

GELENEKSEL YOLLARLA ÜRETİLMİŞ TURŞU ÖRNEKLERİNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU, MOLEKÜLER YÖNTEMLER KULLANILARAK TANIMLANMASI VE BAZI FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Hümeýra İSPİRLİ^{1*}, Enes DERTLİ²

¹Bayburt Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı, Bayburt, Türkiye

²Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

Geliş/ Received 29.01.2023; Kabul/ Accepted : 26.02.2023; /Online baskı: Published online 28.02.2023

İspirli, H., Dertli, E. (2023). Geleneksel yollarla üretilmiş turşu örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanması ve bazı fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi. *GIDA* (2023) 48 (2) 360-380 doi: 10.15237/gida.GD23019

İspirli, H., Dertli, E. (2023). Isolation of lactic acid bacteria from traditional pickle samples, their identification using molecular methods, and determination of some functional properties. *GIDA* (2023) 48 (2) 360-380 doi: 10.15237/gida.GD23019

ÖZ

Bu çalışmada ülkemizin farklı illerinden toplanmış 17 adet geleneksel turşu örneğinden Laktik Asit Bakterileri (LAB) izole edilip tanımlanmış ve izolatların fonksiyonel nitelikleri karakterize edilmiştir. Genotipik ayrıştırma sonucunda 9 farklı türe ait 21 suş tespit edilmiştir. Takiben bu 21 suşun potansiyel probiyotik değerlendirmeleri safra tuzlarına direnç ve düşük pH'da gelişim açısından test edilmiş ve *Lactiplantibacillus plantarum* ve *Levilactobacillus brevis* suşlarının yüksek canlılık gösterdiği tespit edilmiştir. İzolatlarının antibiyotik dirençlerinin ise oldukça düşük seviyede olduğu gözlenmiştir. Önemli olarak antifungal aktivite açısından suş spesifik etki gözlenirken, antibakteriyel aktivite noktasında oldukça güçlü aktivite sergilemişlerdir. Son olarak turşu izolatlarının GABA üretim potansiyelleri açığa çıkarılmış ve *Levilactobacillus brevis* VB13 suşunun 0.628±0.11 mg/mL GABA üretebildiği gösterilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar turşuda bulunan LAB çeşitliliğini ve bu suşların fonksiyonel etki potansiyelini göstermesi bakımından önem arz etmektedir.

Anahtar kelimeler: Turşu, Laktik Asit Bakterileri, probiyotik, GABA üretimi

ISOLATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM TRADITIONAL PICKLE SAMPLES, THEIR IDENTIFICATION USING MOLECULAR METHODS, AND DETERMINATION OF SOME FUNCTIONAL PROPERTIES

ABSTRACT

In this study, Lactic Acid Bacteria (LAB) were isolated and identified from 17 traditional pickled vegetable samples collected from different provinces and their functional roles were characterised. As a result of genotypic separation, 21 strains belonging to 9 different species were identified. These strains were further tested for their potential probiotic roles by testing their bile salts and low pH resistance and strains of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Levilactobacillus brevis* demonstrated superior characteristics in terms of survival. The antibiotic resistance of isolates was found to be at very low

* Yazışmadan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: humeyra_ispirli@hotmail.com

☎: (+90) 458 211 1152/3305

☎: (+90) 458 211 1127

Hümeýra İspirli; ORCID no: 0000-0002-7601-0374

Enes Dertli; ORCID no: 0000-0002-0421-6103

levels. Importantly, while strain-specific effects were observed in terms of antifungal activity, they showed very strong activity in antibacterial activity. Finally, pickle isolates were tested for GABA production and *Levilactobacillus brevis* VB13 strain demonstrated 0.628 ± 0.11 mg/mL GABA production. The results we obtained are important in terms of showing the diversity of LAB in pickles and the functional effect potential of these strains.

Keywords: Pickle, Lactic Acid Bacteria, probiotic, GABA production

GİRİŞ

Tüketici taleplerine ve Dünya'daki beslenme eğilimlerindeki değişikliklere paralel olarak son dönemde bitkisel temelli fermente ürünlere olan ilgi çok hızlı bir şekilde artmaktadır (Behera vd., 2020). Ülkemiz fermente ürünler açısından oldukça zengin bir konumdadır ve bitkisel ürünlerin fermentasyonu ile üretilen turşu ülkemiz fermente ürünlerinin başında gelmektedir. Bu kapsamda çok çeşitli sebzeler ve bazı meyveler turşu üretiminde kullanılabilirken, fermentasyonu yürüten Laktik Asit Bakterileri (LAB), hammaddede bulunan ve spontan olarak üründe gelişen türlerin suşlarından oluşmaktadır. İlgili LAB'ler ortamda bulunan diğer mikroorganizmaları baskılayıp gelişerek pH'nın düşüşü ve aynı zamanda fermente ürünlerin organoleptik özelliklerinin oluşumu ile neticelenen süreci yönetmektedirler (Tokatlı vd., 2019). Aynı zamanda turşu üretim sürecinin önemli faktörleri olan su aktivitesi, ortam sıcaklığı, kullanılan tuz konsantrasyonu, anaerobiosis ve yüksek asitlik gibi faktörler LAB'nin ortamda dominant olmasına ve neticede istenmeyen diğer mikroorganizmaların inhibisyonuna katkı sağlamaktadır (Erten vd., 2016). LAB'nin diğer mikroorganizmalara karşı gösterdiği bu antagonistik aktivitenin farklı mekanizmalar ile meydana geldiği bilinmektedir. LAB'nin karbonhidrat kaynaklarını fermente etmeleri sonucu ürettikleri laktik ve asetik asit gibi organik asitler nedeni ile düşen pH ya karşı birçok mikroorganizmanın hassasiyet göstermesi, yine LAB tarafından üretilen H_2O_2 'nin mikroorganizmalar üzerine inhibitör etki göstermesi ve LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin özellikle yakın ilişkili bakteriler üzerine inhibitör etki göstermesi bu mekanizmalar arasında yer almaktadır. Ayrıca LAB tarafından üretilen, diasetil, alkol ve CO_2 gibi bazı metabolitlerinde bazı mikroorganizmalar üzerine inhibitör etki gösterebilmektedir (Tokatlı, 2013). Neticede turşu orijinli LAB türleri yüksek rekabet

güçleri, düşük pH ve yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişip canlılıklarını sürdürme potansiyelleri açısından dikkat çekmekte ve özellikle bitkisel fermente ürünlerin öneminin her geçen gün arttığı günümüzde starter kültür ve önemli olarak potansiyel probiyotik mikroorganizma olarak önem arz etmektedirler (Liu vd., 2022). Ayrıca antimikrobiyal aktiviteye sahip starter kültür suşları, fermente gıdaların patojen ve bozulma etmeni birçok mikroorganizmaya karşı korunmasında, gıda güvenliği ve insan sağlığı açısından en etkin çözümü sunmaktadır (Huang vd., 2009). Bu noktada oldukça farklı bitkisel materyalin kullanılabilirdiği geleneksel turşularımızdan LAB türlerinin izolasyonu ve bunların özellikle probiyotik potansiyellerinin belirlenmesi oldukça önem arz etmektedir. Böylece hem ticari probiyotiklere erişimi çok kolay olmayan küçük işletmeler için fonksiyonel starter kültür üretimi ile ilgili bir başlangıç yapılabilecek (Zielińska vd., 2015), hem de büyük çaplı endüstriyel uygulamalar için geleneksel LAB türlerimiz açığa çıkarılmış olabilecektir. Aynı zamanda özgün fonksiyonel starter olabilecek LAB suşlarının izolasyonu geleneksel suşlarımızın korunması ve fermente ürünlerin daha kontrollü şartlarda nitelikli üretimine de katkı sağlayabilecektir (Liu vd., 2022).

Laktik asit bakterileri gıda üretiminde starter kültür olarak kullanılmalarının yanı sıra, endüstride probiyotik olarak da kullanılmaktadırlar. Turşu gibi geleneksel fermente ürünlerden izole edilen LAB suşlarının probiyotik potansiyellerinin değerlendirilmesi amacıyla safra tuzlarına direnç, düşük pH şartlarında canlılıklarını sürdürme, antimikrobiyal etkinlik, düşük antibiyotik direnci gibi önemli parametrelerin ilk olarak değerlendirilmesi ve burada üstün özellik gösteren suşların in vitro ve in vivo denemeler kapsamında test edilmesi gerekmektedir (Zeng vd., 2020). Probiyotik

bakteriler için ilk gereksinim, transfer olduğu aktif alanlarda hayatta kalabilmeleridir. Yararlı bağırsak işlevleri olan probiyotik bakterilerin midenin asidik ortamından geçerken hayatta kalması gerekmektedir. Bununla birlikte bakterilerin bağırsaktaki epitel yüzeylere tutunması; kolonizasyon, immün sistemin aktive edilmesi ve patojenlere karşı antagonistik aktivitenin ön şartı olarak kabul edilmekte ve probiyotik seçimi için temel kriter olarak görülmektedir. Mikroorganizmaların en dıştaki yüzeyinin hidrofobik doğası konakçıya tutunmasını sağlayan birkaç mekanizmadan biridir ve hidrofobisite; probiyotik seçimi için temel kriterlerden birisi olarak görülmektedir (Monteagudo-Mera vd., 2019).

Fermente ve probiyotik gıdaların üretiminde kullanılacak LAB'lerin güvenli mikroorganizmalar olmaları istenmektedir. LAB'lerin antibiyotik direnç geni bulundurmaları durumunda, bu genleri patojenlere veya florada bulunan diğer bakterilere aktarma olasılıkları önemli bir sorun teşkil etmektedir. Bu nedenle gıda sanayiinde farklı amaçlarla kullanılacak LAB'nin antibiyotik direnç genlerine sahip olmaması istenmektedir (Mathur ve Singh, 2005; Zarzecka vd., 2023). Geleneksel kaynaklardan izole edilen özgün LAB türlerinin probiyotik potansiyellerinin ortaya konması adına belirtilen bu kriterlerin test edilerek açığa çıkarılması oldukça önemlidir.

