde asimile edilebildiği gözlemlenmiştir. Bakterilerin membran yapısına katılarak ya da kolesterol yüzeyine tutunarak, kolesterolün bağırsaklardan kana emilimini azaltabildiği belirlenmiştir (Alp ve Ertürkmen, 2017).

Probiyotik suşların tespiti için kolesterol asimilasyon yeteneklerinin belirlenmesi en önemli in vitro testlerden biridir.

Yapılan çalışmalarda proses genel olarak incelendiğinde, bilinen miktarda kolesterol içeren besiyerlerinde probiyotik aday mikroorganizma inkübe edilmekte, inkübasyon sonunda ortamdaki kolesterol miktarı ölçülerek başlangıç seviyesine göre fark belirlenmektedir (Walker ve Gilliland, 1993). Probiyotiklerin kolesterol asimilasyonu farklı yöntemlerle tayin edilebilmektedir. Örneğin; Tsai'nın 2013 yılında yaptığı bir çalışmada probiyotiklerin BSH aktivitesini ve kolesterol etme yeteneklerini belirlemek için yüksek performanslı sıvı kromatografisini (HPLC) kullanmışlardır.

Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak kullanılabilmesi için; patojen olmaması, mide asidine ve safra tuzuna dayanıklı olması, bağırsak yüzeyine tutunabilmesi ve dolayısıyla hidrofobisitesi ve otoagregasyon yeteneklerinin yüksek olması, sindirim sisteminde yaşamını devam ettirebilmesi, antimikrobiyal bileşikler üretebilmesi ve bu bileşiklerin patojenler üzerinde inhibe edici etki oluşturması, bağışıklık sistemini uyarması, kolesterol asimilasyonu ve laktaz aktivitesi gibi metabolik etkiler gösterebilmesi, teknolojik süreçlere dayanıklı olması beklenmektedir. Bu nedenle probiyotik suşların seçiminde mide ortamına direnç, safra tuzuna tolerans, antibiyotik direnci, antagonistik aktivite, kolesterol asimilasyonu gibi in vitro testler tercih edilmektedir.

Antimikrobiyal maddelerin üretimi

Laktik asit bakterilerinin sentezledikleri organik asitler, yağ asitleri, hidrojen peroksit gibi antimikrobiyal etkiler gösteren çeşitli metabolik bileşikler bulunmaktadır. Bununla birlikte bazı laktik asit bakterileri bakteriyosin üreterek çevresindeki zararlı suşlara karşı antimikrobiyal etki göstermektedir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen antimikrobiyal maddeler ve etki spektrumları Tablo 2.2.'de gösterilmektedir (Fuller, 1992; Dunne ve ark., 2001).

Tablo 2. 2 Laktik asit bakterileri tarafından üretilen antimikrobiyal maddeler ve etki spektrumları (Fuller, 1992; Çetin, 2006)

Metabolit ürün	Etki spektrumu
Organik asitler	
Laktik asit	Putreaktif ve Gram (-) bakteriler, bazı küfler
Asetik asit	Putreaktif bakteriler, Clostridium'lar, bazı maya ve küfler
Hidrojen peroksit	Patojenler ve bozulma etkeni mikroorganizmalar

Enzimler	
Laktoperoksidaz enzimi	Patojenler ve bozulma etkeni bakteriler (süt ve süt ürünleri)
Lizozim	İstenmeyen Gram (+) bakteriler
Düşük molekül ağırlıklı metabolitler	
Reuterin	Geniş bakteri spektrumu, maya ve küfler
Diasetil	Gram (+) bakteriler
Yağ asitleri	Çeşitli bakteriler
Bakteriosinler	Bazı LAB ve Gram (+) bakteriler, bazı sporlu bakteriler

Dunne 'nın 2001 yılında yapmış olduğu bir çalışmada insan bağırsağından izole ettikleri *L. salivarius* UCC118 suşunun *Listeria*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *E. coli*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Bifidobacterium* üzerinde antimikrobiyal etkisi üzerine çalışılmıştır. Yapılan çalışmanın sonucunda; *L. salivarius* UCC118 suşunun Lactobasiller ve Bifidobakterleri üzerinde antimikrobiyal etki görülmemiş fakat diğer bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir.

Bir mikroorganizmanın antagonistik etkisinin belirlenmesi için üç yöntem kullanılır. Bunlardan birincisi disk difüzyon (DD) yöntemidir. Bu yöntemde bakteri süpernatantı bir diske emdirilir ve araştırılmak istenilen mikroorganizmanın bulunduğu besiyerine yerleştirilir. Besiyerinde disk çevresinde oluşan berrak zon ve çapı antagonistik etkisi hakkında bilgi vermektedir. İkinci yöntem olan kuyu difüzyon (KD) yönteminde ise agar üzerinde kuyucuklar oluşturulur ve incelenmek istenen örnek kuyulara doldurulur. İnkübasyon sonrası antimikrobiyal etki gösteren örneklerin bulunduğu kuyuların çevresinde oluşan berrak zon ve çapı ölçülmektedir. Üçüncü bir test olan minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) testinde ise, araştırılmak istenen maddenin etki ettiği en düşük doz belirlenir ve bu amaçla, araştırılmak istenen çözelti hazırlanan farklı konsantrasyonlarda hedef mikroorganizma üzerinde denenmektedir. İnhibisyonun görüldüğü konsantrasyon MİK değeri olarak kabul edilmektedir (Hummel, 2007; Anonymous, 2018; De Melo Pereira, 2018).

2.3. BAKTERİYOSİNLER

Bakteriyosinler çoğu zaman antibiyotik benzeri olarak tanımlanmaktadır. Fakat klasik antibiyotiklerden farklı olarak protein yapısında ve aynı türe içerisinde olan

mikroorganizmalara karşı da etki gösterebilmektedirler. Bununla birlikte, bakteriyosinleri klasik antibiyotiklerden ayıran diğer bir özellikte protein yapıda oldukları için sindirim sisteminde proteazlar tarafından aminoasitlere parçalanmasıdır. Bu nedenle bakteriyosinler vücutta absorbe edilmezler ve kalın bağırsak florasına ulaşamazlar.

Bakteriyosinler bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenirler ve üreten tür kendi bakteriyosinine karşı bağışıklığa sahip olmaktadır (Cokmus ark., 1993, O'Keeffe ark., 1999). Bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktivitelerinin yanı sıra doğal olmaları, renksiz, tatsız ve kokusuz olmaları gıda sektöründe ürün özellikleri açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle bakteriyosinler et ve süt ürünleri başta olmak üzere birçok alanda kullanılabilmesi ile birlikte antimikrobiyal aktivitesi sayesinde gıda ambalajlarında da kullanılabilmektedir. Isı stabilitelerinin yüksek olması, işlem sırasından ısıya karşı dayanıklılık göstermesi ile birlikte birçok gıda maddesinde kullanılabilirliği kanıtlanmıştır (Cintas ve ark., 1998, Kuleaşan 2002).

Üretilen bakteriyosinler daha çok Gram (+) bakteriler üzerinde etki göstermekte ve her bakterinin en az bir adet bakteriyosin ürettiği belirtilmektedir. Laktik asit bakterileri de diğer Gram pozitif bakterilere karşı aktivite gösteren çok çeşitli bakteriyosinler üretirler (Abee ve ark., 1994). Ayrıca diğer tüm bakteriler ile karşılaştırıldığında daha fazla bakteriyosin ürettiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle laktik asit bakterileri bakteriyosin üretimi açısından önemli bir yere sahiptir. Laktik asit bakterilerinin bakteriyosin sentezleme yeteneği bakımından bu denli zengin olmasının sebebi hem çok farklı cins ve türleri içermesinden hem de GRAS (Generally Recognized As Safe) olarak kabul edilmesinden kaynaklanmaktadır (Powell 2006; Curiel ve ark., 2010).

Gıda sektöründe gıdaların raf ömrünün uzatılması ve gıda koruyucu olarak laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin tatsız, kokusuz, doğal ve güvenilir olmaları bilim insanları tarafından oldukça dikkat çekmektedir. Bu nedenle bakteriyosin üretici laktik asit bakterilerinin gıdalarda kullanımı oldukça yaygınlaşmaktadır. Gıdalarda kullanımları genel olarak incelendiğinde; doğrudan gıda maddesine bakteriyosin katılması, bakteriyosin sentezleyen koruyucu kültürlerin gıdaya inokülasyonu,

bakteriyosin sentezleyen koruyucu kùltürlerin ambalaj materyali yüzeyine pùskùrtùlmesi şeklinde olabilmektedir (Leroy ve ark., 2003).

Diğer bir deyişle bakteriyosinlerin gıdalarda kullanımı ile gıda kalitesinin artırılması, gıdanın doğallığının ve özellikle güvenliğin korunması hedeflenmektedir (Moreno ve ark., 2003).

Yukarıdaki literatùr taramasının ışığında alınan numunelerden siderofor üretici mikroorganizmaların izolasyonunun gerçekleştirilip, bu mikroorganizmaların hangi tipteki sideroforu ürettiği tespit edilecektir. Siderofor üretimi pozitif olan suşlar maksimum siderofor üretimi için optimize edilecek ve saflaştırılacak sideroforların karakterizasyonu yapılacaktır. Probiyotik özellik gösteren bakterilerin siderofor varlığının araştırılması ve bu sideroforların probiyotiklerin belirlenmesi için gerekli olan in vitro testlerden olan kan hemolizi, kolesterol asimilasyonu ve bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi incelenecektir. Siderofor üretici probiyotik suşların ve sideroforun gıda endùstrisinde uygulama potansiyelinin araştırılması amaçlanmaktadır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Siderofor üretici probiyotik bakteriler

Bu çalışmada Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Endüstriyel Mikrobiyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvarının kültür koleksiyonunda bulunan laktik asit bakteri suşları kullanılmıştır.

3.1.2. Ekipman

Çalışmada kullanılan tüm ekipmanların isim ve markaları aşağıdaki gibidir.

Tablo 3. 1 Kullanılan ekipman ve markaları

CİHAZLAR	MARKA
Manyetik Karıştırıcı	MTOPS MS300HS
Çalkalamalı İnkübatör	NEW BRUNSWICK SCİENTİFİC
Masa Üstü Çalkalamalı İnkübatör	LAB. COMPANİON SI-600
Santrifüj	HETTICH ROTİXA/RP
Masa Üstü Santrifüj	HERAEUS LABOFUGE 400R
Vakum Konsantratör	BACHOFER
Su Banyosu	HAAKE B3
+4°C ve -20°C Buzdolabı	VESTEL BZP-L3302W
Etüv	GEMO DT104
Pasteur Fırını	PARAFFİN
Vorteks	SCİLOGEX MX-S
Hassas Terazi	RADWAG AS220.R2
pH Metre	İNOLAB
Uv-Spektrofotometre	PG T60
0.45 ve 0.22 µm Steril Filtre	MİLLEX-HV
Quartz Küvet	PG INSTRUMENTS LİMİTED
Lam	ISO LAB
Mikroskop	OLYMPUS CX21
0.5-10 µl Otomatik Pipet	CAPP
1-5 ml Otomatik Pipet	CAPP
10-100 µl Otomatik Pipet	CAPP
Dondurucu	HETTICH
Kar Makinesi	VISION
Otoklav	HICLAVE HV-50L

3.1.3. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup, isim ve markaları aşağıdaki gibidir.

CAS, MRS Agar, LB Agar, Agar, MRS Broth, NaOH, HCL, FeCl₃, Süksinik asit, milk, D-glukoz, Nişasta, Maltoz, Sükroz, Potasyum Nitrat, Tripton, Amonyum Sülfat, Metanol, Safra tuzu, Fenol, NaCl, Ksilen, Aseton, Heptan, Kloroform, Etil Asetat, Kolesterol, Hidrojen Peroksit, Dimetil Fenildiamin Dihidroklorit, K₂SO₄, K₂HPO₄, NH₄Cl, MgSO₄.7H₂O, ZnSO₄.7H₂O, CaCl₂.2H₂O, CuSO₄, MnSO₄.H₂O, Thiamin.HCl, Sülfosalisilik asit, Desferal, 2,3-DHBA, KCl, Na₂ HPO₄, KH₂HPO₄,

3.1.4. Besiyerleri ve çözeltiler

MRS Agar: 68.2 g MRS Agar ve 1 litre dH₂O karıştırılır. 121°C’de 15dk otoklavlanır. 50°C’ de el yakmayacak sıcaklığa geldiğinde steril petrilere dökülür.

MRS Broth: 50 g MRS Broth tartılır ve üzerine 1 litre dH₂O ilave edilir. Ardından manyetik karıştırıcı yardımı ile bir miktar ısı verilerek homojen karışması sağlanır. Deney tüplerine 5’er ml olmak üzere eşit hacimde ayrılır ve 121°C’de 15 dakika otoklavlanır.

Chemically defined low-iron medium (CDLIM Besiyeri) (g/L): K₂SO₄: 2, K₂HPO₄: 3, NH₄Cl: 1, MgSO₄.7H₂O: 0,08, ZnSO₄.7H₂O: 0,002, CaCl₂.2H₂O: 0,1, CuSO₄: 5x10⁻⁶, MnSO₄.H₂O: 3,5x10⁻⁵, Thiamin.HCl: 2x10⁻⁴, Maltoz: 25 Tartılan malzemeler 800 ml miliQ su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılır. Ardından 1 L’ye tamamlanarak pH 7 ye ayarlanır ve 0.22 µM şırınga filtrelerden geçirilerek steril edilir.

CAS (Crome Azurol S) Solüsyonu:

1. Çözelti (CAS Solüsyonu): 0.06 g CAS tartılır ve 50 ml miliQ su içerisinde çözdürülür. Ardından 0.22 µM şırınga filtrelerden geçirilerek içerisinde kalan partiküllerden uzaklaştırılır.
2. Çözelti (FeCl₃.6H₂O Solüsyonu): 0,0027 FeCl₃.6H₂O tartılır ve 10 ml 10Mm HCl içerisinde çözdürülür. 0,0027 g tartılması zor olduğundan 0,027 g tartılır ve 10 ml

10Mm HCl içerisinde çözündürülür. Ardından içerisinde 1 ml alınır ve 9 ml 10mM HCl içerisinde ilave edilir.

3. Çözelti (HDTMA Solüsyonu): 0,073 g HDTMA tartılır ve 40 ml miliQ içerisinde çözündürülür. Tam berraklık elde edilmesi biraz ısıtılır.

Solüsyon karışımı (1+2+3): Solüsyon 1'in içerisinde 9 ml solüsyon 2'den ilave edilir. Ardından solüsyon 3'ün tamamı karıştırılır. Solüsyon mavi renge dönüştükten sonra cam bir şişede otoklava atılır. Kullanım süresi 1 haftadır, ışık ile teması olmamalı ve buzdolabında saklanmalıdır.

LB- CAS Agar:

500 ml dH₂O içerisinde 20 g LB Agar besiyerinden ilave edilir ve çözündürülür. Ardından tam mavi rengi yakalamak için besiyerinin pH'sı 6,5'e sabitlenir ve otoklava atılır (Eğer besiyeri pH'sı 6,8 'in üzerine çıkar ise hazırlanan agar plakları yeşil renge dönüşmektedir). Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50°C 'ye kadar soğuduğunda hazırlanan boya solüsyonu ile besiyeri birleştirilir. 1 Litre besiyeri için 100 ml CAS boya solüsyonu kullanılmaktadır.

Sülfosalisilik asit çözeltisi (shuttle solüsyonu): 0.25 g sülfosalisilik asit tartılır ve 5 ml miliQ su içerisinde çözündürülür.

PBS Tampon 10X (g/L) (pH 7.2): NaCl: 80.6, KCl: 2.2, Na₂ HPO₄ 11.5, KH₂HPO₄ 2.0

Tartılan ürünler 800 ml dH₂O içerisinde çözündürülür ve ardından çözünmemiş parçacıkları çıkarmak 0.45 µM gözenekli filtreler ile filtre edilir. Otoklavda sterilize edilir ve kapaklı cam kavanozlar kullanılmak üzere saklanır.

0.1 mol/L KNO₃: 10.11g KNO₃ tartılır ve 1 litre suda çözündürülür.

% 5 koyun kanı ile takviye edilmiş MRS: 100 ml MRS Agar besiyerine 5 ml koyun kanı ilave edilerek yapılmaktadır.

Kolesterol Çözeltisi: 500 mg kolesterol tartılarak üzerine 100 mL su içerisinde ilave edilmiştir. Çözelti 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmiştir

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Siderofor üretici laktik asit bakterilerinin tespiti ve CAS yöntemi ile kantitatif olarak siderofor miktarının belirlenmesi

Endüstriyel Mikrobiyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda -80 °C'de bulunan 45 adet laktik asit bakteri izolatlarından 20'şer µL örnek, MRS broth besiyerine inoküle edilerek 30°C'de 48 saat boyunca ön-aktifte edilmiştir. Saflıkları mikroskopik olarak kontrol edilen suşlar, gece boyunca MRS Agar besiyerinde 30°C'de ikinci kez aktive edildikten sonra elde edilen kolonilerden "Chrome Azurol S (CAS)" agar besiyerine çizgi ekim yapılmış ve 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda mavi olan besiyerinde turuncu renkli üreme görülmesi pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir (Payne, 1994; Halkman K., 2005).

Siderofor üretimi katı besiyerinde kalitatif olarak gösterilen suş(lar)dan, spektrofotometrede kantitatif siderofor üretimi çalışması yapılmıştır. Bu amaçla, 4.5 mL MRS Broth içeren tüplere 500 µl (%10) 48 saat boyunca aktive edilen kültürden aktarılacak, 30°C, 180 rpm'de 24 saat inkübe edilmiştir. Üreyen hücrelerin konsantrasyonu OD₆₀₀ 'de 1'e ayarlandıktan sonra, CAS boyası ile boyanmadan önce demir içermeyen CDLIM besiyerine ekimi yapılmıştır. MRS besiyerinden gelebilecek demirin uzaklaştırılması için ön hazırlık çalışması yapılmıştır. Bunun için Khan ve ark., (2021) tarafından önerilen aşağıdaki protokol takip edilmiştir.

1. 5 ml *L. plantarum* sp. kültürü 5 dk 7000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
2. Toplanan bakteri peleti iki defa PBS ile yıkanıp 5 dk 7000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
3. Steril erlene 49 ml CDLIM besiyeri aktarılmıştır.
4. CDLIM besiyeri içerisine 1 ml bakteri süspansiyonu inoküle edilmiş ve hemen OD₆₀₀'de absorbans ölçerek başlangıç bakteri konsantrasyonu belirlenmiştir. Aynı zamanda başlangıç siderofor miktarının belirlenmesi için de 2 ml örnek alınarak 7000 rpm'de santrifüj yapılmış ve süpernatantlar toplanmıştır.
5. Hücreler 30 °C 'de 180 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır

6. Belirli aralıklarla toplanan süpernatanttaki siderofor üretim kapasitesi CAS metodu ile incelenmiştir.

Toplanan süpernatantlardan 1.5 mL süpernatant 300 µl CAS boya solüsyonu ile karıştırılarak boya içerisindeki CAS- HDTMA kompleksinden Fe⁺³ iyonlarının, süpernatanttaki sideroforlar ile kompleks oluşturması sağlanır. Daha sonra ortama ilave edilen 20 µl sülfosalisilik asit shuttle solüsyonu, sideroforlara bağlanmayan serbest demirin (Fe+3) şelatlanması için kullanılır. Demir (III), 5-sülfosalisilik asit ile kırmızı bir şelat kompleksi oluşturur. Siderofor tarafından demirin alınması, boyanın renginde değişime neden olmaktadır. Boyanın rengi; Maviden menekşe mora dönmesi katekol tip siderofor varlığını, maviden turuncuya dönmesi hidroksammat tip siderofor varlığını ve maviden açık sarıya dönmesi ise karboksilat tip siderofor varlığını göstermektedir (Miranda ve ark., 2007). OD₅₈₀ absorbans ölçülerek ortamda bulunan serbest demir miktarı belirlenir.

Buna istinaden renk değişimine bağlı olarak 580 nm dalga boyunda yapılan spektrofotometrik absorbans ölçümleri sonucunda siderofor üretim yüzdeleri aşağıdaki siderofor yüzde formülü üzerinden hesaplanmıştır (Payne, 1994).

$$\% \text{siderofor birimi} = \frac{(Ar - As)}{Ar} * 100$$

Ar: Referans değeri

As: Örnek değeri

3.2.2. 16s rRNA gen dizi analizi yapılarak seçilen mikroorganizmanın tanılanması

En yüksek siderofor üreticisi mikroorganizmanın tanılanması, 16s rRNA bölgesinin dizilemesi ile yapılmıştır. MRS Broth besiyerinde 30°C'de inkübasyona bırakılan siderofor üreticisi probiyotik bakteriye ait 16S rRNA bölgesi primerler kullanılarak kimliklendirilmesi yapılmıştır. Bu çalışma hizmet alımı olarak Atlas Biotechnologies, Co., Ltd.'dan yapılmıştır. SeqScape ile sekans çakışmalarını kontrol edilmiştir. 27F-1492R ile elde edilen PCR bantlarından 785F ve 907R primerleri kullanarak sekans PCR reaksiyonunu gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. *Lactobacillus plantarum* BHC03 suşunun optimum siderofor üretim zamanının belirlenmesi

Optik dansite (OD) optimizasyonu

Boyanın rengi; Maviden menekşe mora dönmesi katekol tip siderofor varlığını, maviden turuncuya dönmesi hidroksamat tip siderofor varlığını ve maviden açık sarıya dönmesi ise karboksilat tip siderofor varlığını göstermektedir (Miranda ve ark., 2007). Siderofor üreticisi *L. plantarum* BHC03 suşunun hangi tip siderofor üreticisi olduğunu bilmediğimiz veya bilinmeyen bir siderofor tipine sahip olabileceği ihtimali de göz önüne alınarak sideroforun absorbe ettiği en uygun ışık dalga boyu optimizasyonu yapılmıştır. Siderofor üretimi OD₄₀₀, OD₄₅₀, OD₅₈₀ ve OD₆₃₀ değerlerinde ölçülerek değerler arasında karşılaştırma yapılmıştır. Yapılan karşılaştırmada en yüksek absorbans değerini veren dalga boyu kullanılarak çalışmaya devam edilmiştir.

Sıcaklık optimizasyonu

Ana stoktan (-80 °C) alınan *L. plantarum* BHC03 suşu 5 ml tüplerde bulunan MRS Broth içerisine 10 µl ekimi gerçekleştirilmiştir. Ardından 37 °C 48h 180 rpm’de birinci aktivasyonun gerçekleşmesi için inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat sonra ikinci aktivasyon için 5 ml MRS Broth içerisine birinci aktivasyondan 500 µl ekim yapılmış ve 24h inkübasyona bırakılmıştır. Gerçekleştirilen çift aktivasyonun ardından örnekler OD₆₀₀ ‘de 1’e ayarlanmıştır. Her 5 ml örnek 10000 rpm’de santrifüj yapılmış ve iki defa PBS tamponu (pH7.2) ile yıkanmıştır. Hazırlanan 50 ml CDLIM besiyerine yapılan inokülasyonların her biri farklı sıcaklıklarda büyütülmüştür. Sıcaklık optimizasyonu için 23 °C, 30 °C, 37°C ve 45 °C sıcaklıklarında siderofor üretimi gerçekleştirilmiştir. Her bir sıcaklık için 4 saatte bir 2 ml örnek alınıp santrifüj yapılmış ve hücre süpernatantları CAS solüsyonu ile boyanmıştır. UV-spektrofotometre ölçümler gerçekleştirilecek ve birbirleri ile karşılaştırılmıştır. En yüksek absorbans değerini veren sıcaklık seçilerek çalışmaya o sıcaklık ile devam edilmiştir (Güney, 2014).

pH optimizasyonu

Ana stoktan (-80 °C) alınan *L. plantarum* BHC03 suşu 5 ml tüplerde bulunan MRS Broth içerisine 10 µl ekimi gerçekleştirilmiştir. Ardından 37 °C 48 saat 180 rpm’de birinci aktivasyonun gerçekleşmesi için inkübasyona bırakılmıştır.

48 saat sonra ikinci aktivasyon için 5 ml MRS Broth içerisine birinci aktivasyondan 500 µl ekim yapılmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gerçekleştirilen çift aktivasyonun ardından örnekler OD₆₀₀’de 1’e ayarlanmıştır. Her 5 ml örnek 10000 rpm’de santrifüj yapılmış ve iki defa PBS tamponu (pH 7.2) ile yıkanmıştır. Ardından 50 ml CDLIM besiyerine ekimi yapılmış ve 37 °C ‘de 7 farklı pH değerinde siderofor üretim verimi incelenmesi için 4, 5, 6.5, 7, 8.5, 10 ve 12 pH değerleri kullanılmıştır. Her bir pH için 4 saat aralıklar ile 2 ml örnek alınıp santrifüj yapılmış ve hücre süpernatantları CAS solüsyonu ile boyanmıştır. UV-spektrofotometrede ölçümler gerçekleştirilmiş ve birbirleri ile karşılaştırılmıştır. En yüksek absorbans değerini veren pH seçilmiş ve çalışmaya devam edilmiştir (Güney, 2014).

FeCl₃ Optimizasyonu

Siderofor üretimi 0, 1,2.5, 5, 50 ve 100 µM olmak üzere 6 farklı konsantrasyonda FeCl₃ içeren CDLIM besiyeri içerisinde gerçekleştirilmiştir. Her bir farklı FeCl₃ konsantrasyonu için 4 saat aralıklar ile 2 ml örnek alınıp santrifüj yapılmış ve hücre süpernatantları CAS solüsyonu ile boyanmıştır. UV-spektrofotometrede ölçümler gerçekleştirilmiş ve birbirleri ile karşılaştırılmıştır. En yüksek absorbans değerini veren FeCl₃ konsantrasyonu seçilmiş çalışmaya devam edilmiştir (Güney, 2014).

Azot ve karbon kaynağı optimizasyonu

Siderofor üretimine karbon kaynağının etkisinin belirlenmesi amacıyla süksinik asit, süt tozu, D-glukoz, nişasta, maltoz, şükroz ve gliserol, azot kaynağı olarak ise; amonyum klorid, potasyum nitrat, tripton, amonyum sülfat ve yeast ekstrakt CDLIM besiyerindeki maltoz yerine kullanılmıştır.

Farklı karbon ve azot kaynağı içeren 50 ml’lik CDLIM besiyerileri hazırlanmıştır. Her farklı azot ve karbon kaynağı için 4 saat aralıklar ile 2 ml örnek alınıp santrifüj yapılmış ve hücre süpernatantları CAS solüsyonu ile boyanmıştır ve UV-spektrofotometrede

absorbans değerleri ölçölmüştür. Sonuçlar birbirleri ile karşılaştırılmış ve siderofor üretim kapasitesini en yüksek ölçüde arttıran karbon ve azot kaynakları tercih edilmiştir. (Güney, 2014).

Siderofor üretimini arttırmak için yapılan her bir optimizasyonun aşamasının sonucunda en yüksek üretimin göröldüğü sonuçlar değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmenin sonucunda optimal koşullar birleştirilerek siderofor üretimindeki artışın gözlemlenmesi için deneme yapılmıştır.

3.2.4. *Lactobacillus plantarum* BHC03 sideroforunun saflaştırılması ve karakterizasyonu

Optimum koşullar sağlanarak hazırlanmış olan 2 litre CDLIM besiyeri içerisine yine 3.2.1’de verilen protokol uygulanarak 40 mL bakteri inokülasyonu gerçekleştirilmiş ve 37 °C’de 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminin ardından 7000 rpm’de 15 dakika santrifüj yapılmış ve kültür süpernatantları falkon tüplere ayrılarak -20°C’de dondurulduktan sonra 0,1 mbar basınç ve -64 °C sıcaklıkta liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon işlemi Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında bulunan Labconco marka liyofilizatör cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Liyofilize edilen her bir falkon (50 mL) 1 mL metanolde çözdürölmüş ve 7000 rpm’de 15 dakika santrifüj yapıldıktan sonra elde edilen süpernatantlar 0.45 µM’lık şırınga filtrelerden geçirilerek temizlenmiş ve sideroforlar saflaştırma için hazır hale getirilmiştir (Jürgen ve ark., 2001).

Sideroforun saflaştırma işlemi esas olarak Kolon kromatografisinde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra tanılama amaçlı İnce tabaka Kromatografisi (TLC) ve Yüksek Basıncılı Sıvı kromatografisi (HPLC) de uygulanmıştır.

Kolon Kromatografisi

Kolon kromatografisi, Sephadex LH-20 dolgu maddesi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 40 gr Sephadex LH-20 dolgu maddesi üzerine 120ml metanol ilave edilmiş ve 4 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır ve dolgu maddesinin şişmesi ve çapraz bağların oluşması sağlanmıştır. 4 saatin sonunda olgunlaşmış olan Sephadex LH-20 resini herhangi bir hava kabarcığı bırakılmadan saflaştırma kolonuna yüklenmiştir. Kolonun

tam anlamıyla yerleşmesi için 3 gün boyunca, yaklaşık 4 kolon hacmi olacak kadar metanol kolondan geçirilmiştir. Kolon yüzeyinde yaklaşık 1 cm yüksekliğinde metanol kaldığında, kolon kapatılarak çalışmalar için hazır hale getirilmiştir.

Metanol içerisinde olan liyofilize haldeki sideroforlar karışımından 1ml örnek büret ile alınarak kolon yüzeyine eşit hacimde ve kolon dolgu maddesine zarar vermeden yüklenmiştir.



Şekil 3. 1 Sephadex LH-20 saflaştırma kolonu hazırlanması

Yer çekimine karşı gerçekleştirilen akış esnasında her biri 2 ml’lik 50 fraksiyon toplanmıştır. Toplanan fraksiyonlardaki siderofor varlığının tespit edilebilmesi için CAS metodu kullanılmıştır. Boyanan her bir fraksiyon OD₅₈₀ ‘de ölçülmüştür. Ölçümün ardından birbirine eşdeğer olan fraksiyonlar birleştirilmiştir.

İnce Tabaka (TLC) Kromatografisi

TLC uygulaması için silika jel kaplı cam plakalar kullanılmıştır. Plaka alt kısmından 1cm boşluk ve örnekler arasında 2 cm aralık bırakılarak işaretlenmiştir. İşaretlenen bölgelere pozitif kontrol olarak 2,3-DHBA ekstraktı ve desferal damlatılmıştır. Desferal içeriğinde yüksek miktarda hidroksamat tipi siderofor ailesine ait olan desferrioksamin bulunduran ilaç grubudur. İşaretlenmiş diğer noktalara ise saflaştırılmış fraksiyonlardan 10 µL damlatılmıştır. Örneklerin uygulandığı plakalar, çift bölmeli cam TLC tankı içerisinde 20 ml benzen-asetat-su (125:72:3) karışımından oluşan çözücüde yürütülmüştür (López-Goñi ve ark, 1992).

