



**LACTOBACILLUS CİNSİ BAKTERİLERİN LİYOFİLİZE  
EKZOPOLİSAKKARİTLERİNİN BİFİDOBAKTERİLERİN GELİŞİMİNİ  
DÜZENLEYİCİ ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

**Dilek Uzundağ<sup>1\*</sup>, Zehranur Yüksekdağ<sup>1</sup>, Mustafa Uludağ<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup>Bilyem Gıda Sanayi ve Tic. Ltd. Şti., Yenikent, Ankara, Türkiye

Geliş / Received: 15.11.2019; Kabul / Accepted: 29.04.2020; Online baskı / Published online: 11.05.2020

Uzundağ, D., Yüksekdağ, Z. Uludağ, M. (2020). *Lactobacillus* cinsi bakterilerin liyofilize ekzopolisakkaritlerinin bifidobakterilerin gelişimini düzenleyici etkisinin belirlenmesi. *GIDA* (2020) 45(3) 496-505 doi: 10.15237/gida.GD20015

Uzundağ, D., Yüksekdağ, Z. Uludağ, M. (2020). *Determination of the lyophilized exopolysaccharides of Lactobacillus bacteria bifidogenic growth stimulator effect. GIDA* (2020) 45(3) 496-505 doi: 10.15237/gida.GD20015

## ÖZ

Bu çalışmada, Ankara ilinin farklı bölgelerinden temin edilen serbest dolaşan köy tavuklarının gastrointestinal sisteminden *Lactobacillus* cinsine ait 119 bakteri izole edilmiştir. Yüksek ekzopolisakkarit (EPS) üretim kapasitesine sahip 11 izolat seçilmiştir. Seçilen izolatların biyokimyasal ve moleküler tanımlamaları gerçekleştirilmiş ve tanımlama sonuçlarına göre 6 izolatın *Lactobacillus salivarius*, 2 izolatın *Lactobacillus agilis*, 2 izolatın *Lactobacillus reuteri* ve 1 izolatın da *Lactobacillus saerimneri* olduğu tespit edilmiştir. Yüksek EPS üreten 3 suşun (*L. salivarius* ZDM2132, BİS312 ve BİS722) EPS'leri kültür ortamından izole edilerek liyofilize edilmiştir. *Bifidobacterium gallinarum* ATCC 33777 suşunun, *L. salivarius* ZDM2132, BİS312 ve BİS722 bakterilerden elde edilen liyofilize EPS'yi (I-EPS) fermente edebilme kapasitesi ve bifidobakterilerin gelişimini düzenleyici (BGD) etkileri ticari bir prebiyotik olan inülin ile karşılaştırılmıştır. I-EPS'lerin *B. gallinarum* tarafından fermente edildiği ve inülininden daha iyi bir BGD etkisi gösterdiği gözlemlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Gıda endüstrisi, Ekzopolisakkarit, Prebiyotik, Bifidobakterilerin Gelişimini Düzenleyici (BGD) etki, Endüstriyel biyoloji.

## DETERMINATION OF THE LYOPHILIZED EXOPOLYSACCHARIDES (L-EPS) OF LACTOBACILLUS BACTERIA BIFIDOGENIC GROWTH STIMULATOR EFFECT

### ABSTRACT

In this study, 119 bacteria belonging to the genus *Lactobacillus* were isolated from the gastrointestinal system of free-range village chickens obtained from different regions of Ankara. 11 isolates with high exopolysaccharide (EPS) production capacity were selected. Biochemical and molecular identification of the selected isolates was performed and according to the identification results, it was determined that 6 isolates were *Lactobacillus salivarius*, 2 isolates were *Lactobacillus agilis*, 2 isolates were *Lactobacillus reuteri* and 1 isolate was *Lactobacillus saerimneri*. EPS of 3 strains producing high EPS (*L. salivarius*

\* Yazışmalardan sorumlu yazar /Corresponding author

✉ dilekuzundag@gmail.com

☎ (+90) 507 881 4885

Dilek Uzundağ; ORCID no: 0000-0002-6256-574X

Zehranur Yüksekdağ; ORCID no: 0000-0002-0381-5876

Mustafa Uludağ; ORCID no: 0000-0003-1976-162X

ZDM2132, BIS312, and BIS722) were isolated from the culture medium and lyophilized. In the study, the ability of *Bifidobacterium gallinarum* ATCC 33777 strain to ferment lyophilized EPS (l-EPS) obtained from *L. salivarius* ZDM2132, BIS312 and BIS722 bacteria were determined. In addition, the effects of l-EPS the bifidogenic growth stimulator (BGD) were compared to inulin that a commercial prebiotic. l-EPSs are fermented by *B. gallinarum* and have been shown to show a better BGD effect than inulin.