Son dönemde LAB suşlarının fonksiyonel etki mekanizması kapsamında değerlendirilen bir diğer parametrede özellikle beyinde nörotransmitter olarak rol alarak insan sağlığının devamı noktasında fizyolojik fonksiyonları olan önemli bir biyoaktif madde γ -aminobütirik asit (GABA) üretimi gelmektedir (Chakraborty vd., 2023). Yapılan çalışmalar GABA ile zenginleştirilmiş gıdaların tüketiminin kanserli hücrelerin çoğalmasını engelleyebildiğini (Park ve Oh, 2007), hafızayı ve öğrenme yeteneklerini geliştirebildiğini ortaya koymuştur (Miura vd., 2006). Bu yararlı işlevleri nedeniyle GABA artan ticari bir öneme sahiptir. GABA'nın kimyasal veya biyolojik olarak sentezlenmesi için birçok yöntem bulunmasına rağmen (Coda vd., 2010; Inoue vd., 2003; Plokhov vd., 2000), biyolojik yöntemler ile

üretimi kimyasal sentez yöntemlerine göre önemli avantajlar sunmaktadır (Huang vd., 2007). Bu açıdan LAB'ler yüksek düzeyde GABA üretimi için özgün mikroorganizmalar olarak görülmektedir. Özellikle GABA açısından zenginleştirilmiş gıdaların üretiminde kullanılabilme potansiyellerinin yüksek olması nedeniyle GABA üreten LAB'ler büyük bir öneme sahiptir. Yapılan çalışmalar GABA üretiminin LAB türleri arasında önemli düzeylerde farklılık gösterdiğini ortaya koymuş olup (Demirbaş vd., 2017), yüksek miktarlarda GABA üretimi gerçekleştirebilen suşların probiyotik içeren ve fonksiyonel fermente ürünlerin üretiminde kullanımını sağlamak için geleneksel ürünlerimizdeki LAB'lerin GABA üretimi noktasında test edilmesi önem arz etmektedir. Bu noktalardan hareketle bu çalışma kapsamında ülkemizin 7 farklı ilinden toplam 17 farklı geleneksel turşu örneği toplanmış ve turşu örneklerinde yer alan LAB'lerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Turşu örneklerinin pH, organik asit ve şeker içerikleri HPLC analizi ile belirlenmiştir. LAB türlerinin izolasyonunu takiben morfolojik olarak farklı türler rep-PCR analizi ile genotipik ayırma tabi tutulmuş ve genotipik ayırım neticesinde farklı bulunan LAB suşları 16S rRNA geni temelli tanımlanmışlardır. Takiben tanımlanan LAB suşlarının potansiyel probiyotik değerlendirmesi ve fonksiyonel etkileri safra tuzları ve düşük pH'da canlılık, hidrofobisite, antibiyotik hassasiyetinin belirlenmesi, antibakteriyel ve antifungal etkinliklerinin değerlendirilmesi ve son olarak GABA üretim yeteneklerinin açığa çıkartılması kapsamında ortaya konmuştur. Bu sonuçların özellikle geleneksel turşu örneklerimizde bulunan LAB suşlarının fonksiyonel niteliklerini göstermesi bakımından özgün katkılar sunabileceği öngörülmektedir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

PCR çalışmalarında kullanılan bileşenler Thermo Fisher Scientific (ABD) firmasından satın alınmıştır. Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan kimyasal malzemeler Merck (Almanya) firmasından ve kullanılan tüm HPLC standartları ise Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin

edilmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan bütün kimyasallar analitik saflıktadır.

Turşu Örnekleri

Çalışma kapsamında LAB'nin izolasyonu için Türkiye'nin farklı illerinden herhangi bir şekilde

starter kültür ilavesi yapılmadan üretilmiş 17 adet geleneksel meyve ve sebze turşu örneği toplanmıştır (Çizelge 1). Toplanan örnekler steril numune kaplarına alınarak soğuk zincirde laboratuvara getirilmiş ve analiz sürecinde buzdolabı şartlarında muhafaza edilmiştir.

Çizelge 1. Toplanan turşu örneklerinin dağılımı
Table 1. Distribution of the collected pickle samples

| Örnek Toplanan İller Sample Collected Provinces | Turşu çeşidi Pickle variety |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Bayburt | Salamura fasulye yaprağı (1) Pickled bean leaves |
| | Fasulye turşusu (2) Bean pickle |
| | Pazı turşusu (1) Chard pickle |
| | Kırmızı pancar turşusu (1) Pickled red beetroot |
| | Lahana turşusu (1) Sauerkraut |
| | Karnabahar turşusu (1) Cauliflower pickle |
| | Brokoli turşusu (1) Broccoli pickle |
| | Dereotlu karışık turşu (1) Mixed dill pickle |
| | Yabani armut turşusu (1) Pickled wild pear |
| Alıç sirkesi (1) Hawthorn vinegar | |
| Giresun | Fasulye turşusu (1) Bean pickle |
| Nevşehir | Biber turşusu (1) Pickled peppers |
| İstanbul | Fasulye turşusu (1) Bean pickle |
| Ankara | Salatalık turşusu (1) Pickled cucumber |
| Trabzon | Lahana turşusu (1) Sauerkraut |
| Malatya | Karışık turşu (1) Mixed pickle |

Turşu Örneklerinin Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Toplanan turşu örneklerinin kimyasal özellikleri pH, organik asit ve şeker içerikleri belirlenerek ortaya konmuştur.

Turşu örneklerinde pH tayini

Turşu örneklerinin pH'sını belirlemek için dijital pH-metre (WTW Inolab 7110, Almanya) kullanılarak ölçümler yapılmıştır. pH metre standart tampon çözeltiler ile kalibre edildikten sonra ölçüm işlemi $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirilmiştir.

Turşu örneklerinin şeker içeriğinin HPLC ile belirlenmesi

Turşu örneklerinin şeker içeriği HPLC (Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) cihazı (Schimadzu CBM-20A, Japonya) kullanılarak analiz edilmiştir. Bu amaçla ilk olarak turşu suları $0.22 \mu\text{m}$ 'lik filtreden geçirilerek HPLC viallerine alınmış ve analiz için $20 \mu\text{L}$ örnek HPLC'ye verilmiştir. Analizde mobil faz olarak H_2O kullanılmış ve akış hızı 0.6 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Analiz için kolon sıcaklığı 85°C 'ye ayarlanmış olup

CONCISE CarboSep CHO 87C ($300 \times 7.8 \text{ mm}$, ABD) kolon kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Şekerlerin tespiti için refraktif indeks detektörü (Shimadzu RID-10A, Japonya) kullanılmış ve standart şeker olarak glukoz, galaktoz, maltoz ve fruktoz kullanılarak cihazın kalibrasyonu yapılmıştır.

Turşu örneklerinin organik asit içeriğinin HPLC ile belirlenmesi

Turşu örneklerinin organik asit içeriği HPLC (Schimadzu CBM-20A, Japonya) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Analizde mobil faz olarak 10 mM HClO_4 kullanılmış ve mobil faz akış hızı 0.8 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Analiz edilen turşu suları $0.22 \mu\text{m}$ 'lik filtreden geçirilerek HPLC viallerine alınmış ve örnekten $20 \mu\text{L}$ cihaza enjekte edilmiştir. Her bir analiz süresi, organik asit piklerinin çıkış süresine göre 20 dakika olarak belirlenmiştir. Organik asitlerin maksimum absorpsiyonu PDA (Photodiode Array Detector) dedektörde (Shimadzu SPD-M20A, Japonya) 210 nm dalga boyunda belirlenmiştir. Analiz için

İnertsil ODS-3 C18 (250 x 4.6 mm 5 µm, Japonya) kolonu kullanılmış ve kolon sıcaklığı 40°C olarak ayarlanmıştır. Standart olarak laktik, asetik, sitrik, propiyonik, okzalik, tartarik ve formik asit kullanılarak kalibrasyon yapılmıştır.

Turşu Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması

Laktobasillerin izolasyonu

Turşu örneklerinden LAB türlerini izole etmek amacı ile örneklerden 10 gram steril stomacher poşetlerine tartılıp 90 mL steril fizyolojik tuzlu su çözeltisi ilave edilerek homojenize edilmiştir. Daha sonra örneklerden seri dilisyonlar hazırlanmıştır. Laktobasil türlerinin izolasyonu için 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} dilisyonlardan MRS agara yayma yöntemi ile ekim yapıp petri plakaları 37°C de 48 saat aerobik ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda katı besiyeri ortamında gelişen morfolojik olarak farklı olan koloniler seçilip MRS agar ortamına çizilerek saflaştırılmıştır. İzole edilip saflaştırılan kültürler ilgili sıvı besi ortamında geliştirilerek stok solüsyonları sonraki analizlerde kullanılmak üzere %40'lık gliserol kullanılarak hazırlanıp -80° C'de depolanmıştır.

Genomik DNA izolasyonu

İzole edilen ve saflaştırılan kültürlerden DNA izolasyonu fenol:kloroform:izoamil alkol kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu metod ile bazı izolatlarda sonuç alınamamış olup gerekli görüldüğü durumlarda DNA izolasyonu Genomik DNA Ekstraksiyon Kiti (İnvitrogen, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Fenol:kloroform:izoamil alkol ile DNA izolasyonu için sıvı kültür ortamında bir gece geliştirilmiş kültürden eppendorf tüpü içerisine 1 mL alınarak 10 dakika 8000×g de santrifüj işlemi ile bakteri hücreleri bir araya toplanmıştır. Tüpteki süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra bir araya toplanan hücrelerin üzerine 450 µL TE (Tris EDTA) tamponundan ilave edilip hafif bir karıştırma ile hücrelerin tampon içerisinde süspansiyon sağlanmıştır. Süspansiyon edilen hücrelere 50 µL %10'luk SDS (Sodyum dodesil sülfat) ve 2 µL Proteinaz K ilave edilip iyice vortekslelendikten sonra 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda

0.5 mL fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) karışımından ilave edilip tüpler baş aşağı çevrilerek iyice karıştırılmış ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İçerik 4°C'de 10 dakika 7000×g de santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatant benzeri yüksek viskoziteli jel otomatik pipet kullanılarak toplanıp yeni bir tüpe aktarılmıştır. İşlem fenol-kloroform-izoamil alkol karışımı ile bir kez daha tekrarlanıp oluşan süpernatant benzeri yüksek viskoziteli jel yeni bir tüpte toplanmıştır. 5M'lık sodyum asetattan 50 µL içeriğe ilave edilip hafifçe karıştırılmıştır. İçeriğe 1 mL izopropanol ilave edilerek çöken DNA'nın beyaz iplikçikleri oluşana kadar ters-düz edilerek hafifçe karıştırılmıştır. İçerik 3000×g de 10 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant uzaklaştırılıp, elde edilen pellet üzerine 0.5 mL %70'lik etanol ilave edilip hafif karıştırıldıktan sonra içerik 3000×g de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan etanolü uzaklaştırmak için içerik 37°C'de 5-10 dakika bekletilmiş ardından elde edilen DNA 100 µL distile su ilave edilerek süspansiyon edilmiştir.

rep-PCR analizi ile genotipik karakterizasyon

İzole edilen ve saflaştırılan kültürlerin farklı suşlara ait olup olmadığını belirlemek için rep-PCR (repetitive element palindromic PCR) analizi yapılmıştır. rep-PCR analizi için daha önce bu kapsamda tanımlanmış olan GTG5 primeri (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') kullanılmıştır. Bu amaç için hazırlanan PCR karışımı ve rep-PCR şartları daha önceki çalışma gibi uygulanmıştır (Dertli vd., 2016).

16S rRNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu

rep-PCR işlemi takiben seçilen farklı kolonilere 16S PCR işlemi uygulanmıştır. 16S geninin amplifikasyonu AMP_F (5'-GAGAGTTTGATYCTGGCTCAG-3') ve AMP_R (5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA-3') primer çifti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR işlemi için; ekstrakte edilen DNA ların 1 µL'si DNA Polimeraz ile yürütülen PCR da DNA şablonu olarak kullanılmıştır. Bu amaçla hazırlanan PCR karışımı ve PCR şartları daha önceki çalışma gibi uygulanmıştır (Dertli vd., 2016).

PCR ürünlerinin jel elektroforezi ile kontrolü için konsantrasyonu %1 olan agaroz jeli 0.5X Tris borat EDTA (TBE) tamponu kullanılarak hazırlanmıştır. PCR ürününden 10 µL alınarak agaroz jeldeki kuyucuklara yüklenmiş ve TBE tamponu kullanılarak 100 V da 50 dk elektroforez işlemine bırakılmıştır. Elektroforez işleminin ardından jeller 1 mg/L'lik etidyum bromid (Thermo Fisher Scientific, ABD) çözeltisi içerisinde 30 dk bekletilerek jelde yüklü olan DNA parçacıklarının boyanması için beklenmiştir. Bu işlemin ardından jeller deiyonize su içerisinde kısa süre tutularak durulandıktan sonra UV Transilluminatör (Cleaver Scientific, İngiltere) kullanılarak UV ışık altında görüntülenmiştir. GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD) her elektroforetik jelde DNA boyutlayıcısı olarak kullanılmıştır.