Çözücü plakanın üst kısmına ulaştığında plakalar çözücünden çıkartılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan plaka üzerinde yürüyen örnekler ultraviyole ışığı altında incelenmiş (Jadhav ve ark., 1992)

Yüksek Basınçlı Sıvı kromatografisi (HPLC)

Üretilen sideroforu daha saf halde elde edebilmek ve hangi tür siderofor ailesine ait olduğunu kesinleştirmek için HPLC analizi yapılmıştır. Analiz için ters faz (Reverse Phase) HPLC metodu kullanılmıştır. 217 nm dalga boyu ve 4 nm rezolüsyonda 1mg standart kullanılarak standart kalibrasyonu tamamlanmıştır. Jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan örnekler, C18 kolonunda (5 µM, 100 Å, 150 × 4.6 mm), 0.7 ml dk-1 akış hızında ters faz HPLC metodu ile analiz edilmiştir (Günşen U, 2016). Standart olarak bir katekolat analogu olan 2,3- DHBA ve hidroksamat tipi siderofor ailesine ait olan desferrioksamin bulunduran Desferal kullanılmıştır. Analiz için Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Shimadzu-Prominence Modular LC20A marka HPLC cihazı kullanılmıştır.

Fourier Transform İnfrared (FT-IR) Spektroskopisi ile siderofor karakterizasyonu

Bu yöntem ile moleküler bağ karakterizasyonu yapılarak; sıvı halinde bulunan sideroforun yapısındaki fonksiyonel gruplar, yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri ve yapının aromatik ya da alifatik olup olmadığı belirlenmiştir. Saflaştırma işleminin ardından metanol içerisinde toplanan fraksiyonlar siderofor içeriği bakımından değerlendirilmiştir. Siderofor içerdiği düşünülen fraksiyonlardan 1 mL alınmış içerisinde bulunan metanol etüvde uçurulmuştur. Analize hazır hale getirilmiş olan fraksiyonlar Analiz Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Kimya Bölümü, Anorganik Laboratuvarında bulunan Jas.co FT/IR 4700 marka FTIR cihazında ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

¹H-NMR ile siderofor karakterizasyonu

Saflaştırılan siderofor örneklerinin karakterizasyonu için kullanılmış olan NMR analizi, sideroforların yapı tayinlerini, fonksiyonel gruplarını, komşu gruplarını tespit etmek için kullanılmıştır.

Analize hazırlanırken saflaştırma işleminin ardından metanolde toplanan fraksiyonlar etüvde uçurulmuştur ve siderofor içerdiği düşünülen 6 adet fraksiyona ¹H-NMR analizi yapılmıştır. Analize başlamadan önce her bir fraksiyondan 1mL alınarak ependorflara aktarılmış içerisinde bulunan metonol etüvde 40° C’de uçurulmuştur.

D-Metanol (dötörometanolde (metanol-d₆, CD₃OD)) içerisinde çözdürülmüş ve analize hazır hale getirilmiştir. ¹H-NMR spekturumları karşılaştırıldığında içeriğinde siderofor olan fraksiyonlar belirlenmiş ve hangi siderofor ailesine ait olduğu ortaya çıkarılmıştır. Siderofor üretimi için kullanılan besiyerinin kompleks bir besiyeri olmasından kaynaklı ortaya çıkacak karmaşıklığı önlemek amacıyla içerisinde siderofor üretimi gerçekleştirilmemiş CDLIM besiyerinin ¹H-NMR spektrumları incelenmiş ve referans alınarak diğer spektrumlar ile karşılaştırılmıştır.

Analiz Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopi Laboratuvarında Quench marka 400 MHz’ lik NMR cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. *Lactobacillus plantarum* BHC03 suşunun probiyotiklik özelliklerinin belirlenmesi ve sideroforların bazı probiyotik özellikleri üzerine etkisinin araştırılması

L.plantarum BHC03 suşu probiyotiklik özellikleri açısından incelenmiştir. Bununla birlikte sideroforların kan hemolizi, kolesterol asimilasyonu ve bakteriyosin aktivitesi üzerinde etkileri araştırılmıştır. Çalışma için saflaştırılmamış siderofor süpernatantları kullanılmıştır.

Katalaz Testi

Katalaz aktivitesi incelenmek istenilen örnekten aktif kültürden bir öze dolusu alınarak ve lam üzerine süspanse edilmiştir. Ardından 1-2 damla %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) solüsyonu örneğin üzerine eklenmiş ve hava kabarcıklarının (O₂) oluşumu incelenmiştir. Hava kabarcıklarının oluşumu durumunda testin pozitif olduğu yani bakterinin katalaz enzimine sahip olduğu kabul edilmiştir (Dinges ve ark 2000).

Oksidaz Testi

Bir kurutma kağıdı üzerine 2-3 damla oksidaz ayırıcı olan tetrametil fenilendiamin dihidroklorid damlatılarak ve üzerine, öze ile test edilecek aktif bakteri örneğinden bir miktar alınarak sürülmüştür.

Yaklaşık 1 dakika kadar bekletilmiş ve kağıt üzerinde mor veya kahverengi-siyah bir renk oluşması sitokrom oksidaz enzimin varlığını, bununla birlikte testin pozitif olduğunu göstermiştir (Hitchins, 1998).

Asit toleransı

10 ml MRS Broth besiyerinin pH değerleri sırasıyla 1, 2, 2.5, 3, ve 4'e ayarlanmış ve otoklavda sterilizasyonu tamamlanmıştır. Hazırlanan her bir tüpe, MRS Broth içerisinde ikinci aktivasyonu tamamlanmış *L. plantarum* BHC03 hücrelerinden 50 µL ekim yapılmış ve 37 ° C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0, 2 ve 4.saatlerinde seri dilüsyonlar ile hücreler MRS Agar plakaları üzerine yayılarak canlı hücre sayısı belirlenmiştir (Chung ve ark., 1999). Petri kaplarında büyüyen hücrelerin farklı asidik koşullarda sağ kalım yetenekleri değerlendirilmiştir.

Safra tuzu toleransı

Safra tuzu toleransı çalışması için 10 ml MRS Broth besiyeri içeren tüplerin safra tuzu konsantrasyonu sırasıyla %0.1, %0.3, %0.5, %1 ve %2 olmak üzere hazırlanmış ve şırınga filtreler ile (0.45 µM) sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan her bir tüpe ikinci aktivasyonu tamamlanmış probiyotik aday olan bakteri örneğinden (*L. plantarum* BHC03) 50 µL ekim yapılmış ve 37°C'de inkübe edilmiştir. 0, 2, 4, ve 24. saatlerde seri dilüsyonlar ile MRS Agar petrileri üzerine yayma ekim yapılarak canlı hücre sayısı belirlenmiştir (Chung ve ark., 1999). Farklı safra tuzu konsantrasyonlarında suşların sağ kalım yetenekleri değerlendirilmiştir.

Fenol toleransı

10 ml MRS Broth besiyeri içerisine %0.1, % 0.5, %1, ve % 2 olacak şekilde fenol ilave edilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan her bir tüpe ikinci aktivasyonu tamamlanmış probiyotik aday olan bakteri örneğinden (*L. plantarum* BHC03) 50 µL ekim yapılmış ve 37 ° C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0, 2, 4, ve 24. saatlerinde de seri

dilüsyonlar ile yayma ekim yapılarak canlı hücre sayısı belirlenmiştir (Teply M., 1984). Farklı fenol konsantrasyonlarında suşların sağ kalım yetenekleri değerlendirilmiştir.

NaCl toleransı

Yapılan çalışmada %2, %4, %6, %8, %10 ve %12 konsantrasyonlarında NaCl içeren 10 ml MRS broth besiyerine, bir gece büyütülerek aktive edilen *L. plantarum* BHC03 suşundan 100 µl inoküle edilerek 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Hücrelerin toleransı, 600 nm'de absorbans ölçülerek analiz edilmiş ve inhibisyon % 'si hesaplanmıştır. NaCl içermeyen MRS broth kontrol olarak kullanılmıştır (Adnan ve ark., 2007).

$$\% \text{ İnhibisyon: } (OD1 - OD2) / OD1 * 100$$

OD1: Kontrol

OD2: Suşların farklı NaCl ortamlarında gelişme oranı

Antibiyotik duyarlılık testi

Antibiyotik ilaç duyarlılığı disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla gece boyunca ikinci kez aktive edilen hücrelerden 100 µL, MRS agar içeren petri kaplarına aktarılmış ve drigalski özesi yardımıyla hücreler besiyeri yüzeyine yayılmıştır. Petri yüzeyindeki ıslaklık kuruyunca besiyeri yüzeyine aseptik olarak standart antibiyotik diskler Tetracycline (TE30, 30 µg/mL), Streptomycin (S10, 10 µg/mL), Erythromycin (E15, 15 µg/mL), Gentamicin (CN30, 30 µg/mL), Chloramphenicol (C30, 30 µg/mL), Penicillin (P10, 10 µg/mL) ve Levofloxacin (LEV5, 5 µg/mL) yerleştirilmiş ve petriler 37 ° C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve oluşan inhibisyon zon bölgeleri kaydedilmiştir (Sanchez ve ark., 2007).

Otoagregasyon deneyi

Otoagregasyon deneyi için Del Re ve arkadaşlarının 2000 yılında yapmış olduğu çalışma referans alınmıştır. Buna göre; *L.plantarum* BHC03 suşu MRS Broth içinde 37 ° C'de gece boyunca büyütülüp 5000rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelet iki kez PBS (pH 7.2) ile yıkanmış ve aynı tamponda süspanse edilip OD600'de absorbansı ölçülmüştür. Bu değer A0 olarak kabul edilmiştir. 37°C'de 4 saatlik

inkübasyondan sonra 600 nm’de tekrar ölçüm yapılmıştır. İnkübasyondan sonra üst süspansiyonun absorbansı At olarak ölçülmüştür. 0. ve 4. saatlerdeki değerler otoagregasyon formülünde yerine konularak otoagregasyon yüzdeleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Otoagregasyon: } (A_0 - A_t) / A_0 \times 100$$

At = t = 4 saatte absorbansı,

A0 t = 0 saatte absorbansı temsil eder.

Suşların hidrofobikliği

İzolatlar gece boyunca 37°C’de büyütülüp, 8000 g’da 5 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve pelet iki kez PBS pH 7.3 ile yıkanmış ve 0.1 mol/L KNO₃ (pH 6.2) içerisinde yeniden süspansiyon edilmiştir. OD₆₀₀’deki absorbans A0 olarak ölçülmüştür. 3 ml hücre süspansiyonuna 1 ml çözücü (Ksilen, Aseton, Heptan, Kloroform ve Etil asetat) ilave edilip oda sıcaklığında 10 dakikalık ön inkübasyondan sonra, iki faz 2 dakika boyunca hafifçe karıştırılmış ve oda sıcaklığında 4 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından sulu faz, inkübasyondan sonra uzaklaştırılmış ve daha sonra OD₆₀₀, A1 olarak ölçülmüştür (Rosenberg ve ark., 1980).

$$\text{Hidrofobisite: } (A_0 - A_1 / A_0) \times 100$$

A0: 0.saat absorbans değeri

A1: 4.saat absorbans değeri

Hemolitik aktivite

L. plantarum BHC03 suşunun hemolitik aktivitesi, % 5 koyun kanı ile takviye edilmiş MRS Agar plakaları üzerinde incelenmiştir. İncelemeye göre; kanlı agar plakaları üzerinde eritrositlerin tam olarak eritilmesine bağlı olarak şeffaf zonlar oluşması durumunda alfa hemolitik, eritrositlerin tam olarak eritilmemesi sonucu yeşilimsi bir bölge oluşmasına alfa hemolitik ve herhangi bir hemoliz oluşmaması ise gama hemolitik olarak değerlendirilmiştir (Hitchins, 1998).

Sideroforların kan hemolizi, kolesterol asimilasyonu ve bakteriyosin aktivitesi gibi probiyotik özellikler üzerine etkisi de araştırılmış ve bunun için probiyotik bakteri

süpernatantları ile siderofor karışımları belirli oranlarda karıştırılarak (1:1, 1:2, 2:1) kullanılmıştır.

Kolesterol Asimilasyonu

Kolesterol asimilasyon yeteneğinin belirlenmesi Alp'ın 2019'da yapmış olduğu bir çalışma modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Kolesterol çözeltisi (500 mg/dl) 10000 rpm de 10 dakika santrifüj yapılarak üstte kalan sıvı kısımdan 10'ar ml MRS broth besiyerleri içeren steril tüplere 2.5 mL eklenmiştir.

Sideroforun kolesterol asimilasyonu üzerinde etkisinin incelenmesi için 7 farklı tüp hazırlanmıştır. Deneme deseni Tablo 3.2'de verildiği gibidir.

Tablo 3. 2 Kolesterol asimilasyonu şeması

No.			Siderofor Karışımı	<i>L.plantarum</i> BHC03 (10 ⁵ CFU/mL)
1	Siderofor pozitif kontrol	10 ml MRS + Kolesterol Çözeltisi	300µL	---
2	Probiyotik kontrol	10 ml MRS + Kolesterol Çözeltisi	---	300 µL
3	1:1 Siderofor:probiyotik	10 ml MRS + Kolesterol Çözeltisi	150µL	150µL
4	2:1 Siderofor: probiyotik	10 ml MRS + Kolesterol Çözeltisi	200µL	100µL
5	1:2 Siderofor :probiyotik	10 ml MRS + Kolesterol Çözeltisi	100µL	200µL
6	MRS ve kolesterol negatif kontrol	10 ml MRS + Kolesterol Çözeltisi	---	---
7	MRS negatif kontrol	10 ml MRS Broth	---	---

Tablo 3.2'deki gibi hazırlanan örnekler, 37 °C'de 24 saat süreyle anaerob ortamda inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonrasında tüpler 10000 rpm 10 dakika santrifüj edilmiş, santrifüj sonunda elde edilen süpernatantların kolesterol miktarı saptanmıştır (Alp, D., 2019).

Bakteriyosin Aktivite Testi

Bakteriyosin aktivite testi, patojen indikatör test mikroorganizmalarının (*Proteus vulgaris*, *Salmonella enteritidis*, *B. cereus*, *E. aerogenes*, *Candida albicans*, *Streptococcus pyogenes*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) inhibisyonunun kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmesi üzerine kurgulanmıştır. İkinci aktivasyonu 37 °C'de 18 saat boyunca LB Broth besiyerinde gerçekleştirilen indikatör kültürlerden 100 µL alınarak %0,6 agar içeren LB yumuşak Agar ile karıştırılmıştır.

Yumuşak agar donduktan sonra, besiyeri üzerine steril mavi pipet uçları kullanılarak 7.1 mm çaplı kuyular açılmıştır. Kuyu ihtivasının kaybolmaması için steril agar ile kaplanan kuyulara 100 µL bakteriyosin aktivitesi belirlenecek bakteri karışımları ilave edilmiştir. Bakteriyosin aktivitesinin belirlenmesi için *L. plantarum* BHC03 bakterisi ön aktivasyon yapıldıktan sonra kültürden 500 µL, 5 mL MRS broth içerisine aktarılmış ve kültür 37 °C’de 24 saat boyunca ikinci kez aktive edilmiştir. Süre sonunda 7000 rpm’de 15 dk santrifüj edilerek toplanan süpernatant, bakteriyosin kaynağı olarak değerlendirilmiştir.

Sideroforun, bakteriyosine etkisini belirlemek için deneme deseni Tablo 3.3’teki gibi oluşturulmuştur;

Tablo 3. 3 Bakteriyosin aktivitesi için deneme deseni

1.KUYU	<i>L. plantarum</i> BHC03 besiyeri süpernatantı	100 µL
2.KUYU	Siderofor karışımı	100 µL
3.KUYU	<i>L. plantarum</i> BHC03	100 µL
4.KUYU	1:1 oranda siderofor ve besiyeri süpernatantı karışımı (w/v)	50:50 µL
5.KUYU	1:2 oranda siderofor ve besiyeri süpernatantı karışımı (w/v)	25:75 µL
6.KUYU	2:1 oranda siderofor ve besiyeri süpernatantı karışımı (w/v)	75:25 µL

Kuyulara örnekler ilave edildikten sonra kültürler 37 °C’de 48 saat inkübe edilmiş ve oluşan inhibisyon zonları değerlendirilmiştir.



4. BULGULAR ve TARTIŞMA

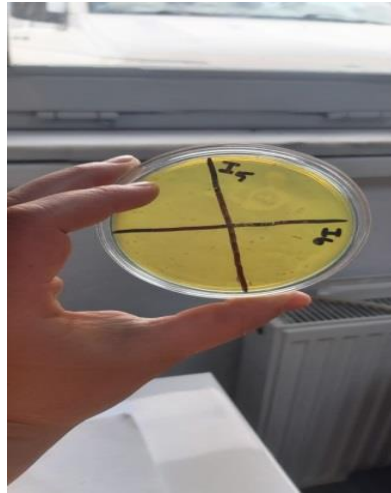
Bu çalışmada Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Endüstriyel Mikrobiyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda bulunan ve daha önce peynirden (P), inek sütünden yapılan yoğurttan (I), manda sütünden yapılan yoğurttan (M), Lahana Turşusundan (L), Kefirden (K), ticari olarak satılan probiyotik kapsüllerden (LAB) izole edilen laktik asit bakteri izolatları kullanılmıştır. Kullanılan suşların morfolojik özellikleri aşağıda belirtilmektedir.

Şekil 4. 1 Biyomühendislik Bölümü Endüstriyel Mikrobiyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda bulunan laktik asit bakterilerinin morfolojik yapısı

Kod	Gram (+/-)	Saflık	Şekil	Kod	Gram (+/-)	Saflık	Şekil
P1	(+)	(?)	Streptobasil	K3	(+)	(?)	Streptokokbasil

P2	(+)	(?)	Streptokok	M1	(+)	(?)	Streptokok
P3	(+)	Saf	Streptokok	M2	(+)	(?)	Maya
P4	(+)	Saf	Streptokok	M3	(+)	Saf	Maya
P5	(+)	Saf	Maya	M4	(+)	Saf	Maya
P6	(+)	Saf	Streptokok	M5	(+)	Saf	Maya
P7	(+)	Saf	Streptokok	M6	(+)	Saf	Maya
P8	(+)	(?)	Streptokok	M7	(+)	Saf	Maya
I1	(+)	(?)	Maya	M8	(+)	Saf	Maya
I2	(+)	(?)	Maya	M9	(+)	Saf	Maya
I3	(+)	(?)	Maya	M10	(+)	Saf	Maya
I4	(+)	(?)	Maya	M11	(+)	Saf	Maya
I5	(+)	Saf	Basil	M12	(+)	Saf	Maya
I6	(+)	(?)	Maya	LAB1	(+)	(?)	Streptobasil
L1	(+)	Saf	Diplokok	LAB2	(+)	Saf	Diplokok
L2	(+)	Saf	Streptokok	LAB4	(+)	Saf	Maya
L3	(+)	Saf	Streptokok	LAB5	(+)	Saf	Maya
L4	(+)	Saf	Streptokok	LAB6	(+)	Saf	Maya
L5	(+)	Saf	Küçük kok	LAB7	(+)	(?)	Streptokok
L6	(+)	Saf	Küçük kok	LAB8	(+)	(?)	Maya
L7	(+)	(?)	Streptokok	LAB9	(+)	(?)	Maya
K1	(+)	Saf	Streptokok	LAB10	(+)	(?)	Maya
K2	(-)	(?)	Küçük kok				

Eldeki izolatların siderofor üretimlerinin belirlenmesinde CAS Agar (Klement ve ark., 1990) besiyeri kullanılmıştır. 45 adet laktik asit bakterisi içerisinde inek yoğurdundan izole edilmiş olan I5 ve I6 kodlu örneklerin diğer örneklerle göre daha yüksek sarı zon oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4. 1 CAS Agar besiyerinde siderofor üretiminin mikroorganizma tarafından sağlanması

En yüksek siderofor üretiminin kantitatif olarak belirlenebilmesi için, demirsiz CDLİM besiyerine aktarılan izolatlardan CAS boyası kullanılarak spektrofotometrik olarak

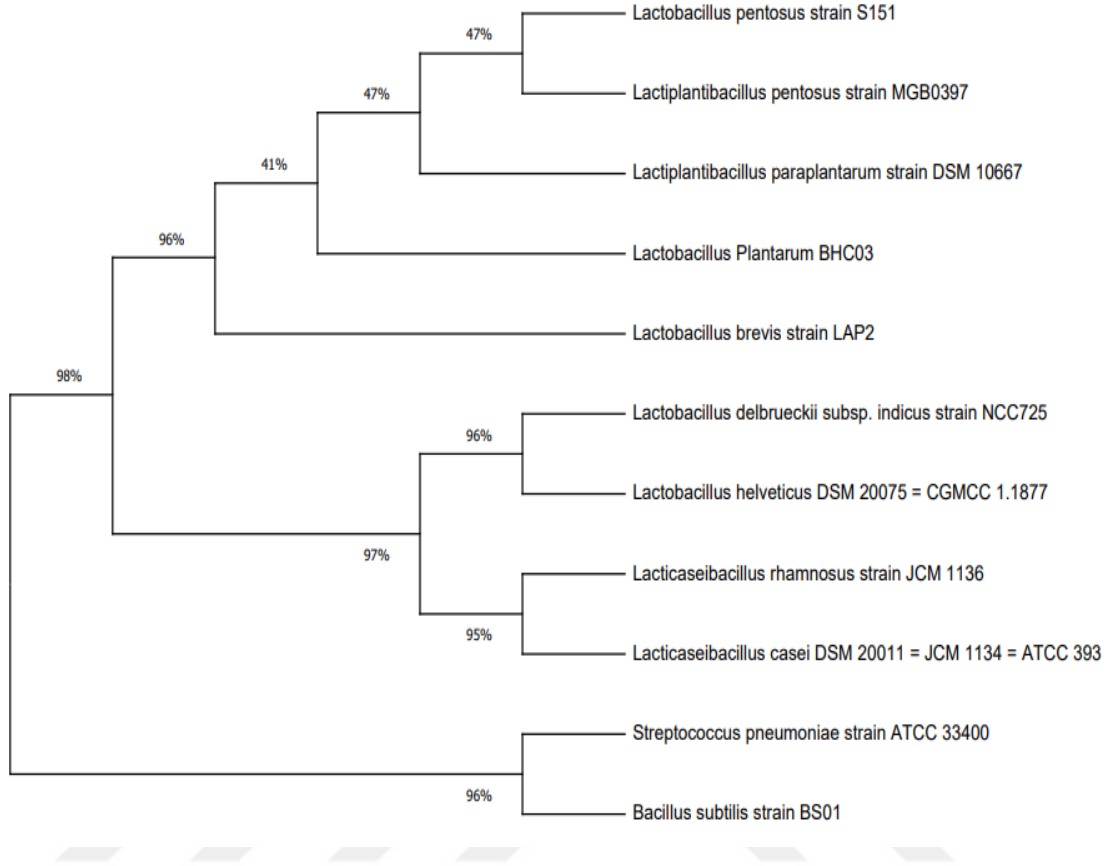
ölçümler gerçekleştirilmiştir. Siderofor birimi hesaplamasını yapılırken elde edilen veriler üzerinden negatif (-) sonuçlar dikkate alınmıştır. CAS metodunda boya solüsyonu içerisinde kullanılan FeCl_3 'ün siderofor tarafından ne kadar absorbe edilebildiğini incelenmektedir ve bu durumda ne kadar çok demir absorbe edilirse ortamda o kadar çok siderofor olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle siderofor yüzdesi sonuçlarından elde edilen verilerden sadece negatif sonuçlar kullanılmıştır.

I5 kodlu örnekte % 50.5 oranında siderofor üretimi görülmüştür. CAS-Agar besiyeri üzerindeki zon çapları ve spektrofotometre sonuçları dikkate alındığında en verimli siderofor üretimini I5 kodlu örneğin gösterdiği kesinleştirilmiş ve çalışmaya I5 ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Çalışılacak mikroorganizmanın tanılanması amacıyla I5 numaralı izolatın 16S rRNA dizi analizi yapılmıştır. Siderofor üretimini pozitif olarak yorumladığımız örneğin 16s rRNA analizi sonucunda (Şekil 3.2) *Lactobacillus plantarum* türü olduğu %99 doğrulukla belirlenmiş ve *L. plantarum* BHC03 şeklinde isimlendirilmiştir (Şekil 4.3). *L. plantarum* BHC03 suşunun MegaX programında Maximum Likelihood algoritması ile soy ağacı (Şekil 4.4) oluşturulmuştur.

```
CTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAA
GGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAA
GAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGA
CATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACT
GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT
GGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTA
ATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAA
TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
CCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAG
CCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTTGAA
```

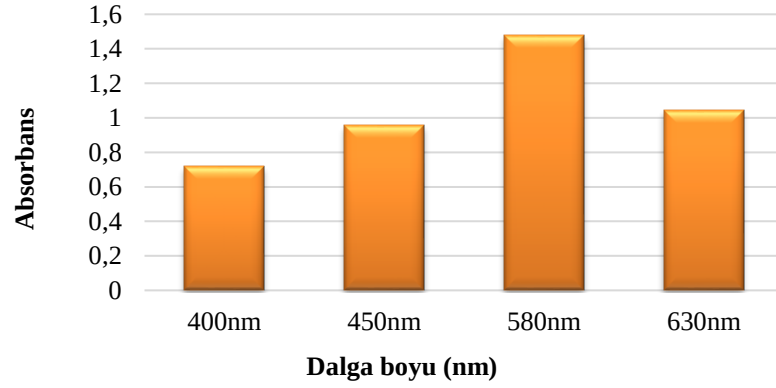
Şekil 4. 2 16s rRNA dizi analizi sonucu elde edilen nükleotid dizisi



Şekil 4. 3 *L. plantarum* BHC03 izolatının soy ağacı

4.1. *L. plantarum* BHC03 suşunun siderofor üretiminin optimizasyonu

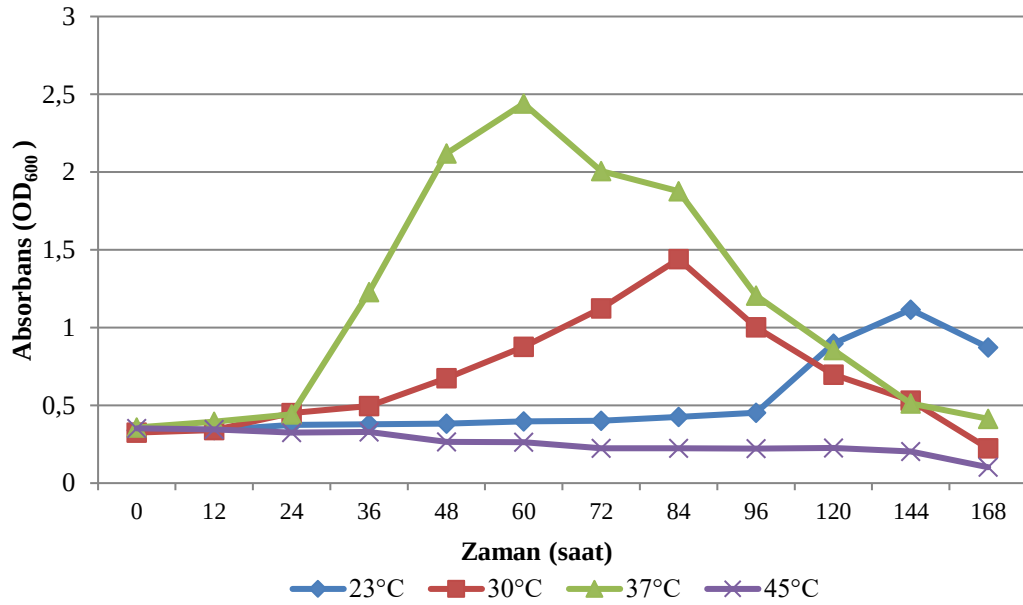
Siderofor üretiminin optimizasyonu için ilk olarak OD (Optik Dansite) optimizasyonu yapılmıştır. Bunun nedeni ise siderofor çeşitlerinin birbirinden farklı OD değerlerinde incelenmiş olmasıdır. Sideroforun CAS metodu ile tayin edilmesi durumunda farklı çeşit sideroforlar birbirinden farklı renk değişimlerine sebep olabilmektedir. Katekol grubu sideroforlar CAS solüsyonunun rengini maviden menekşe döndürürken, hidroksamat tipi sideroforlar ise maviden turuncuya döndürmektedir. Bu renk değişimleri siderofor çeşitleri arasında farklılık gösterdiğinden renk spekturumları dikkate alınarak farklı OD değerlerinde siderofor üretimi incelenmiştir. OD optimizasyonu için OD₄₀₀, OD₄₅₀, OD₅₈₀ ve OD₆₃₀ değerlerinde ölçümler yapılmış ve en yüksek absorbans değeri olan 1,48'e, OD₅₈₀'ta ulaşılmıştır. Çalışmanın devamında ölçümler 580 nm üzerinden gerçekleştirilmiştir.



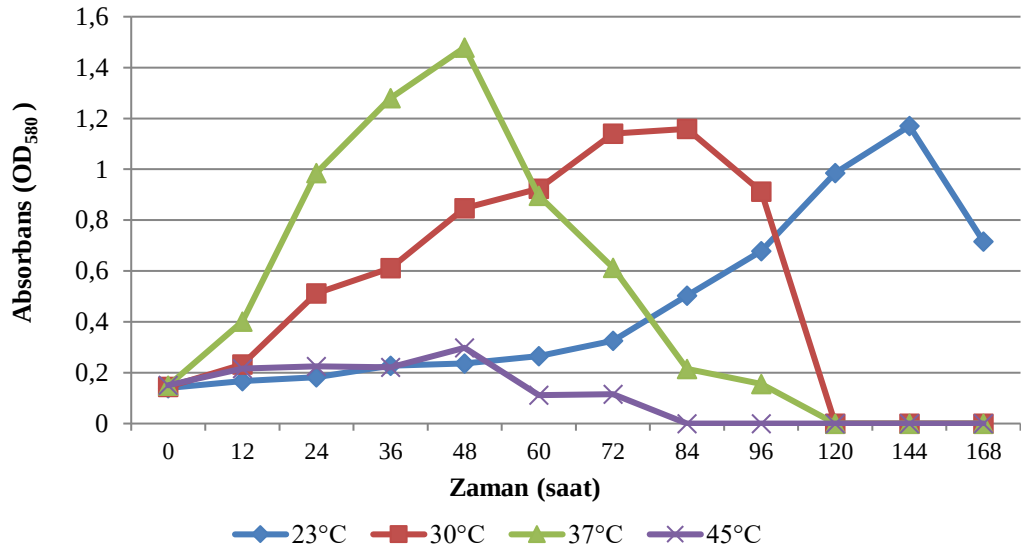
Şekil 4. 4 OD (Optik Dansite) Optimizasyonu Sonuçları

4.1.1. Sıcaklık Optimizasyonu

Yapılan sıcaklık denemesinde 4 farklı sıcaklığın hem mikroorganizma üzerine etkisi hem de siderofor üretim kapasitesine etkisi araştırılmıştır. Bu bağlamda 600 nm dalga boyunda alınan absorbans değerlerinin verildiği Şekil 3.5 ve bu sıcaklıklarda ortama salınan siderofor absorbansı ve yüzdesi sırasıyla Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'deki gibidir.