**Keywords:** Food industry, Exopolysaccharides, Prebiotic, Bifidogenic Growth Stimulator effect, Industrial biology.

## GİRİŞ

Dünyadaki temel sorunlardan biri ve belki de en önemlisi, insan beslenmesidir. Bu nedenle, bitki ve hayvan kaynaklarının iyi şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu amaca ulaşmak için hayvanlardan maksimum ve en ekonomik verimi sağlamak, başka bir ifadeyle, yemden yararlanmayı artırmak için çeşitli yöntemler geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam edilmektedir. Sürekli büyüme gösteren kanatlı sektöründe bazı stres faktörleri, hastalıklar ve diğer olumsuz çevresel koşullar nedeniyle ciddi ekonomik kayıplar meydana gelebilmektedir. Hem kayıpların azaltılması hem de verimin artırılmasına yönelik olarak daha çok antibiyotiklerden yararlanılmaktadır (İbrahim vd., 2019). Ancak yemlerde antibiyotiklerin kullanılması, insan ve hayvanlarda dirençli bakteri gelişimine sebep olması ve kanatlı etinde kalıntı bırakması nedeniyle AB ülkelerinde antibiyotiklerin hayvansal üretimde kullanılması yasaklanmıştır. Antibiyotik kullanımının hayvanlar üzerinde yasaklanması ile kanatlı endüstrisi işletmecileri ve sağlıklı ürün arayışında olan tüketiciler bilim insanlarını bir araya sürükleyerek alternatif maddelerin üretimine dair yeni çalışmalara yönlendirmiştir (Toghyani ve Faghan 2017; Tayeri vd., 2018). Kanatlı hayvan endüstrisinde tüm dünyada antibiyotikli büyüme destekçilerinin kullanımına yönelik yasaklardan dolayı antibiyotikli yemlere alternatiflere artan bir ihtiyaç doğmuştur. Prebiyotik, probiyotik ve bunların sinbiyotik olarak kombinasyonu alternatif olarak kabul edilmektedir (Gadde vd., 2017). Mikrobiyal prebiyotiklerin antibiyotikli yemlere ve bitkisel kaynaklı prebiyotik katkı maddelerine alternatif olarak tercih edilme nedenlerinin bağırsakta yer alan yararlı mikroorganizmaların sayısını arttırmalarından dolayıdır. Probiyotiklerin tercih nedeninin ise bağırsak mikrobiyotasındaki hastalıkları

engellemesi veya azaltması, antibiyotiklerle bozulan bağırsak biyotasının dengesini yeniden kurmasıdır (Shao vd., 2015; El-Shall vd., 2020).

Beslenme ve sağlık açısından sindirim sistemi mikroorganizmalarının ve bu mikroorganizmaların aktivitesini ve/veya gelişimini seçici olarak uyaran ve bağırsakta enteropatojen olmayan bakterilerin kolonizasyonunu kolaylaştıran, konakçı sağlığını olumlu yönde etkileyen, fermente olabilen prebiyotiklerin kanatlı hayvanlar için yararlı ve sağlıklı bir mikrobiyota oluşturdukları bildirilmektedir (Chen vd., 2017). Kanatlıların bağırsak mikrobiyotasında sağlığı iyileştirme özellikleri, tavuklarda verim ve performans özelliklerini arttırmalarından dolayı prebiyotikler, son yıllarda yem katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Caly vd., 2015; El-Shall vd., 2020). İnülin, GOS, FOS ve ksilo-oligosakkaritler gibi prebiyotikler bağırsak mikrobiyotasını uyaran ve sindirilemeyen oligosakkaritlerdir. Bağırsak mikrobiyotasında doğal olarak bulunan ve asıl yerleşim yerleri kalın bağırsak olan bifidobakteriler, sindirilemeyen bu kompleks oligosakkaritleri en küçük yapı taşları olan monosakkaritlere parçalarlar ve prebiyotikleri enerji kaynağı olarak kullanırlar (Hidalgo vd., 2017).

Bu çalışmada, tavuklarda doğal gastrointestinal mikrobiyota elemanı olan laktobasil cinsi bakterilerin izole edilmesi, kültür ortamında yüksek EPS üretim yeteneğine sahip izolatların seçilerek tanımlamalarının yapılması hedeflenmiştir. Ayrıca yüksek EPS üreten 3 suşun (*L. salivarius* ZDM2132, BIS312 ve BIS722) lyofilize EPS'lerin, EPS'lerin prebiyotik olarak değerlendirilmesinde kullanılan kriterlerden biri olan, *B. gallinarum* gelişimi üzerine etkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Bakteri İzolasyonu ve Fenotipik