Dizji analizi

Amplifikasyonu takiben saflaştırılan 16S rRNA genine ait PCR ürünlerinin sekans analizi ülkemizde dizileme analizi konusunda hizmet veren Medsantek firmasından (İstanbul, Türkiye) hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sekanslar, %99-100 benzerlik kriteri ile BLAST algoritması kullanılarak hizalanmış ve böylelikle suşlar tanımlanmıştır. Sekans dataları NCBI veri sistemine submit edilmiş olup submission numaraları OQ428838;OQ428858 arasında değişmektedir. Tanımlanan suşların evrimsel ilişkilerini, aralarındaki genom benzerliklerini veya farklılıklarını ortaya koymak için filogenetik analizleri MEGAX paket programı kullanılarak yapılmış ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Kumar vd., 2018). Bu bağlamda filogenetik ağaçlar 1000 tekrarlı özyükleme ile neighbour-joining (NJ) metodu kullanılarak oluşturulmuştur (Saitou ve Nei, 1987; Tamura vd., 2004).

İzolatların Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi

Suşların düşük pH ve safra tuzlarına karşı direncinin belirlenmesi

Seçilen farklı LAB türlerinin düşük pH ve safra tuzlarına karşı direncinin değerlendirilmesi için izolatlar MRS besiyeri kullanılarak geliştirilmiştir. Ardından kültürler %0.85'lik steril fizyolojik tuzlu su ile iki kez yıkanarak yoğunlukları OD₆₀₀ nm de

~ 1'e ayarlanmıştır. Kontrol amaçlı pH ayarlaması yapılmadan ve safra tuzu ilave edilmeden kültürler MRS ortamına %1 oranında inoküle edilmiştir. Aynı şekilde %0.3 (w/v) safra tuzu (Biolife, İtalya) içeren ve 1M HCl ile pH 4'e ayarlanmış MRS besiyeri ortamlarına kültürlerden %1 olacak şekilde inoküle edilerek 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Kültürlerin gelişimleri her dört saatte bir 24 saat boyunca spektrofotometre kullanılarak OD₆₀₀ nm de ölçülmüştür (İspirli vd., 2015).

İlgili türlerin hidrofobisite niteliklerinin belirlenmesi

Seçilen türlerde tutunma analizi Sagdic vd., (2014)'nin yapmış oldukları metoda göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için geliştirilen kültürler, santrifüj (1200×g, 4°C, 10 dk) işlemi uygulandıktan sonra 50 mM K₂HPO₄ (pH 6.5) ile iki kez yıkanmış ve ardından aynı tampon çözeltide süspansiyon edilmiştir. İzolatların yoğunluğu OD₅₉₀ nm'de yaklaşık olarak 1'e ayarlanmış ve deney tüpleri içerisine 3 mL bakteriyel süspansiyon ve 0.6 mL n-hekzadekan ilave edilmiştir. Takiben karışım 120 saniye vortekslenmiş ve daha sonra faz ayrışması için hareket ettirmeden 20 dk boyunca 37°C inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası alt faz (sulu) dikkatlice alınıp OD₅₆₀ nm'de ölçüm yapılmıştır. % Adezyon aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Adezyon} = [(A_0 - A) / A_0] \times 100,$$

A₀ ölçümden önceki başlangıç OD değeri

A ise 20 dk'lık inkübasyondan sonraki OD değeri

İlgili türlerin antibiyotik hassasiyetlerinin belirlenmesi

Seçilen LAB türlerinde antibiyogram testi antibiyotik difüzyon diskleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için İspirli vd., (2015)'nin belirttiği metot kullanılmıştır. İlgili besiyerlerinde aktifleştirilen bakteriler 10⁷ kob/mL olacak şekilde ayarlanmış ve takiben 100 µL alınarak MRS agar üzerine yayma yöntemi ile ekilmiştir. Ardından antibiyotik diskler (Streptomisin, Penisilin, Kanamisin, Kloramfenikol, Eritromisin, Tetrasiklin, Oksitetrasiklin, Ampisilin) (Bioanalyse, Türkiye) agar üzerine yerleştirilmiş ve petriler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan inhibisyon zonları kaydedilerek izolatların antibiyotik hassasiyetleri belirlenmiştir.

İzolaların antifungal aktivitelerinin belirlenmesi

Seçilen izolatlarının antifungal aktiviteleri gıda güvenliği açısından önem taşıyan *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* ve *Penicillium chrysogenum* test küflerine karşı test edilmiş olup (Bhunia, 2018) ilgili test küfleri Yıldız Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Antifungal etkinin belirlenmesi amacıyla öncelikle test edilen küfler PDA besiyerinde 25-30°C de 5-7 gün boyunca geliştirilmiş ve küf sporları 1×10^6 spor/mL olmak koşulu ile hasat işlemi gerçekleştirilmiştir. Seçilen LAB izolatları MRS agar besiyerine 10 µL'lik üç kopya halinde nokta ekim yöntemi ile ekilmiş ve 37°C'de 48 saat boyunca aerobik şartlarda inkübasyona bırakılmıştır. LAB suşlarının gelişimini takiben petrilere üzerine 1×10^6 spor/mL fungus içerecek şekilde PDA soft agar (%0.8 agar) eklenmiştir. Takiben petrilere aerobik koşullar altında 30°C'de 48 saat boyunca inkübe edilmiş ve küflerde oluşan inhibisyon zonu ölçülmüştür (Demirbaş vd., 2017). İnhibisyon zonu oluşmuş alanın total ekim yapılan petri alanına bölünmesi ile elde edilmiştir. Sonuç olarak turşu izolatlarının küfler üzerindeki etkisi – inhibisyon yok, + petri alanının %0.1~3'ünde fungal gelişim yok, ++ petri alanının %3~8'inde fungal gelişim yok ve +++ petri alanının %8~12'sinde fungal gelişim yok ve ++++ petri alanının >%12'sinde fungal gelişim yok şeklinde belirlenmiştir (Magnusson ve Schnürer, 2001). Küflere karşı etkinin bakteriyosin benzeri maddelere ilaveten laktik-asetik asit gibi çeşitli son ürünlerden kaynaklanabileceği düşünülmüş dolayısıyla bu işlemler bakterilerin kendisi ile yürütülmüştür.

İzolaların antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi

Seçilen LAB türlerinin antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla ilgili izolatlar *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Salmonella typhimurium* RSSK 95091 patojen türlerine karşı test edilmiştir. İlgili patojen türler TSB besiyeri içinde 37°C'de geliştirilerek analiz için hazır hale getirilmiştir. LAB suşlarının antibakteriyel etkisinin belirlenmesi için agar noktalama testi kullanılmış olup izolatlar 37°C'de 18-24 saat MRS besiyeri ortamında geliştirildikten sonra, MRS agar ortamına, bir petride 2 farklı suş

olacak şekilde nokta ekim yapıp 37°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. TSB sıvı ortamında geliştirilen patojen bakteriler %0.8 oranında agar içeren 10 mL yumuşak agar (TSB) ortamına inoküle edilerek, nokta ekim yapılan MRS agar plaklarının üzerine ikinci tabaka halinde dökülmüş ve homojen bir şekilde yayılmıştır. Daha sonra bu ortamlar patojen bakterilerin gelişimi için 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda, izolatların patojen bakterilere karşı oluşturdukları inhibisyon zonları incelenmiştir (Hwanhlem vd., 2011).

LAB suşlarının GABA üretim seviyelerinin HPLC ile belirlenmesi

LAB suşlarının GABA üretim potansiyelleri Villegas vd., (2016) tarafından ifade edildiği şekilde belirlenmiştir. Bu amaçla tüm suşlar 53 mM MSG içeren MRS sıvı besiyeri ortamlarında 30°C'de 96 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun tamamlanmasının ardından kültür süpernatantları $6000 \times g$ 'de 15 dakika santrifüj işlemi ile toplanmış ve suşların GABA üretim seviyeleri HPLC (Schimadzu CBM-20A, Japonya) ile belirlenmiştir. Kültür süpernatantlarında bulunan GABA'nın HPLC ile tespit edilebilmesi için süpernatantlar türevlendirme işlemine tabi tutularak analiz için hazır hale getirilmiştir. Türevlendirme işlemi için 100 µL kültür süpernatantı alınarak üzerine aseton ile hazırlanmış 50 mg/mL'lik konsantrasyona sahip dansil klorid çözeltisinden 100 µL, 0.2 M Sodyum borat:NaOH çözeltisinden (pH 9.0) 800 µL ilave edilmiş ve homojen çözelti oluşturmak için vorteks yardımı ile karıştırılmıştır. Elde edilen çözelti ultrasonik banyoda 40°C'de 30 dk inkübasyona tabi tutulmuş ve ardından 12000 rpm'de 10 dk santrifüj işlemi uygulanarak ortamda bulunabilecek safsızlıklar çöktürülmüştür. Santrifüj işlemi sonucunda elde edilen süpernatanta eşit hacimde metanol ilave edilmiş ve sonrasında örnekler 0.22 µm filtreden geçirilerek HPLC viallerine aktarılmıştır. Türevlendirilen örneklerin HPLC'de analizi için mobil faz olarak Solvent A (6.25 mL CH₃COOH, 1.97 g CH₃COONa, 200 mL CH₃CN, son hacim saf su ile 1 L ye tamamlanmıştır) ve Solvent B (Asetonitril) gradient akış eşliğinde 1:1 oranında kullanılmıştır. Mobil faz akış hızı 1 mL/dk olarak, cihaza enjekte edilen örnek miktarı ise 1 µL olacak

şekilde ayarlanmıştır. GABA'nın tespiti FLD (Fluorescence Detector) detektörde (Shimadzu RF-20A, Japonya) 295 nm ve 500 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Analiz için İnertsil ODS-3 C18 (250 x 4.6 mm 5 µm, Japonya) kolonu kullanılmış olup kolon sıcaklığı 25°C'ye sabitlenmiştir. Kültür süpernatantlarındaki GABA seviyeleri, belirtilen HPLC şartlarında ticari bir GABA standardı (Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılarak belirlenmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Turşu Örneklerinin Bazı Kimyasal Analiz Sonuçları

Toplanan farklı sebze ve meyve turşularının pH, organik asit ve şeker içeriği belirlenmiş olup elde edilen sonuçları Çizelge 2'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlardaki değişkenliğin turşuların olgunluk düzeyindeki farklılıklardan ve farklı meyve ve sebze içeriklerinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 2. Turşu örneklerinin pH, organik asit ve şeker içeriği
Table 2. pH, organic acid and sugar content of pickle samples

| No | Turşu çeşidi <i>Pickle variety</i> | pH | Organik Asit (mg/kg) <i>Organic Acid</i> | | Şeker (mg/mL) <i>Sugar</i> | |
|----|--------------------------------------------------------|------|---------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| | | | Laktik asit <i>Lactic acid</i> | Asetik asit <i>Acetic acid</i> | Glukoz <i>Glucose</i> | Fruktoz <i>Fructose</i> |
| 1 | Salamura fasulye yaprağı <i>Pickled bean leaves</i> | 4.79 | 10452.292 | 3257.550 | 3.156 | 2.745 |
| 2 | Fasulye turşusu <i>Bean pickle</i> | 3.00 | 10132.573 | 2202.325 | - | - |
| 3 | Fasulye turşusu <i>Bean pickle</i> | 2.99 | 10344.677 | 2747.856 | - | - |
| 4 | Pazı turşusu <i>Chard pickle</i> | 3.12 | 5474.276 | 2027.272 | - | - |
| 5 | Lahana turşusu <i>Sauerkraut</i> | 3.07 | 8675.182 | 3076.300 | - | - |
| 6 | Fasulye turşusu <i>Bean pickle</i> | 3.29 | 8171.024 | 2242.348 | - | - |
| 7 | Karnabahar turşusu <i>Cauliflower pickle</i> | 6.67 | 7044.100 | 1923.009 | - | - |
| 8 | Kırmızı pancar turşusu <i>Pickled red beetroot</i> | 3.76 | 1655.532 | 923.802 | 11.774 | 12.383 |
| 9 | Brokoli turşusu <i>Broccoli pickle</i> | 3.07 | 11230.529 | 5528.345 | 2.911 | 1.613 |
| 10 | Yabani armut turşusu <i>Pickled wild pear</i> | 3.50 | 2404.117 | 2187.815 | 14.457 | 45.946 |
| 11 | Dereotlu karışık turşu <i>Mixed dill pickle</i> | 2.97 | 8915.247 | 6207.088 | - | - |
| 12 | Biber turşusu <i>Pickled peppers</i> | 3.45 | 5478.982 | 12404.042 | - | - |
| 13 | Fasulye turşusu <i>Bean pickle</i> | 3.22 | 9920.611 | 529.838 | - | - |
| 14 | Salatalık turşusu <i>Pickled cucumber</i> | 3.13 | 720.622 | 1266.921 | - | - |
| 15 | Lahana turşusu <i>Sauerkraut</i> | 3.74 | 4891.030 | 3343.721 | - | - |
| 16 | Karaşık turşu <i>Mixed pickle</i> | 3.19 | 312.525 | 1312.101 | - | - |
| 17 | Alıç sirkesi <i>Hawthorn vinegar</i> | 3.06 | 2217.125 | 9365.789 | - | - |