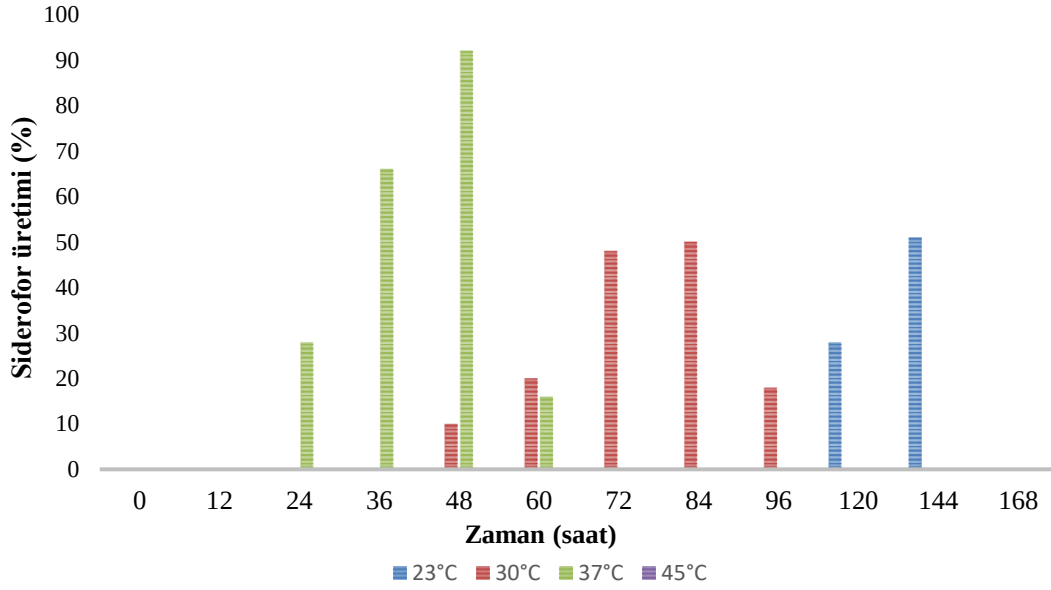
Şekil 4. 5 Sıcaklığın bakteri büyümesi üzerine etkisi



Şekil 4. 6 Sıcaklığın siderofor üretimi üzerine etkisi

Düşük sıcaklıklarda mikroorganizmalarda ölümden ziyade faaliyetleri durdurma veya azaltma etkisi söz konusudur. Maksimum sıcaklığın üstündeki yüksek sıcaklıklarda ise, mikroorganizmalar üzerinde olarak ölüm olayına neden olmaktadır. Sıcaklıktaki artış hızı da hücre yaşamı için önemlidir. Bununla birlikte 37°C'lik sıcaklıkta yine tıpkı diğer sıcaklıklarda olduğu gibi log evresiyle siderofor üretim eğrisi aynı noktalarda görülmektedir.

Bu değerlere göre log evresinden durgun faz evresine kadar olan kısımda bakterinin siderofor üretimini gerçekleştirdiğini ve durgun faz evresinden sonra sideroforun parçalanmaya başladığını söyleyebiliriz. Aynı zamanda 45°C'lik sıcaklık incelendiğinde bakterinin üreme göstermediğini bununla birlikte siderofor üretimin gerçekleşmediği de söylenebilir.



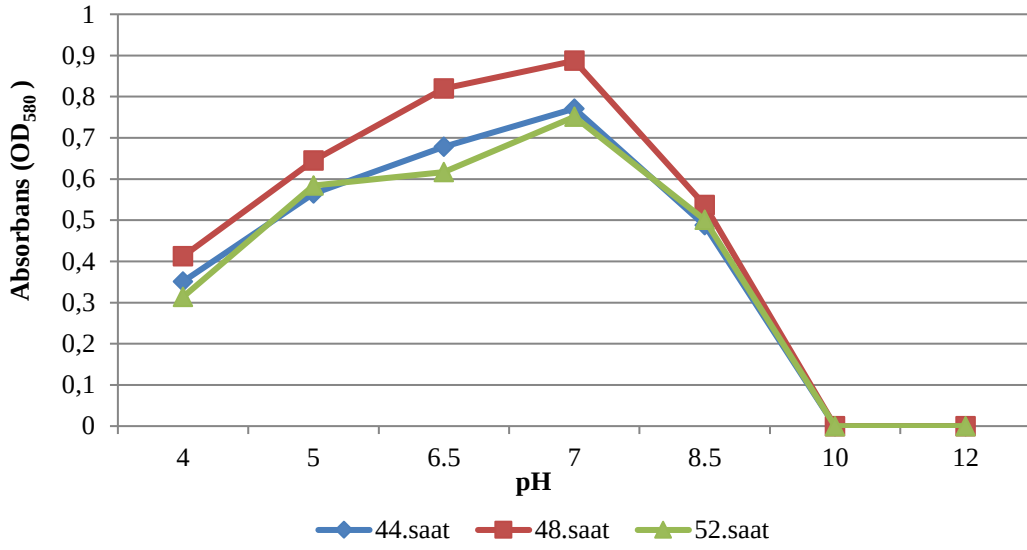
Şekil 4. 7 Sıcaklık optimizasyonunun siderofofor üretim yüzdesi üzerine etkisi

Siderofofor üretim yüzdeleri incelendiğinde ise; *L. plantarum* BHC03 suşunun en yüksek siderofofor üretim yüzdesi 37 °C’de ve 48.saatte % 92 olarak saptanmıştır. Sıcaklık optimizasyonu öncesi yapılmış siderofofor üretim çalışmasında % 50,5’lik siderofofor üretiminin elde edilmiştir. Buda yapılan sıcaklık optimizasyonu ile verimin % 41,5 oranında artırıldığını göstermektedir. Yapılan sıcaklık optimizasyonu sonucunda 37°C’de maksimum siderofofor üretimi 48. saatte görüldüğünden dolayı bundan sonraki optimizasyon çalışmalarında olası hataları önlemek amacı ile 44, 48 ve 52. saatlerde ölçümler alınacaktır.

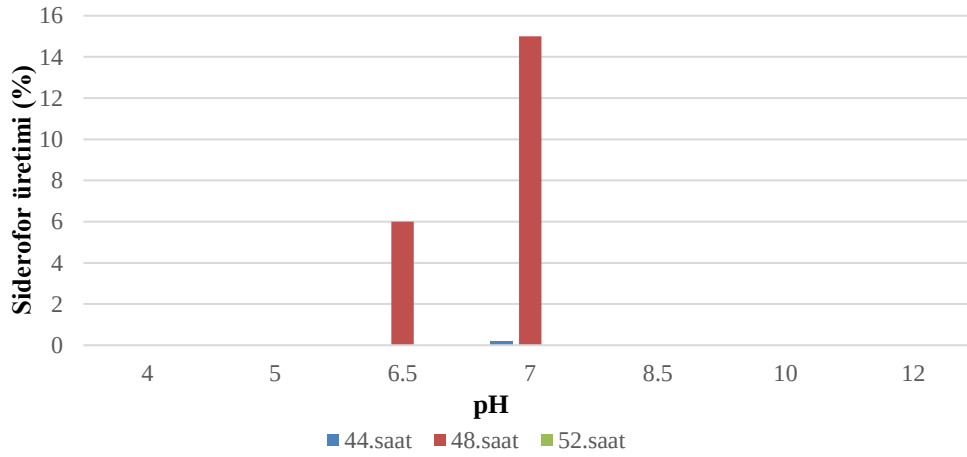
4.1.2. pH Optimizasyonu

Laktik asit bakterilerinin pH 2.5 ile pH 8 arasında rahatlıkla büyüyebildiği bilinmektedir. Fakat düşük pH değerlerinde ortamda bulunan demirin kolaylıkla çözülmektedir. Bu sebeple Nötral pH’da daha fazla siderofofor üretimi gerçekleşmektedir.

L. plantarum BHC03 suşunun 10 ve 12 pH değerlerinde büyümemesinden kaynaklı olarak ortamda siderofofor tayin edilememiştir. Siderofofor üretim yüzdesi incelendiğinde (Şekil 4.9) ise; sadece 6.5 ve 7 pH’da sırasıyla % 6 ve % 15 oranında siderofofor üretimi olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4. 8 Farklı pH değerlerinin siderofor üretim etkisi



Şekil 4. 9 pH optimizasyonunun siderofor üretim yüzdesi üzerine etkisi

Demirin çözünürlüğünde pH önemli bir faktördür ve nedenle ortamdaki demir mikroorganizmanın büyümesini etkileyen faktörlerden biridir. Nötral pH'da demir çözünmemiş formdadır bu sebeple bakterilerin büyümesini sınırlandırır (Sayyed, 2011). Ancak bu şartlarda ortamdaki demir çözünemediğinden oluşan demir streside mikroorganizma siderofor üretimini arttırmaktadır.

Güney'in 2014 yılında yaptığı bir çalışmada pH'nın siderofor üretimi belirlemek için *B. cereus* DSM 4312 demir içermeyen MM9 besi ortamında büyütülmüş ve sonra siderofor

taini için absorbans değerleri incelenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde maksimum siderofor üretimi pH 6.5 olarak tespit edilmiştir.

Nagar'ın 2011 yılında yapmış olduğu bir çalışmada *P. aeruginosa*'nın maksimum siderofor üretiminin pH 7'de gerçekleştiğini belirlemişlerdir (Nagar, 2011). Benzer olarak Tailor ve Joshi 'nin 2012'de *P. fluorescens* ile yaptığı çalışmada en yüksek siderofor üretimi pH 7'de tespit edilirken, en az siderofor üretimi ise pH 5'de tespit edilmiştir (Tailor ve Joshi, 2012).

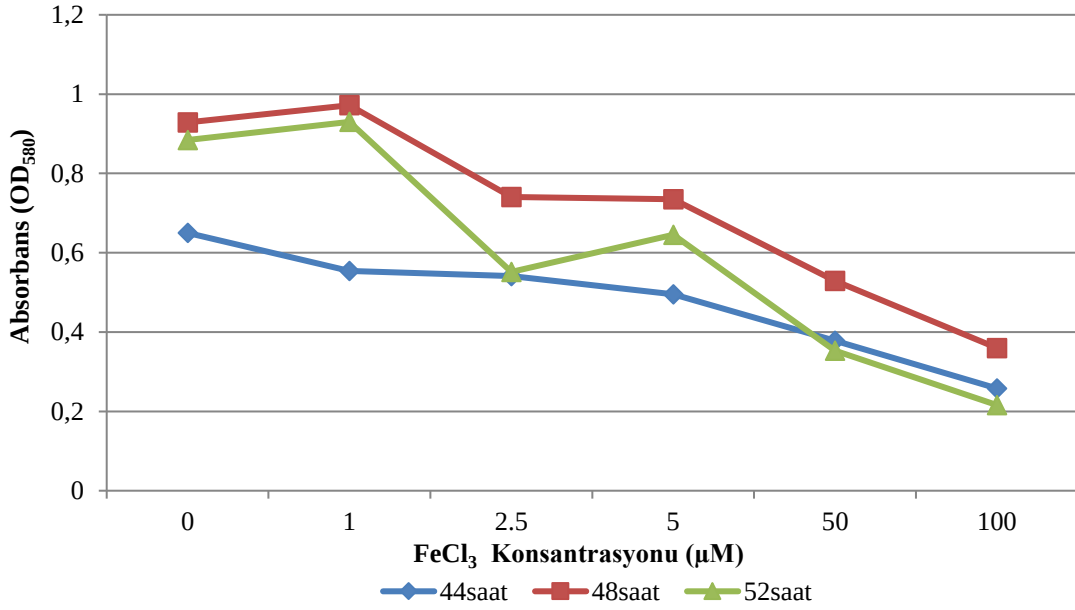
Literatür taraması incelendiğinde ve yaptığımız pH optimizasyonu ile karşılaştırıldığında çalışmanın literatür ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. *L. plantarum* BHC03 suşu için yapılmış olan optimizasyon çalışmasında en yüksek siderofor üretimi pH 7'de grlmştir. Bu sebeple nötral pH'larda demir znemediğinden mikroorganizmanın demir stresinden kaynaklı siderofor biyosentezi gerçekleştirildiği doğrulanmaktadır. Çalışmaya pH 7'de devam edilmiştir.

4.1.3. FeCl₃ Optimizasyonu

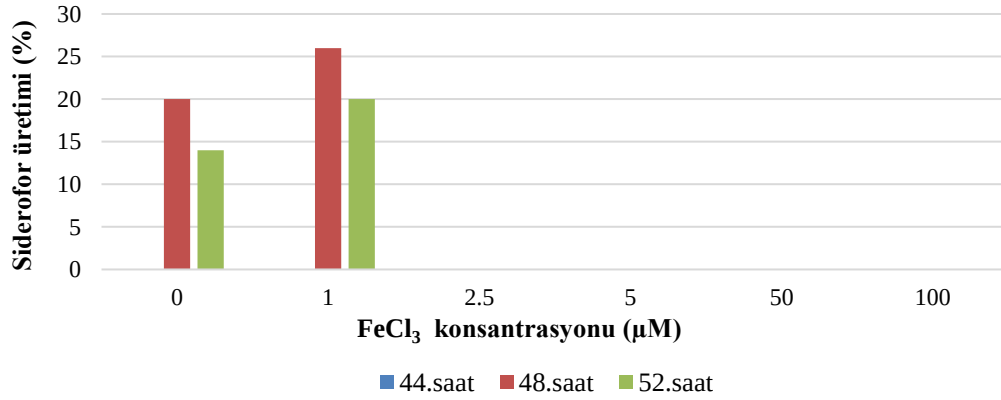
Demirin siderofor üretimi ile ilişkisini belirlemek amacıyla 0, 1, 2,5, 5, 50 ve 100 μ M FeCl₃ konsantrasyonlarındaki CDLIM besiyeri içerisinde büyütülmüş olan *L. plantarum* BHC03 suşu için CAS metodu ile siderofor ölçümleri yapılmıştır. Yapılan FeCl₃ optimizasyonu sonuçları incelendiğinde 0 μ M ve 1 μ M sonuçlarının birbirine yakın olduğu görülmektedir.

Demir elementi tüm canlıların büyümesi için gerekli olan bir elementtir. Yüksek demir konsantrasyonunda siderofor biyosentezinin baskılandığı bilinmektedir. Fakat bakterinin bazı aktivitelerini yerine getirebilmesi için ortamda minimal derecede demir olması gerekmektedir (Neiland, 1987). 1 μ M demir konsantrasyonu sonucu incelendiğinde bakterinin daha verimli büyüyebildiği ve bu sebeple ortamdaki demiri tükettiğinde siderofor üretimine tekrar başladığı düşünülmektedir.

Bununla birlikte 1 μ M zeri demir konsantrasyonlarında bakterinin siderofor biyosentezinin baskılandığı ve bu nedenle siderofor üretiminde azalma gözlemlenmektedir.



Şekil 4. 10 Farklı FeCl₃ konsantrasyonunun siderofor üretimi üzerine etkisi



Şekil 4. 11 FeCl₃ optimizasyonunun siderofor üretim yüzdesi üzerine etkisi

Güney'in 2014 yılında yapmış olduğu bir çalışmada farklı demir konsantrasyonlarındaki MM9 besiyerlerinde büyütülen *B. cereus* suşunun siderofor ölçümleri yapılmış ve *B. cereus* bakterisinin maksimum siderofor üretimi 1 µM demir konsantrasyonunda olduğu tespit edilmiştir. 5 µM'ın üzerindeki demir konsantrasyonlarında ise siderofor üretimi giderek azaldığı gözlemlenmiştir (Güney, 2014).

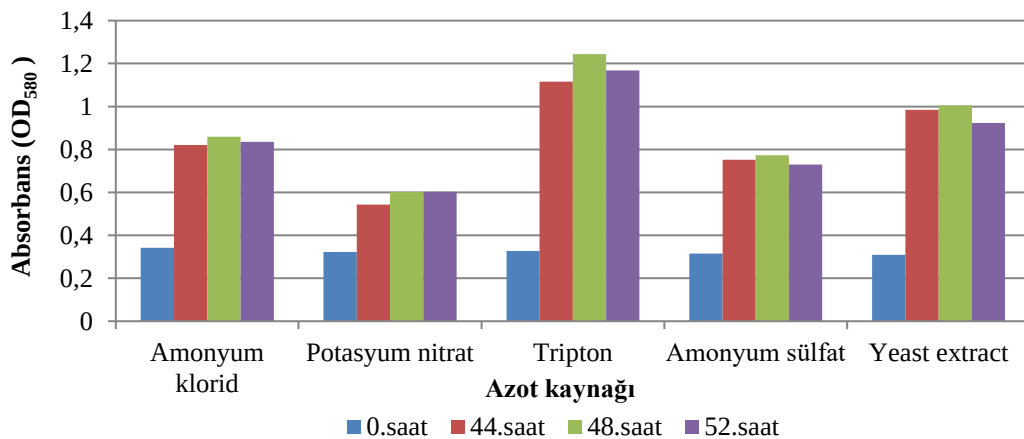
Taylor ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptığı bir çalışmaya göre *P. fluorescens* bakterisi yüksek siderofor üretimini 1 µM demir konsantrasyonunda belirlenirken, demir

konsantrasyonları artması ile birlikte siderofor üretiminde azalma gözlemlenmiştir (Tailor ve Joshi, 2012). Yine benzer bir şekilde *P. putida* ile yapılan bir çalışmada en yüksek siderofor üretimi 2 µM konsantrasyonda en az siderofor üretimi ise 16 µM demir konsantrasyonunda gözlenmiştir (Murugappan, 2012).

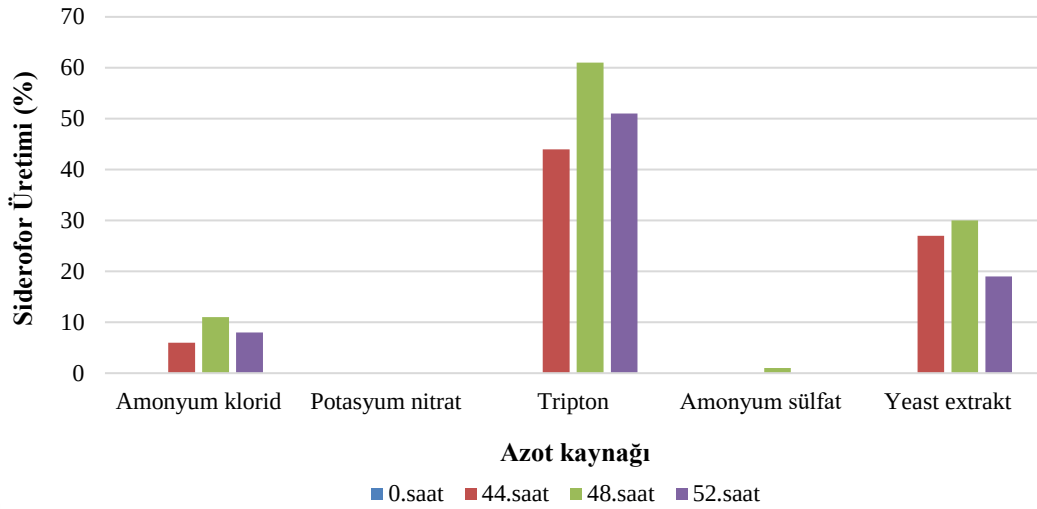
FeCl₃ optimizasyonu sonuçları ile siderofor üretim yüzdeleri hesaplandığında en yüksek siderofor %26 oranında 1 µM siderofor konsantrasyonunda tespit edilmiştir. FeCl₃ konsantrasyonu arttıkça siderofor üretici genlerin baskılandığı ve siderofor üretimi gerçekleştirilmediği görülmektedir. Fakat ortamda 1 µM konsantrasyonunda demir olduğunda bakterinin indüklendiği ve bakteri büyümesi için ortamdaki demiri tüketerek siderofor üretimine başladığı düşünülmektedir. Bu nedenle daha yüksek oranda siderofor üretimi gerçekleştirmek için ortamda minimal düzeyde demire ihtiyaç duyulmaktadır.

4.1.4. Karbon ve Azot Kaynağı Optimizasyonu

Karbon ve azot kaynaklarının siderofor üretimi ile ilişkisini belirlemek amacıyla CDLIM besiyeri içerisinde büyütülmüş olan *L. plantarum* BHC03 suşu için CAS metodu ile siderofor ölçümleri yapılmıştır. Karbon kaynağı optimizasyonu için; süksinik asit, süt tozu, D-glukoz, nişasta, maltoz ve sükroz azot kaynağı optimizasyonu için ise; amonyum klorür, potasyum nitrat, tripton, amonyum sülfat kullanılmıştır.



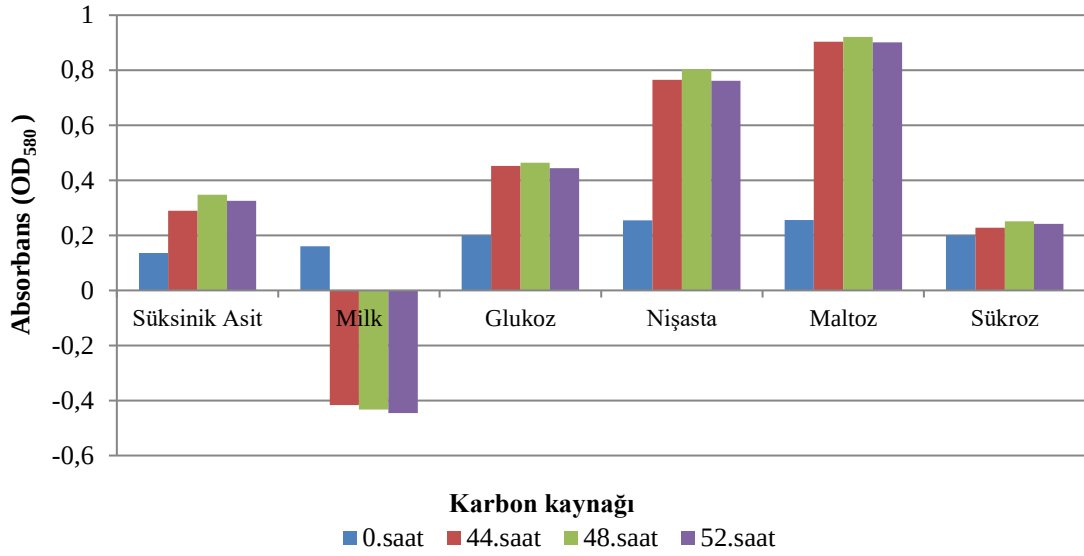
Şekil 4. 12 Farklı azot kaynaklarının siderofor üretimi üzerine etkisi



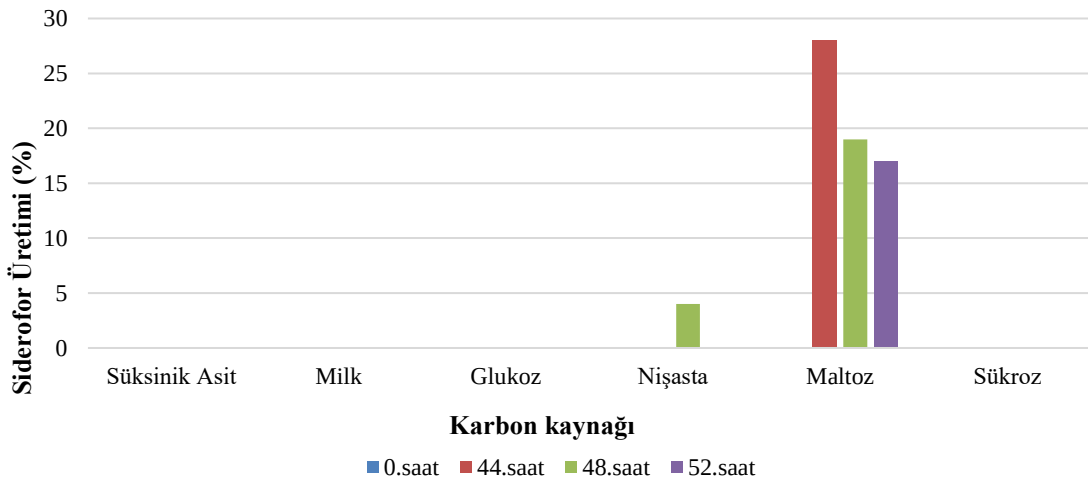
Şekil 4. 13 Farklı azot kaynaklarının siderofor üretim yüzdesi üzerine etkisi

Azot optimizasyonu için kullanılan 5 farklı azot kaynağının sonuçları incelendiğinde en yüksek siderofor yüzdesi %61 oranında tripton kullanıldığında görülmüştür. Fakat tripton besiyeri içerisinde bir bulanıklığa neden olmuş ve bu sebeple spektrofotometre ölçümlerinde hata payı olabileme ihtimali düşünüldüğü için tripton tercih edilmemiştir. İkinci en yüksek siderofor üretim yüzdesi %30 oranında yeast ekstraktta gözlemlenmiştir. Yeast ekstrakt kompleks bir içeriğe sahip azot kaynağıdır ve içerisinde bakterinin daha verimli büyümesini sağlayan birçok azotlu bileşen bulunmaktadır ve bunun için ikinci en yüksek siderofor üretiminin yeast ekstrakt kullanıldığında gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu nedenle farklı azot kaynağı sonuçları incelendiğinde diğer kaynaklara göre % 30 oranında siderofor üretimi gösteren yeast ekstrakt azot kaynağı olarak tercih edilmiştir.

Karbon kaynağı optimizasyonu için kullanılan 6 farklı karbon kaynağı sonuçları incelendiğinde; yüksek siderofor üretimi maltoz kullanıldığında görülmüştür. Diğer bir karbon kaynağı olan süt tozu kullanıldığında ise siderofor üretimi gözlemlenmemiştir. Bunun nedeni besiyeri ortamında süt tozu kullanıldığında besiyeri renginin bulanıklaşması ve bu nedende CAS metodu ile boyandığında bulanık bir rengin ortaya çıkması ve dolayısıyla spektrofotometrede sağlıklı bir ölçüm yapılamamasıdır. Bu nedenle en yüksek siderofor üretimi için kullanılan karbon kaynağı olarak maltoz tercih edilmiştir.



Şekil 4. 14 Farklı karbon kaynaklarının siderofor üretimine etkisi



Şekil 4. 15 Farklı karbon kaynaklarının siderofor üretim yüzdesi üzerine etkisi

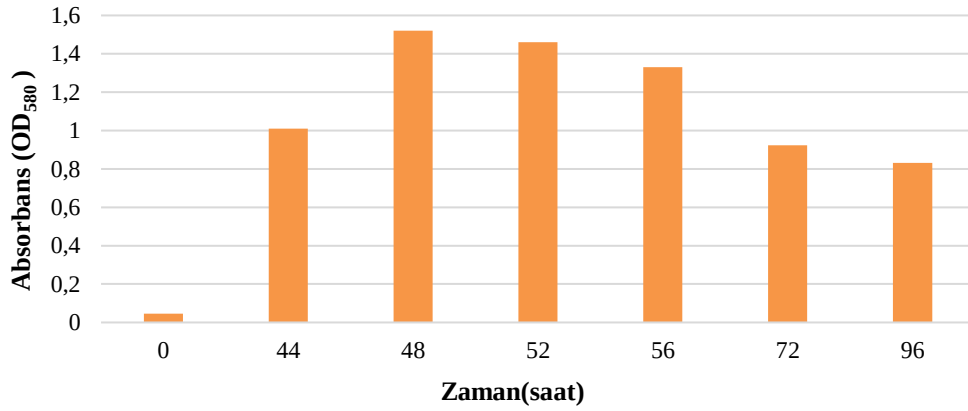
Karbon kaynağı optimizasyonu sonucunda siderofor üretim yüzdesi hesaplandığında ise; en yüksek siderofor üretimi %28 oranında maltozda görülmüştür. Diğer karbon kaynakları incelendiğinde ise yeterli bir artış gözlemlenmemiştir.

Karbon ve azot kaynağının yapısı siderofor üretimini düzenleyen demir ihtiyacı belirlemektedir. Kolay asimile edilebilen şekerler mikroorganizmanın hızlı büyümesine sebep olmakta ve bu sebeple siderofor üretimi artmaktadır. Yapılan azot ve karbon kaynağı optimizasyonu sonucunda azot kaynağı olarak yeast ekstrakt ve karbon kaynağı

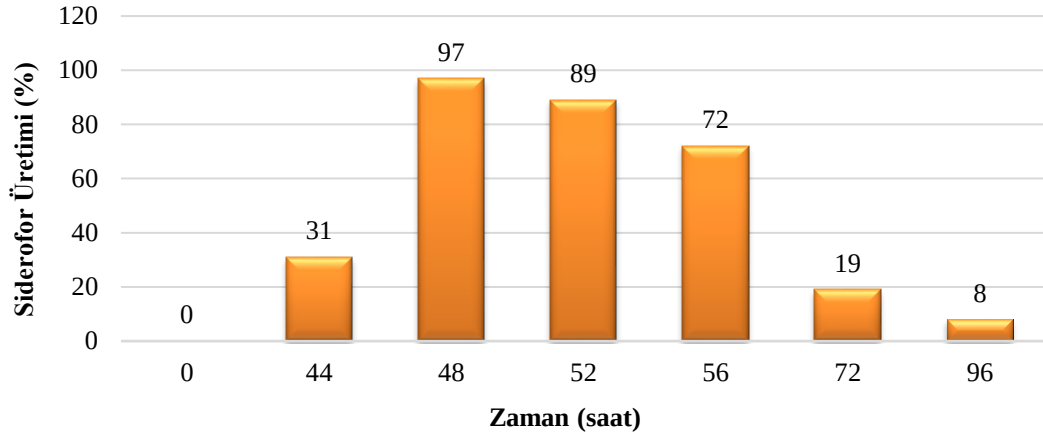
olarak ise maltoz seçilmiştir. Yapılan optimizasyonların ardından en yüksek siderofor üretimini vermiş koşullar tercih edilerek çalışma tekrar edilmiştir.