#### Karakterizasyon

Çalışmada, izolasyon materyali olarak Ankara ilinin 4 farklı bölgesinden (Yenikent, Soğulcak, Yatsören, Beypazarı) temin edilen 29 farklı serbest dolaşan köy tavuğu bağırsağı kullanılmıştır. Tavuklarda izofluran anestezisi kullanılarak ötenazi uygulanmış, ardından servikal dislokasyon yapılarak bağırsakları aseptik olarak çıkarılmış, steril plastik torbalara konulmuş ve hemen mikrobiyal analiz için laboratuvara getirilmiştir. Aseptik koşullarda laboratuvara getirilen bağırsakların her birinden 10 g alınmış ve MRS (de Man, Ragosa Sharpe) sıvı besiyerinde (40 mL) zenginleştirilmiştir. Aerobik şartlar altında homojen çalkalama ile 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 900 µL'lik hazırlanan fizyolojik su içerisine örnekten 100 µL ilave edilerek farklı dilüsyonları hazırlanmıştır. Örnekten hazırlanan 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> ve 10<sup>-6</sup> dilüsyonlarından MRS katı besiyerine ekimler yapıp 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyerlerinde gelişen beyaz ve kremi koloniler seçilmiştir. Saf kültürler, Gram boyama, hücre morfolojisi, katalaz ve koagülaz reaksiyonu ile LAB olarak karakterize edilmiştir. Gram pozitif, katalaz ve koagülaz negatif izolatlar seçilmiş ve -20°C'de %28 gliserol (Merck) içeren MRS sıvı besiyerlerinde saklanmıştır. Stok kültürler her kullanımdan önce MRS besiyerinde iki kez alt kültürleme ile aktifleştirilmiştir (Reuben vd., 2019).

#### İzolatların Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu

Tavukların GIS den 119 *Lactobacillus* cinsine ait 119 bakteri izole edilmiştir; kültür ortamında EPS üretim kapasitesi tespit edilen (sonuçlar verilmemiştir) ve yüksek EPS üreticisi 11 izolat tanımlanmak amacı ile seçilmiştir. Elde edilen 11 izolatın farklı sıcaklıklarda (15, 30, 45 ve 50°C), farklı tuz oranlarında (%2, %4 ve %6.5), farklı pH'larda (3.5; 4.5; 8.5 ve 9.5) gelişebilme yetenekleri ve glikozdan gaz oluşumu incelenerek ön tanımlamaları ile cins bazında ayrımları sağlanmıştır. Ayrıca izolatların şeker kullanımlarını belirlemek için API 50 CHL test kitinden (BioMérieux, Marcy l'Étoile France)

yararlanılmıştır. İzolatların API sonuçlarının değerlendirilmesi, API WEB (NTSYSpc 2.0) programında standart ATCC suşlarının API sonuçları ile karşılaştırılarak yapılmıştır.

İzolatların genomik DNA izolasyonu, MRS besiyerinde 37°C'de 18-20 saat üretilen kültürlerden ticari DNA izolasyon kiti (Fermentas, K0512) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen genomik DNA moleküllerinin saflık kontrolü 260/280 ve 230 µL'deki absorbanları dikkate alınarak 260/280 ve 260/230 oranları ile belirlenmiştir. İzole edilen DNA'lar kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir. Yaklaşık 1500 bp'lik 16S rRNA gen dizilerinin çoğaltıldığı polimeraz zincir reaksiyonu, bakterilerin 16S rRNA gen bölgesine spesifik olan 27F ileri (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ve 1492R geri (5'-TACGGTTACCTTGTACGACTT-3') primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonu için 1 örneğe toplamda 50 µL olacak şekilde 5 µL genomik DNA, 5 µL 10xKCl reaksiyon buffer, 5 µL MgCl<sub>2</sub> (25mM), 27 µL steril dH<sub>2</sub>O, 1.5 µL ileri primer (10 mM), 1.5 µL geri primer (10 mM), 1 µL dNTP karışımı (her biri 2 mM), 4 µL Taq DNA polimeraz (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, ABD) hazırlanmıştır. Bu karışım Veriti™ Thermal Cycler cihazı (Applied Biosystems) kullanılarak; 4 dakika boyunca 94°C'de, 45 saniye 35 döngüde 94°C'de denatürasyon, 45 saniye 59°C'de bağlanma, 1 dakika 72°C'de uzama ve 5 dakika 72°C'de son uzaması gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri, 100 bp'lik marker kullanılarak % 1.5'lük agaroz jel elektroforezinde 70 V'da 2.5-3 saat yürütülmüştür. PCR ürünlerinin moleküler ağırlıkları, Bio-Rad görüntüleme sistemi yardımıyla hesaplanmıştır. 16S rRNA gen bölgesinin baz dizisini belirlemek amacıyla çift yönlü dizi analizi Ref-Gen Biyoteknoloji merkezinde hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları blast fonksiyonu ile NCBI (National Center for Biotechnology Information) DNA Gen Bankası verilerinde karşılaştırılarak moleküler tanımlamaları yapılmıştır.