-: Tespit edilmedi

Çizelge 2'den de görüleceği üzere farklı bitkisel materyallerden üretilmiş geleneksel turşuların pH'ları ağırlıklı olarak pH 3 civarında bulurken, karnabahar ve salamura yaprağı turşusunun pH'ları sırasıyla 6.67 ve 4.79 olarak kaydedilmiştir. Turşu örneklerinin pH değerleri kullanılan sebzenin türü, spontan gelişen mikroflora, fermantasyon süresi gibi faktörlere bağlı olarak değişmekle birlikte elde ettiğimiz sonuçlar literatür verileri ile uyum göstermektedir (Aljahani, 2020; Çetin, 2011; Karasu, 2006; Tokatlı vd., 2019). Benzer olarak turşu örneklerinin laktik asit ve asetik asit içerikleri de oldukça değişken bir profil şeklinde meydana gelmiştir. Turşu fermantasyon süreci hem homofermantatif hem de heterofermantatif LAB suşları tarafından yönlendirildiği için farklı oranlarda laktik asit ve asetik asit oranlarının bulunması beklenen bir sonuçtur. Bununla birlikte laktik ve asetik asit bulunma oranı açısından örnekler arasında gözlenen geniş yelpaze, fermantasyonu yürüten mikrofloranın biyokimyasal niteliklerinin bir yansıması olarak görülebilir (Moon vd., 2018). Önemli olarak bazı turşu örneklerinde bulunan laktik asit ve asetik asit miktarları daha önce yapılan bir çalışmada seçilmiş kültürler ile üretilen turşu örneklerinin 6. ayında bulunan laktik asit ve asetik asit oranlarına benzer değerlerde kaydedilmiştir (Tokatlı vd., 2019). Bununla birlikte spontan fermantasyondan kaynaklı düşük miktarlarda laktik-asetik asit üretimi, geleneksel turşu örneklerinde gözlenmiştir (Çizelge 2). Benzer sonuçlar Yuliana vd. (2013) tarafından yapılan çalışma sonucunda da elde edilmiş olup spontan fermantasyon ile üretilen turşu örneğinde toplam laktik asit miktarı LAB ilavesi ile üretilen turşu örneğine göre göre oldukça düşük bulunmuştur. LAB ilavesinin laktik ve çeşitli organik asitlerin yanı sıra diğer çeşitli metabolitlerin üretimi ile ham maddede hızlı bir asit birikimine neden olduğu ifade edilmiştir (Yuliana vd., 2013). Son olarak geleneksel turşu örneklerinde fermantasyon ortamında kalan glukoz ve fruktoz miktarı tespit edilmiş ve 17 örnekten sadece 4 adet turşu örneğinde glukoz ve fruktoz sırasıyla 2.91-14.45 ve 1.61-45.9 mg/mL oranlarında tespit edilmiştir ve yüksek fruktoz düzeyi armut meyvesi bazlı turşu örneğinde gözlenmiştir. Daha önce gerçekleştirilen bir

çalışmada ise starter ile üretilen turşu örneklerinde 6. ayın sonunda örneklerde kalan glukoz ve fruktoz miktarları sırasıyla 4.4-7.4 ve 0.2-2.1 mg/mL aralığında bulunmuştur (Tokatlı vd., 2019). Elde edilen bu sonuçlar literatür ile uyumluluk gösterse de test edilen parametrelerin turşu çeşidine bağlı olarak oldukça değişkenlik göstermesi turşu fermantasyonu sürecinin çok faktörlü oldukça dinamik bir süreç olduğunu göstermesi bakımından önem arz etmektedir.

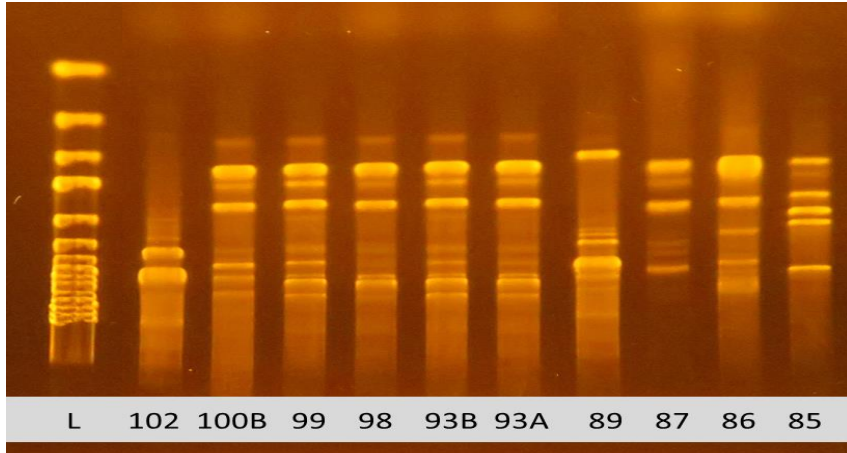
Turşu Örneklerinden İzole Edilen Kültürlerin rep-PCR Analizi ile Genotipik Karakterizasyonu

Toplanan 17 adet turşu örneğinden MRS besiyerine ekim yapılarak toplamda farklı olabileceği düşünülen 47 koloni izole edilerek saflaştırılmış ve gliserol stoğa alınmıştır. Turşu örneklerinden izole edilen suşların genotipik ayrımının gerçekleştirilmesi amacıyla rep-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Genotipik karakterizasyon metodu olarak seçilen bu işlemde GTG5 primeri kullanılmıştır (Dertli vd., 2016). Şekil 1 izolatların rep-PCR tiplendirmesine esas örnek agaroz jel görüntüsünü göstermektedir.

Şekil 1'den de görüleceği üzere turşu izolatlarının genotipik ayrımı GTG primeri kullanılarak rep-PCR işlemi ile başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve farklı olduğu düşünülen 21 suş bir sonraki basamak olan tanımlama işlemi için seçilmiştir.

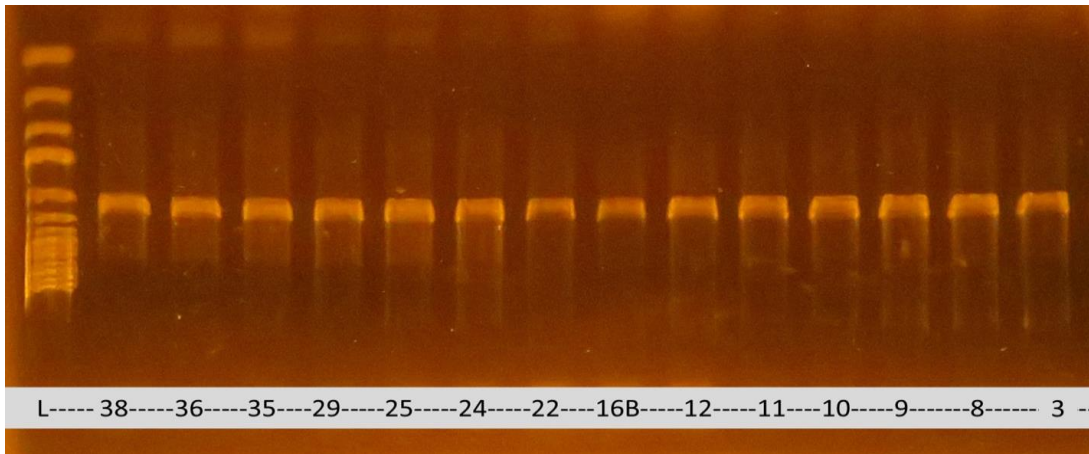
İzolatların 16S rRNA Genlerinin Tanımlanması

rep-PCR sonucu farklı olduğu düşünülerek seçilen 21 izolatda 16S rRNA geni ampilifiye edilmiş (Şekil 2) ve hizmet alımı ile sekans analizi gerçekleştirilmiştir. Sekans işleminin ardından sonuçlar BLAST (<http://goo.gl/lohXcq>) veya Ribosomal database project (<http://goo.gl/8OILPU>) veri banklarında mevcut türler ile karşılaştırılarak ilgili izolatların hangi türe ait olduğu belirlenmiştir. İzolatların 16S rRNA dizilerinin NCBI veritabanına yüklenmiş olup erişim numaraları Ek Dosya 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Turşu izolatlarının GTG5 profillerini gösteren örnek bir agaroz (%1) jel görüntüsü:

Figure 1. An exemplary agarose (1%) gel image showing GTG5 profiles of pickle isolates: *Levilactobacillus brevis* (85), *Furfurilactobacillus rossiae* (89), *Lactiplantibacillus plantarum* (86, 87, 93A, 93B, 98, 99, 100B), *Pediococcus parvulus* (102)



Şekil 2. Turşu izolatlarının 16S profillerini gösteren agaroz (%1) jel görüntüsü

Figure 2. Agarose (1%) gel image showing 16S profiles of pickle isolates

Genotipik karakterizasyon ve takiben tanımlama işlemlerinin ardından toplanan turşu örneklerinde 9 farklı LAB türüne ait 21 suşun bulunduğu saptanmıştır. Çizelge 3’de tanımlanan suşlar ve bu suşların izole edildiği turşu örneklerini göstermektedir.

Şekil 3 turşu izolatlarının MEGAX hizalanmasını göstermektedir. Şekilden de görüleceği üzere *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis*, *Furfurilactobacillus rossiae*, *Pediococcus parvulus*, *Lactocaseibacillus paracasei*, *Lentilactobacillus buchneri*, *Lentilactobacillus diolivorans*, *Enterococcus faecium* ve

Leuconostoc mesenteroides suşları başarılı bir şekilde farklı grupları oluşturmuştur.

Lactiplantibacillus plantarum suşları farklı ortamlarda bulunsalar da genel olarak turşularda en fazla bulunan LAB türleri arasında bulunmaktadır (Mao vd., 2021). Benzer olarak *Levilactobacillus brevis* suşları da farklı turşu ortamlarında bulunan ve özellikle GABA üretimi açısından ön plana çıkan bir türdür (Jin vd., 2023). *Furfurilactobacillus rossiae*’de özellikle fermente meyve temelli ürünlerde bulunmakta olup (Di Cagno vd., 2013) çalışmamız kapsamında karışık turşudan izole edilmiştir. Öte yandan farklı turşu örneklerinden

izole edilen *Pediococcus parvulus*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lentilactobacillus buchneri*, *Lentilactobacillus diolivorans*, *Enterococcus faecium* türlerinin de farklı orijinli turşu örneklerinde bulunabildiği daha önceki çalışmalar kapsamında gösterilmiştir (Bağder vd., 2015; Di Biase vd., 2022; Jonganurakkun vd., 2008; Xiong vd., 2012). Önemli olarak *Leuconostoc mesenteroides* suşu bu çalışma kapsamında fermente bir meyve

turşusundan izole edilmiş olup daha önceki çalışmalarda da bu türün meyve turşularında önemli bir kültür olduğu gösterilmiştir (Chen vd., 2013). Sonuç olarak bu çalışma kapsamında oldukça fazla sayıda LAB türü geleneksel turşularımızdan izole edilmiş olup elde ettiğimiz sonuçlar geleneksel turşularımızda bulunan LAB çeşitliliğini göstermesi bakımından oldukça önem arz etmektedir.