Yapılan demir optimizasyonu çalışmasında 0 μM ve 1 μM demir konsantrasyonunda yaklaşık aynı oranda siderofor üretimi gözlenmiştir. Fakat besiyeri ortamında azot kaynağı optimizasyonunda en yüksek siderofor içeriği yeast ekstrakt olarak belirlenmiş ve yeast ekstrakt içeriğinde bulunan düşük miktarda ki demir içeriği nedeniyle (Sommer. 1998) besiyeri ortamında fazla demir olmaması için 0 μM 'lık FeCl_3 konsantrasyonu sonuçları dikkate alınmıştır. Çalışmanın sonraki sürecinde pH 7'de, 37°C 'de, 0 μM FeCl_3 konsantrasyonunda, azot kaynağı olarak yeast ekstrakt ve karbon kaynağı olarak ise maltoz kullanılarak tüm optimal koşullar bir araya getirilmiş ve siderofor üretimi yüzdesi tekrar incelenmiştir.

Optimize edilen koşullarda maksimum siderofor üretimi aşağıdaki grafikteki gibi gözlenmiştir.



Şekil 4. 16 Optimize edilen koşullarda siderofor üretiminin gerçekleştirilmesi

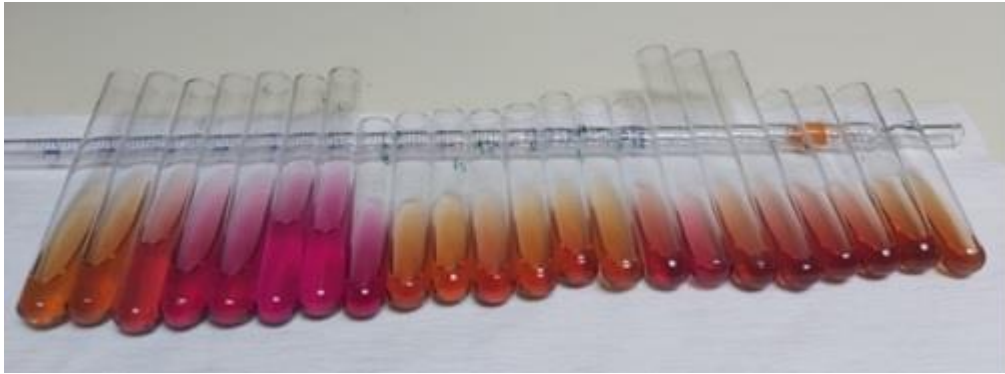


Şekil 4. 17 Optimize edilen koşullarda siderofor üretim yüzdesi

Optimize edilen koşullarda siderofor üretimi gerçekleştirilmiş optimizasyon öncesi sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Optimizasyon öncesi yapılan siderofor üretiminde siderofor üretimi %50,5 oranında görülmüşken optimizasyon sonrası siderofor üretim yüzdesi hesaplandığında ise bu oran %97 olarak görülmektedir. Yapılan optimizasyon işleminin siderofor üretimi üzerinde %46,5 oranında bir artışa neden olduğu görülmektedir.

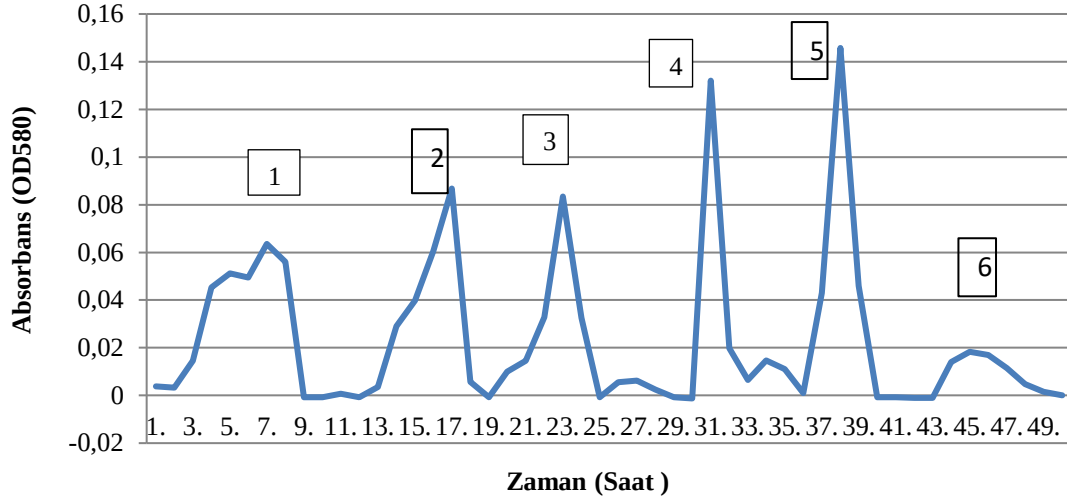
4.2. *L. plantarum* BHC03 sideroforunun saflaştırılması

Sephadex LH-20 dolgu maddesi kullanılarak yapılan kolon kromatografisi sonucu toplanan fraksiyonlardaki siderofor varlığı CAS metodu ile gösterilmiştir. Toplanan fraksiyonlar spektrofotometrede ölçülmeden önceki görüntüsü Şekil 4.19’da verildiği gibidir.



Şekil 4. 18 Toplanan fraksiyonların CAS metodu ile siderofor analizi

Boyanan her bir fraksiyon OD₅₈₀ 'de ölçülmüştür. Ölçümün ardından birbirine eşdeğer olan fraksiyonlar birleştirilmiştir.



Şekil 4. 19 Fraksiyonların CAS Analizi sonuçları

Oluşturulan grafikte eşdeğer alanlarda görülen pikler birleştirilmiştir. Buna göre: toplanmış olan 50 fraksiyon içerisinde CAS testi pozitif sonuç vermiş olan fraksiyonlar (pembe renk değişimi) birleştirilmiştir. Ortaya çıkarılan 6 fraksiyonun daha ileri saflaştırılması ve içerisindeki sideroforun karakterizasyonunu amacı ile HPLC yapılmıştır. Yapılan HPLC analizi ve sonuçları şu şekildedir;

HPLC analizine başlamadan önce saflaştırmada elde edilen 6 adet fraksiyon 1-2, 3-4 ve 5-6 olmak üzere 2'şerli fraksiyonlar halinde birleştirilmiş ve toplamda 3 adet fraksiyon haline getirilerek Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında Shimadzu Prominence Modular LC20A marka HPLC cihazında analiz yapılmıştır. HPLC analizi için 2 farklı standart kullanılmıştır. Birinci standart olan 3,2-DHBA (Dihidroksibenzoik asit) katekolat tipi bir siderofordur ve katekolat tipi sideroforların tayini için kullanılmıştır. İkinci standart olan DESFERAL ise demir şelatlayıcı ilaç gruplarından ve etken madde olarak yapısında hidroksamat tipi siderofor olan desferrioksamin bulundurmaktadır.

2,3 DHBA kromatogramı incelendiğinde içerisinde bulunan etken maddenin %98,8 oranında en yüksek piki verdiği ve 21,5 dakika sonra kolondan ayrıldığı görülmektedir.

DESFERAL kromotogramı incelendiğinde ise kullanılan ilacın içerisindeki en yüksek etken maddenin % 57,8 oranında en yüksek piki verdiği ve 23,6 dakika sonra kolondan ayrıldığı görülmektedir.

İki standart genel olarak incelendiğinde 2,3-DHBA'nın oldukça saf olduğu fakat DESFERAL'in biyolojik olarak kullanılan bir ilaç olmasında kaynaklı yapısında bulunan diğer birleşenlerden dolayı safsızlıkların olduğu görülmektedir. İki standart referans alınarak diğer fraksiyonları yorumlanmış ve fraksiyonların kromotogramları birbirleri arasında karşılaştırılarak incelenmiştir.

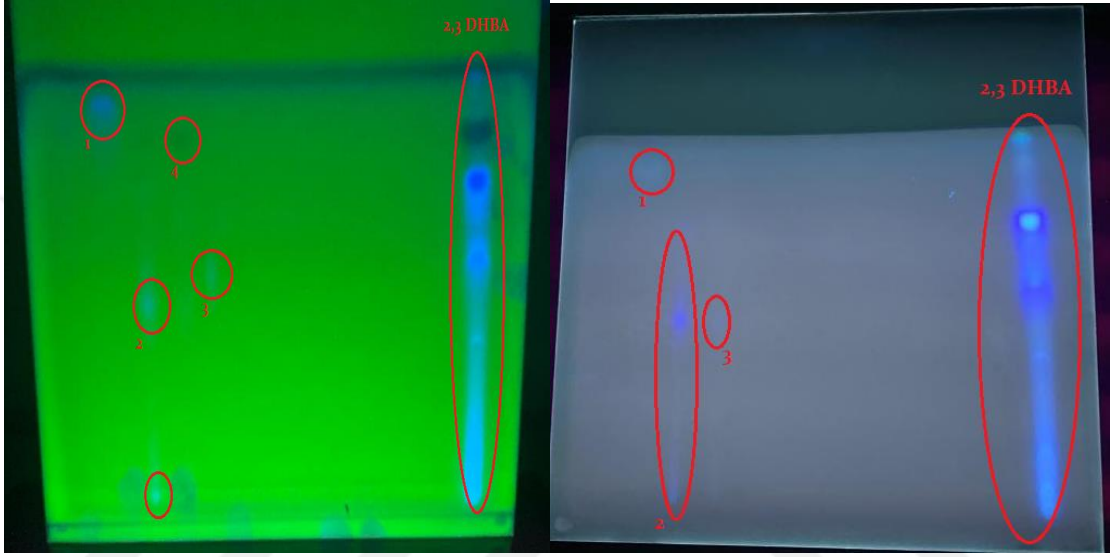
1. ve 2. fraksiyonların kromotogramları incelendiğinde 3, 3.4, 3.9, 5.7, 8.7 ve 24.3 dakikalarında kolondan ayrılan bileşiklerin ortak olduğu görülmektedir. 1. Fraksiyon kromotogramında görülen 4, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 20, 21, 23 ve 27. Dakikalarda kolondan ayrılan bileşiklerin iki fraksiyonda görülmemiştir. 1. Fraksiyon örnekleri saflaştırma sırasında saflaştırma kolonundan toplanan ilk örnekler olduğundan CDLİM besiyeri bileşikleri olma ihtimali yüksektir. Bununla birlikte siderofor üretiminde kullanılan modifiye besiyeri ortamı (karbon kaynağı olarak maltoz, azot kaynağı olarak yeast ekstrakt) içerisinde bulunan kompleks bileşikler piklerin karmaşıklığını açıklamaktadır.

1. fraksiyon kromotogramı referans alınarak 2. Fraksiyon kromotogramı incelendiğinde; 2.7, 11.4, 12.9 ve 19. Dakikalarda ortaya çıkan 4 farklı pik oluşumu gözlemlenmiştir. 3. Fraksiyon kromotogramının ise 2. Fraksiyon kromotogramıyla aynı çıkmıştır. Yapılan çalışmada sonuçlar genel olarak incelendiğinde standart olarak kullanılan 2,3-DHBA ve DESFERAL kromotogramları ile bir eşleşme görülmemektedir. Fakat CAS metodunda siderofor analizlerinin pozitif çıkması ve 2.fraksiyon kromotogramında ortaya çıkan yeni pikler farklı bir tür siderofor olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle Ters-Faz HPLC analizi sonuçlarından elde edilen verilerin yeterli olmadığı besiyeri bileşenlerinin ortamdaki safsızlık seviyesini arttırması nedeni ile kesin sonuçlar elde edilememesinden dolayı diğer analiz yöntemleri ile sonuçlar desteklenmiştir. Yapılan HPLC analizi sonuçları Ekler'de verilmiştir.

4.3. *L. plantarum* BHC03 sideroforunun karakterizasyonu

4.3.1. TLC sonuçları

Saflaştırmada elde edilen 6 adet fraksiyon cam plakalar üzerine uygulanmış ve çift bölmeli cam TLC tankı içerisinde 20 ml benzen-asetat-su (125:72:3) karışımından oluşan çözücüde yürütülmüştür. Elde edilen görüntüler Şekil 4.21’de verildiği gibidir.



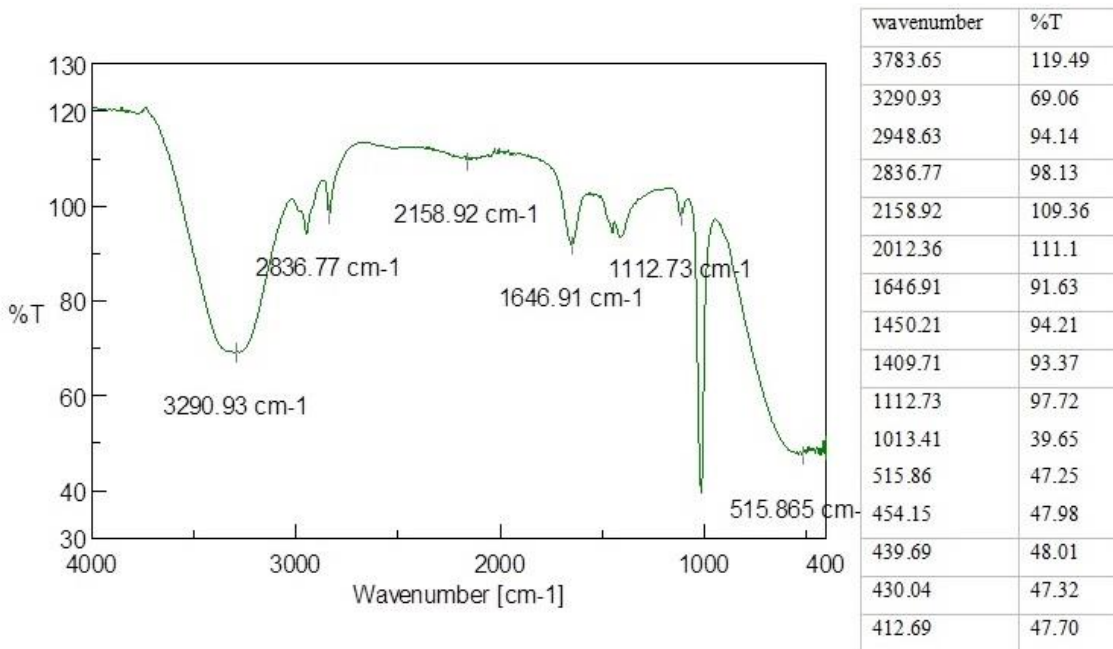
Şekil 4. 20 TLC (İnce tabaka kromatografisi) kromotogramı

Cam plak üzerinde standart olarak kullanılan 2,3 DHBA (2,3-dihidroksibenzoik asit) net olarak görüntülenebilirken DESFERAL görüntülenememiştir. Bununla birlikte plak üzerine yüklenen 6 adet fraksiyon siderofor varlığının tespiti için karışık bir şekilde yüklenmiştir. Yüklenen fraksiyonların 3 tanesinde belirli bantlar görülmektedir. Yüklenen örnekler ile standart karşılaştırıldığında 1. görsele göre 1 ve 4 numaralı örneklerin standart ile eşleştiği görülmektedir. 2. görsel incelendiği de ise 4 numaralı örneğin bandının net olarak görülmediği görülmektedir. Buna sebep olarak saflaştırılan örnekler içerisinde siderofor konsantrasyonunun az miktarda olduğu şeklinde bir yorum yapılabilir. Yapılan ince tabaka kromatografi sonucunda elde edilen verilere göre kesin bir sonuç elde edilemediğinden, daha kesin sonuçlar elde edilebilmesi amacı ile diğer karakterizasyon yöntemleri ile sonuçlar desteklenmiştir.

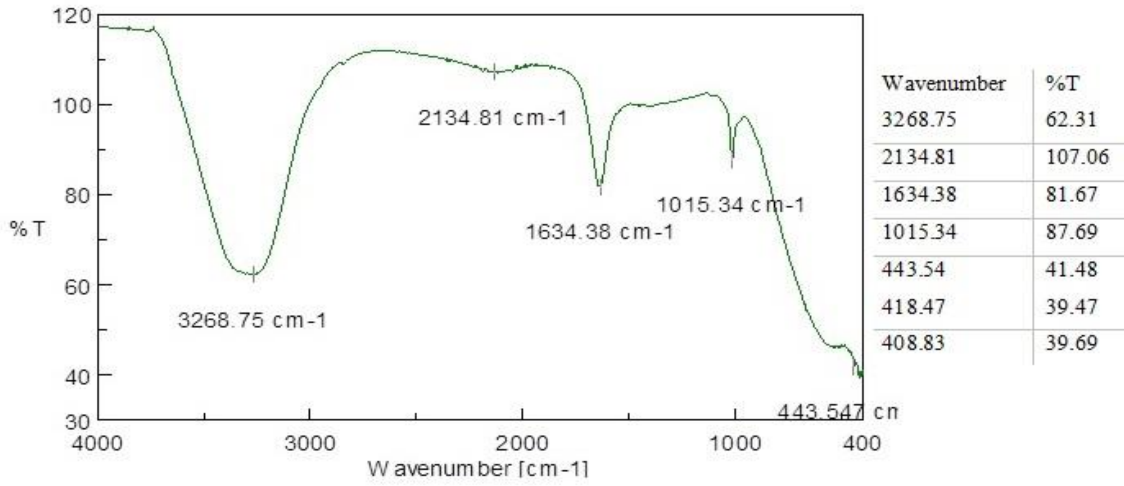
4.3.2. FTIR Sonuçları

Sideroforun yapısındaki fonksiyonel grupların varlığı, yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri ve yapının aromatik ya da alifatik olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılan FTIR analiz spektrumuna göre, 3 ve 5 numaralı fraksiyonların spektrumlarında; 3290.93cm^{-1} 'de gözlemlenen absorpsiyon bantları O-H gerilme titreşimine ait bantlar olduğu görülmektedir.

Bantlardaki titreşim yoğunluğunun sebebi siderofor saflaştırma aşamasında fraksiyonların metanol içerisinde toplanmış olması olarak düşünülmektedir. 3. fraksiyon spektrumunda görülmekte olan 2948.63cm^{-1} ve 2836.77cm^{-1} arasında görülen bantlar ise aromatik C-H gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. Buna ek olarak iki fraksiyon spektrumunda görülmekte olan 2158.92cm^{-1} 'deki pikler ise C=C gerilme titreşimine ait olduğu ve bununla birlikte bileşiğin yapısında aromatik halkaların bulunduğunu desteklemektedir. Ayrıca spektrumda ki 1450.21cm^{-1} ve 1409.71cm^{-1} 'deki bantlar C-H eğilme titreşime karşı, 1112.73cm^{-1} ve 1013.41cm^{-1} C-O gerilme titreşime karşı oluşan bantlardır. Bununla birlikte 1646cm^{-1} ve 1634cm^{-1} 'deki bantlar C=O gerilmesine bağlı titreşimlere karşılık gelmektedir.



Şekil 4. 21 3 numaralı fraksiyon FT-IR Sonuçları

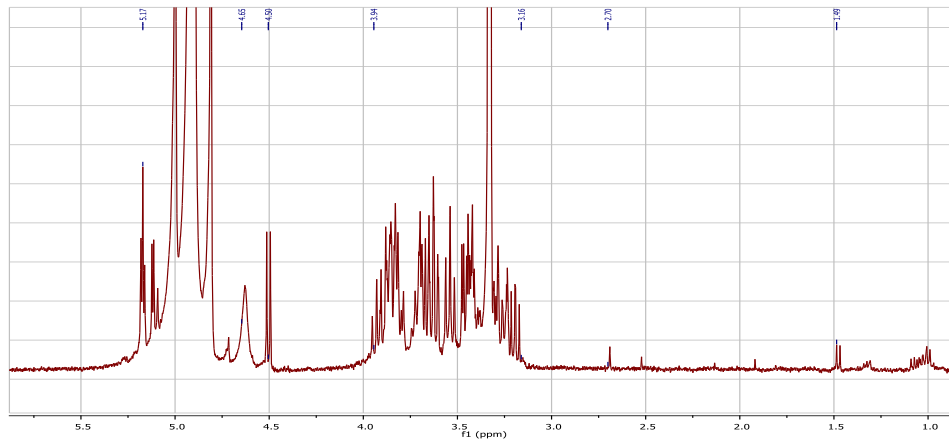


Şekil 4. 22 5 numaralı fraksiyon FT-IR sonuçları

3. ve 5. Fraksiyon spektrumları genel olarak incelendiğinde aromatik ve alifatik grupların olduğu görülmektedir. Neilands'ın 1981 yılında yapmış olduğu bir çalışmada sideroforların morfolojik yapıları incelendiğinde katekolat (fenolat) tipi sideroforların aromatik ve alifatik gruplardan oluştuğu görülmüştür. Bu sebeple spekturumlarda görülmüş olan aromatik bölge bantları katekolat tipi sideroforların varlığını göstermektedir (Nithyapriya ve ark 2021). Siderofor üretimi sırasında kullanılmış olan modifiye besiyeri ortamının kompleks bir besiyeri olması dolayısıyla ortamda bulunan sideroforun yapı tayini yapılamamış fakat yapısında bulunan fonksiyonel gruplar nedeniyle katekolat tipi siderofor olduğu tespit edilmiştir.

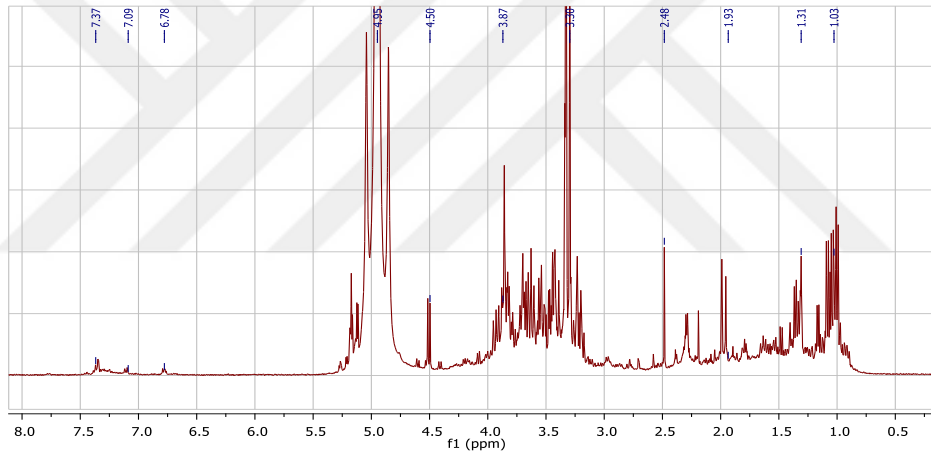
4.3.3. ¹H-NMR sonuçları

6 adet fraksiyon ¹H-NMR analiz sonuçları incelenmiştir.



Şekil 4. 23 ¹H-NMR referans besiyeri spektrumu (Siderofor üretimi gerçekleştirilmemiş boş besiyeri)

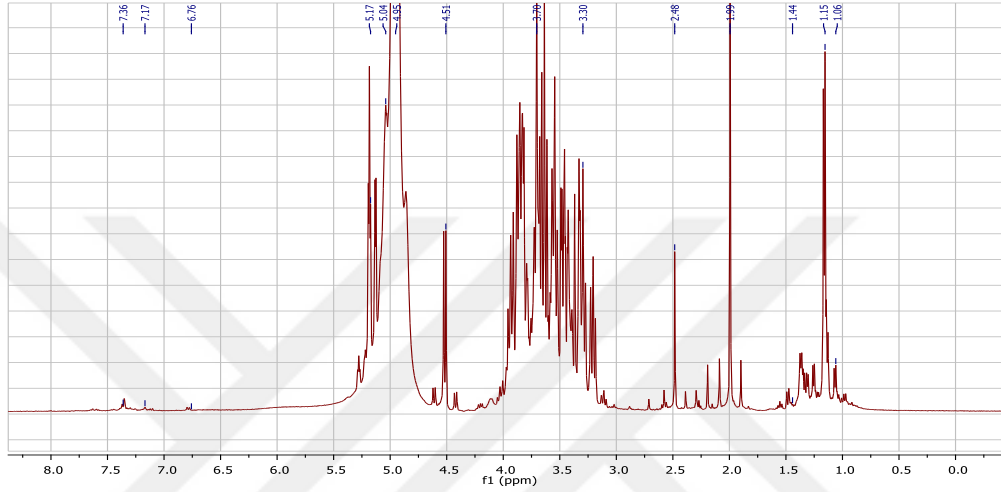
Birinci fraksiyon sonuçları incelendiğinde ve 4.8 ppm ve 3.3 ppm 'de görülen piklerin çözücü olarak kullanılan D-metanol ve besiyeri bileşiminde kullanılan H₂O olduğu görülmektedir. Birinci fraksiyon spektrumları ile referans besiyeri spektrumları karşılaştırıldığında 4.0 ppm ve 3.2 ppm arasında görülmekte olan piklerin besiyeri bileşiminden geldiği maltoz ve yeast ekstrakt kaynaklı olduğu düşünülmektedir. 3 ppm ve 1 ppm arası incelendiğinde ise ortaya çıkan piklerin genel olarak alifatik grupları içerdiği düşünülmektedir. Bununla birlikte 1 ppm'de ve 4.5ppm'de görülen piklerin referans besiyeri spektrumunda da görüldüğü, siderofor kaynaklı olmadığı ve besiyeri kaynaklı olduğu doğrulanmaktadır. Genel olarak incelendiğine ise birinci fraksiyonun daha çok besiyeri atıklarından oluştuğu yüksek miktarda maltoz içerdiği ve siderofor kaynaklı pikler görülmediği gözlemlenmektedir.



Şekil 4. 24 1.fraksiyon ¹H-NMR spektrum sonuçları

2.fraksiyon sonuçları incelendiğinde yine 1.fraksiyonda olduğu gibi besiyeri içerisindeki kompleks bileşiklerden kaynaklı pikler görülmektedir. Bununla birlikte 6.5 ppm ve 7.5 ppm arasında görülmekte olan aromatik grup bölgesinde görülmekte olan piklerin 1. Fraksiyondan gelmiş olduğu görülmektedir. Birinci fraksiyon spektrumu ile 2. Fraksiyonun spektrumları karşılaştırıldığında 4.0 ppm ve 3.2 ppm arasında görülmekte olan piklerin yine besiyeri bileşiminden geldiği ve maltoz ve yeast ekstrakt kaynaklı olduğu düşünülmektedir. 2.5 ppm ve 1 ppm arası incelendiğinde ise ortaya çıkan piklerin genel olarak alifatik grupları içerdiği düşünülmektedir. Bununla birlikte 1 ppm'de ve 4.5ppm'de görülen piklerin referans besiyeri spektrumunda ve 1. Fraksiyon spektrumunda da görüldüğü, siderofor kaynaklı olmadığı ve besiyeri kaynaklı olduğu

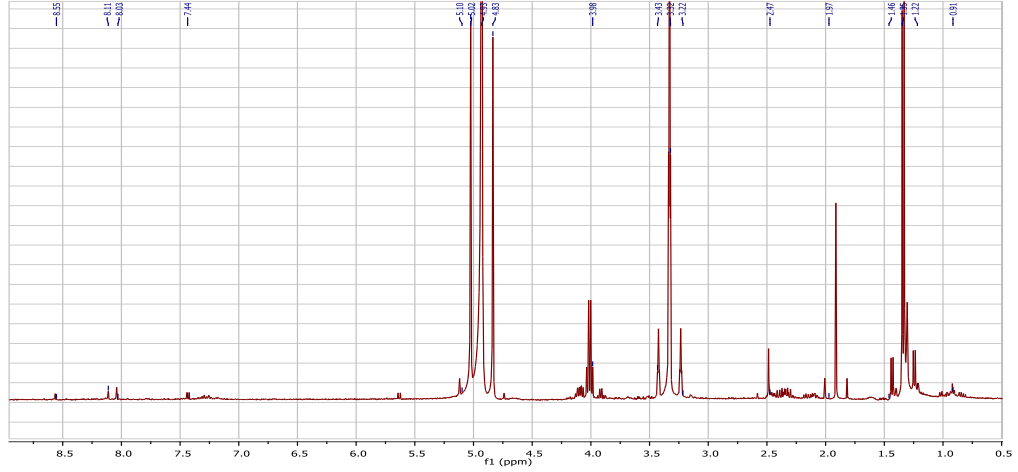
doğrulanmaktadır. Fakat 7.5 ppm ve 6.5 ppm arasında hem referans besiyeri spektrumundan farklı aynı zamanda 1.fraksiyon spektrumundan farklı olmak üzere çok küçük pikler görülmektedir. Aromatik bölgede görülen pikler katekolat tipi siderofor varlığını düşündürmesine rağmen piklerin çok küçük olması ve tam olarak ayrıştırılamaması kesin bir siderofor varlığından söz ettirilememektedir.



Şekil 4. 25 2.fraksiyon ¹H-NMR spektrum sonuçları

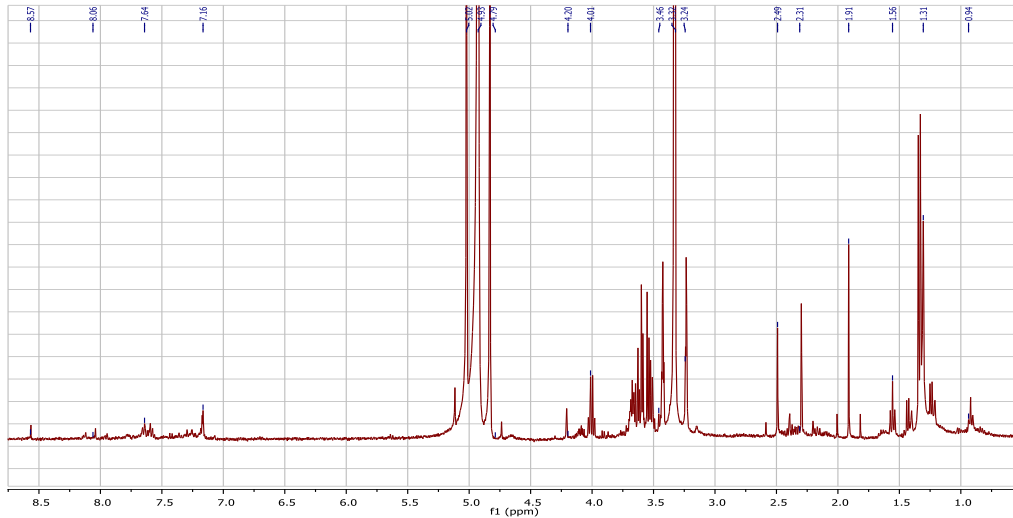
3.fraksiyon spektrumu incelendiğinde 1 ppm’de görülmekte olan piklerin besiyeri kaynaklı olduğu ve diğer spektrumlarda da görülmekte olduğu, 2.5 ppm ve 1 ppm arasında ise alifatik grupları içerdiği (CH₃, CH₂, CH vb.) görülmektedir. Bununla birlikte 3.3 ve 4.85 ppm’de görülmekte olan piklerin D-metanol ve H₂O kaynaklı olduğu ve diğer spektrumlarla da eşleştiği görülmektedir.