### **Lactobacillus** Suşlarından EPS İzolasyonu

Bakterilerinden EPS izolasyonu, Tsuda ve arkadaşlarının (2008) kullandığı metotta bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Aktif bakteriler Den-1 cihazında (Densitometer, bioSan, Australia) McFarland 7 bulanıklık değerine ayarlanarak standart bir bulanıklık değeri oluşturulduktan sonra, 800 mL MRS besiyerine %2 oranında aşılınmış ve 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 95°C'de sıcak su banyosunda 10 dk. benmari usulü ısıtılmıştır. Oda sıcaklığına gelen örnekler, %4 oranında trikloroasetik asit (%80 TCA-Sigma) ile homojenize edilip, santrüfuj edilmiştir. Filtratların üzerine hacmin üç katı kadar soğuk %96'lık etanol ilave edilip 1 gün boyunca +4°C'de bekletilmiştir. Ardından tekrar santrifuj edilerek EPS'nin presipite olması sağlanmıştır. Elde edilen EPS'ler steril distile suda çözüldükten sonra, liyofilizasyon tüplerine (vial) alınıp bir gece -80°C'de bekletilmiş ve EPS'ler liyofilizatör cihazında (Christ alpha 2-4 LD plus, Germany), dondurulup kurutulularak toz hâline (l-EPS) getirilmiştir.

### **l-EPS'lerin Bifidobakteriler Tarafından Fermente Edilmesi**

*Bifidobacterium gallinarum* ATCC 33777 suşunun l-EPS'yi fermente edip edemediğini araştırmak için, Bifidus Selective Medium (BSM) besiyerinde bulunan glikoz çıkarılmış ve yerine aynı oranda yüksek EPS üretim yeteneğine sahip olan *L. salivarius* ZDM 2132, BİS 722 ve BİS 312 suşlarından elde edilen (l-EPS<sub>ZDM2132</sub>, l-EPS<sub>BİS722</sub> ve l-EPS<sub>BİS312</sub>) l-EPS'ler eklenmiştir. *B. gallinarum* ATCC 33777 McFarland 7 bulanıklık değerine ayarlanmış ve modifiye besi yerine %2 oranında aşılınarak, 37°C'de ve %10 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde (Panasonic, Japon) 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Tsuda vd., 2008). İnkübasyon sonucunda kültürlerin canlılık değerleri seri dilüsyonlar yapılarak log kob/mL cinsinden hesaplanmıştır.

### **l-EPS'lerin Bifidobakter Gelişimini Düzenleyici (BGD) Etkisinin Belirlenmesi**

Farklı konsantrasyonlarda (%2.5, %5 ve %10) l-EPS<sub>ZDM2132</sub>, l-EPS<sub>BİS722</sub> ve l-EPS<sub>BİS312</sub>'lerin bifidobakteri gelişimini düzenleyici (BGD) etkisi

belirlenmiştir. Glikozu tamamen çıkarılmış ve içerisinde ayrı ayrı %2.5, %5 ve %10 oranlarında l-EPS<sub>ZDM2132</sub>, l-EPS<sub>BİS722</sub> ve l-EPS<sub>BİS312</sub> bulunan 5 mL steril BSM besiyerlerine, McFarland 7 bulanıklık değerindeki *B. gallinarum* ATCC 33777 %2 oranında aşılandıktan sonra 37°C'de ve %10 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde (Panasonic, Japon) en iyi gelişim süresi olan 24 saatte inkübasyona bırakılmıştır. Negatif kontrol olarak steril glikozsuz BSM besiyeri, pozitif kontrol olarak aynı oranlarda ticari bir prebiyotik olan inülin kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda kültürlerin canlılık değerleri seri dilüsyonlar yapılarak koloni sayım formülüne göre log kob/mL cinsinden hesaplanmıştır.

### **SONUÇ VE TARTIŞMA**

Gastrointestinal sistem (GİS) bir sindirim sistemi organı olmasının yanında baştan sona lenfoid doku niteliğinde olan mukozası ile en büyük bağışıklık sistemi organıdır (Bai vd., 2016). Organizmalarda bağırsak mikrobiyotasının yapısı beslenme, hastalık, çevresel faktörler, antibiyotik tedavisi gibi nedenlere bağlı olarak değişmektedir. Sağlıklı bir mikrobiyota bağırsak epitel hücrelerinde oluşturduğu bariyer sayesinde organizmayı, tüketilen besinler aracılığı ile alınan patojen bakterilerden ve antijenlerinden korumaktadır. GİS mikrobiyotasının dengesi patojenler, antijenler, oksidatif stres, radyasyon vb. faktörlerle bozulduğu zaman, normal mikrobiyotanın oluşturduğu bariyer ortadan kalkmakta ve mikrobiyota dengesi patojen mikroorganizmalar lehine kaymaktadır. Bunun sonucu olarak, bağırsak faaliyetlerinde bozulma, toksin oluşumu, kanser, karaciğer rahatsızlıkları ve bağırsak enfeksiyonları ortaya çıkabilmektedir (Alloui vd., 2013). Tavuk sindirim sisteminde insanda da olduğu gibi birbirinden farklı birkaç yüz bakteri vardır ve bu mikroorganizmalar bağırsak mikrobiyotasını oluşturmaktadırlar (Apajalahti vd., 2004; Han vd., 2016). Konağın sağlıklı bir şekilde yaşamına devam edebilmesi için bu mikrobiyotadaki yararlı ve zararlı bakterilerin denge içinde olması gerekmektedir (Baldwin vd., 2018).