Çizelge 3. İzolatlarının turşu örneklerindeki dağılımı

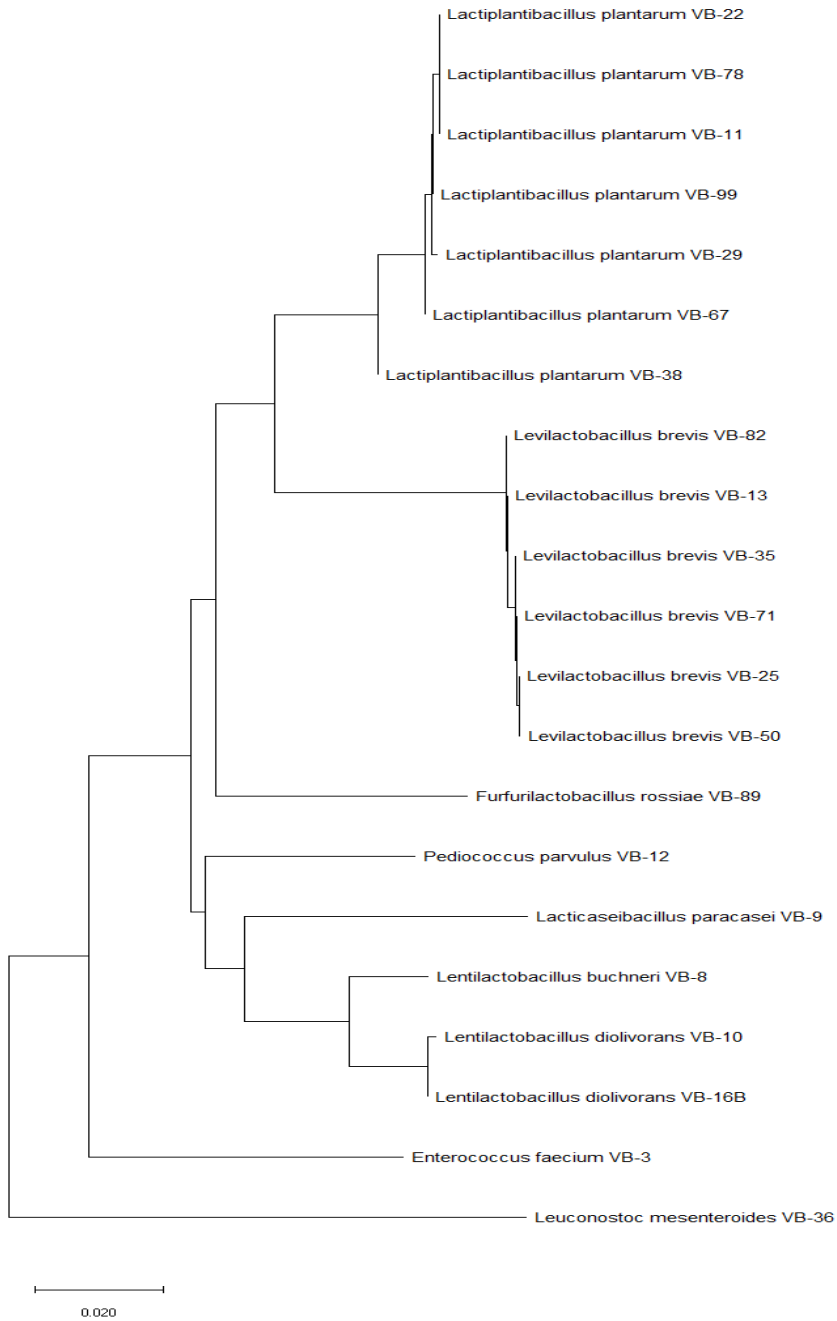
Table 3. Distribution of isolates in pickle samples

| Tanımlama sonucu <i>Identification result</i> | İzole edildiği kaynak <i>Source isolated</i> |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <i>Enterococcus faecium</i> VB3 | Salamura fasulye yaprağı <i>Pickled bean leaves</i> |
| <i>Lentilactobacillus buchneri</i> VB8 | Fasulye turşusu <i>Bean pickle</i> |
| <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> VB9 | Fasulye turşusu <i>Bean pickle</i> |
| <i>Lentilactobacillus diolivorans</i> VB10 | Fasulye turşusu <i>Bean pickle</i> |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB11 | Pazı turşusu <i>Chard pickle</i> |
| <i>Pediococcus parvulus</i> VB12 | Pazı turşusu <i>Chard pickle</i> |
| <i>Levilactobacillus brevis</i> VB13 | Pazı turşusu <i>Chard pickle</i> |
| <i>Lentilactobacillus diolivorans</i> VB16B | Lahana turşusu <i>Sauerkraut</i> |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB22 | Fasulye turşusu <i>Bean pickle</i> |
| <i>Levilactobacillus brevis</i> VB25 | Karnabahar turşusu <i>Cauliflower pickle</i> |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB29 | Kırmızı pancar turşusu <i>Pickled red beetroot</i> |
| <i>Levilactobacillus brevis</i> VB35 | Brokoli turşusu <i>Broccoli pickle</i> |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> VB36 | Yabani armut turşusu <i>Pickled wild pear</i> |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB38 | Dereotlu karışık turşu <i>Mixed dill pickle</i> |
| <i>Levilactobacillus brevis</i> VB50 | Biber turşusu <i>Pickled peppers</i> |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB67 | Fasulye turşusu <i>Bean pickle</i> |
| <i>Levilactobacillus brevis</i> VB71 | Fasulye turşusu <i>Bean pickle</i> |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB78 | Salatalık turşusu <i>Pickled cucumber</i> |
| <i>Levilactobacillus brevis</i> VB82 | Lahana turşusu <i>Sauerkraut</i> |
| <i>Furfurilactobacillus rossiae</i> VB89 | Karışık turşu <i>Mixed pickle</i> |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB99 | Alıç sirkesi <i>Hantborn vinegar</i> |

Düşük pH ve Safra Tuzlarına Karşı Direncin Belirlenmesi

Tüketici beklentisi ve bilimsel çalışmalar çerçevesinde turşu izolatlarının fermantasyonu gerçekleştirmek yanında en önemli özelliklerinin başında probiyotik nitelikleri gelmektedir. Bu kapsamda izole ettiğimiz LAB suşlarının ön

probiyotik değerlendirmeleri safra tuzuna ve düşük pH'ya gösterdikleri direnç ölçülerek gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4'den de görüleceği üzere turşu izolatlarının safra tuzu ve düşük pH canlılıkları sırasıyla %13.01-65.18 ve %0.54-35.88 arasında gözlenmiş olup oldukça geniş bir aralık olacak şekilde ilgili özellikleri ölçülmüştür.



Şekil 3. Turşu izolatlarının filogenetik ilişkisini gösteren dendrogram.
 Figure 3. Dendrogram showing the phylogenetic relationship of the pickle isolates.

Önceki çalışmalara da paralel olmak üzere (Çetin, 2011; Suzuki vd., 2014; Tokatlı vd., 2015; Wang vd., 2010) geleneksel turşu izolatlarımızdan ön probiyotik nitelikleri kapsamında öne çıkan suşlar *Lactiplantibacillus plantarum* (VB11-VB22) ve

Levilactobacillus brevis (VB13 – VB82) suşları olmuştur. Öne çıkan suşların safra tuzları ve düşük pH açısından canlılık değerleri önceki çalışmalar ile uyumluluk sergilemektedir (Tokatlı vd., 2015; Wang vd., 2010).

LAB Türlerinin Hidrofobisite Nitelikleri

Çalışma kapsamında tanımladığımız suşların potansiyel probiyotik niteliklerini açığa çıkarmak için hidrofobisite özellikleri test edilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4'de verilmiştir. Çizelgeden de görüleceği üzere turşu izolatlarının % hidrofobisite değerleri % 4.22- % 92.89 değerleri arasında ölçülmüştür. Canlılık açısından ön plana çıkan suşlardan özellikle *Levilactobacillus brevis* (VB13–VB82) suşlarının hidrofobisite değerleri oldukça yüksek bulunurken,

Lactiplantibacillus plantarum (VB11–VB22) suşlarının tutunma yüzdeleri de %50'nin üzerinde ölçülmüştür. Bununla birlikte tutunma açısından bu suşlara kıyasla daha yüksek çıkan izolatlar da mevcuttur. Genel olarak elde ettiğimiz hidrofobisite değerleri literatür ile uyumlu olup (Tokatlı vd., 2015) canlılık değerleri açısından öne çıkan suşların aynı zamanda yüksek hidrofobisite değerlerine sahip olması probiyotik potansiyellerini göstermesi bakımından önem arz etmektedir.

Çizelge 4. Turşu izolatlarının safra asitleri ve düşük pH'da canlılık, hidrofobisite (Adezyon %) oranları ve GABA üretim yetenekleri

Table 4. Bile acids and low pH viability, hydrophobicity (Adhesion %) rates and GABA production capabilities of pickle isolates

| | Safra tuzu (% Canlılık) Bile salt (% Vitality) | pH 4 (% Canlılık) (% Vitality) | Adezyon (%) Adhesion (%) | GABA (mg/mL) |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------|
| <i>Ent. faecium</i> VB3 | 64.40±0.00 | 1.57±0.74 | 4.22±0.57 | TE* |
| <i>Lentilactobacillus buchneri</i> VB8 | 13.01±5.75 | 23.58±5.75 | 66.73±9.80 | 0.398 ± 0.09 |
| <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> VB9 | 14.42±0.92 | 4.21±1.15 | 42.06±3.29 | TE |
| <i>Lentilactobacillus diolivorans</i> VB10 | 13.22±0.26 | 5.43±3.07 | 93.80±0.28 | TE |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB11 | 56.70±7.29 | 31.53±2.06 | 53.89±2.15 | TE |
| <i>Pediococcus parvulus</i> VB12 | 13.64±6.43 | 3.98±0.80 | 6.02±0.06 | TE |
| <i>Levilactobacillus brevis</i> VB13 | 65.18±1.82 | 25.62±1.82 | 82.24±0.42 | 0.628 ± 0.11 |
| <i>Lentilactobacillus diolivorans</i> VB16B | 25.96±10.53 | 4.29±0.32 | 92.89±0.15 | TE |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB22 | 63.88±0.76 | 25.78±8.72 | 54.74±2.37 | TE |
| <i>Levilactobacillus brevis</i> VB25 | 45.16±4.22 | 11.32±0.87 | 30.19±0.14 | 0.408 ± 0.08 |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB29 | 32.37±3.50 | 37.81±5.31 | 13.05±2.11 | TE |
| <i>Levilactobacillus brevis</i> VB35 | 19.04±2.33 | 9.60±0.42 | 92.42±0.09 | TE |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> VB36 | 20.64±12.51 | 0.54±0.00 | 3.86±5.47 | TE |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB38 | 34.23±4.49 | 3.42±0.08 | 38.50±0.57 | 0.081 ± 0.02 |
| <i>Levilactobacillus brevis</i> VB50 | 45.43±8.48 | 20.33±0.29 | 76.54±0.86 | 0.492 ± 0.09 |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB67 | 58.05±1.81 | 15.02±0.09 | 37.19±2.35 | TE |
| <i>Levilactobacillus brevis</i> VB71 | 31.75±3.95 | 13.55±0.72 | 58.50±2.60 | 0.489 ± 0.1 |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB78 | 50.00±0.47 | 1.55±0.31 | 41.49±2.97 | TE |
| <i>Levilactobacillus brevis</i> VB82 | 62.55±7.20 | 35.88±1.71 | 71.05±6.92 | 0.454 ± 0.08 |
| <i>Furfurilactobacillus rossiae</i> VB89 | 14.96±0.52 | 1.48±0.52 | 70.79±3.73 | TE |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB99 | 39.06±3.13 | 30.42±1.15 | 69.86±0.56 | 0.096 ± 0.01 |