Siderofor varlığı incelemesi yapıldığında ise aromatik bölgede 8.55 ppm ve 7.22 ppm arasında yeni piklerin oluştuğu ve bu piklerin besiyeri kaynaklı olmadığı bakterinin aromatik gruplar içeren bileşikler ürettiğini göstermektedir. Siderofor grupları incelendiğinde; katekol tipi sideroforların yapısında aromatik ve alifatik grupların bulunduğu bilinmektedir (Hyun Sun Ko ve ark., 2011). Bu durumda ise *L. plantarum* BHC03 suşun siderofor ürettiği ve bu sideroforun katekolat tipi bir siderofor olduğu doğrulanmaktadır.



Şekil 4. 26 3.fraksiyon ^1H -NMR spektrum sonuçları

4. fraksiyon spekturumu incelendiğinde 3.fraksiyondan farklı olarak aromatik bölgede yeni pikler olduğu görülmektedir. Bu piklerin besiyeri kaynaklı olmadığı ve bakterinin yapısında aromatik gruplar olan bileşikler sentezlediğini görülmektedir. 7.7 ppm ve 7.5 ppm arasında ve 7.19 ppm’de görülen yeni pikler ve 3. Fraksiyon spekturumunda görülmemektedir. Bu nedenle ikinci bir katekolat tipi siderofor olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda 2 fraksiyonda da ortak görülmekte olan aromatik bölge pikleri 4. Fraksiyonun içerisinde bulunan bileşiklerin aynı zamanda 3. Fraksiyonda da bulunduğu ve 4. fraksiyonun bir karışım olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 27 4.fraksiyon ^1H -NMR spektrum sonuçları

5.fraksiyon spekturumu incelendiğinde 4. Fraksiyonda bulunan bazı piklerin 5. Fraksiyonda da olduğu görülmektedir. Bununla birlikte 4.fraksiyon spekturumundan

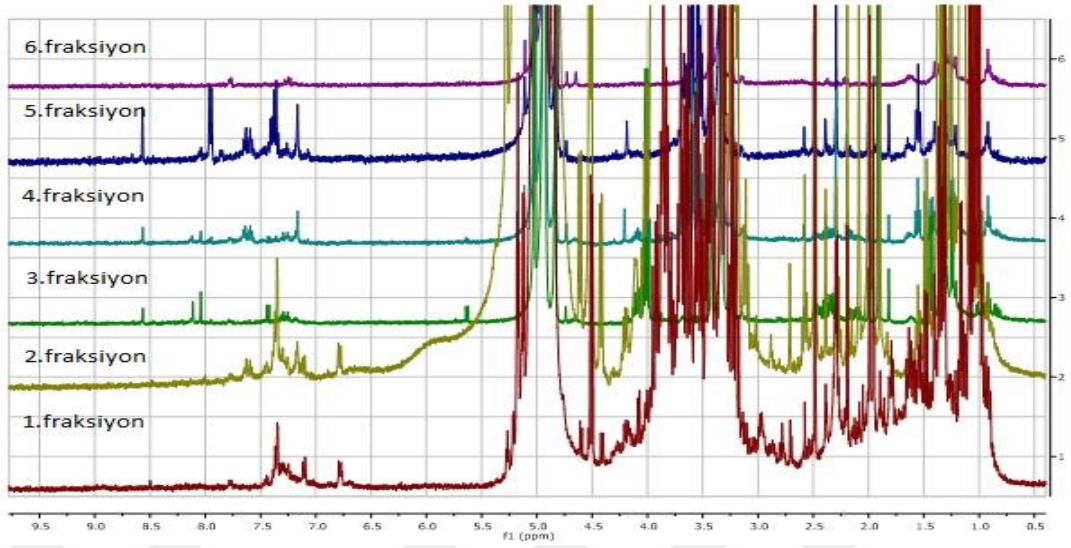
Şekil 4. 28 5.fraksiyon ^1H -NMR spektrum sonuçları

6.fraksiyon spektrum sonuçları incelendiğinde; Aromatik bölgede ve alifatik bölgede görülmekte olan piklerin katekolat tipi siderofor olduğu düşünülmektedir. 5. Fraksiyon ile büyük oranda benzerlik görülmekte ve bu nedenle 5. Fraksiyonun devamı olduğu düşünülmektedir.

72

Genel olarak 6 spekturum karşılaştırıldığında 1. ve 2. Fraksiyonun çoğunlukla besiyeri atıklarından oluştu, 3. Fraksiyonunda ise bakterinin yapısında aromatik gruplar ve alifatik gruplar içeren bileşikler sentezlediği görülmektedir. 5. Fraksiyon spekturumunda 3. Fraksiyondan farklı olarak aromatik bölgede yeni pik oluşumu görülmektedir. Buda ikinci bir katekolat tipi sideroforun varlığını göstermektedir. 3,4 ve 5 fraksiyon spekturumlarının aromatik bölgeleri karşılaştırıldığında 8.57ppm'de ortaya çıkan pikin 3 fraksiyonda da ortak olduğu görülmektedir. Bununla birlikte 3. Fraksiyon spekturumda 8.04 ve 8.11 ppm'de ortaya çıkan piklerin 4. Fraksiyon spekturumunda da olduğu görülmektedir. Dolayısıyla, 3. Fraksiyonda bulunan bileşiğin az miktarda 4. Fraksiyonda da olduğunu göstermektedir. 5. Fraksiyon spekturumunda ise 3. Fraksiyondan farklı olarak 7.96 ile 7.94ppm, 7.63 ile 7.60ppm, 7.41 ile 7.3ppm arasında yeni pik oluşumları görülmektedir. Dolayısıyla 3. Fraksiyon ve 5. Fraksiyon içerisinde aromatik gruplar içeren 2 farklı bileşik olduğunu göstermektedir. 4. Fraksiyon spekturumu incelendiğinde ise 5. Fraksiyon ve 3. Fraksiyon içerisinde bulunan aromatik grupların ikisini de içerdiği ve 2 fraksiyonun karşım olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak yapılan ^1H -NMR sonuçları incelendiğinde 3. ve 5. Fraksiyonda *L.plantarum* BHC03 suşunun aromatik ve alifatik gruplar içeren bileşikler sentezlediğini görülmüştür. Yapılan literatür taraması ile ^1H -NMR sonuçları karşılaştırıldığında ise bu bileşiklerin katekolat tipi sideroforlar olduğu tespit edilmiştir. Yapılan ^1H -NMR analizinde 2 çeşit katekolat tipi siderofor olduğu kanıtlanmış fakat kullanılan besiyerinin kompleks bir besiyeri olması ve bu nedenle ortaya çıkan piklerin karmaşıklığı sebebi ile kesin yapıları tayin edilememiştir.

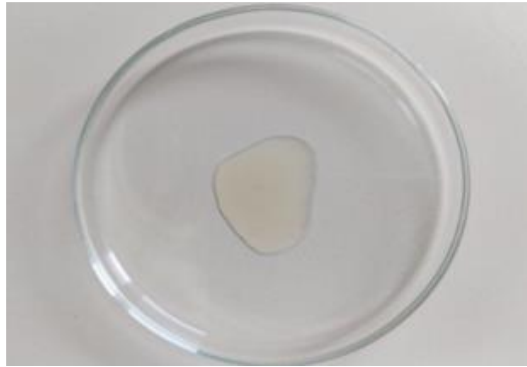


Şekil 4. 30 Fraksiyonların ¹H-NMR spektrum karşılaştırılması

4.4. *Lactobacillus plantarum* BHC03 suşunun probiyotiklik özelliklerinin belirlenmesi ve sideroforların bazı probiyotik özellikleri üzerine etkisinin araştırılması

4.4.1. Katalaz testi

Probiyotik özelliklerinden bir tanesi katalaz testidir. Yapılan katalaz testi sonucunda *L. plantarum* BHC03 suşunun katalaz negatif olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.32).



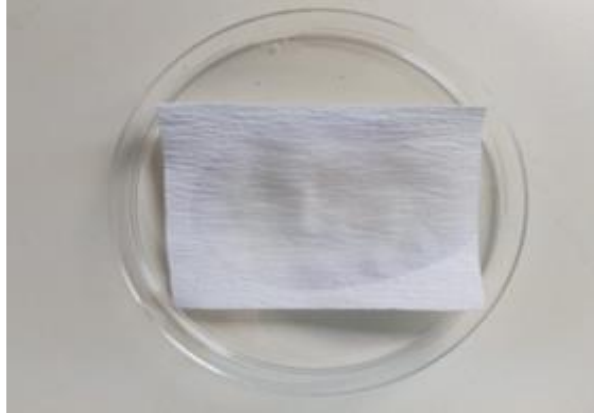
Şekil 4. 31 *L. plantarum* BHC03 suşunun katalaz testi sonucu

Laktik asit bakterileri hücre duvarı yapısı bakımından genellikle Gram pozitifdir, hidrojen peroksidi su ve oksijene dönüştüren katalaz enzimini üretmemektedirler (İsmail ve ark., 2019).

Hidrojen peroksit (H_2O_2); laktik asit bakterileri metabolitleri içerisinde yer almaktadır. (Ramos ve ark., 2012). H_2O_2 , bakteri hücre zarında bulunan lipidlerdeki sülfidril gruplarını okside etmekte ve bu güçlü oksidasyon aktivitesi sayesinde hidrojen peroksit bakterisidal etki gösterme avantajı sağlayarak patojenler üzerinde antimikrobiyal etki göstermektedir. Benzer bir şekilde yapılan bazı çeşitli çalışmalarda, hidrojen peroksit üreten bakterilerin, ortamdaki oksijeni tüketerek anaerobik koşullar yarattığı ve gelişmek için oksijene ihtiyaç duyan mikroorganizmaların hücre zarı geçirgenlik fonksiyonlarını bozarak antimikrobiyal etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Lukic ve ark., 2018).

4.4.2. Oksidaz Testi

L. plantarum BHC03 suşunun oksidaz testi sonuçları incelendiğinde sitokrom C oksidaz enzimi içermediği yani oksidaz-negatif olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.33). Bu özellik, laktik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri açısından doğrulayıcı bir sonuçtur. Bununla birlikte literatür taraması yapıldığında bu çalışmaya benzer şekilde diğer laktik asit bakteri suşlarının çoğunda oksidaz negatif olduğu bildirilmiştir



Şekil 4. 32 *L. plantarum* BHC03 suşunun oksidaz test sonucu

Yapılan çeşitli çalışmalarda *L. coryniformis* suşunun; çomak şekilli, katalaz negatif, oksidaz negatif, Gram pozitif bir bakteri olduğu tespit edilmiştir. *L. coryniformis* fermente süt ürünlerinden ve sebzelerden izole edilebilir oldukları, ürettiği çeşitli antifungal bileşiklerle de çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (Slavica ve ark, 2015).

L. reuteri; çomak şekilli, anaerobik, katalaz negatif Gram pozitif bir bakteridir. Doğal olarak insanlar, domuzlar, tavuklar ve fareler dahil olmak üzere çok çeşitli organizmaların bağırsaklarında bulunurlar. Fermente süt ürünlerinden ve insan sütünden izole edilebilirler (Ahl ve ark, 2016). Yapılan bir çalışmada *Lactobacillus* türlerinin genellikle katalaz ve oksidaz negatif olarak bilinmektedirler (Hammes ve Vogel, 1995).

4.4.3. Asit toleransı

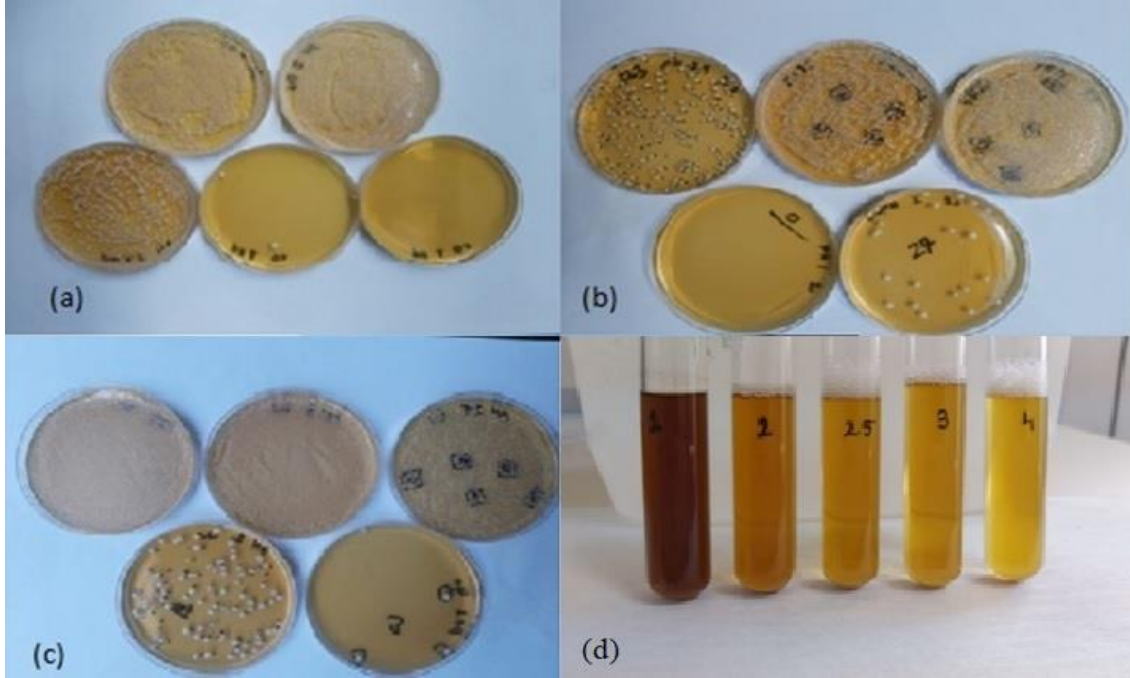
Mide suyunun toplam hacminin % 0,5 'ini Hidroklorik asit oluşturmaktadır. Mide asidinin ortalama pH değeri ise 1 ila 2 civarındadır ve yiyecekler bu asidik ortamda sindirilir (Chou ve Weimer, 1999). Bu sebeple mide asidi seçici bir ortamdır. Mide ortamının asidik değeri 3 iken bazı patojen mikroorganizmalar ürerken midenin asitlik değeri 2 civarlarında olduğunda ise yalnızca probiyotik bakteriler üreyebilir.

Buna istinaden bir probiyotik suşun mide asidik koşullarında hayatta kalabilmesi için asit toleransı yeteneği önemli bir seçim kriteridir (Havenaar ark., 1992; Castorena-Alba ark., 2018) ve bir probiyotik mikroorganizmanın mide pH değerini tolere edip edemediğini belirlemek için in-vitro testlerden biri olan asit tolerans testi kullanılır (Castorena-Alba ark., 2018).

Laktobasiller fakültatif anaerobik olup pH 3,0'e kadar tolerans gösterir, böylece düşük mide pH'sında canlılıklarını koruyarak, bağırsak kanalına geçip etkilerini burada gerçekleştirirler. Mideden salgılanan sıvının asitlik değeri normal şartlar altında 0.9 olmasına rağmen günlük besin ihtiyaçlarımızı karşıladığımızda yediğimiz yiyeceklerle birlikte bu değer 3'e kadar çıkabilmektedir (Erkkila ve Petaja, 2000). Bu tür asitlik toleransı çalışmalarında birbirinden farklı pH değerleri kullanılmaktadır. Bu durumun sebebi ortamdaki bakterilerin çok seçici koşullar altında üreyebilmesidir. Yapılan çalışmalarda ortam pH değeri 2 olduğunda çok seçici bir ortam oluşurken 3 olduğunda ise ortamda probiyotikler dışında diğer bakteri türlerinin üreyebilmesine olanak sağladığı görülmüştür. Bu durumda ara kritik değer olarak pH 2.5 kullanılmıştır.

Bu sebeple *L.plantarum* BHC03 suşunun 5 farklı asidik koşulda canlılığı incelenmiş ve sonuç olarak pH 2.5'da bir kırılma noktasının gerçekleştiği görülmüştür. *L. plantarum*

BHC03 suşu diğer probiyotikliği kanıtlanmış bakterilerde de olduğu gibi canlılığını pH 2.5'te koruyabilmiştir.



Şekil 4. 33 Farklı pH değerlerinde büyütülen *L. plantarum* BHC03 suşu (a) 0.saat sağkalım yetenekleri (b) 2.saat sağkalım yetenekleri (c) 4.saat sağkalım yetenekleri (d) MRS Broth'taki üreme şekli

Tablo 4.2 incelendiğinde, petri kaplarında yapılan canlı sayım sonuçları görülmektedir. Tabloda görülen sonuçlar üzerinde bazı artış ve azalmalar görülmektedir.

Bunun sebebi *L. plantarum* BHC03 suşunun asidik koşullara adaptasyonu ve yüksek asidik koşullarda canlılığını kaybetmemesi şeklinde yorumlanabilir. Buna göre pH:3 değerinde 2 ve 4. saat boyunca yapılan inkübasyon sürecinde üremenin gerçekleştiği görülmektedir. Hatta 2.5 ve pH 2'de dahi *L. plantarum* BHC03 büyüme yeteneğini korumaktadır. Bu durumda *L. plantarum* BHC03 suşu ağızdan başlayıp mide ve bağırsığa kadar uzanan yolda yüksek asidik koşullarda dirençli olduğu kanıtlanmıştır.

Tablo 4. 2 Farklı pH değerlerinde büyütülen *L. plantarum* BHC03 suşunun sağkalım yeteneği

	0.Saat	2.Saat	4.Saat
pH 4	SKÇ*	SKÇ	SKÇ
pH 3	3,5x10 ⁴	SKÇ	SKÇ
pH 2,5	1,9x10 ⁴	2,1x10 ⁴	2,0x10 ⁴
pH 2	<15	27	100
pH 1	<15	<15	<15

* SKÇ; sayılamayacak kadar çok

Bir çalışmada, *L. plantarum* ZDY 2013 pH 3'te canlılığını korurken pH 2'de ise inkübasyon süresinin başında hala canlı olduğunu fakat inkübasyon süresinin uzamasıyla birlikte canlılıklarını yitirmeye başladığını belirtilmiştir (Huang ve ark., 2015).

Maragkoudakis ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptığı bir çalışmada 29 farklı *Lactobacillus* suşunun probiyotik özellikleri incelenmiştir ve sonuç olarak, çoğu *Lactobacillus* suşunun pH 1'de 1 saatlik inkübasyon süresinin ardından canlılıklarını yitirdiklerini fakat, pH 2 değerine bakıldığında bakterilerin çoğunun canlılık oranında büyük oranda düşüş görüldüğünü, pH 3'te incelendiğinde ise canlılıklarını koruyabildikleri belirtilmiştir.

Sonuçlar incelediğinde, *Lactobacillus* suşlarının 2,5-4,0 pH değerlerinde ki asidik mide ortamında canlılıklarını koruyabildikleri ancak pH 2,5 altındaki daha asidik koşullarda canlılıklarını yüksek oranda yitirdikleri görülmektedir ve buda benzer çalışmalardan elde edilen veriler ile uyumludur (Maragkoudakis ve ark.,2006; Yadav ve ark., 2016; Huang ve ark., 2015; Yu ve ark., 2013).

4.4.4. Safra tuzu toleransı

Safra suyu karaciğerde sentezlenir ve temel hammaddesi kolesterol olup safra kesesinde depolanmaktadır. (Mathara ve ark., 2008; Begley ve ark., 2006). Gerek duyulduğunda ince bağırsağa salgılanan bu sıvının asıl amacı yağları parçalamasıdır. Bu durumdan dolayı hücre duvarı lipitlerine büyük etkisi bulunmaktadır. Hücre zarına zarar vererek bakteriler üzerinde antimikrobiyal etki yaratmaktadır. Bununla birlikte aynı zamanda safra sıvısı DNA'ya zarar verip bazı proteinlerin denatürasyonuna yol açabilmektedir (Begley ve ark., 2005b). Safra suyu toleransı ile ilgili fizyolojik safra konsantrasyonu %0,3-%0,5'tir (Mathara ve ark., 2008). Yapılan bazı çalışmalarda sonucunda safra

tuzuna dirençli kültürlerin tespiti için %0,3 safra tuzu konsantrasyonunun kritik değeri olduğu belirtilmektedir (Erkkila ve Petaja, 2000; Gilliland ve ark., 1985).

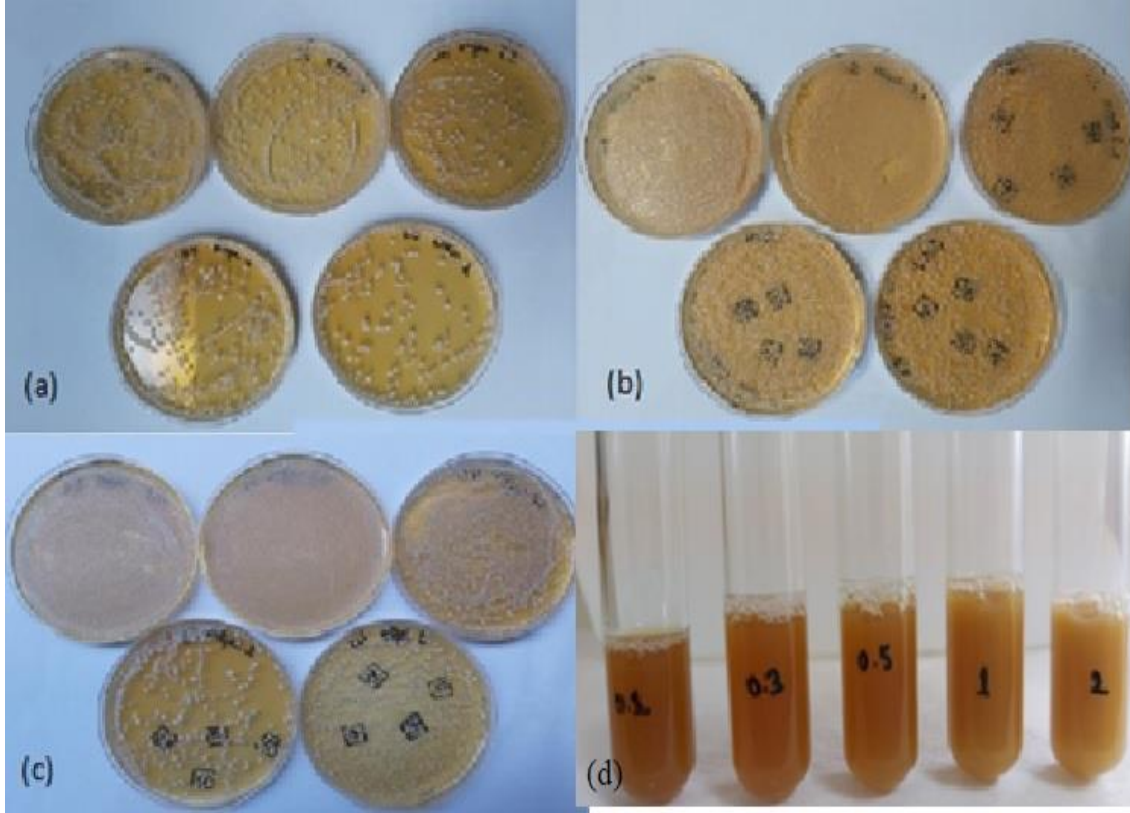
Yapılan çalışmada *L. plantarum* BHC03 suşunun % 2 safra tuzu varlığında dahi üremesini devam ettirdiği görülmektedir. Her ne kadar sağ kalan bakteri sayısı az olsa da inkübasyonun 4. saatinde dahi bölünmenin ve çoğalmanın olduğu Tablo 4.3’de görülmektedir. Ancak en hızlı ve normal ikilenmenin % 0,3 konsantrasyondaki safra tuzu varlığında olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4. 3 Farklı safra tuzu konsantrasyonlarında büyütülen *L.plantarum* BHC03 suşunun sağkalım yeteneği

Safra Tuzu	0.Saat	2.Saat	4.Saat
%0,10	SKÇ*	SKÇ	SKÇ
%0,30	1,6x10 ⁴	SKÇ	SKÇ
%0,50	1x10 ⁴	3,8x10 ⁴	3,9x10 ⁴
%1	6,7x10 ³	8,8x10 ³	9,1x10 ³
%2	2,8x10 ²	1,3x10 ³	9,4x10 ³

*SKÇ; sayılamayacak kadar çok

Elde edilen veriler doğrultusunda *L. plantarum* BHC03 suşunun safra tuzu toleransı probiyotikliği kanıtlanmış olan bakterilerin standartlarına uygun olduğu ve literatür incelendiğinde bakterinin bir probiyotik bakteri olduğunu doğrulamaktadır. Şekil 4.34’te safra tuzu varlığında *L. plantarum* BHC03’ün deney ortamındaki üremesi görülmektedir.



Şekil 4. 34 Farklı safra tuzu konsantrasyonlarında büyütülen *L. plantarum* BHC03 suşunun MRS agar besiyerleri üzerinde sağkalım yeteneklerinin belirlenmesi (a) 0.saat sağkalım yetenekleri (b) 2.saat sağkalım yetenekleri (c) 4.saat sağkalım yetenekleri (d) MRS Broth

Jacobsen ve arkadaşlarının 1999’da yaptıkları bir çalışmada benzer şekilde %0,3 oxgall konsantrasyonun gelişmeyi yavaşlattığını gözlemlemişlerdir. Benzer diğer bazı çalışmalarda da *Lactobacillus* kültürlerinin %0,3 konsantrasyonda gelişimlerinin yavaşladığı tespit edilmiştir (Pennacchia ve ark., 2004; Gupta ve ark., 1996; Maragkoudakis ve ark., 2006). Aynı şekilde Suomalainen ve arkadaşlarının 2007’de *Propionibacterium* türleri üzerinde yaptıkları çalışmada %0,3 konsantrasyonun gelişimi engellediğini tespit etmişlerdir.

Erkkila ve Petaja ‘nın 2000’de yapmış oldukları bir çalışmada ise bu sonuçların aksine %0,3’lük safra tuzu konsantrasyonunun kültürlerin gelişimini önemli ölçüde engellediğini gözlemlemişlerdir.

4.4.5. Fenol toleransı

Enterobacteriaceae, *Peptostreptococcus*, *Clostridia* ve *Eubacteria* gibi bağırsak bakterileri, üreyi amonyak, fenol ve indolamin gibi probiyotik bakterilerin faaliyetlerini

riske atabilecek potansiyel olarak toksik maddelere dönüştürebilmektedirler. Bu nedenle probiyotik bakterilerin canlılıklar

ını devam ettirebilmeleri için bağırsaktaki diğer bakterilerin oluşturduğu fenole karşı dirençli olmalıdır. Bu nedenle probiyotik suşların tespit edilmesinde fenol tolerans testi oldukça önemlidir (Yadav ve ark., 2016; Singhal ve ark., 2019).

Yapılan fenol toleransı çalışması sonucunda, *L. plantarum* BHC03 suşunun %1 konsantrasyonda fenol varlığında canlı kaldığı ancak üremediği, %2'lik fenolün ise 2. Saat sonunda bakteriyi iyice yok ettiği anlaşılmaktadır (Tablo 4.4).

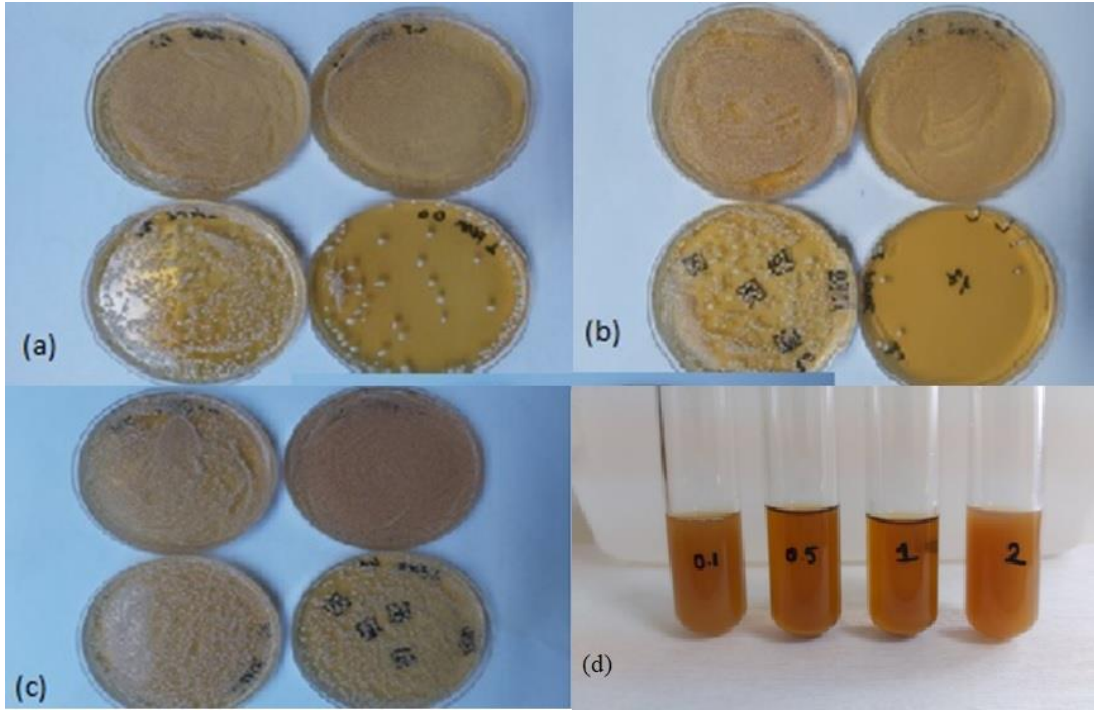
Tablo 4. 4 Farklı fenol konsantrasyonlarında büyütülen *L.plantarum* BHC03 suşunun sağkalım yeteneği

FENOL	0.SAAT	2.SAAT	4.SAAT
%0,10	SKÇ*	SKÇ	SKÇ
%0,50	SKÇ	SKÇ	SKÇ
%1	1,7x10 ⁴	1x10 ⁴	1x10 ⁴
%2	124	<15	<15

*SKÇ; sayılamayacak kadar çok

Şekil 4.35'da ise farklı konsantrasyonlarda fenol içeren besiyerlerinde yapılan canlı sayımları ve üreyen bakteriler görülmektedir.