Endüstriyel uygulamalarda araştırmaların en temel amacı kullanılacak bakterilerin seçimidir. Bu

nedene kullanılacak izolatların tanımlanmasında doğru, belirgin ve spesifik olarak ayırım sağlayan güvenilir yöntemlerin seçilmesi gerekmektedir (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011). Bu çalışmada 29 adet tavuğun gastrointestinal sisteminden 119 bakteri izolasyonu yapılmıştır. İzolatların 8'i Yenikent (%7), 15'i Soğulcak (%14), 28'i Yatsören (%26), 9'u Beypazarı (%8) ve 49'u Çalta'dan (%45) elde edilmiştir. Daha sonra izolatların kültür ortamındaki EPS üretim kapasiteleri tespit edilmiş (sonuçlar verilmemiştir) ve izolatlar arasından yüksek EPS üretme

kapasitelerine göre 11 bakteri seçilmiştir. İzolatların saf kültürleri elde edildikten sonra ilk olarak Gram boyama, mikroskopik morfolojisi ve katalaz testi yapılmıştır. Daha sonra izolatların cins düzeyinde tanımlanması amacıyla biyokimyasal ve fizyolojik testler uygulanmıştır. Çubuk şeklindeki izolatların tanımlanmasında; glukozdan gaz oluşturma, farklı sıcaklık (15, 30, 45 ve 50°C), tuz (%2, %4 ve %6.5) ve pH (3.5/ 4.5/ 8.5 ve 9.5)'da gelişebilme ve katalaz testlerinden yararlanılmıştır. Sonuçlar Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. İzolatların biyokimyasal tanımlamaları  
Table 1. Biochemical definitions of isolates

İzolatlar	HO/ HE	Gram reaksiyonu	Katalaz	pH 3.5	pH 4.5	pH 8.5	pH 9.5	%2'lik NaCl	%4'lik NaCl	%6,5'lik NaCl	15°C'de gelişme	30°C'de gelişme	45°C'de gelişme	50°C'de gelişme
isolates	HO/ HE	Gram reaction	Catalase	pH 3.5	pH 4.5	pH 8.5	pH 9.5	%2 NaCl	%4 NaCl	%6.5 NaCl	Development at 15 °C	Development at 30 °C	Development at 45 °C	Development at 50 °C
ZDM 2132	HO	+	-	±	+	±	±	+	+	-	-	+	+	-
312	HO	+	-	±	+	±	±	+	+	-	-	+	+	-
722	HO	+	-	±	+	±	±	+	+	+	-	+	+	-
721	HO	+	-	±	+	±	±	+	+	+	-	+	+	-
731	HO	+	-	±	+	±	±	+	+	-	-	+	+	-
911	HO	+	-	±	+	±	±	+	+	+	-	+	+	-
713	HO	+	-	±	+	±	±	+	+	+	-	+	+	-
612	HO	+	-	±	+	±	±	+	+	-	-	+	+	-
412	HO	+	-	±	+	±	±	+	+	-	-	+	+	-
717	HO	+	-	±	+	±	±	+	+	-	-	+	+	-
820	HO	+	-	±	+	±	±	+	+	-	-	+	+	-

HO: Homofermantatif

HE: Heterofermantatif

+: Gelişme iyi

-: Gelişme yok

±: Gelişme az

HO: Homofermantative

HE: Heterofermantative

+: Good improvement

-: No improvement

±: Little improvement

Bakterilerin karbohidrat fermentasyon karakterizasyonu hakkında bilgi sağlayarak tanımlamayı kolaylaştıran API (Analytical Profile Index) sistemi, laktik asit bakterilerinin tür düzeyinde belirlenebilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Kültürlerin tür düzeyinde belirlenebilmesi amacıyla API 50 CHL test kitinden (BioMérieux, Marcy l'Étoile Fransa) yararlanılmıştır. API 50 CHL test kitinden alınan sonuçlar, 'API Tanımlama Yazılımı' (API Lab Plus ProGram, BioMérieux, Fransa) programında değerlendirilerek, izolatlar tür düzeyinde belirlenmiştir. İzolatların %9'u *L. affmolactis*, %18'i *L. acidophilus*, %27'si *L. fermentum* ve %46'sı *L. salivarius* olarak tanımlanmıştır.