TE*: Tespit edilmedi

LAB Türlerinin Antibiyotik Hassasiyetleri

Antibiyotik dirençlilik sorunu uluslararası ölçekte önemli bir sorun olup özellikle probiyotik ve starter olarak kullanılabilen suşların antibiyotik dirençlilik ile ilgili sorun oluşturmaması ve özellikle transfer edilebilir antibiyotik direnç genlerini taşıyıp taşımadığı gerekmektedir (Mathur ve Singh, 2005; Zarzecka vd., 2023). Çizelge 5 geleneksel turşu izolatlarımızın oksitetrasiklin, kloramfenikol, streptomisin, penisilin, kanamisin, eritromisin, tetrasiklin ve ampisilin antibiyotiklerine olan hassasiyet testinin sonuçlarını göstermektedir. Çizelge 5’den de görüleceği üzere izolatlar kanamisin ve streptomisin hariç yüksek hassasiyet göstermiştir ve bazı antibiyotiklere karşı suş seviyesinde farklı hassasiyet sonuçları elde edilmiştir. Örneğin *Furfurilactobacillus rosaliae* VB89 ve *Lentilactobacillus*

diolivorans VB16B oksitetrasikline, *Lentilactobacillus buchneri* VB8, *Lentilactobacillus diolivorans* VB10, *Lentilactobacillus diolivorans* VB16B ve *Lactiplantibacillus plantarum* VB78 tetrasikline karşı direnç göstermişlerdir. Daha önce yapılan çalışmalarda geleneksel gıdalardan izole edilen farklı LAB suşlarının farklı antibiyotik duyarlılıklarının olduğu ifade edilmiştir (Encu vd., 2022; Kaya vd., 2022; Wang vd., 2010). Önemli olarak önceki çalışmalarda da LAB suşlarının kanamisin ve streptomisine karşı oldukça dirençli oldukları not edilmekle birlikte (Dušková vd., 2021; Kaya vd., 2022) bu direncin daha içsel faktörlere bağlı olarak (membran geçirimsizliği) oluşabileceği öne sürülmüştür (Štšepetova vd., 2017). Sonuç olarak geleneksel turşu izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları genel itibarıyla istenen nitelikte gözlenmiştir.

Çizelge 5. Turşu izolatlarının farklı antibiyotiklere karşı hassasiyetleri

Table 5. Susceptibility of pickle isolates to different antibiotics

| Suş Strain | İnhibisyon zonu (cm) Inhibition zone (cm) | | | | | | | |
|---------------|----------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | T30 | C30 | S10 | K30 | TE30 | P10 | AM10 | E15 |
| VB3 | 3.0±0.20 | 2.8±0.01 | - | - | 2.6±0.20 | 2.8±0.10 | 3.4±0.01 | 3.0±0.02 |
| VB8 | 1.1±0.10 | 3.8±0.10 | - | - | - | 3.4±0.10 | 3.0±0.01 | 3.4±0.10 |
| VB9 | 3.0±0.10 | 3.0±0.30 | - | - | 3.1±0.01 | 3.3±0.01 | 3.0±0.03 | 3.2±0.10 |
| VB10 | 1.2±0.30 | 3.9±0.20 | 1.6±0.02 | - | - | 2.5±0.20 | 3.8±0.10 | 4.0±0.05 |
| VB11 | 1.5±0.01 | 2.9±0.05 | - | - | 1.8±0.10 | 2.5±0.03 | 3.4±0.01 | 2.5±0.20 |
| VB12 | 1.3±0.05 | 3.2±0.04 | - | - | 1.8±0.05 | 3.5±0.01 | 3.6±0.20 | 2.4±0.30 |
| VB13 | 1.6±0.2 | 2.8±0.30 | - | - | 1.4±0.07 | 1.8±0.10 | 3.2±0.20 | 2.5±0.04 |
| VB16B | - | 2.9±0.01 | 1.0±0.10 | - | - | 2.4±0.01 | 2.7±0.01 | 3.2±0.02 |
| VB22 | 1.6±0.01 | 2.6±0.04 | - | - | 2.1±0.01 | 2.3±0.10 | 2.7±0.10 | 2.2±0.10 |
| VB25 | 2.0±0.30 | 2.9±0.05 | 1.0±0.10 | - | 1.5±0.20 | 1.7±0.03 | 2.8±0.01 | 2.5±0.01 |
| VB29 | 1.3±0.02 | 2.5±0.10 | - | - | 2.0±0.04 | 2.5±0.20 | 3.4±0.01 | 2.5±0.20 |
| VB35 | 1.8±0.10 | 3.0±0.01 | - | - | 1.8±0.01 | 2.5±0.02 | 3.6±0.30 | 2.5±0.05 |
| VB36 | 2.4±0.02 | 3.4±0.2 | 1.4±0.1 | 1.0±0.01 | 2.3±0.10 | 3.2±0.01 | 2.8±0.02 | 2.8±0.20 |
| VB38 | 1.6±0.10 | 2.9±0.20 | - | - | 1.6±0.30 | 2.6±0.03 | 3.7±0.10 | 2.6±0.20 |
| VB50 | 2.2±0.04 | 3.3±0.05 | 1.1±0.04 | - | 2.1±0.02 | 2.7±0.01 | 3.3±0.20 | 2.6±0.20 |
| VB67 | 2.0±0.20 | 3.4±0.10 | - | - | 1.7±0.05 | 3.8±0.10 | 4.0±0.01 | 3.4±0.07 |
| VB71 | 1.6±0.20 | 3.3±0.30 | - | - | 1.6±0.01 | 2.3±0.04 | 3.2±0.20 | 2.8±0.30 |
| VB78A | 1.8±0.01 | 2.7±0.01 | - | - | - | 2.2±0.20 | 3.2±0.10 | 2.6±0.04 |
| VB82 | 1.2±0.04 | 3.2±0.20 | - | - | 1.2±0.01 | 1.7±0.20 | 3.0±0.05 | 2.3±0.30 |
| VB89 | - | 3.5±0.01 | - | - | 2.7±0.10 | 2.8±0.01 | 3.6±0.30 | 2.5±0.01 |
| VB99 | 1.8±0.01 | 2.8±0.10 | - | - | 1.7±0.20 | 2.3±0.02 | 3.6±0.01 | 2.5±0.01 |

Uygulamada kullanılan antibiyotikler; T: Oxytetracycline (30 µg), C: Chloramphenicol (30 µg), S: Streptomycin (10 µg), K: Kanamycin (30 µg), TE: Tetracycline (30 µg), P: Penicillin G (10 Units), AM: Ampicillin (10 µg), E: Erythromycin (15 µg), —: İnhibisyon zonu yok. Veriler ortalama ± standart sapmadır (n = 3).

Antibiotics used in practice; T: Oxytetracycline (30 µg), C: Chloramphenicol (30 µg), S: Streptomycin (10 µg), K: Kanamycin (30 µg), TE: Tetracycline (30 µg), P: Penicillin G (10 Units), AM: Ampicillin (10 µg), E: Erythromycin (15 µg), —: No inhibition zone. Data are mean ± standard deviation (n = 3).

İzolatların Antifungal Aktiviteleri

Son dönemde starter olarak kullanılabilir LAB türlerinden hem probiyotik özellikler gibi fonksiyonel hem de antifungal-antibakteriyel aktivite gibi ilave teknolojik özellikler sergilemesi beklenmektedir (Demirbaş vd., 2017). Bu kapsamda turşu izolatlarının gıda sanayiinde sorun oluşturan üç önemli küf türüne karşı antifungal aktiviteleri karakterize edilmiştir. Çizelge 6'dan da görüleceği üzere genel itibarıyla turşu izolatları test edilen küflere karşı güçlü antifungal aktivite sergilemiştir. Bununla birlikte test edilen 21 suştan 7 tanesi *A. niger*'e, 2 tanesi *P. chrysogenum*'a ve son olarak 1 tanesi *A. alternata*'ya karşı herhangi bir antifungal aktivite sergilememiştir. Özellikle ön probiyotik aktivite bakımından öne çıkan *Lactiplantibacillus plantarum* (VB11–VB22) suşları

antifungal aktivite açısından da önemli bir aktivite sergilemişlerdir. Daha önce fermente ürünlerden izole edilen farklı LAB türlerinin de önemli antifungal aktivite gösterdikleri farklı çalışmalar ile gösterilmiştir (Chen vd., 2021; Demirbaş vd., 2017; Sathe vd., 2007). Bizim çalışmamızla uyumlu olarak yeni yapılan bir çalışmada fermente zeytinden izole edilen *Lactiplantibacillus plantarum* ve *Levilactobacillus brevis* suşlarının güçlü antifungal aktivite sergiledikleri gösterilmiştir (Abouloifa vd., 2020). Sonuç olarak bitkisel temelli LAB izolatlarının bu kadar yüksek antifungal aktivite sergilemesi bu izolatların sonraki çalışmalarda starter ve biyokoruyucu kültür olarak kullanım potansiyelinin oldukça yüksek olduğunu ortaya koymaktadır.

Çizelge 6. Turşu izolatlarının farklı küflere karşı antifungal aktivitelerinin değerlendirilmesi
Table 6. Evaluation of antifungal activities of pickle isolates against different molds

| | <i>A. niger</i> | <i>P. chrysogenum</i> | <i>A. alternata</i> |
|---------------------------------------------|-----------------|-----------------------|---------------------|
| <i>Enterococcus faecium</i> VB3 | -* | ++++ | ++++ |
| <i>Lentilactobacillus buchneri</i> VB8 | ++++ | ++++ | - |
| <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> VB9 | +++ | ++++ | ++++ |
| <i>Lentilactobacillus diolivorans</i> VB10 | + | ++++ | ++++ |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB11 | +++ | ++++ | ++++ |
| <i>Pediococcus parvulus</i> VB12 | - | - | +++ |
| <i>Levilactobacillus brevis</i> VB13 | + | +++ | ++++ |
| <i>Lentilactobacillus diolivorans</i> VB16B | - | ++ | ++++ |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB22 | +++ | ++++ | ++++ |
| <i>Levilactobacillus brevis</i> VB25 | ++++ | ++++ | ++++ |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB29 | +++ | ++++ | ++++ |
| <i>Levilactobacillus brevis</i> VB35 | - | ++ | +++ |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> VB36 | - | + | ++ |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB38 | - | ++++ | ++++ |
| <i>Levilactobacillus brevis</i> VB50 | - | - | +++ |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB67 | ++++ | ++++ | ++++ |
| <i>Levilactobacillus brevis</i> VB71 | ++++ | ++++ | ++++ |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB78 | +++ | ++++ | ++++ |
| <i>Levilactobacillus brevis</i> VB82 | ++ | ++++ | ++++ |
| <i>Furfurilactobacillus rossiae</i> VB89 | +++ | ++++ | ++++ |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB99 | ++++ | ++++ | ++++ |

*- inhibisyon yok, + petri alanının %0.1~3'ünde fungal gelişim yok, ++ petri alanının %3~8'inde fungal gelişim yok, +++ petri alanının %8~12'sinde fungal gelişim yok ve ++++ petri alanının >%12'sinde fungal gelişim yok.