Xanthopoulos'un 2000 yılında yaptığı bir çalışmada fenolik bileşenlerin özellikle *Lactobacillus* kültürleri üzerinde inhibe edici etkisi olabileceği belirtilmektedir. Yapılan bir çalışmada, *Bifidobacterium* kültürünün %0,2-0,5 arasında 4 farklı fenol konsantrasyonunda canlılığını izlemiş ve konsantrasyon %0,5'e yükseltildikçe canlılığın azaldığını tespit etmişlerdir (Acharya ve Shah 2002).



Şekil 4. 35 Farklı fenol konsantrasyonlarında büyütülen *L.plantarum* BHC03 suşunun MRS agar besiyerleri üzerinde sağkalım yeteneklerinin belirlenmesi (a) 0.saat sağkalım yetenekleri (b) 2.saat sağkalım yetenekleri (c) 4.saat sağkalım yetenekleri (d) Farklı konsantrasyonlarda fenol içeren MRS Broth besiyerleri

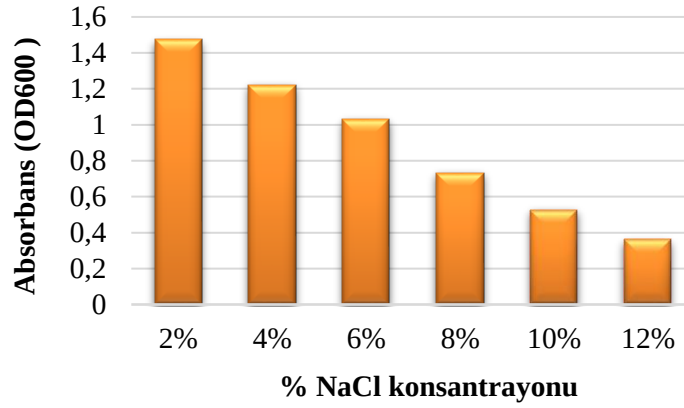
Sindirim sisteminde oluşabilecek fenolik bileşenlerin konsantrasyonu hakkında kesin değerler belirtilmemiş olmakla birlikte % 0,4 konsantrasyonda canlı kalan kültürlerin yeterli dirence sahip olduğu düşünülmektedir. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde test edilen *L. plantarum* BHC03 suşunun %0,5 fenol konsantrasyonuna hassas oldukları görülmektedir. Bununla birlikte test edilen bakterinin fenole karşı gösterdiği dirençlilik probiyotik bakteri olduğunu doğrulamaktadır.

4.4.6. NaCl toleransı

Probiyotik kültür mikroorganizmalarının seçiminde tuza dayanıklılık önem taşımaktadır. Farklı NaCl konsantrasyonlarında büyütülmüş olan, *L. plantarum* BHC03 suşunun % inhibisyon oranları Şekil 4.36'de verilmiştir. Farklı NaCl konsantrasyonlarında inhibisyon değeri sırasıyla şu şekildedir %13, %28, %39, %57, %69 ve %79 'dur. Sonuçlar incelendiğinde tuz konsantrasyonu arttıkça probiyotik suş

üzerindeki inhibisyon etkisinin arttığı ve bakteri büyümesinin yavaşladığı görülmektedir.

L. plantarum BHC03 %1-12 NaCl arasında değişen konsantrasyonlarda tuza dayanıklı olması, probiyotik kültür olarak kullanım açısından yeterli olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4. 36 *L. plantarum* BHC03 suşunun NaCl toleransı

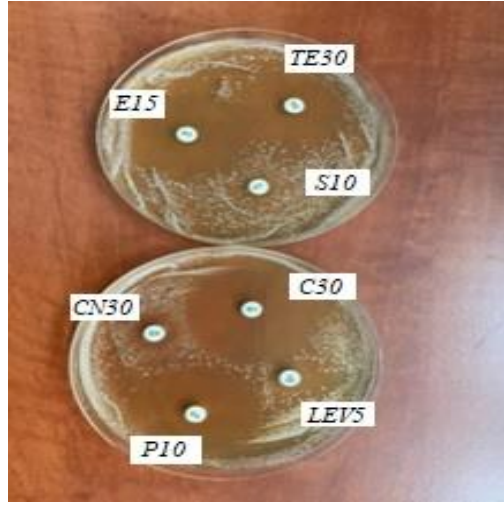
Ertekin ve arkadaşlarının 2014 yılında yapmış olduğu bir çalışmada tüm izolatların %3.0, 4.0, 5.0 ve 6.5 NaCl içeren ortamda gelişebildikleri; %8.0 NaCl oranında sadece *L. plantarum* O20; %9.0 NaCl oranında ise *L. plantarum* O20 ve *L. curvatus* 3 gelişememiştir. Bu sonuçlar tuza dayanıklılık açısından tüm izolatların starter kültür olarak kullanım için yeterli dayanıklılıkta olduğunu ortaya koymuştur.

4.4.7. Antibiyotik duyarlılık testi

Yapılan çalışmada 3 farklı inhibisyon mekanizmasına sahip antibiyotikler kullanılmıştır ve bu antibiyotikler arasında hücre duvarı sentezini engelleyici olarak “Penicillin G”, protein sentezini engelleyiciler olarak “Chloramphenicol”, “Erythromycin”, “Gentamicin”, “Tetracycline”; nükleik asit sentezini engelleyici olarak ise “Levofloxacin” dir. Tetracycline (TE30), Streptomycin (S10), Erythromycin (15), Gentamicin (CN30), Chloramphenicol (C30), Penicillin (P10) ve Levofloxacin (LEV5) antibiyotiklerine direnç disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. *L. plantarum* BHC03 suşunun antibiyotiklere karşı gösterdiği direnç Tablo 4.5 ve Şekil 4.37 ’de gösterilmektedir.

Tablo 4. 5 *L. plantarum* BHC03 suşunun antibiyotik direnç profili

Antibiyotikler	Zon çapı (mm)
Tetracycline (TE30)	34mm
Streptomycin (S10)	zon yok
Erythromycin (E15)	35mm
Gentamicin (CN30)	10mm
Chloramphenicol (C30)	38mm
Penicillin (P10)	32mm
Levofloxacin (LEV5)	10mm



Şekil 4. 37 *L. plantarum* BHC03 suşunun antibiyotik duyarlılık testi sonuçları

Yapılan bir çalışmada laktik asit bakterilerinin “Chloramphenicol” ve “Tetracycline” antibiyotiklerine karşı hassas olduğu tespit edilmiştir (Ammor ve Mayo, 2007). Bu çalışmada *L. plantarum* BHC03 suşunun en yüksek hassasiyet gösterdiği antibiyotikler “Chloramphenicol” ve “Tetracycline” olmuştur. Fakat literatürde bu antibiyotiklere karşı dirençli kültürlerin de tespit edildiği çalışmalar bulunmaktadır (Charteris ve ark., 1998; Danielsen ve Wind, 2003).

“Gentamicin”e karşı direnç konusunda yaygın bir görüş olmamakla birlikte direnç gösteren bakterilerin olduğu çalışmalar bulunmaktadır (Lara-Villoslada, 2007; Zhou ve ark., 2005). Yapılan çalışmada *L. plantarum* BHC03 suşunun “Gentamicin”e karşı direnç gösterdiği görülmektedir. Çalışmada *L. plantarum* BHC03 suşu birden fazla antibiyotiğe direnç göstermiştir.

Laktik asit bakterilerinin sıklıkla birden fazla antibiyotiğe doğal olarak (intrinsik direnç) direnç gösterebildiği bilinmektedir (Ammor ve Mayo, 2007).

Son yıllarda en büyük sağlık sorunlarından biride bakterilerdeki antibiyotik direncinin artmasıdır (Kastner ve ark., 2006). Yapılan bir çalışmada insan ve hayvan gaita örnekleri ve fermente gıdalardan izole edilen bağırsak florasında bulunan mikroorganizmalarda antibiyotik direnç genlerinin bulunduğu belirlenmiştir (Florez ve ark., 2005, Klare ve ark., 2007). Bu direnç genlerine doğal direnç genleri adı verilir ve laktik asit bakterileri bu doğal direnç genlerinin aktarımını gerçekleştiremez. Bununla beraber; *L. fermentum*, *L. plantarum* ve *L. reuteri* gibi bazı laktik asit bakterilerinin, plazmid kodlu ve yatay gen transferi yolu ile aktarılabilen antibiyotik direnç genlerini taşıyabildikleri belirlenmiştir (Fons ve ark., 1997, Zhou ve ark., 2005). Probiyotik mikroorganizmalar antibiyotik direnç genine sahip olduklarında, gen transferi ile bu genlerin bağırsaktaki diğer mikroorganizmalara aktarımını sağlar ve antibiyotiğe dirençli patojen bakterilerin gelişmesini sağlar. Bu sebeple insanların ve hayvanların tükettiği probiyotik türlerinde antibiyotik direnç genlerine sahip mikroorganizmalar tercih edilmemektedir (Saarela ve ark., 2000, Hummel ve ark., 2007).

Kullanılan probiyotik mikroorganizmaların antibiyotik dirençlilik seviyelerinin standartların üzerinde bulunması insan ve hayvan sağlığı üzerinde olumsuz etki yaratmaktadır. Bu durumda kullanılacak olan probiyotik mikroorganizmanın yatay gen transfer yeteneği bulunmaması insan ve hayvan sağlığındaki olumsuz etki riskini ortadan kaldırmaktadır. Bu sebeple, kullanılan suşların antibiyotik dirençlilik analizleri yapılması gerekmektedir.

4.4.8. Otoagregasyon deneyi

Otoagregasyon yeteneği yüksek olan probiyotik suşlar bağırsak epitel yüzeyine kolaylıkla tutunur ve patojen bakterilerin tutunmasına ve orada bir hasar meydana getirmesini önlemektedir. Bu nedenle probiyotik suşların otoagregasyon yeteneği bağırsak epitel hücrelerine tutunması için gereklidir ve bu nedenle probiyotik suşların incelenmesinde bu test önemli rol oynamaktadır (Del Re ve ark., 2000; Kos ve ark.,

2003). Yapılan ölçümün ardından elde edilen verilere göre *L. plantarum* BHC03 suşunun otoagregasyon yeteneği formüle göre hesaplanmıştır.

Buna göre;

$$\% \text{Otoagregasyon} = (0,50375 - 0,041333) / 0,50375 * 100 = \%92,11$$

Literatür taraması yapıldığında ve sonuç incelendiğinde *L. plantarum* BHC03 suşunun otoagregasyon yeteneği diğer yapılan çalışmalar ile uyumlu olduğu ve probiyotik bakteri olarak kabul edilebilmesi için yeterli otoagregasyon yeteneği gösterdiği belirlenmiştir. Buna istinaden incelenen suşun bağırsak epitel yüzeyine yüksek oranda tutunma kabiliyetinin olduğu ve probiyotik bir bakteri olduğu doğrulanmaktadır.

Huang ve arkadaşları 2015 yılında yapmış olduğu bir çalışmada *L. plantarum* K3, K4 ve E41 suşlarının otoagregasyon yeteneklerini incelemişlerdir. Sonuç olarak; inkübasyon işleminin ikinci saatinde sırasıyla %23,1, % 19,4 ve %20,3, beşinci saatinde ise % 52,6, %41,0 ve %47,5 olduğu ve incelenen LAB'leri arasında *L. plantarum* suşlarının en yüksek otoagregasyon yeteneğine sahip olduğu belirtilmiştir. Araştırmalar bakterilerin otoagregasyon yeteneklerinin inkübasyon süresinin uzamasıyla birlikte arttığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar bazı probiyotik suşların otoagregasyon yoluyla bir bariyer oluşturarak patojenik bakterilerin bağırsak mukozasına yapışmasını engelleyebildiği bildirmektedirler (Collado ve ark., 2007a; 2008; Ferreira ve ark., 2011).

4.4.9. Suşların hidrofobikliği

Probiyotik özelliklerin belirlenmesi için en önemli özelliklerden birde hidrofobisite yani suşların hidrofobiklik yeteneğidir. Yapılan çalışmada *L. plantarum* BHC03 suşunun Ksilen, Aseton, Heptan, Kloroform ve Etil asetat varlığında hidrofobiklik yeteneği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar formülde yerine konulduktan sonra ortaya çıkan % hidrofobisite değerleri Tablo 4.6'da verildiği gibidir.

Tablo 4. 6 *L.plantarum* BHC03 hidrofobisite sonuçları

Organik çözücü	Hidrofobisite (%)
Ksilen	93,90
Aseton	64,24
Heptan	71,20
Kloroform	90,70
Etil asetat	73,52

Elde edilen verilere göre kullanılan çözücüler arasında bakterilerin en yüksek hidrofobite gösterdiği çözücü ksilen olmuştur.

Vindorela ve Reinheimer'in 2003 yılında yaptığı bir çalışmada probiyotik izolatların %38.1 ve %68.7 arasında hidrofobisitelerinin olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde ve literatür verileri ile karşılaştırıldığında diğer probiyotik özellik gösteren izolatlara göre düşük olduğu ve özellikle *L.plantarum* O21 (%50.82) ve O22b (%45.56) izolatlarının probiyotik özelliklerinin üzerinde daha detaylı çalışılması gerektiğini belirtmişlerdir.

Savage tarafından yapılan çalışmada, insan, dana, sıçan ve domuz sindirim sisteminden laktik asit bakterileri izole edilmiş ve bu bakterilerin hidrofobisite değerleri incelenmiştir. İncelemenin sonucunda elde edilen verilere göre; insan sindirim sisteminden izole edilen *L. acidophilus* izolatı için %35, dana sindirim sisteminden izole edilen *L. reuteri* için %44 fare sindirim sisteminden izole edilen *L. fermentum* için %57.6, sıçan sindirim sisteminden izole edilen *L. murinis* için %81 ve domuz sindirim sisteminden izole edilen *L. acidophilus* ve *L. fermentum* için ise %17 olarak saptanmıştır. Yapılan çalışmada izole edilen laktik asit bakterileri incelendiğinde en yüksek hidrofobisite yeteneği gösteren örnek sıçan sindirim sisteminden izole edilen *L. Murinis* olduğu anlaşılmıştır. Bu izolatların % hidrofobisite değerleri intestinal epitel hücrelere tutunabileceğini göstermektedir.

Özdoğan'nın 2011 yılında yapmış olduğu bir çalışmada *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun hidrofobisitesi % 83.48 olarak hesaplanmıştır.

Yüksek hidrofobisite gösteren bakterilerin gastrointestinal sistemde daha kuvvetli tutunmasının diğer patojen bakterilere karşı yüksek avantaj olarak düşünülmektedir (Naidu ve ark., 1999, Todorov ve ark., 2007). Buna karşın, Ouwehand 1999'da intestinal mukusa tutunmaları üzerine yapmış olduğu bir çalışmada bakterilerin yüzey hidrofobisite ile tutunma yetenekleri arasında bir korelasyon olmadığını göstermiştir.

Bir çalışmada yüksek otoagregasyon kabiliyetine sahip olan laktobasiller, yüksek hidrofobiklik gösterdiği belirtilmiştir (Chen ve ark., 2010; Nikolic ve ark., 2010). Bu referans alındığına *L. plantarum* BHC03 suşunun otoagregasyon yeteneği ve hidrofobisitesinin doğru oranda yükseldiği bu tezin doğruluğunu kanıtlamaktadır.

4.4.10. Hemolitik aktivite

Patojenler için yaygın bir virülans faktörü olan hemoliz, mikroorganizmanın demire ulaşmasını kolaylaştırır. Bakteri tarafından üretilen hidrojen peroksitin hemoglobini yeşil methemoglobine okside etmesi ve bakteri kolonisine yeşil rengi vermesine alfa (α) hemoliz denilmektedir. Bununla birlikte beta hemoliz ise (β -hemoliz), kırmızı kan hücrelerinin parçalanmasına ve dolayısıyla kanlı agarda kolonilerin etrafında şeffaf zon görülmesine görünmesine neden olmaktadır. Buna istinaden hemoliz virülans bir faktör olduğu için probiyotik suşlar için hemolitik aktivitenin negatif olması gerekmektedir. Dolayısıyla probiyotik suşlar için kanı agarda hemolitik aktivite tayini yapılması zorunlu testler arasındadır (Elli ve ark., 2000; FAO/WHO, 2002).

Bir probiyotik aday suşların en önemli şartlarından biri hemolitik aktiviteye sahip olmamasıdır. Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmaların, hemolize neden olmayan γ -hemolitik suşlar olması gerekmektedir (Maragkoudakis ve ark., 2006, Mourad ve Nour-Eddine 2006).

Çalışma kapsamında *L. plantarum* BHC03 suşunun hemolitik aktivitesi incelenmiştir. Kanlı agar üzerinde yapılmış olan çizgi ekimde bakterinin hemolitik aktivitesi incelendiğinde hiçbir hemolitik aktivite göstermediği gözlemlenmiş ve sonuç olarak *L. plantarum* BHC03 suşunun gama (γ) hemolitik olduğu Şekil 4.39'da gösterilmektedir.



Şekil 4. 38 *L. plantarum* BHC03 suşunun hemolitik aktivitesi

Aynı zamanda yapılan çalışma iki aşamalı gerçekleştirilmiştir. Yukarıdaki görselde iki adet kanlı agar görülmektedir. Solda ki kanlı agar üzerinde *L. plantarum* BHC03 suşunun ekimi yapılmışken sağdaki kanlı agar üzerine 1:1 *L. plantarum* BHC03 suşu ve kısmi saflaştırılmış siderofor karışımı hazırlanarak ekimi gerçekleştirilmiştir. Hemolizin mikroorganizmalar üzerinde demire ulaşmasını kolaylaştırdığı bilinmektedir (Elli ve ark., 2000; FAO/WHO, 2002). Bu nedenle sideroforların demir üzerinde yüksek afinitesi olduğu bilindiğinden ötürü siderofor ve *L. plantarum* BHC03 suşu karışımında sideroforun etkisi incelenmek istenmiştir. Yapılan ekim sonucunda sağdaki agar üzerinde görülmekte olduğu gibi sideroforun bakterinin hemolitik aktivitesi üzerinde herhangi bir etkisi görülmemektedir. Buda bizlere siderofor ile desteklenmiş olan *L. plantarum* BHC03 suşunun probiyotik bakteri olarak kullanımını doğrulamaktadır.

Yapılan bir çalışmada benzer şekilde *L. plantarum* MJM60319, MJM60298 ve MJM60399 suşlarının *L. plantarum* RYPR1 ve diğer 5 farklı *Lactobacillus* suşlarının hemolitik aktiviteleri incelenmiş ve incelenen hiçbir suşun hemolitik aktivitesi olmadığı belirlenmiştir (Palaniyandi ve ark., 2017). Yine Maragkoudakis ve arkadaşlarının 2006 yılında yapmış olduğu bir diğer çalışmada ise süt ürünlerinden izole ettikleri 29 adet *Lactobacillus* suşlarının hemolitik aktivitesi incelenmiş ve izole edilen 29 suşun hepsini hemoliz negatif olarak bildirmişlerdir.

4.4.11. Kolesterol Asimilasyonu

Yapılan çalışmada *L. plantarum* BHC03 suşunun kolesterol asimilasyon sonuçları Tablo 4.7’de verilmektedir.

Tablo 4. 7 *L. plantarum* BHC03 suşunun kolesterol asimilasyon sonuçları

No	Karışım içeriği*	Kolesterol konsantrasyonu (mg/dl)			
	Zaman (saat)	0	24	48	72
1	Siderofor pozitif kontrol [<i>L. plantarum</i> (-)]	19	31	43	57
2	Probiyotik kontrol [Siderofor (-)]	19	25	52	96
3	1:1 Siderofor:probiyotik	19	47	83	121
4	2:1 Siderofor: probiyotik	24	47	81	112
5	1:2 Siderofor :probiyotik	27	32	64	99
6	MRS ve kolesterol negatif kontrol [<i>L.plantarum</i> ve Siderofor (-)]	35	39	51	60
7	MRS negatif kontrol [Kolesterol, <i>L.plantarum</i> ve Siderofor (-)]	7	7	7	7

*7 numaralı örnek haricinde diğer altı örnekte MRS + Kolesterol temel ortam olarak bulunmaktadır. 7 numaralı örnekte ise sadece MRS besiyeri bulunmaktadır.

Sonuçlar genel olarak incelendiğinde çözelti içerisindeki kolesterol miktarının zaman bağlı olarak attığı görülmektedir. Bunun nedeni ise kullanılan kolesterolün çözünürlüğü ile bir ilgisinin olduğu düşünülmektedir. 6 numaralı örnek olan standart kolesterol çözeltisi incelendiğinde zamana bağlı olarak kolesterolün çözündüğü ve kolesterol miktarında sürekli artış olduğu tespit edilmiştir. 6 numaralı örnek olan standart kolesterol çözeltisi ile diğer siderofor + kolesterol, bakteri + kolesterol ve siderofor + bakteri + kolesterol karışımlarının sonuçları karşılaştırılmıştır. 1 numaralı örnek olan siderofor + kolesterol karışımı ile standart kolesterol karışımının aynı miktarda artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle siderofor kolesterol çözünmesinde herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. 2 numaralı örnek olan bakteri + kolesterol karışımı ile standart kolesterol karşılaştırıldığında ise bakterinin kolesterol çözünmesinde etkin bir rol oynadığı görülmektedir. 3 numaralı örnek olan siderofor + bakteri (1:1) kolesterol karışımında ise sideroforların bakteri ile birlikte kullanıldığında kolesterol çözünmesinde yüksek oranda bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde ise; kolesterol çözeltisinin içerisinde bulunan kolesterol miktarının sabit kalmaması ve zamana bağlı olarak kolesterol

artışının devam etmesi nedeni ile *L. plantarum* BHC03 suşunun ve sideroforların kolesterol asimilasyonları üzerine etkileri tespit edilememiştir.

4.4.12. Bakteriyosin Aktivite Testi

Bakteriyosinler bakteriler tarafından sentezlenen doğal antimikrobiyal bileşikler olup; hidrofobik, katyonik peptid özelliğine ve küçük molekül ağırlığına sahiptirler. Bilim dünyasında genel bir kabul gören bu görüşe göre, doğada tüm bakterilerin en az bir bakteriyosin ürettiği ileri sürülmektedir (Klaenhammer 1993, Klaenhammer ve ark., 1995, Hernandez ve ark., 2005).

Antimikrobiyal aktiviteye sahip suşların büyük çoğunluğunda bu inhibitör aktivitenin bakteriyosin üretiminden kaynaklandığının tespiti, söz konusu metabolitlerin bakteriler tarafından yaygın bir şekilde üretildiği görüşünü desteklemektedir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin etki spektrumları bazı türlerle sınırlı olup, daha çok Gram (+) mikroorganizmalar üzerinde etkilidirler (Evren ve ark., 2006). 9 farklı indikatör bakteriye karşı, agar noktalama (van Belkum ve ark., 1989) ve kuyu difüzyon testleri kullanılarak belirlenmiştir.

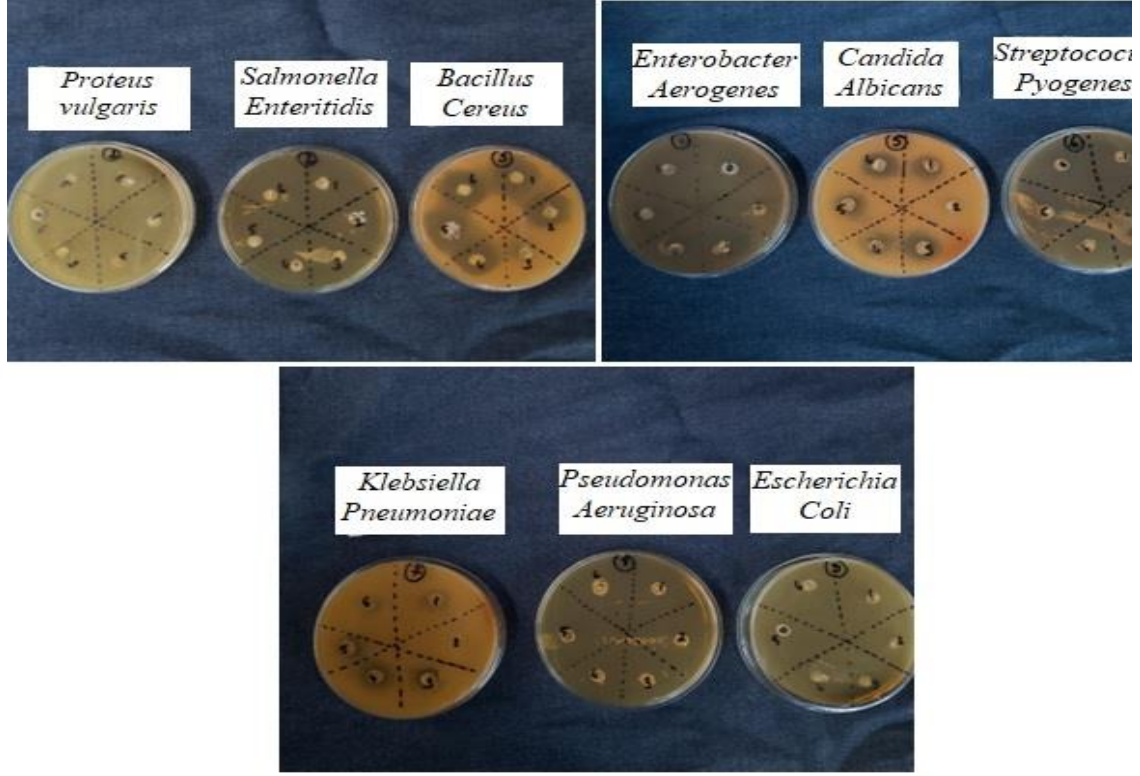
Yapılan çalışmada *L.plantarum* BHC03 suşunun bakteriyosin aktiviteleri 9 farklı suş üzerinde incelenmiştir. *L.plantarum* BHC03 suşun ürettiği bakteriyosinlerin ve bu bakteriyosin siderofor kompleksi karışımlarının *P. vulgaris*, *S. enteritidis*, *E. aerogenes*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* ve *E.coli* suşları üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Tablo 4. 8 *L.plantarum* BHC03 suşunun bakteriyosin aktivitesi sonuçları

NO	İNDİKATÖR BAKTERİ	1.KUYU	2.KUYU	3.KUYU	4.KUYU	5.KUYU	6.KUYU
1	<i>P. vulgaris</i>	.*	-	-	-	-	-
2	<i>S. enteritidis</i>	-	-	-	-	-	-
3	<i>B. cereus</i>	+++	+++	+	+++	+++	+++
4	<i>E. aerogenes</i>	-	-	-	-	-	-
5	<i>C.albicans</i>	+	-	++	++	+	++
6	<i>S. pyogenes</i>	-	-	-	-	-	-
7	<i>K. pneumoniae</i>	+	-	++	++	++	+

8	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-
9	<i>E. coli</i>	-	-	+	-	-	-

*İnhibisyon zon çapı +<0,5cm, 0,5cm<++<1cm, 1cm<+++ olarak değerlendirilmiştir. (-); Zon yok



Şekil 4. 39 *L.plantarum* BHC03 suşunun bakteriyosin aktivitesinin incelenmesi

Dündan ve arkadaşlarının 2006’da yapmış olduğu bir çalışmada *L. plantarum* tarafından üretilen laktolin ve gibi bakteriyosinlerin *S. aureus*, *Listeria* spp. *B.cereus*, *C. perfringens* gibi birçok patojeni inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir.

Soomro ve ark 2002’de yapmış olduğu çalışmada laktik asit bakterilerinin tarafından üretilen bakteriyosinler Gram (+) bakterilere etki ederken, genellikle Gram (-) bakterilere, maya ve küflere etki etmediğini tespit etmişlerdir. Bu suşların gram (-) olması ve bakteriyosin aktivitesi göstermemesi Soomro ve ark 2002’de yapmış olduğu çalışmayı doğrulamaktadır. Fakat *K. pneumoniae* suşunun gram (-) olmasına rağmen bakteriyosin aktivite göstermiştir.

L.plantarum BHC03 suşunun diğer gram (+) bakteriler olan *B. cereus* ve *C. albicans* suşlarının üzerinde yüksek oranda bakteriyosin aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca siderofor ve süpernatant karışımlarının bulunduğu kuyuların *B. cereus*, *C. albicans* ve *K.*

pneumoniae üzerinde daha büyük zon çapları oluşturmaları sideroforların bakteriyosin aktivitelerini arttırdığını düşündürmektedir.

5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında laktik asit bakterilerinin izolasyonu, tanılanması ve siderofor üretim yetenekleri incelenmiştir. Mikroorganizmaların maksimum siderofor üretimini gerçekleştirebilmesi için siderofor üretim optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte ekstraselüler olarak üretilen sideroforlar saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. Siderofor üretici mikroorganizmanın probiyotik özellikleri incelenmiştir.

Tez kapsamında Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Endüstriyel Mikrobiyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda bulunan yoğur ve süttten elde edilen 46 adet suş kullanılmıştır. 46 adet örneğin siderofor üretim kapasitelerinin incelenmesi için CAS deneyi yapılmıştır. Mikroorganizmaların CAS agar platelerine yapılan ekimin ardından turuncu zon veren örnekler siderofor üreticisi olarak tanımlanmış ve CDLIM içerisine inoküle edilerek siderofor üretimi CAS metodu ile kesinleştirilmiştir.