LAB tanımlamasında cins ve tür bazında ayrımı için halen kullanılan ve yorumlaması zor, zaman alıcı ve daha az ayırım gücüne sahip olan fenotipik yöntemlerin yerine moleküler yöntemler tercih edilmektedir (Bennani vd., 2017). Çalışmamızda, tür ve alt tür düzeyinde tanımlama yapan API testinin sonuçları ile biyokimyasal tanımlama testlerinin sonuçları arasında bazı uyumsuzluklar olduğu görülmüş ve bu durumun API testinde yapılan tanımlamaların düşük oranda (%90'nın altı) olmasından kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır. Fenotipik ve biyokimyasal

tanımlamalar halen önemli bir rol oynasa da yorumlaması oldukça zor ve zaman alıcıdır. Bu yöntemler moleküler yöntemlere göre daha az ayırım gücüne sahip olduklarından çalışmamızda, 11 izolatın moleküler tanımlamaları yapılmıştır. Bakteriler 16S rRNA dizi analizinden elde edilen baz sıralarının NCBI BLAST veri tabanındaki sonuçlarına göre; 11 izolattan 6'sı *L. salivarius*, 2'si *L. reuteri*, 2'si *L. agilis* ve 1'i *L. saerimneri* olarak tanımlanmıştır. API ve moleküler tanımlama sonuçlarında, yalnız 4 izolatta benzer sonuçlar elde edilirken 7 izolat için farklı türler tanımlanmıştır (Çizelge 2). Kobierecka vd (2017), 64 tavuğun gastrointestinal sisteminden toplam 107 *Lactobacillus* sp. izole etmişler ve moleküler tanımlama sonucuna göre *L. salivarius* (%68) ve *L. agilis* (%12) türlerinin diğer *Lactobacillus* türlerinde göre daha yaygın olduğunu bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmada, tavuktan izole edilen 46 izolat *L. salivarius* (n=15), *L. johnsonii* (n=11), *L. crispatus* (n=5), *L. ingluvei* (n=5), *L. reuteri* (n=5), *L. oris* (n=2) ve *L. saerimneri* (n=3) olarak tanımlamışlardır (Madej vd., 2015). Yapılan çalışmalar bizim çalışmamızı destekler nitelikte olup, tavukların mikrobiyotasında *L. salivarius* türünün baskın olduğu görülmektedir.

Çizelge 2. İzolatların API ve moleküler tanımlamaları

Table 2. API and molecular definitions of isolates

İzolat Kodu (Isolate Code)	API ile tanımlama (Identification with API)	% Tanımlama (% Identification)	16 S rRNA'ya göre tanımlama (To 16 S rRNA identification by)	% Tanımlama (% Identification)	EMBL / Genbank No	OD <sub>260/280</sub> nm
ZDM 2132	<i>L. salivarius</i>	99.9	<i>L. salivarius</i>	99	CP017107.1	1.98
BİS 312	<i>L. salivarius</i>	99.9	<i>L. salivarius</i>	99	CPO17107.1	1.92
BİS 412	<i>L. affmolactis</i>	98.2	<i>L. salivarius</i>	99	CPO17107.1	1.90
BİS 713	<i>L. fermentum</i>	93.9	<i>L. salivarius</i>	97	FJ751783.1	1.75
BİS 722	<i>L. salivarius</i>	87.0	<i>L. salivarius</i>	99	KP090132.1	1.89
BİS 820	<i>L. salivarius</i>	99.0	<i>L. salivarius</i>	99	CP017107.1	1.98
BİS 612	<i>L. acidophilus</i>	99.8	<i>L. reuteri</i>	99	JF927773.1	1.83
BİS 731	<i>L. fermentum</i>	89.7	<i>L. reuteri</i>	99	LC163917.1	1.83
BİS 717	<i>L. fermentum</i>	96.0	<i>L. saerimneri</i>	99	KU991812.1	2.00
BİS 721	<i>L. salivarius</i>	88.1	<i>L. agilis</i>	99	KP979478.1	1.92
BİS 911	<i>L. acidophilus</i>	90.7	<i>L. agilis</i>	98	AB911458.1	1.95

Probiyotik ve prebiyotikler gerek sağlıklı bir gelişme gerekse hastalıkların tedavisinde antibiyotiklerin yerine, doğal biyolojik ürünleri destekleyici alternatif ürünler olarak kullanılabilir (Clavijo vd., 2017). Fermente olabilen prebiyotikler, kümes hayvanlarının GIS'de mikrobiyal popülasyon üyelerinin sayılarını ve ürettikleri metabolitlerini arttırmakta ve konakçı sağlığını desteklemektedirler. Kümes hayvanlarının GIS sağlığını geliştirmek için son yıllarda tavuklarda yem katkısı olarak prebiyotiklerin kullanılması hız kazanmıştır (Tayeri vd., 2018; Baldwin vd., 2018). Prebiyotiklerin öneminin artmasından dolayı, bu çalışmada laktobasillerden elde edilen l-EPS'lerin prebiyotik katkı olarak kullanılabilirliğinin araştırılması için l-EPS'lerin (l-EPS<sub>ZDM2132</sub>, l-EPS<sub>BIS722</sub> ve l-EPS<sub>BIS312</sub>) bifidobakteriler tarafından fermente edilme yetenekleri ve bifidobakterilerin gelişimini düzenleyici (BGD) etkisi, ticari bir prebiyotik olan inülin ile karşılaştırılarak incelenmiştir.