*- no inhibition, + no fungal growth in 0.1~3% of petri area, ++ no fungal growth in 3~8% of petri area, +++ no fungal growth in 8~12% of petri area, and ++++ no fungal growth in >12% of the petri area.

İzolatların Antibakteriyel Aktiviteleri

Probiyotik ve teknolojik nitelik açısından LAB türlerinin bir diğer fonksiyonu da antibakteriyel aktiviteleridir (İspirli ve Dertli, 2021). Bu kapsamda turşu izolatlarının antibakteriyel aktiviteleri *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Salmonella typhimurium* RSSK 95091 suşlarına karşı test edilmiştir. Yapılan test sonucuna göre turşu izolatlarının tamamı test edilen patojenik bakterilere karşı çok güçlü antibakteriyel aktivite göstermiş ve patojen bakteriler test sırasında petri kutusunda herhangi bir gelişim gösterememişlerdir. Daha önceki yapılan çalışmalarda da bazı LAB türlerinin antimikrobiyal uygulamalarında petri kutusunda herhangi bir gelişimin gözlenmediği rapor edilmiştir (İspirli ve Dertli, 2021). LAB türleri ile yapılan antibakteriyel etkinlik testleri bu etkinin daha çok suş spesifik sebeplerden kaynaklandığını ve bu etki gerisinde ilgili suşların bakteriyosin, H₂O₂, organik asitler ve postbiyotik olarak son zamanlarda gündeme gelen toplam diğer metabolitler sebebiyle ortaya çıktığını göstermektedir (Encu vd., 2022; İspirli ve Dertli, 2021; Kaya vd., 2022; Todorov vd., 1999). Örneğin ilginç olarak *Lactiplantibacillus plantarum* tarafından üretilen ekstraselüler veziküllerin antibakteriyel etkinliği olduğu, yine *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecium*, *Lentilactobacillus buchneri*, *Lactocaseibacillus paracasei*, *Lentilactobacillus diolivorans*, *Levilactobacillus brevis* ve *Furfurilactobacillus rossiae* 'nin bakteriyosin gibi bileşenler üreterek antibakteriyel kapasite sergiledikleri önceki çalışmalarda ortaya konmuştur (Amini vd., 2022; Demirbaş vd., 2017; Hassanzadazar vd., 2014; Lee vd., 2021; Nasiri Moslem vd., 2022; Purutoğlu vd., 2020; Schurr vd., 2015; Yıldırım ve Yıldırım, 2001). Sonuç olarak turşu izolatlarının oldukça yüksek antibakteriyel aktivite göstermesi bu suşların sonraki süreçlerde değerlendirilebilme imkanlarını göstermesi bakımından oldukça önemli bir husustur.

LAB Suşlarının GABA Üretim Seviyeleri

Son dönemde geleneksel LAB izolatlarının teknolojik ve fonksiyonel nitelikleri kapsamında üzerinde en fazla durulan konuların başında

GABA üretimi gelmektedir (Demirbaş vd., 2017). Çizelge 4 turşu izolatlarının GABA üretim miktarlarını göstermektedir. Test edilen 21 izolattan 13'ü GABA üretim kabiliyeti göstermezken diğer 8 izolat ise $0.081 \pm 0.02 - 0.628 \pm 0.11$ mg/mL düzeyinde GABA üretimi göstermiştir. GABA üretimi gösteren 8 suşun 5 tanesi *Levilactobacillus brevis* suşu olup en yüksek GABA üretim kapasitesi yine bir *Levilactobacillus brevis* suşunda gözlenmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuç literatür ile de uyumlu olup LAB suşları arasında en fazla ve yüksek oranda GABA üretimi görülen türlerin başında *Levilactobacillus brevis* gelmektedir (Demirbaş vd., 2017; Villegas vd., 2016; Wu ve Shah, 2017). Öte yandan çalışmamızda en yüksek GABA üretiminin ön probiyotik değerlendirmede de öne çıkan *Levilactobacillus brevis* VB13 suşunda gözlenmesi ayrıca önem arz eden bir husustur. İlerleyen çalışmalarda bu suştan GABA üretim veriminin yükseltilmesine dönük optimizasyon süreçlerine geçilecektir. Çalışmamızda GABA üretimi gözlenen diğer türler olan *Lentilactobacillus buchneri* ve *Lactiplantibacillus plantarum*'un farklı suşlarının GABA üretim kabiliyetinde oldukları daha önceki çalışmalar ile ortaya konmuştur (Cho vd., 2007; Nakatani vd., 2022). Sonuç olarak turşu izolatlarımızın bazıları zihinsel fonksiyonlar için önemli bir bileşen olan GABA üretim kabiliyeti sergilemişler ve ön probiyotik testlerde öne çıkan *Levilactobacillus brevis* VB13 suşu en yüksek GABA üretimini gerçekleştirmiştir. Geleneksel ürünlerimizde GABA gibi biyoaktif bileşenleri üretebilen LAB suşlarının bulunması bu ürünlerin sağlık yararı noktasında etkinliklerinin daha iyi irdelenmesine imkân verebilecektir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada geleneksel turşu örneklerimizden genotipik ayırım sonucunda 9 farklı türe ait olduğu saptanan toplam 21 adet LAB suşu izole edilerek tanımlanmıştır. Bu 21 suşun potansiyel probiyotik değerlendirmeleri safra tuzlarına direnç, düşük pH'da canlılık ve hidrofobisite testleri ile gerçekleştirilmiş olup *Levilactobacillus brevis* (VB13–VB82) ve *Lactiplantibacillus plantarum* (VB11–VB22) suşları probiyotik potansiyelleri açısından ön plana çıkmıştır. Önemli olarak turşu izolatlarının antibiyotik dirençleri LAB suşlarının

iç faktörlerine bağlı olarak direnç gösterebildikleri kanamisin ve streptomisine karşı gözlenmiş olup geleneksel izolatlarımızın antibiyotik duyarlılıkları sonraki süreçlerde kullanım potansiyellerini göstermektedir. Turşu izolatlarını ön plana çıkartan bir diğer nitelikleri de yüksek antifungal ve antibakteriyel aktiviteleri olmuş olup bu suşların biyokoruyucu olarak kullanım potansiyeli oldukça yüksektir. Son olarak turşu izolatlarının GABA üretim potansiyelleri açığa çıkarılmış ve potansiyel probiyotik kabiliyet gösteren *Levilactobacillus brevis* VB13 suşunun oldukça yüksek miktarda GABA üretimi sergilediği gösterilmiştir. Sonuç olarak geleneksel turşu örneklerimizin yüksek LAB çeşitliliği göstermesi ve bu suşlardan bazılarının ürünlere probiyotik nitelik gibi fonksiyonellik katabilecek özelliklere sahip olması bu ürünlerden beklenen fonksiyonel etkinin sebeplerinin anlaşılabilmesi adına önemli çıktılardır. Bu suşların probiyotik etkinliklerini konu alan ve endüstride özellikle biyokoruyucu starter olarak kullanımları noktasındaki çalışmaların önümüzdeki dönemde hızlanacağı düşünülmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarların, başka kişiler ve/veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

YAZARLARIN KATKISI

Çalışmanın planlaması ve sonuçların değerlendirme kısımları iki yazar tarafından planlanmıştır. Hümeyra İspirli laboratuvar çalışmalarını yürütmüş ve makalenin orijinal taslağını oluşturmuştur. Makalenin yazım süreci ise Hümeyra İspirli ve Enes Dertli tarafından gerçekleştirilmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Bayburt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü (BAP) tarafından 2021/69001-01-01 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

Abouloifa, H., Rokni, Y., Bellaouchi, R., Ghabbour, N., Karboune, S., Brasca, M., Salah, R. B., Chihib, N. E., Saalaoui, E., Asehrou, A. (2020). Characterization of Probiotic Properties of Antifungal *Lactobacillus* Strains Isolated from

Traditional Fermenting Green Olives. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(2): 683-696, doi:10.1007/s12602-019-09543-8.

Aljahani, A. H. (2020). Microbiological and physicochemical quality of vegetable pickles. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 19(6): 415-421, doi:https://doi.org/10.1016/j.jssas.2020.07.001.

Amini, E., Salimi, F., Imanparast, S., Mansour, F. N. (2022). Isolation and characterization of exopolysaccharide derived from *Lactocaseibacillus paracasei* AS20 (1) with probiotic potential and evaluation of its antibacterial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 75(4): 967-981, doi.org/10.1111/lam.13771.

Bağder Elmacı, S., Tokatlı, M., Dursun, D., Özçelik, F., Şanlıbaba, P. (2015). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles of the Çubuk region in Turkey. *Folia Microbiologica*, 60(3): 241-251, doi:10.1007/s12223-014-0363-x.

Behera, S. S., El Sheikha, A. F., Hammami, R., Kumar, A. (2020). Traditionally fermented pickles: How the microbial diversity associated with their nutritional and health benefits? *Journal of Functional Foods*, 70, 103971, https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103971.

Bhunia, A.K. (2018). Molds and Mycotoxins. In: *Foodborne Microbial Pathogens*, Springer, New York, NY, pp. 167-174.

Chakraborty, P., Dey, A., Gopalakrishnan, A. V., Swati, K., Ojha, S., Prakash, A., Kumar, D., Ambasta, R. K., Jha, S. K., Dewanjee, S. (2023). Glutamatergic Neurotransmission: A Potential Pharmacotherapeutic Target for the Treatment of Cognitive Disorders. *Ageing Research Reviews*, 101838, https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101838.

Chen, O., Hong, Y., Ma, J., Deng, L., Yi, L., Zeng, K. (2021). Screening lactic acid bacteria from pickle and cured meat as biocontrol agents of *Penicillium digitatum* on citrus fruit. *Biological Control*, 158, 104606, https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104606.