46 adet izolat içerisinde sadece inek yoğurdundan izole edilen I5 kodlu örneğin siderofor ürettiği tespit edilmiştir. Yapılan CAS sıvı deneyi sonucunda I5 kodlu örneğin $[(Ar - As)/Ar] \times 100$ formülü ile %50,5 oranında siderofor üretimi gerçekleştirdiği görülmüştür. Ardından I5 kodlu örnek 16s rRNA dizi analizi ile *L. plantarum* olarak tanımlanmıştır. Örneğin türü tam olarak tanımlanmadığından *L. plantarum* BHC03 olarak kodlanmıştır. *L. plantarum* BHC03 suşunun maksimum siderofor üretimini tespit etmek amacıyla sıcaklık, pH, FeCl₃, farklı azot ve karbon kaynaklarının siderofor üretimi üzerine etkileri incelenmiştir.

Yapılan sıcaklık optimizasyonu sonuçları incelendiğinde %92 oranında maksimum siderofor üretiminin 48.saatte ve 37 C'de gerçekleştiği tespit edilmiştir. Sıcaklık optimizasyonun siderofor üretimi üzerinde %41,5'lik bir artışa neden olduğu görülmüştür. FeCl₃ optimizasyonu sonuçları incelendiğinde ise; 0 ve 1 µM konsantrasyonlarında maksimum siderofor üretiminin gözlemlendiği bunula birlikte 1 µM

üzeri konsantrasyonlarda ise siderofor biyosentezinin gerçekleşmediği görülmüştür. Yapılan pH optimizasyonu sonuçları incelendiğinde en yüksek siderofor üretimin pH7 gibi nötral koşullarda gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bunun nedeninin nötral koşullarda demirin çözünürlüğünün yüksek olduğu düşünülmektedir.

Azot ve karbon kaynağının yapısı siderofor üretimini tetiklemektedir. Kolay asimile edilebilen karbon ve azot kaynakları hızlı büyümeye sebep olmakta ve dolayısıyla siderofor üretimi artmaktadır (Tailor ve Joshi, 2012). Azot ve karbon kaynağı sonuçlarına göre maksimum siderofor üretimi karbon kaynağı olarak maltozda azot kaynağı olarak ise yeast ekstraktta tespit edilmiştir.

Tüm optimal koşullar birleştirildiğinde ve birim siderofor yüzdeleri hesaplandığında %97 oranında siderofor üretimi tespit edilmiş ve optimizasyonun %5 oranında siderofor artışına neden olduğu görülmüştür. Maksimum siderofor üretimi koşullarının belirlenmesinin ardından konsantre siderofor çözeltisinin elde edilmesi için büyük ölçekli siderofor üretimi gerçekleştirilmiş ve liyofilizatör cihazında liyofilize edilerek konsantre hale getirilmiştir.

Konsantre edilen siderofor çözeltisi 1 ml metanolde çözdürülerek Sephadex-LH20 resini dolgulı kolonda saflaştırma işlemine tabi tutulmuştur. 1 dakika aralıklarla toplanan fraksiyonlar CAS metodu ile siderofor tayinleri OD₅₈₀'de yapılmış ve siderofor içeren fraksiyonlar toplanmıştır. Saflaştırma kolonunda 6 farklı fraksiyon elde edilmiş ve siderofor karakterizasyonunu gerçekleştirilmesi için TLC kromatografi, HPLC, FT-IR ve ¹H-NMR analizleri yapılmıştır. Siderofor karakterizasyonu için gerçekleştirilen analizlerin ışığında ¹H-NMR analizi ile 3 ve 5 fraksiyon içerisinde 2 farklı türde katekolat tipi siderofor varlığı kesinleştirilmiştir.

L.plantarum BHC03 suşunun 2 farklı türde siderofor ürettiği kesinleştirilmiş ve ardından bakterinin probiyotik özellikleri incelenerek saflaştırılan sideroforların bazı probiyotik özellikleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

Probiyotik özelliklerinin incelenmesi için yapılan in vitro testlerin sonucunda; *L.plantarum* BHC03 suşunun pH 2.5 'ta asit toleransı gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte suşun %0,5 fenol, %0,3 safra tuzu ve %8 NaCl toleransı olduğu

görülmüştür. Ayrıca %92 otoagregasyon ve %93 oranında hidrofobisite yeteneğinin olduğu belirlenmiştir. Antibiyotik duyarlılık testinin sonuçları incelendiğinde ise; streptomycin, gentamicin ve levofloxacin antibiyotiklerine karşı direnç gösterdiği gözlemlenmiştir.

Elde edilen sideroforların kan hemolizi üzerinde etkisinin incelenmesi için *L.plantarum* BHC03 suşu ile 1:1 oranında karıştırılmış ve kanlı agar üzerine ekimi yapılmıştır. Analiz sonucunda sideroforların hemolitik aktivite üzerinde bir etkisinin olmadığı ve kan içerisinde bulunan demire bağlanmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen veriler ışığında sideroforların *L.plantarum* BHC03 suşu üzerinde hemolitik aktivite göstermemesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Sideroforların kolesterol asimilasyonu üzerine etkisi incelendiğinde ise; Kolesterol karışımı içerisinde bulunan kolesterol konsantrasyonun zaman bağlı olarak sürekli artmasından dolayı kolesterol asimilasyonu üzerine etkileri kesin olarak tespit edilememekle birlikte, 1:1 oranda siderofor ve bakteri içeren kolesterol karışımının kolesterol çözünürlüğü üzerine yüksek oranda etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan tez çalışması kapsamında tüm sonuçlar göz önüne alındığında; *L.plantarum* BHC03 suşunun siderofor ürettiği tespit edilmiş ve sideroforlar saflaştırılarak karakterizasyon yapılmıştır. Suşun 2 farklı türde katekolat tipinde siderofor ürettiği kanıtlanmış ve bu sideroforların probiyotiklerin bakteriyosin aktivitesi ve hemolitik aktivite özellikleri üzerinde pozitif etki gösterdiği kanıtlanmıştır. *L.plantarum* BHC03 suşunun probiyotik özellikleri incelendiğinde ise yapılan in vitro testlerin ışığında suşun diğer probiyotik bakteriler ile büyük oranda benzerlik gösterdiği ve probiyotik standartlarına uyduğu tespit edilmiştir.

Panda ve arkadaşları 2017’de Siderofor üreten mikroorganizmaların daha güçlü probiyotik suşları olduğunu gözlemlemişler ve gıda biyoteknolojisinde sideroforların kullanılabilme potansiyelinin olabileceğini tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmada *L.plantarum* BHC03 suşunun demir yoksunluğunda biyosentezini gerçekleştirdiği katekolat tipi sideroforların bakteriyosin aktivitesini arttırdığı gözlemlenmiştir.

Ahmad ve arkadaşlarının 2017’de yapmış olduğu bir çalışmada bakteriyosinlerin gıda maddelerine doğrudan katılabilir olduğunu ve bunun yanında, bakteriyosin üreten suşlar; starter kùltürler şeklinde veya starter kùltür karışımları gibi tekniklerle gıdalara eklenebilir veya gıdanın paketlenildiği ambalaj materyaline uygulanarak da kullanılabileceğini gözlemlemişlerdir.

Sideroforların bakteriyosin aktivitesini arttırması, gıda endüstrisinde bakteriyosinler ile karıştırılarak daha dayanıklı gıdaların üretilabileceğini düşündürmektedir.

Bu nedenle sideroforların gıda endüstrisinde kullanımının geniş bir yelpazeye sahip olabileceği ve bununla birlikte sideroforların tarım ve sağlık uygulamalarının yanı sıra gıda endüstrisinde de kullanımının yaygınlaşacağı düşünölmektedir.

6 .REFERANSLAR

- Abee, T., Rombouts, F.M., Hugenholtz, J., Guihard, G. and Letellier, L. 1994, Mode of action of Nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. *Appl Environ Microbiol.* Vol. 60(6), pp. 1962–1968.
- Ahl D, Liu H, Schreiber O, Roos S, Phillipson M, Holm L. *Lactobacillus reuteri* increases mucus thickness and ameliorates dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Acta Physiologica* 2016, 217(4), 300-310.
- Adnan, A. F. M., Tan, I. K. 2007. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresour. Technol.*, 98, 1380-1385.
- Akman, E., 2009. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Al Saleh, A.A., Metwalli, A.A.M., Abu-Tarboush, H.M., 2006. Bile Salts and Acid Tolerance and Cholesterol Removal from Media by some Lactic Acid Bacteria and *Bifidobacteria*. *Saudi Society Food Nutr.*, 1 (1): 1-17.
- Ali, S. S., Vidhale, N. N. 2013. Bacterial siderophore and their application: A review. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2(12), 303-312.
- Alp, D., Ertürkmen, P., 2017. Probiyotik Olarak Kullanılan *Lactobacillus* spp. Suşlarının Kolesterol Düşürücü Etkileri ve Olası Mekanizmalar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(1), 108-113.
- Alp, D., Kuleaşan, H. 2019. Farklı kaynaklardan izole edilmiş laktik asit bakterilerinin ekzopolisakkarit üretimi ve kolesterol asimilasyon yeteneklerinin belirlenmesi. *GIDA* (2019) 44 (2): 191-201 doi: 10.15237/gida.GD18059
- Ammor, M.S. ve Mayo, B., 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: an update. *Meat Science*, 76, 138-146.
- Ammor, M.S., Florez, A.B. ve Mayo, B., 2007. Antibiotic resistance in nonenterococcal lactic acid bacteria and *Bifidobacteria*. *Food Microbiology*, 24, 559–570
- Anonymous, 2009. Examples of Antibiotic Sensitivity Testing Methods. *Antimicrobial Resistance Learning antioksidan aktivitelerinin saptanması*, Doktora Tezi, Celal Bayar Üniversitesi., 2018a.
- Argyri, A.A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.A.G., Tsakalidou E., Nychas G.J.E., Panagou E.Z., Tassou C.C., 2013. Selection of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria from Fermented Olives by *In Vitro* Tests. *Food Micro.*, 33: 282-291
- Arnou LE. 1937, Colorimetric determination of the components of 3,4 dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures

- Aygün G., 2002 Antibiyotikler II: Akılcı antibiyotik kullanımı ve erişkinde toplumdan edinilmiş enfeksiyonlar, Sempozyum dizisi No:31 39-54
- Badis, A., Guetarni, D., Moussa-Boudjemâ, B., Henni, D.E., Tornadijo, M.E., Kihal, M., 2004. Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiology* 21: 343-349.
- Begley, M., Gahan, C.G.M., Hill, C., 2005b. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 625–651.
- Begley, M., Hill, C. ve Gahan, C.G., 2006. Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1729- 1738
- Begley, M., Sleator, R.D, Gahan, C. G. M. ve C. Hill., 2005. The contribution of three bile-associated loci (bsh, pva, and btlB) to gastrointestinal persistence and bile tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun*, 73, 894–904.
- Bergeron L., Burne R.A., 2001, “Roles of fructosyltransferase and levanase-sucrase of *Actinomyces naeslundii* in fructan and sucrose metabolism”, *Infection and Immunity*, 69, 5395–5402.
- Bezbaruah B., Saikia N., 1998, “Influence of Metals on Siderophore Production by *Azotobacter chroococcum* RRLJ 203” *Indian Journal of Experimental Biology*, 36, 680-687.
- Bilgehan H., Klinik Mikrobiyoloji Tanı, 4. Baskı, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 2004
- Bonade A, Murelli F, Vescovo M, Scolari G. 2001. Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*. *Letters in Applied Microbiol.*, 33, 153-158.
- Bortesi, L., Fisher, R., “The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond”, *Biotechnology Advances* 33(1), 41- 52, 2015
- Boukhalfa H., Crumbliss A.L., 2002, “Chemical aspects of siderophore mediated iron transport”, *BioMetals*, 15(22), 325-339.
- Breitbart M, Rohwer F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol* 2005;13(6):278–84.
- Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJH, Snijders AP, et al. Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science* 2008;321(5891):960–4.
- Capon R.J., Stewart M., Ratnayake R., Lacey E., Gill J.H., 2007, “Citromycetins and bilains A–C: new aromatic polyketides and diketopiperazines from Australian marine-derived and terrestrial *Penicillium* spp, *Journal of Natural Products*, 70, 1746- 1752.
- Carrillo-Castaneda G., Munoz J.J., Peraltavidea J.R., 2005, “A spectrophotometric method to determine the siderophore production by strains of fluorescent *Pseudomonas* in the presence of copper and iron”, *Microchemical Journal*, 81, 35- 40.
- Castorena-Alba, M. M., Vázquez-Rodríguez, J. A., López-Cabanillas Lomeli, M. and González-Martínez, B. E., “Cholesterol assimilation, acid and bile survival of probiotic bacteria isolated from food and reference strains”, *CyTA-Journal of Food* 16(1), 36-41, 2018.
- Cerbo A, Palmieri B, Aponte M, Medina J.C.M, Lannitti T. Mechanisms and therapeutic effectiveness of *Lactobacillus*. *Journal of Clinical Pathology* 2016, 69, 187–203.
- Challis G. L., 2005, “A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases”, *ChemBioChem*, 6, 601-11.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. ve Collins, J.K., 1998. Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic *Lactobacillus* Species. *Journal of Food Protection*, 61(12), 1636-1643.

- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. ve Collins, J.K., 2001. Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic Lactobacilli Journal of Food Protection, 64(12), 2007-2014.
- Chaudhari B.L., Rane M.R., Chincholkar S.B., 2007, "Microbial Siderophores in Human and Plant Health-Care" Soil Biology & Biochemistr, 12, 205-242.
- Chen, X., Tian, F., Liu, X., Zhao, J., Zhang, H. P., Zhang, H. and Chen, W., "In vitro screening of lactobacilli with antagonistic activity against Helicobacter pylori from traditionally fermented foods", J. Dairy Sci 93:5627–5634, 2010.
- Chikindas, M.L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V.A., Dicks, L.M., 2018. Functions and Emerging Applications of Bacteriocins. Curr. Opin. Biotechnol., 49: 23-28.
- Chincholkar S.B., Rane M.R., Chaudhari B.L., 2005, "Siderophores their biotechnological applications", Biotechnological applications, 11(45), 177-198.
- Chou, L. S. and Weimer, B., "Isolation and characterization of acid-and bile-tolerant isolates from strains of Lactobacillus acidophilus", Journal of Dairy Science 82(1), 23- 31, 1999.
- Chung, H.S., Kim Y.B., Chun S.L. and Ji, G.E. 1999. Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria. Int. J. Food Microbiol, 47, 25-32.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Fernandez, M.F. and Hernandez, P.E., 1998, Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. Food Microbiol. Vol. 15, pp. 289-298.
- Clarke T. E., Ku S. Y., Dougan D. R., Vogel H. J. Tari L.W., 2000, "The structure of the ferric siderophore binding protein FhuD complexed with gallichrome", Nature Structural & Molecular Biology, 7, 287-291.
- Cokmus, C. and Yousten, A. 1993. Bacteriocin Production by Bacillus sphaericus. J of Invertebrate Pathology Vol. 61, pp. 323-325.
- Collado, M. C., Meriluoto, J. and Salminen, S., "Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: In vitro evaluation of different methods", J. Microbiol. Methods 71:71–74, 2007a
- Conventry, M.J., Wan, J., Gordon, J.B., Mawson, R.F. and Hickey, M.W. 1996. Production of brevicin 286 by Lactobacillus brevis VB286 and partial characterization. J. of Appl. Bacteriol. 80; 91-98.
- Cornelis P., Andrews S.C., 2010, "Iron uptake and homeostasis in microorganisms", National Academies Press, 978, 65-73.
- Cornelis P., Matthijs S., 2007, "Pseudomonas Siderophores ve their Biological Significance", Soil Biology & Biochemistry, 12, 193-203.
- Coşkun, T., 2006. Pro-, pre-ve sinbiyotikler, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 49, 2, 128-148.
- Couillerot O., Prigent-Combaret C., Caballero-Mellado J., Moënne-Loccoz Y., 2009, "Pseudomonas fluorescens and closely-related fluorescent Pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens", Letters in Applied Microbiology, 48, 505-512.
- Crosa J.H., Walsh C.T., 2002, "Genetics ve assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria", Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66(33), 223-49.
- Csaky T.Z., 1948, On the estimation of bound hydroxylamine in biological materials. Acta Chemica Scandinavica 2: 450–454.

- Curiel, J.A., Rodriguez, H., Landete, J.M., Rivas, B. and Munoz, R. 2010, Ability of *Lactobacillus brevis* strains to degrade food phenolic acids. *Food Chemistry*, Vol. 120, pp. 225–229
- Çomak-Göçer E.M.Ç., Ergin F., Küçükçetin A., 2016. Sindirim Sistemi Modellerinde Probiyotik
- Dave B.P., Dube H.C., 2000, “Detection and chemical characterization of siderophores of *De Melo Pereira*, G.V., Coelho, B.D.O., Junior, A.I.M., Thomaz-Soccol, V., Soccol, C.R., 2018.
- De Voort FR. 1992. Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. *Food Res Int*, 25, 397– 403.
- Del Olmo A., Caramelo C., SanJose, C., 2003 “Fluorescent complex of pyoverdine with aluminum”, *The Journal of Inorganic Biochemistry*, 97, 384–387.
- Del Re BS, Miglioli B, Palenzona MD 2000 Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett Appl Microbiol* 31: 438–444.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M. and Palenzona, D., 2000, “Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*”, *Letters in Applied Microbiology* 31(6), 438–42
- Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM., 2000, Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(1), 16–34.
- Divisekera, D.M.W.D., Samarasekera, J.K.R.R., Hettiarachchi, C., Gooneratne, J., Choudhary, M.I., Gopalakrishnan, S., and Wahab, A.T. “Lactic acid bacteria isolated from fermented flour of finger millet, its probiotic attributes and bioactive properties”. *Annals of Microbiology*, 69(2), 79–92, 2019.
- Duncan R., Harvie S.V., James R. S., David J. E., (2005), “*Bacillus cereus* Fur regulates iron metabolism and is required for full virulence”, *Microbiology*, 151, 569–577.
- Dunne, C.O., Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O’Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O’Sullivan, G.C., Shanahan, F., Collins, J.K., 2001. In Vitro Selection Criteria for Probiotic Bacteria of Human Origin: Correlation with In Vivo Findings. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73: 386S–92S.
- Dündar, H., 2006. Characterization and purification of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Middle East Technical University, Department of Biotechnology, Ph.D. Thesis, Ankara, 195
- Eisendle M., Schrettl M., Kragl C., Muller D., Illmer P., Haas H. 2006, “The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage, oxidative-stress resistance, germination ve sexual development in *Aspergillus nidulans*”, *Eukaryot Cell*. 5, 1596–1603.
- Elcioglu, O., Kunduhoglu, B., 2014. Probiotic Characteristics of Natural Lactobacilli Isolated from Traditional Kargı Tulum Cheese. *Italian Journal of Food Science*, 26, 31–41.
- Erkahveci A, Karaali A. 1996. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektroskopisinin gıda analizlerine uygulanması, *GIDA*, 21 (5):337–345.
- Erkkilä, S. ve Petäjä, E., 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*, 55, 297–300
- European Food Safety Authority (EFSA), 2012. Guidance on the Assessment of Bacterial Susceptibility to Antimicrobials of Human and Veterinary Importance. Parma, Italy.
- Evren, M., Albayram, C., Apan, M., 2006, Laktik asit bakterilerinin oluşturduğu antimikrobiyel maddeler. Türkiye 9. Gıda Kongresi, May 24–26, Bolu, Türkiye, Kongre Bildiri Kitabı, 977–980p.

- FAO/WHO, 2001 (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization) "Health and nutritional properties of probiotics in food include powder milk with live lactic acid bacteria", Cordoba, Argentina
- FAO/WHO, 2002 (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization) "Guidelines for the evaluation of probiotics in food", Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada
- Ferguson A.D., Koedding J., Walker G., Bos C., Coulton J.W., Diederichs K., Braun V., Welte W., 2001, "Active transport of an antibiotic rifamycin derivative by the outer-membrane protein FhuA", *Structure (Camb.)*, 9(45), 707-716.
- Ferreira, C. L., Grześkowiak L., Collado M. C., and Salminen, S., "In vitro evaluation of *Lactobacillus gasseri* strains of infant origin on adhesion and aggregation of specific pathogens", *J. Food Prot.* 74:1482–1487, 2011.
- Fischbach M. A., Walsh C. T., 2006, "Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms" *Chemical Reviews*, 106, 3468-3496.
- Fuller R., 1992. *Probiotics, The Scientific Basis*. Springer Science-Business Media Dordrecht, Edinburgh, Scotland.
- Gad, G.F.M., Abdel-Hamid, A.M., Farag Z.S.H., 2014. Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria Isolated from Some Pharmaceutical and Dairy Products. *Braz. J. Microbiol.*, 45 (1): 25-33.
- Garssen, J., Herreijers, M., Van Loveren, H., Vos, J., 2004. Immunomodulation by probiotics: a literature survey.
- Gismondo, M., Drago, L. ve Lombardi, A., 1999. Review of probiotic available to modify gastrointestinal flora, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12, 4, 287-292.
- Goh, Y.J., and Klaenhammer, T. R., "Functional roles of aggregation-promoting-like factor in stress tolerance and adherence of *Lactobacillus acidophilus* NCFM", *Appl. Environ. Microbiol.* 76:5005–5012, 2010.
- Gomes, A.M. Malcata, F.X., 1999. *Bifidobacterium* spp. And *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and their pharmaceutical properties relevant for use as probiotics, *Trends in Food Science & Technology*, 10, 4-5, 139-157.
- Gülay Z., 2002, Antibiyotik duyarlılık testlerinin yorumu, *Toraks Dergisi*, 3 (1) 75-88.
- Gülbandılar, A. ve Dönmez, M., 2017. Fonksiyonel Gıda Olarak Kullanılan Probiyotikler ve Özellikleri, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 10, 1, 44-47.
- Gündüz T. 2002. *İnstrümental Analiz*. 6. Baskı, Gazi Kitabevi, Ankara, s. 1357.
- Güney E., 2014 *Bacillus* Sp. Türlerinde Siderofor Üretimi ve *Bacillus Cereus* Dsm 4312'De Siderofor Üretiminin Optimizasyonu
- Günşen U., 2016, Gıda Analizlerinde Kullanılan Kromatografik Yöntemler-I: HPLC, *Türkiye Klinikleri J Food Hyg Technol-Special Topics*. 2016;2(1):23-32
- Halkman K., 2005, Anonymous, 2005. *Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*. Ed: A. K. Halkman. Ankara, 358s
- Haslan, E., 2010, Soğutma kulelerinden izole edilen Gram negatif bakterilerde n-açıl homoserin lakton (AHL) üretiminin incelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Havenaar, R., Huis in't Veld, J.H.S., "Probiotics: A General View", In: 'Wood, B.J.B (Ed), *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*, The Lactic Acid Bacteria, Vol. 1, Chapman and Hall, New York, pp. 209-224, 1992.

- Higgs P.I., Letain T.E., Merriam K.K., Burke N.S., Park H., Kang, C., Postle K. 2002, "TonB interacts with non-receptor proteins at the outer membrane of *Escherichia coli*", *Journal of Bacteriology*, 184, 1640-1648.
- Hitchins, A.D., 1998, *Listeria monocytogenes*, *Bacteriological analytical manual*, In: Jackson, G.J., (ed.), Chapter 10, 8th ed., Revision A, AOAC International, Gaithersburg, MD, 1001-1013.
- Holinsworth B., Martin, J., 2009, "Siderophore production by marine-derived fungi", *BioMetals*, 22(12), 625-632.
- Hord, N.G., 2008, Eukaryotic-microbiotacrosstalk: Potential mechanisms for health benefits of prebiotics and probiotics, *Annual Review of Nutrition*, 28, 215-231.
- Huang, R., Tao, X., Wan, C., Li, S., Xu, H., Xu, F., Shah, N.P. and Wei, H., 2015, "In vitro probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and its modulatory effect on gut microbiota of mice", *Journal of Dairy Science* 98:5850–5861
- Hummel, A.S., Hertel, C., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P., 2007. Antibiotic Resistances of Starter and Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 105-112.
- Hyun Sun Ko, Hamisi Tindwa, Rong De Jin, Yong Seong Lee, Seong Hyun Hong, Hae Nam Hyun, Yi Nam, and Kil Yong Kim 2011. Investigation of Siderophore production and Antifungal activity against *Phytophthora capsici* as related to Iron (III) nutrition by *Lysobacter antibioticus* HS124
- Ishino Y, Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., Nakata, A., 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli* and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*. 169: 5429–5433.
- Ivanova, I., Kabadjova, P., Pantev, A., Danova, S., Dousset, X. 2000. Detection, Purification and Partial Characterization of A Novel Bacteriocin Substance Produced By *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis* B14 Isolated From Boza Bulgarian Traditional Microbiology, 730-739.
- Ismail YS., Yulvizar C., Mazhitov, B., 2019, Characterization of lactic acid bacteria from local cow's milk kefir Jimenez P.N., Koch G., Papaioannou E., Wahjudi M., 2010, "Role of PvdQ in *Pseudomonas aeruginosa* virulence under iron-limiting conditions", *Microbiology*, 156, 49-59.
- Katı H., Karaca B., Gülşen Ş., 2016. Toprakta izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanması ve biyolojik özelliklerinin araştırılması. *SAÜ Fen Bil Der* 20. Cilt, 2. Sayı, s. 281-290, 2016
- Kaur, P. I., Chopra, K., Saini, A., 2002, Probiotics: potential pharmaceutical applications, *Eur J Pharm Sci*, 15, 1-9.
- Kerry, R.G., Patra, J.K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H.-S. ve Das, G., 2018. Benefaction of probiotics for human health: A review, *Journal of Food and Drug Analysis*, 26, 3, 927-939.
- Khan A., Singh P., Kumar R., Das S., Singh R., Mina U., Agrawal G., Rakwal R., Sarkar A. and Srivastava A. 2021, Antifungal Activity of Siderophore Isolated From *Escherichia coli* Against *Aspergillus nidulans* via Iron-Mediated Oxidative Stress
- Kılınç, A., 2016. Neonikotinoit Grubu İnsektisitlerin Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12; 39-86.

- Klaenhammer, T.R., Ahn, C., Fremaux, C. and Milton, K. 1995. Molecular Properties of Lactobacillus Bacteriocins. NATO ASI Series. Vol. H65. Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics p. 37-58.
- Klement Z, Rudolph K, Sands D.C., 1990. Methods in Phytobacteriology Akademiai, Kiado, Budapest, p. 568.
- Klingberg, T.D., Axelsson, L., Naterstad, K., Elsser, D., & Budde, B.B., 2005. Identification of Potential Probiotic Starter Cultures for Scandinavian-Type Fermented Sausages. International Journal of Food Microbiology, 105, 419-43.
- Koca N, Rodriguez-Saona LE, Harper WJ, Alvarez VB. 2007. Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for monitoring short-chain free fatty acids in Swiss Cheese. J Dairy Sci, 90, 3596–3603.
- Kos, B., Suskovic, S., Simpraga, M., Frece, J. and Matosic, S., “Adhesion and aggregation ability of probiotic strain Lactobacillus acidophilus M92”, Journal Applied of Microbiology 94; 981-987, 2003.
- Koster W., 2001, “ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12”, Research in Microbiology, 152(25), 291-301.
- Krewulak K. D., Vogel H. J., 2008, “Structural biology of bacterial iron uptake”, Biochimica et Biophysica Acta, 1778, 1781-1804.
- Kuleaşan, H., 2002, Laktobasiller tarafından üretilen bakteriyosinlerin tanımlanması, sınıflandırılması ve bunların bazı gıda kaynaklı patojenler üzerindeki etkilerinin 79 belirlenmesi.
- Kurt, Ş., Zorba, Ö., 2005. Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanım Olanakları. Yüzüncü Yıl Üniv. Veteriner Fak. Derg., 16 (1): 77-83.
- Lahtinen, T., Malinen, E., Koort, J.M., Mertaniemi-Hannus, U., Hankimo, T., Karikoski, N., Pakkanen, S., Laine, H., Sillanpaa, H., Soderholm, H. and Palva, A., 2010, “Probiotic properties of Lactobacillus isolates originating from porcine intestine and feces”, Anaerobe 16, 293–300
- Lara-Villoslada, F., Sierra, S., Martin, R., Delgado, S., Rodriguez, J.M., Olivares, M. ve Xaus, J., 2007. Safety assessment of two probiotic strains, Lactobacillus coryniformis CECT5711 ve Lactobacillus gasseri CECT5714. Journal of Applied Microbiology, 103, 175-184.
- Larsen R.A., Thomas M.G., Postle K., 1999, “Protonmotive force, ExbB and ligvebound FepA drive conformational changes in TonB”, Molecular Microbiology, 31, 1809-1824.
- Leroy, F., Foulquie, M.R. and De Vuyst, L. 2003, Enterococcus faecium RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as co-culture in food fermentation. Int J of Food Microbiol., Vol. 88, pp. 235-240.
- Lesuisse E., Blaiseau P.L., Dancis A., Camadro J.M., 2001, “Siderophore uptake and use by the yeast Saccharomyces cerevisiae”, Microbiology, 147, 289-298.
- Locher K.P., Lee A.T., Rees D.C., 2002, “The E-coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism” Science Citation Index, 296, 1091-1098.
- López-Goñi, I., Moriyón, I. and Neilands, J.B., 1992, Identification of 2,3- dihydroxybenzoic acid as a Brucella abortus siderophore, Infection and immunity, 60 (11), 4496- 4503.
- Lukic J, Chen V, Strahinic I, Begovic J, Lev-Tov, et al. Probiotics or pro-healers the role of beneficial bacteria in tissue repair. Wound Repair and Regeneration 2018, 4.
- Madigan M., Martinko J., 2005, “Brock Biology of Microorganisms”, 13th edition, Kindle Edition.

- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. and Tsakalidou, E., "Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products", *International Dairy Journal* 16, 189-199, 2006.
- Mark G.L., Morrissey J.P., Higgins P., O'Gara, F., 2006, "Molecular-based strategies to exploit *Pseudomonas* biocontrol strains for environmental biotechnology applications", *FEMS Microbiology Ecology*, 56(11), 167-177.
- Martinez J.S., Franklin J.N.C., Mann E.L., Martin J.D., Haygood M.G., Butler A. 2003, "Structure and membrane affinity of a suit of amphiphilic siderophores produced by a marine bacterium" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 3554-3759.
- Mathara, J.M., Schillinger, U., Kutima, P.M., Mbugua, S.K., Guigas, C., Franz, C. ve Holzapfel, W.M., 2008. Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from maasai traditional fermented milk products in Kenya. *Curr Microbiology*, 56, 315-321.
- Meral, H., Korukluoğlu, M., 2014. Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Direnç Mekanizmaları. *Uludağ Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 28 (2): 71-82.
- Miethke M., Klotz O., Linne U., May J. J., Beckering C. L., Marahiel M. A., 2006, "Ferri-bacillibaktin uptake and hydrolysis in *Bacillus subtilis*" *Molecular Microbiology*, 61, 1413-27.
- Miethke M., Marahiel M. A., 2007, "Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(55), 413-451
- Miller M. J., 2008, "Siderophores (microbial iron chelators) and siderophore-drug conjugates (new methods for microbially selective drug delivery)", Doctor of Philosophy thesis, University of Notre Dame.
- Modi P., Kaur A., Kaur M., V.K. Kapoor, 2012, "Siderophores: A Novel Approach for Iron Removal ", *International journal of universal pharmacy and bio sciences*, 2, 628-636.
- Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E., 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*. 60: 174–182.
- Montesinos E., Bonaterra A., Badosa E, Francâç J., Alemany J., Llorente I., Moragrega C., 2002, "Plantmicrobe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control", *International Microbiology*, 5(15), 169–175.
- Moreno, M.R., Rea, M.C., Cogan, T.M. and De Vuyst, L. 2003, Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *Int J of Food Microbiol.*, Vol. 81, pp. 73-84.
- Mudter J, Neurath MF. Il-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflammatory bowel diseases*. 2007; 13(8):1016–23.
- Muş T, Çetinkaya F., 2017. Bursa'da İçme ve Kullanma Sularında İndikatör ve Bazı Patojen Bakterilerin Varlığının Araştırılması. *Toprak Su Dergisi*, 2017, 6 (1): (1-6)
- Nagar S., Road M., 2011, Evaluation of siderophore produced by different clinical isolate *Pseudomonas aeruginosa*", *International Journal of Microbiology Research*, 3, 131-135.
- Nagarajkumar M., Bhaskaran R., Velazhahan R., 2004, "Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen" *Microbiological Research*, 159, 73-81.
- Naidu, A.S., Bidlack, W.R. and Clemens, R.A. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 39; 13-26.

- Namlı, H., 2017. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
- Neilands J. B., 1981, "Microbial iron compounds", *Annual Review of Biochemistry*, 50, 715-731.
- Neilands J. B., 1995, "Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds", *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 26723-26726.
- Nikaïdo H., 2003, "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(12), 593-656.
- Nikolic, M., B. Jovic, M. Kojic, and L. Topisirovic, "Surface properties of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* isolates from home-made cheeses showing auto-aggregation ability", *Eur. Food Res. Technol.* 231:925–931, 2010.
- O’Keeffe T, Hill C. 1999, Bacteriocins: Potential in Food Preservation. In: *Encyclopedia of Food Microbiol*, Robinson RK (chief e d.), Volume 1, Academic Press, New York, pp 183-191.
- Odabaş T., 2011. Ordu İli ve İlçelerinden Toplanan Toprak Numunelerinden *Bacillus* Sp. Suşlarının İzolasyonu ve İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi
- Ouwehand, A.C., Vesterlund, S., 2004, Antimicrobial components from lactic acid bacteria.
- Ozan S., Maden S., 2010 "Funguslarda Siderofor oluşumu" *Selçuk Tarım ve Gıda Bilim Dergisi*, 24, 118-124.
- Ö. Ertekin, A.H. Çon., 2014, Gıdalardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Endüstriyel ve Probiyotik Özellikleri *Akademik Gıda* 12(4) 6-16
- Önal-Darılmaz, D., 2010. Geleneksel Türk Peynirlerinde Propiyonik Asit Bakteri Türlerinin Belirlenmesi ve Bazı Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması.
- Özden, A., 2004. Mikrop ve Mide Hastalıkları. *Türk Gastroenteroloji Vakfı, Fersa Matbaacılık*, Ankara.
- Öztürk R., Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları Antimikrobik İlaçlara Karşı Direnç Gelişmesi
- Palaniyandi, S.A., Damodharan, K., Suh, J.W. and Yang, S.H., 2017, "In Vitro Characterization of *Lactobacillus plantarum* Strains with Inhibitory Activity on Enteropathogens for Use as Potential Animal Probiotics", *Indian Journal of Microbiology* 57(2),201-210,
- Panda, S., Goli, J., Das, S., Mohanty, N., 2017, Production, optimization and probiotic characterization of potential lactic acid bacteria producing siderophores
- Pandey, K. R., Naik, S.R. ve Vakil, B.V., 2015, Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review, *Journal of Food Science and Technology*, 52, 12, 7577-7587.
- Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S. ve Kim, H.Y., 2006, Probiotics and their fermented food product sare beneficial for health, *Journal of Applied Microbiology*, 100, 6, 1171-1185.
- Paul, W. O., Jakki, C. C., 2008. Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 1-9.
- Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio Rivera, S.L., Fernández, F.J., 2007, O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*. 127-131.
- Powell, J.E. 2006, Bacteriocins and bacteriocin producers present in Kefir and Kefir grains. Stellenbosh University Institutional Repository. Master Degree Theses.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J., Gopal, P.K., 1998. Selection and Characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains for Use as Probiotics. *Int. Dairy J.*, 8: 993-1002.

- Pridmore, R.D., Pittet, A.-C., Praplan, F. ve Cavadini, C., 2008. Hydrogenperoxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-Salmonella activity, *FEMS Microbiology Letters*, 283, 2, 210-215.
- Rajendhran, J. and P. Gunasekaran, Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiol Res*, 2011. 166(2): p. 99-110.
- Ramos AN, Sesto Cabral ME, Nosedá D, Bosch A, Yantorno OM, Valdez JC. 2012, Antipathogenic properties of *Lactobacillus plantarum* on *P. aeruginosa*: The potential use of its supernatants in the treatment of infected chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 20(4), 552-562.
- Ranadheera, C. H., Vidanarachchi, J. K., Rocha, R. S., Cruz, A. G., Ajlouni, S., 2017, Probiotic Delivery through Fermentation: Dairy vs. Non-Dairy Beverages, *Fermentation*, 3 (67), 1-17.
- Ratledge C., Dover L.G., 2000, "Iron metabolism in pathogenic bacteria", *The Annual Review of Microbiology*, 54(3), 881-941.
- Ratul S., Nabaneeta S., Robert S.D., Lorelle L.B., 2012, "Microbial Siderophores" *Journal of Basic Microbiology*, 52, 1-15
- Raymond K.M., ve Denz E., 2004, "Biochemical and Physical Properties of Siderophores", *Iron Transport in Bacteria*, 10, 3-17.
- Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M.T. ve McCormick, J.K., 2003, Potential uses of probiotics in clinical practice, *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 4, 658-672
- Rodriguez, E., Gonzalez, B., Gaya, P., Nunez, M. And Medina, M., 2000, Diversity of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated From Raw Milk., *International*
- Ronimus R.S, L.E. Parker, H.W. Morgan 1997, The utilization of RAPD-PCR for identifying thermophilic and mesophilic *Bacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*. 47: 75-79.
- Rosenberg M., Gutnick D., Rosenberg E., 1980, Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett* 9: 29-33.
- Rowland, I.R., 2009, The role of the gastrointestinal microbiota in colorectal cancer, *Current Pharmaceutical Design*, 15, 13, 1524-1527.
- S. Nithyapriya, Sundaram Lalitha , R. Z. Sayyed , M. S. Reddy , Daniel Joe Dailin , Hesham A. El Enshasy , Ni Luh Suriani and Susila Herlambang 2021. Production, Purification, and Characterization of Bacillibactin Siderophore of *Bacillus subtilis* and Its Application for Improvement in Plant Growth and Oil Content in Sesame
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. ve Sandholm, T.M., 2000, Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84, 197-215.
- Sahu G., Sindhu S., 2011, "Disease control and plant growth promotion of green gram by siderophore producing *Pseudomonas* sp", *Research Journal of Microbiology*, 6, 735-749.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.R., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M. ve Rowland, I., 1998, Functional food science and gastrointestinal physiology and function, *British Journal of Nutrition*, 147-171.
- Sanchez, J., Basanta, A., Gómez-Sala, B., Herranz, L.M., Cintas, C. and Hernández, P.E. 2007, Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of

- bacteriocinogenic Enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). Int. J. Food Microbiol, 117, 295-305.
- Sanders, M.E., 2003, Probiotics: considerations for human health, Nutritionreviews, 61, 3, 91-99.
- Searle L., Meric G., Porcelli I., Sheppard S., 2015, Variation in Siderophore Biosynthetic Gene Distribution and Production across Environmental and Faecal Populations of *Escherichia coli*
- Senok, C. A., Ismaeel, Y. A., Botta, G. A., 2005, Probiotics: facts and myths, Clin Microbiol Infect 11, 958-966.
- Shah, N. P., 2007, Functional cultures and health benefits, International Dairy Journal, 17, 1262–1277.
- Singhal, N., Maurya, A. K., Mohanty, S., Kumar, M., and Viridi, J. S. 2019, “Evaluation of bile salt hydrolases, cholesterol-lowering capabilities, and probiotic potential of *Enterococcus faecium* isolated from rhizosphere”, Frontiers in microbiology 10, 1567,
- Skoog D.A, Holler FJ, Nieman T.A., 1998., Principles of Instrumental Analysis. 5th Edition. Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H (çeviri ed) Bilim Yayıncılık, Ankara, s. 850.
- Sommer. R., 1998. Yeast Extract: Production, Properties And Components. Food Austra lia, 50 (4) 181-183.
- Soomro, A.H., Masud, T., Anwaar, K., 2002. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health – a review. Pakistan Journal of Nutrition 1(1): 20-24.
- Sunita S., Lakshminarayana, K., Gupta P.P., Suneja S. 1994 “Role of *Azotobacter chroococcum* Siderophores in Control of Bacterial Rot and Sclerotinia rot of Mustard”, Indian Journal of Mycology and Plant Pathology, 24, 202-205.
- Tailor A.J., Joshi B.H., 2012, “Characterization and optimization of siderophore production from *pseudomonas fluorescens* strain isolated from sugarcane rhizosphere”, Journal of Environmental Research And Development, 6, 25-30.
- Tam R., Saier Jr M.H., 1993, “Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria”, Microbiological Reviews, 57, 320-346.
- Teply, M., 1984., Ciste mlekarke kulture. Phara. SNTL Nakladatelstvi. Technicke Litertury. In: Starters for Fermented Milks, Kurmann JA (chief ed), IDF Bulletin 227; pp. 41-55.
- Thomashow L.S., Weller D.M., 1995, “Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites”, Molecular Plant-Microbe Interactions, 1, 187-235Tıp Eğitimi Etkinlikleri, 39-54
- Timofeeva, A.M.; Galyamova, M.R.; Sedykh, S.E., 2022, “Bacterial Siderophores: Classification, Biosynthesis, Perspectives of Use in Agriculture”, Plants, 11, 3065.
- Todorov, S.D. and Dicks, L.M.T. 2008, Evaluation of lactic acid bacteria from kefir, molasses and olive brine as possible probiotics based on physiological properties. Annals of Microbiology, 58 (4); 661-670.
- Todorov, S.D., Botes, M., Danova, S.T. and Dicks, L.M.T., 2007, Probiotic properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* HV219, isolated from human vaginal secretions. J.Appl. Microbiol, 103, 629-639
- Tsai, C.C., Lin, P., Hsieh, Y.M., Zhang, Z.Y., Wu, H.C., Huang, C.C., 2014. Cholesterol-Lowering Potentials of Lactic Acid Bacteria Based on Bile-Salt Hydrolase Activity andEffect of Potent Strains on Cholesterol Metabolism InVitroandIn Vivo. Sci. World J., 1-10.

- Turkmen, N., Akal, C. ve Özer, B., 2019. Probiotic dairy-based beverages: A review, *Journal of Functional Foods*, 53, 62-75.
- Uysal Z., 2007. Hepsidin ve Demir Metabolizması. VI. Hematoloji İlk Basamak Kursu, Ankara Üniversitesi Tıp Fak. Pediatrik Hematoloji BD, sayfa 9
- Van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Geis, A., Kok, J. and Venema, G., 1989, Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55; 1187-1191.
- Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A. 2003, Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative ‘in vitro’ study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36; 895-904.
- Vonk, R.J., Reckman, G.A., Harmsen, H.J. ve Priebe, M.G., 2012, Probiotic and lactose intolerance, *Intech*, 7, 149-160.
- Walker, D.K., Gilliland, S.E., 1993, Relationships Among Bile Tolerance, Bile Salt Deconjugation, and Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 76(4), 956-961.
- Walsh U.F., Morrissey J.P., O’Gara F., 2001, “*Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation”, *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 289-295.
- Weller D.M., 2007, “*Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years”, *Phytopathology*, 97, 250-256.
- Whipps J.M., 2001, “Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere”, *The Journal of Experimental Botany*, 52(10), 487-511.
- Winkelmann G., 2002, “Microbial siderophore mediated transport”, *Biochemical Society Transactions*, 30, 691-696.
- Yadav, R., Puniya, A.K. and Shukla, P., 2016, “Probiotic Properties of *Lactobacillus plantarum* RYPR1 from an indigenous fermented beverage Raabadi”, *Frontier in Microbiology* 7,1683.
- Yang, B., Wang, Y., and Qian, P.Y., 2016, Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*. 17: p. 13
- Yavuzdurmaz, H., 2007, Isolation, Characterization, Determination of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria from Human Milk. MS Thesis, IZTECH, İzmir, Türkiye.
- Yeşilova, Y., Sula, B., Yavuz, E. ve Uçmak, D., 2010, Probiyotikler, Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi, 21 (1): 49-56.
- Yu, Z., Zhang, X., Li, S., Li, C., Li, D., and Yang, Z., 2013, “Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese sauerkraut”, *World Journal of Microbiology and biotechnology* 29(3), 489-498,
- Yüce, A., 2001, Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları, *Klimik Dergisi*, 14 (2)
- Zago, M., Fornasari, M.E., Carminati, D., Burns, P., Suárez, V., Vinderola, G., Reinheimer, J., Giraffa G., 2011, Characterization and Probiotic Potential of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Cheeses. *Food Microbiol.*, 28: 1033-1040.

LCsolution Analysis Report =====

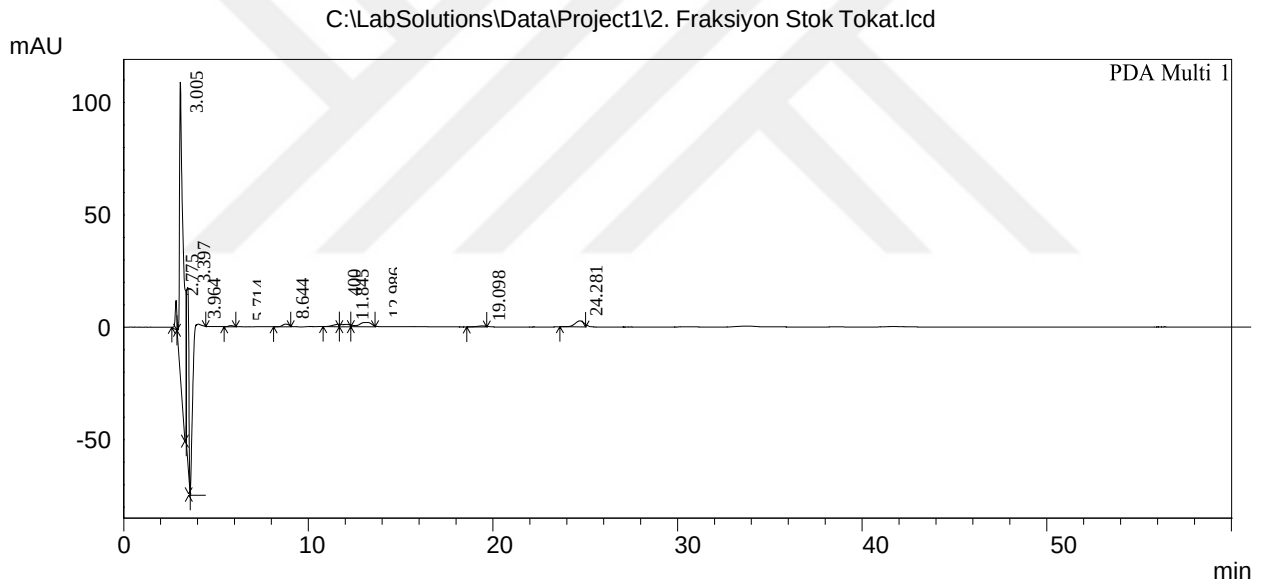
6.EKLER

=====

Shimadzu

Sample Name : 2. Fraksiyon Stok Tokat
Sample ID :
Tray# : 1
Vial # : 2
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : 2. Fraksiyon Stok Tokat.lcd
Method File Name : Desferal and DHBA.lcm
Batch File Name : Desferal ve DHBA Çalışması.lcb
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 8.6.2022 11:26:45
Data Processed : 8.6.2022 12:28:49

<Chromatogram>



1 PDA Multi 1/217nm 4nm

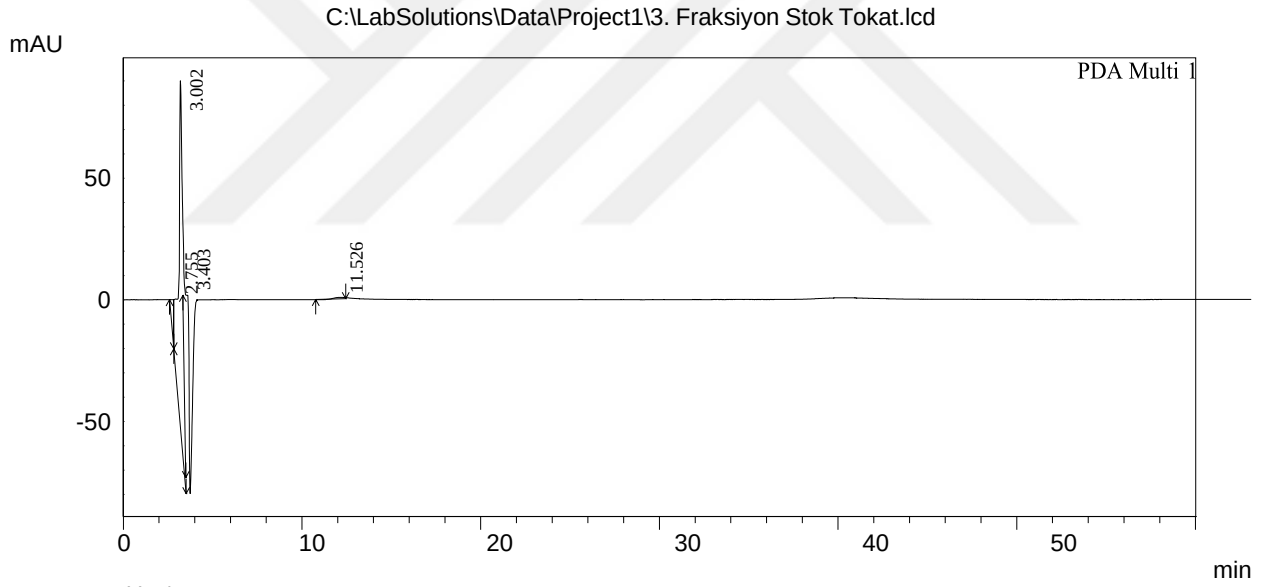
PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.775	74274	12641	1.696	4.815
2	3.005	1801824	123467	41.135	47.025
3	3.397	662772	77480	15.131	29.510
4	3.964	1562782	40606	35.678	15.466
5	5.714	8374	487	0.191	0.185
6	8.644	28854	1158	0.659	0.441
7	11.400	31943	977	0.729	0.372
8	11.845	27875	922	0.636	0.351
9	12.986	78388	1824	1.790	0.695
10	19.098	13322	375	0.304	0.143
11	24.281	89829	2617	2.051	0.997
Total		4380237	262553	100.000	100.000

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
Sample Name : 3. Fraksiyon Stok Tokat
Sample ID :
Tray# : 1
Vial # : 3
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : 3. Fraksiyon Stok Tokat.lcd
Method File Name : Desferal and DHBA.lcm
Batch File Name : Desferal ve DHBA Çalışması.lcb
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 8.6.2022 12:27:14
Data Processed : 8.6.2022 13:38:20

<Chromatogram>



1 PDA Multi 1/217nm 4nm

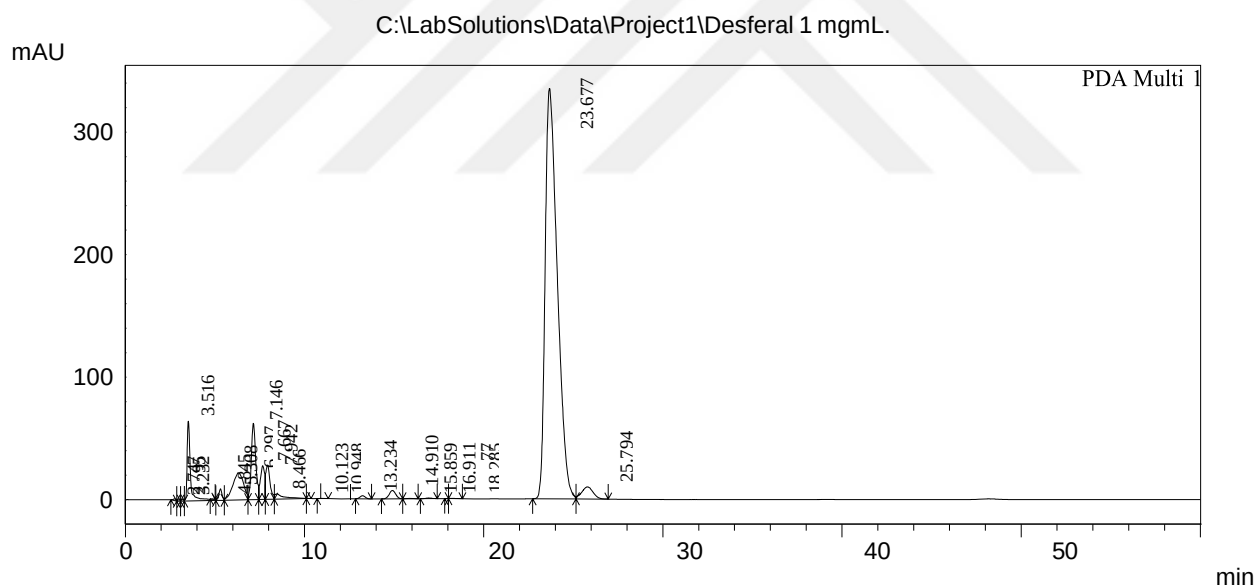
PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.755	143798	14287	5.082	8.394
2	3.002	2463654	125213	87.062	73.566
3	3.403	182034	29961	6.433	17.603
4	11.526	40295	744	1.424	0.437
Total		2829780	170205	100.000	100.000

=== Shimadzu LCsolution Analysis Report ===

Acquired by : Admin
 Sample Name : Desferal 1 mg/mL
 Sample ID :
 Tray# : 1
 Vial # : 3
 Injection Volume : 20 µL
 Data File Name : Desferal 1 mg/mL.lcd
 Method File Name : Desferal and DHBA.lcm
 Batch File Name : Desferal ve DHBA Çalışması.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 3.6.2022 15:26:09
 Data Processed : 7.6.2022 14:52:10

<Chromatogram>



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.747	13566	1539	0.066	0.266
2	2.995	9976	1167	0.049	0.201
3	3.232	13765	1250	0.067	0.216
4	3.516	853527	65184	4.154	11.249
5	4.845	1123	128	0.005	0.022
6	5.308	114174	9521	0.556	1.643
7	6.297	929679	22307	4.524	3.850
8	7.146	1071621	62359	5.215	10.762
9	7.667	444640	27577	2.164	4.759
10	7.942	464251	28111	2.259	4.851
11	8.466	172657	4294	0.840	0.741
12	10.123	1464	196	0.007	0.034
13	10.948	5961	376	0.029	0.065
14	13.234	53037	2534	0.258	0.437
15	14.910	176255	6875	0.858	1.186
16	15.859	10635	392	0.052	0.068
17	16.911	15214	535	0.074	0.092
18	17.877	1015	52	0.005	0.009

19	18.285	8427	300	0.041	0.052
----	--------	------	-----	-------	-------

Ch1 217nm 4nm

20	23.677	15748940	334939	76.641	57.802
21	25.794	439109	9825	2.137	1.695
Total		20549036	579461	100.000	100.000

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report =====

Acquired by : Admin C:\LabSolutions\Data\Project1\DHBA 1 mgmL.lcd

Sample Name : DHBA 1 mgmL

Sample ID :

Tray# : 1

Vail # : 2

Injection Volume : 20 uL

Data File Name : DHBA 1 mgmL.lcd

Method File Name : Desferal and DHBA.lcm

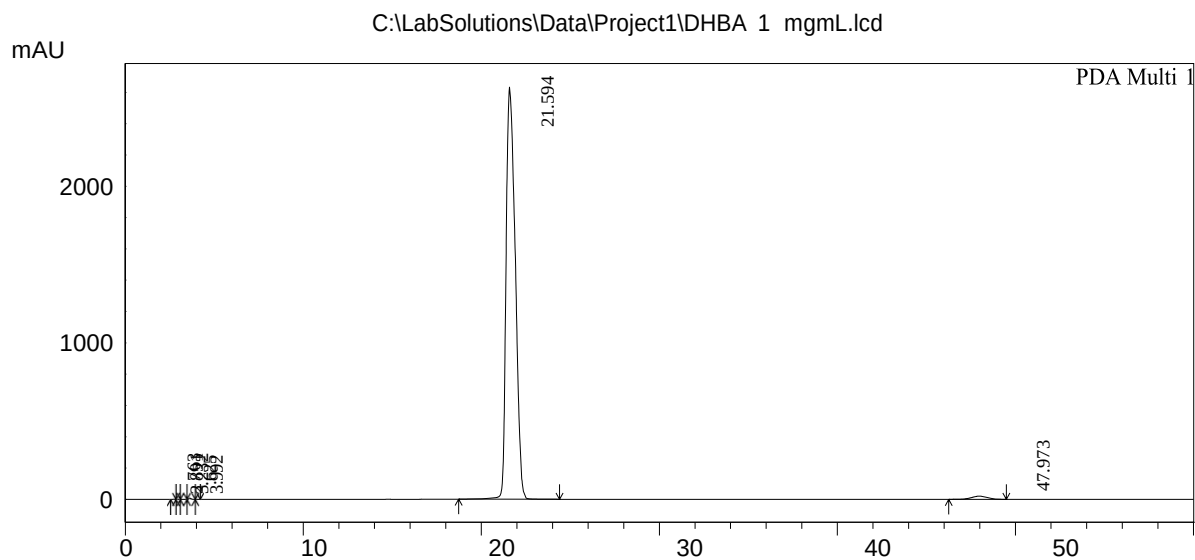
Batch File Name : Desferal ve DHBA Çalışması.lcb

Report File Name : Default.lcr

Data Acquired : 3.6.2022 14:25:36

Data Processed : 7.6.2022 14:52:35

<Chromatogram>



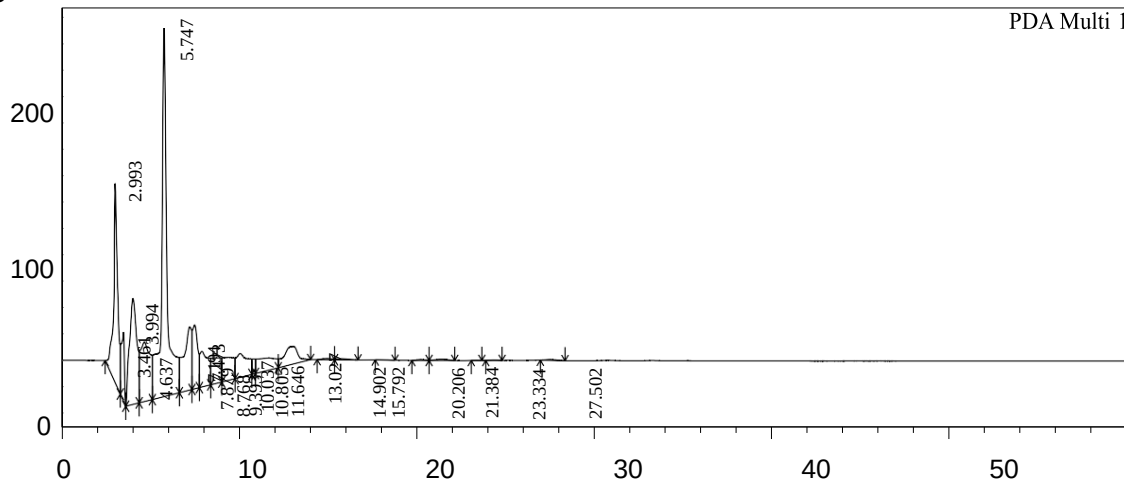
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.763	10293	1068	0.011	0.040
2	2.891	9074	1036	0.009	0.039
3	3.232	6602	360	0.007	0.013
4	3.625	80343	8320	0.084	0.312
5	3.992	2142	212	0.002	0.008
6	21.594	94471559	2636090	98.541	98.822
7	47.973	1290231	20419	1.346	0.765
Total		95870245	2667504	100.000	100.000

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 1. Fraksiyon Stok Tokat
 Sample ID :
 Tray# : 1
 Vial # : 1
 Injection Volume : 20 µL
 Data File Name : 1. Fraksiyon Stok Tokat.lcd
 Method File : Desferal and DHBA.lcm
 NameBatch File : Default.lcr
 Name Report : 8.6.2022 10:26:12
 File Name Data : 8.6.2022 12:28:22
 Acquired Data

1 PDA Multi 1/217nm 4nm

mAU



min

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.993	2380262	150378	11.515	18.281

2	3.461	630941	51920	3.052	6.312
3	3.994	2312389	80139	11.187	9.742
4	4.637	1738091	45063	8.408	5.478
5	5.747	6118705	278683	29.600	33.879
6	7.194	1492887	47848	7.222	5.817
7	7.473	992204	48378	4.800	5.881
8	7.879	888115	26973	4.296	3.279
9	8.768	712544	19106	3.447	2.323
10	9.393	770089	17275	3.725	2.100
11	10.037	841026	18065	4.069	2.196
12	10.805	137695	11321	0.666	1.376
13	11.646	706902	9187	3.420	1.117
14	13.027	759520	13393	3.674	1.628
15	14.902	31798	866	0.154	0.105
16	15.792	37944	810	0.184	0.098
17	17.954	10727	334	0.052	0.041
18	20.206	22486	696	0.109	0.085
19	21.384	43993	920	0.213	0.112
20	23.334	3114	156	0.015	0.019
21	24.377	13035	444	0.063	0.054
22	27.502	26751	632	0.129	0.077
Total		20671218	822584	100.000	100.000