Bir besin bileşeninin prebiyotik özellik taşıyabilmesi için sindirime dirençli olması, kolon mikrobiyota bakterileri tarafından hidrolize edilmesi, bir veya kısıtlı sayıda olmak üzere daha çok bakterinin çoğalmasını uyarması, konakçının sağlığı üzerinde olumlu etkileri olması gibi özellikleri taşıması beklenmektedir (Shang vd.,

2018). EPS'lerin prebiyotik etki göstermesinde, bağırsak mikrobiyotası için *Bifidobacterium* sp. gibi yararlı bakteriler tarafından fermente edilmesi gerektiği bildirilmektedir (Koraklı vd., 2002; Badel vd., 2011). Bu amaçla bu çalışmada l-EPS<sub>ZDM2132</sub>, l-EPS<sub>BIS722</sub> ve l-EPS<sub>BIS312</sub> *B. gallinarum* ATCC 33777 suşu tarafından fermente edilebilme özelliği araştırılmıştır. *B. gallinarum* ATCC 33777 suşu karbon kaynağı (glikoz) çıkarılmış BSM besiyerinde her üç l-EPS'yi (l-EPS<sub>ZDM2132</sub>, l-EPS<sub>BIS722</sub> ve l-EPS<sub>BIS312</sub>) sırasıyla 8.55 log kob/mL, 8.45 log kob/mL, 8.76 log kob/mL kullanarak BSM besiyerine göre (kontrol) gelişimlerini arttırmışlardır (8.0 log kob/mL). *B. gallinarum* ATCC 33777 suşu, ticari olarak kullanılan inülini de karbon kaynağı olarak kullanmıştır (8.02 log kob/mL) (Çizelge 3). Ancak çalışmamızda kullandığımız bakteri kültürlerinden elde edilen l-EPS'lerin *B. gallinarum*'un gelişimini daha çok arttırdığı belirlenmiştir. Salazar ve arkadaşları (2016) ise bazı bifidobakteri suşlarının, karbonhidrat modifiye enzimleri aracılığı ile mannoz içeren polisakaritleri fermente edebildiklerini tespit etmişlerdir. Çalışmamızda, *B. gallinarum*'un üç l-EPS'yi de ticari ve bitki kaynaklı prebiyotik olan inüline göre daha iyi bir şekilde fermente edebilmesinden dolayı tavuklarda yem katkısı olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür.

Çizelge 3. *B. gallinarum* ATCC 33777 suşunun l-EPS<sub>ZDM2132</sub>, l-EPS<sub>BIS722</sub> ve l-EPS<sub>BIS312</sub> ve inülini fermente edebilme kapasitesi

Table 3. *B. gallinarum* ATCC 33777 strain to l-EPS<sub>ZDM2132</sub>, l-EPS<sub>BIS722</sub> ve l-EPS<sub>BIS312</sub> and inulin fermenting capacity

	Besiyeri İçeriği (Media Content)	Canlılık sayısı (Viability number) (log kob/mL)
<i>Bifidobacterium gallinarum</i> ATCC 33777	BSM <sup>a</sup>	8.00 ± 0.2
	C-BSM <sup>b</sup>	6.20 ± 0.2
	l-EPS <sub>ZDM2132</sub> <sup>c</sup>	8.55 ± 0.2
	l-EPS <sub>BIS312</sub> <sup>c</sup>	8.45 ± 0.2
	l-EPS <sub>BIS722</sub> <sup>c</sup>	8.76 ± 0.2
	İnulin <sup>d</sup>	8.02 ± 1.3

a; BSM besiyeri.

b; Glikozu çıkarılmış BSM besiyeri.

c; Glikozu çıkarılmış BSM besiyerine %2 oranında l-EPS ilavesi ile hazırlanmıştır.

d; Glikozu çıkarılmış BSM besiyerine %2 oranında inülin ilavesi ile hazırlanmıştır

a; BSM media.

b; Glucose-removed BSM media.

c; Prepared by adding 2% l-EPS to the glucose-removed BSM medium.

d; Prepared by adding 2% inulin to glucose-removed BSM medium.

Bağırsak mikrobiyotasında bulunan bifidobakterilerin intestinal alanda birçok yararlı etkisi olduğundan gastrointestinal sistemdeki sayısının ve yararlı özelliklerinin artışının sağlanması için bugüne kadar laktuloz, frukto-oligosakkaritler, galakto-oligosakkaritler, soya oligosakkaritleri, izomalto-oligosakkaritler, glukto-oligosakkaritler ve inülin ile ilgili araştırmalar yapılmıştır. Bu karbonhidratlar bifidobakteriler tarafından seçici olarak fermente edilmekte ve bifidogenik aktivite göstermektedirler (Wang vd., 2015; Tarabees vd., 2018; Wang vd., 2020). Sarıkaya vd (2017) bu oligosakkaritlere alternatif olarak, laktik asit bakterilerinden elde edilen EPS'lerin bağırsak mikrobiyotası için yararlı olan bifidobakterilerin gelişimini düzenlediğini bildirmişlerdir.