- Chen, Y.-s., Wu, H.-c., Pan, S.-f., Lin, B.-g., Lin, Y.-h., Tung, W.-c., Li, Y.-l., Chiang, C.-m., Yanagida, F. (2013). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from yan-taozih (pickled peaches) in Taiwan. *Annals of Microbiology*, 63(2): 607-614, DOI 10.1007/s13213-012-0510-z.
- Cho, Y.-R., Chang, J.-Y., Chang, H.-C. (2007). Production of γ -Aminobutyric Acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from Kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(1): 104-109.
- Coda, R., Rizzello, C. G., Gobbetti, M. (2010). Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous flours for the making of a functional bread enriched of γ -aminobutyric acid (GABA). *International journal of food microbiology*, 137(2-3): 236-245, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.010>
- Çetin, B. (2011). Production of probiotic mixed pickles (Tursu) and microbiological properties. *African Journal of Biotechnology*, 10(66): 14926-14931, DOI: 10.5897/AJB11.2621.
- Demirbaş, F., İspirli, H., Kurnaz, A. A., Yılmaz, M. T., Dertli, E. (2017). Antimicrobial and functional properties of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs. *LWT-Food Science and Technology*, 79: 361-366, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.067>.
- Dertli, E., Mercan, E., Arıcı, M., Yılmaz, M. T., Sağdıç, O. (2016). Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics. *LWT - Food Science and Technology*, 71:116-124, doi:doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.030.
- Di Biase, M., Le Marc, Y., Bavaro, A. R., De Bellis, P., Lonigro, S. L., Lavermicocca, P., Postollec, F., Valerio, F. (2022). A predictive growth model for pro-technological and probiotic *Lactocaseibacillus paracasei* strains fermenting white cabbage. *Frontiers in Microbiology*, 13, doi: 10.3389/fmicb.2022.907393.
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33(1): 1-10, doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.003>.
- Dušková, M., Morávková, M., Mrázek, J., Florianová, M., Vorlová, L., Karpíšková, R. (2021). Assessment of antibiotic resistance in starter and non-starter lactobacilli of food origin. *Acta Veterinaria Brno*, 89(4): 401-411, <https://doi.org/10.2754/avb202089040401>.
- Encu, Ş. B., Soykut, E. A., Çakır, İ. (2022). geleneksel yoğurtlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin MALDI TOF MS biotyper sistemi ile tanımlanması ve bazı starter kültür özelliklerinin belirlenmesi. *Gıda*, 47(6): 1059-1082, doi: 10.15237/gıda.GD22088.
- Erten, H., Boyacı-Gündüz, C. P., Ağırman, B., Cabaroğlu, T. (2016). Fermentation, pickling and Turkish table olives. *Handbook of vegetable preservation and processing*, 209-230.
- Hassanzadazar, H., Ehsani, A., Mardani, K. (2014). Antibacterial activity of *Enterococcus faecium* derived from Koopeh cheese against *Listeria monocytogenes* in probiotic ultra-filtrated cheese. *Veterinary research forum: an international quarterly journal*, 5 (3):169 – 175.
- Huang, J., Mei, L. H., Wu, H., Lin, D. Q. (2007). Biosynthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) using immobilized whole cells of *Lactobacillus brevis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 865-871, DOI 10.1007/s11274-006-9311-5.
- Huang, Y., Luo, Y., Zhai, Z., Zhang, H., Yang, C., Tian, H., Li, Z., Feng, J., Liu, H., Hao, Y. (2009). Characterization and application of an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* 05-10 isolated from Sichuan Pickle, a traditionally fermented vegetable product from China. *Food Control*, 20(11): 1030-1035. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.12.008>
- Hwanhlem, N., Buradaleng, S., Wattanachant, S., Benjakul, S., Tani, A., Maneerat, S. (2011). Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (*Plasom*) and production of *Plasom* from selected strains. *Food Control*, 22(3-4): 401-407, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.010>.

- Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., Sansawa, H. (2003). Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European journal of clinical nutrition*, 57(3): 490-495.
- İspirli, H., Dertli, E. (2021). Detection of fructophilic lactic acid bacteria (FLAB) in bee bread and bee pollen samples and determination of their functional roles. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(5), e15414, <https://doi.org/10.1111/jfpp.15414>.
- İspirli, H., Demirbaş, F., Dertli, E. (2015). Characterization of functional properties of *Enterococcus faecium* strains isolated from human gut. *Canadian journal of microbiology*, 61(11): 861-870, <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0446>.
- Jin, Y., Wu, J., Hu, D., Li, J., Zhu, W., Yuan, L., Chen, X., Yao, J. (2023). Gamma-Aminobutyric Acid-Producing *Levilactobacillus brevis* Strains as Probiotics in Litchi Juice Fermentation. *Foods*, 12(2):302, <https://doi.org/10.3390/foods12020302>.
- Jonganurakkun, B., Wang, Q., Xu, S. H., Tada, Y., Minamida, K., Yasokawa, D., Sugi, M., Hara, H., Asano, K. (2008). *Pediococcus pentosaceus* NB-17 for probiotic use. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(1): 69-73, <https://doi.org/10.1263/jbb.106.69>.
- Karasu, N. (2006). Turşu ve zeytinden antagonistik ve probiyotik özellikte laktik starter kültür eldesi. Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Denizli, Türkiye, 78 s.
- Kaya, Y., Erten, T., Vurmaz, M., İspirli, H., Şimşek, Ö., Dertli, E. (2022). Comparison of the probiotic characteristics of Lactic Acid Bacteria (LAB) isolated from sourdough and infant feces. *Food Bioscience*, 47, 101722, doi:<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101722>.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6): 1547–1549, doi: 10.1093/molbev/msy096.
- Lee, B.-H., Wu, S.-C., Shen, T.-L., Hsu, Y.-Y., Chen, C.-H., Hsu, W.-H. (2021). The applications of *Lactobacillus plantarum*-derived extracellular vesicles as a novel natural antibacterial agent for improving quality and safety in tuna fish. *Food Chemistry*, 340, 128104, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128104>.
- Liu, C., Xue, W.-j., Ding, H., An, C., Ma, S.-j., Liu, Y. (2022). Probiotic Potential of Lactobacillus Strains Isolated From Fermented Vegetables in Shaanxi, China. *Frontiers in Microbiology*, 12, 4168, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.774903>.
- Magnusson, J., Schnürer, J. (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and environmental microbiology*, 67(1):1-5, <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.1-5.2001>.
- Mao, B., Yin, R., Li, X., Cui, S., Zhang, H., Zhao, J., Chen, W. (2021). Comparative genomic analysis of *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from different niches. *Genes*, 12(2): 241, <https://doi.org/10.3390/genes12020241>.
- Mathur, S., Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International journal of food microbiology*, 105(3): 281-295, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008.
- Miura, D., Ito, Y., Mizukuchi, A., Kise, M., Aoto, H., Yagasaki, K. (2006). Hypocholesterolemic action of pre-germinated brown rice in hepatoma-bearing rats. *Life sciences*, 79(3): 259-264, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.01.001>.
- Monteagudo-Mera, A., Rastall, R. A., Gibson, G. R., Charalampopoulos, D., Chatzifragkou, A. (2019). Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 6463-6472, <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09978-7>.
- Moon, S. H., Kim, C. R., Chang, H. C. (2018). Heterofermentative lactic acid bacteria as a starter culture to control kimchi fermentation. *LWT*, 88, 181-188, doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.009>.

- Nakatani, Y., Fukaya, T., Kishino, S., Ogawa, J. (2022). Production of GABA-enriched tomato juice by *Lactiplantibacillus plantarum* KB1253. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 134(5): 424-431, <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.08.008>.
- Nasiri Moslem, M., Faezi Ghasemi, M., Amirmozafari, N., Ranji, N. (2022). Antimicrobial activity of *Pediococcus acidilactici* PTCC 1954 and *Leuconostoc mesenteroides* PTCC 1953 isolated from organic meat sausages. *Biological Journal of Microorganism*, doi.10.22108/bjm.2022.134313.1473.
- Park, K. B., Oh, S. H. (2007). Production of yogurt with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract. *Bioresource technology*, 98(8): 1675-1679, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.06.006>.
- Plokhov, A. Y., Gusyatiner, M. M., Yampolskaya, T. A., Kaluzhsky, V. E., Sukhareva, B. S., Schulga, A. A. (2000). Preparation of γ -aminobutyric acid using *E. coli* cells with high activity of glutamate decarboxylase. *Applied biochemistry and biotechnology*, 88, 257-265.
- Purutoğlu, K., İspirli, H., Yüzer, M. O., Serencam, H., Dertli, E. (2020). Diversity and functional characteristics of lactic acid bacteria from traditional kefir grains. *International Journal of Dairy Technology*, 73(1): 57-66, <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12633>.
- Sagdic, O., Ozturk, I., Yapar, N., Yetim, H. (2014). Diversity and probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from gilaburu, a traditional Turkish fermented European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) fruit drink. *Food Research International*, 64, 537-545, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.045>.
- Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4): 406-425, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
- Sathe, S., Nawani, N., Dhakephalkar, P., Kapadnis, B. (2007). Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6): 2622-2628, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03525.x>.
- Schurr, B. C., Hahne, H., Kuster, B., Behr, J., Vogel, R. F. (2015). Molecular mechanisms behind the antimicrobial activity of hop iso- α -acids in *Lactobacillus brevis*. *Food Microbiology*, 46, 553-563, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.09.017>.
- Štšepetova, J., Taelma, H., Smidt, I., Hütt, P., Lapp, E., Aotäht, E., Mändar, R. (2017). Assessment of phenotypic and genotypic antibiotic susceptibility of vaginal *Lactobacillus* sp. *Journal of Applied Microbiology*, 123(2): 524-534, doi:<https://doi.org/10.1111/jam.13497>.
- Suzuki, S., Kimoto-Nira, H., Suganuma, H., Suzuki, C., Saito, T., Yajima, N. (2014). Cellular fatty acid composition and exopolysaccharide contribute to bile tolerance in *Lactobacillus brevis* strains isolated from fermented Japanese pickles. *Canadian journal of microbiology*, 60(4): 183-191, <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0043>.
- Tamura, K., Nei, M., Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(30): 11030-11035, <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>.
- Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Chobert, J., Ivanova, I., Dousset, X. (1999). Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. *International journal of food microbiology*, 48(3): 167-177, [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00048-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00048-3).
- Tokatlı, M. (2013). Ankara çubuk yöresi turşularından izole edilen laktik asit bakterilerinin tanımlanmaları, teknolojik ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi ve starter olarak kullanıma olanaklarının değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara, Türkiye, 183 s.
- Tokatlı, M., Elmacı, S. B., İşleyen, N. A., Özçelik, F. (2019). Seçilmiş endojen laktik starter kültürler ile turşu üretimi. *Gıda*, 44(4): 742-757, <https://doi.org/10.15237/gida.GD19081>.

- Tokatlı, M., Gülgör, G., Bağder Elmacı, S., Arslankoz İşleyen, N., Özçelik, F. (2015). In vitro properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. *BioMed Research International*, *7*(1), 1-1, <https://doi.org/10.1155/2015/315819>.
- Villegas, J. M., Brown, L., de Giori, G. S., Hebert, E. M. (2016). Optimization of batch culture conditions for GABA production by *Lactobacillus brevis* CRL 1942, isolated from quinoa sourdough. *LWT-Food Science and Technology*, *67*, 22-26, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.027>.
- Wang, C.-Y., Lin, P.-R., Ng, C.-C., Shyu, Y.-T. (2010). Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*, *16*(6): 578-585, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.10.003>.
- Wu, Q., Shah, N. P. (2017). High γ -aminobutyric acid production from lactic acid bacteria: emphasis on *Lactobacillus brevis* as a functional dairy starter. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(17): 3661-3672. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1147418>.
- Xiong, T., Guan, Q., Song, S., Hao, M., Xie, M. (2012). Dynamic changes of lactic acid bacteria flora during Chinese sauerkraut fermentation. *Food control*, *26*(1): 178-181, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.027>.
- Yildirim, Z., Yildirim, M. (2001). Characterization of buchnericin LB produced by *Lactobacillus buchneri* LB. *Turkish Journal of Biology*, *25*(1): 73-82.
- Yuliana, N., Nurdjanah, S., Margareta, M. (2013). The Effect of a mixed-starter culture of lactic acid bacteria on the characteristics of pickled orange-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Microbiology Indonesia*, *7*(1), 1-1, <https://doi.org/10.5454/mi.7.1.1>.
- Zarzecka, U., Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., Adamski, P. (2023). High-pressure processing effect on conjugal antibiotic resistance genes transfer in vitro and in the food matrix among strains from starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, *110104*, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110104>.
- Zeng, Y., Li, Y., Wu, Q., Zhang, J., Xie, X., Ding, Y., Cai, S. Z., Ye, Q. H., Chen, M. T., Xue, L., Wu, S., Zeng, H. Y., Yang, X. J., Wang J. (2020). Evaluation of the antibacterial activity and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* isolated from Chinese homemade pickles. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, *2020*, 1-11, <https://doi.org/10.1155/2020/8818989>.
- Zielińska, D., Rzepkowska, A., Radawska, A., Zieliński, K. (2015). In vitro screening of selected probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermented cabbage and cucumber. *Current microbiology*, *70*, 183-194, DOI [10.1007/s00284-014-0699-0](https://doi.org/10.1007/s00284-014-0699-0).