Probiyotik bakterilerden elde edilen l-EPS'lerin, prebiyotik olarak kullanılabilmesi için öncelikle bağırsak mikrobiyotasında yaygın olarak bulunan ve faydalı bir bakteri cinsi olan bifidobakterilerin gelişimini düzenlemesi gerektiğinden, bu çalışmada l-EPS<sub>ZDM2132</sub>, l-EPS<sub>BIS722</sub> ve l-EPS<sub>BIS312</sub>'lerin BGD etkisinin ne düzeyde etkilediği ortaya konulmaya çalışılmıştır. Besiyerinde bulunan glikoz yerine, %2.5, %5 ve %10 oranında l-EPS<sub>ZDM2132</sub>, l-EPS<sub>BIS722</sub> ve l-EPS<sub>BIS312</sub>'ler ilave edilmiştir. Bifidobakterin gelişimi artan l-EPS konsantrasyonlarında kontrol besiyerine (BSM) göre önemli ölçüde arttırmıştır (Çizelge 4). En yüksek BGD aktivitesi %10 l-EPS<sub>BIS722</sub>'li kültür ortamında tespit edilmiştir (11.2 log kob/mL). Kültür ortamına %10 oranında l-EPS<sub>BIS722</sub>'li ilave edildiğinde *B. gallinarum* ATCC 33777 suşunun canlılığı %40 artmıştır. 3 *L. salivarius* suşundan da elde edilen l-EPS'ler en düşük konsantrasyonda (%2.5) dahi bitkisel kaynaklı ticari bir prebiyotik olan inülininden daha yüksek BGD etkisi göstermiştir. Yonezawa ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada, 19 *L. lactis* spp. suşunun *Bifidobacterium longum* BB536 suşuna olan etkisini incelemişler ve hücre duvarı bağlantılı proteinaz enzimine sahip olan suşların bifidobakteri gelişimini arttırdığını bildirmişlerdir.

*L. salivarius* suşlarından elde edilen l-EPS'lerin bifidobakterilerin gelişimini önemli ölçüde arttırmış olması ve tavuklarda ticari olarak

kullanılan bitkisel kaynaklı inüline kıyasla çok daha yüksek olması nedeniyle, tavuklarda prebiyotik yem katkı maddesi olarak değerlendirilme potansiyeli bulunmaktadır.

Çizelge 4. l-EPS<sub>ZDM2132</sub>, l-EPS<sub>BIS722</sub> ve l-EPS<sub>BIS312</sub>'lerin *B. gallinarum* ATCC 33777 suşunun gelişimini düzenleyici etkisi

Table 4. The regulatory effect of l-EPS<sub>ZDM2132</sub>, l-EPS<sub>BIS722</sub> ve l-EPS<sub>BIS312</sub>'s development of strain *B. gallinarum* ATCC 33777

<i>B. gallinarum</i> ATCC 33777 (log kob/mL)	
Kontrol <sup>a</sup> (Control <sup>b</sup> )	8.0 ± 0.0
C-BSM <sup>b</sup>	5.8 ± 0.2
l-EPS <sub>ZDM2132</sub> (%) <sup>c</sup>	
2.5	9.6 ± 0.1
5	9.7 ± 0.1
10	9.8 ± 0.0
l-EPS <sub>BIS312</sub> (%) <sup>c</sup>	
2.5	9.4 ± 0.0
5	9.4 ± 0.0
10	9.6 ± 0.2
l-EPS <sub>BIS722</sub> (%) <sup>c</sup>	
2.5	9.9 ± 0.1
5	10.6 ± 0.1
10	11.2 ± 0.1
İnülin (%) <sup>d</sup>	
2.5	6.5 ± 0.2
5	6.9 ± 0.2
10	7.1 ± 0.2

a; BSM besiyeri.

b; %2 glikozu çıkarılmış BSM besiyeri.

c; %2 glikozu çıkarılmış BSM besiyerine farklı oranlarda l-EPS ilave edilmiş besiyeri.

d; %2 glikozu çıkarılmış BSM besiyerine farklı oranlarda inülin ilave edilmiş besiyeri.

a; BSM media.

b; %2 Glucose-removed BSM media.

c; Fattening medium with different ratios of l-EPS added to BSM fattening medium with 2% glucose removed.

d; Fattening medium with different proportions of inulin added to the BSM fattening medium with 2% glucose removed.



## TEŞEKKÜR

Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'na TAGEM/15/AR-GE/40 nolu proje için vermiş oldukları araştırma-geliştirme desteklerinden dolayı teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

Alloui, M. N., Szczurek, W., Świątkiewicz, S. (2013). The usefulness of prebiotics and probiotics in modern poultry nutrition: A review. *Ann Anim Sci*, 13(1), 17-32.

Apajalahti, J., Kettunen, A., Graham, H. (2004). Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World's Poult Sci J*, 60(2), 223-232.

Badel, S., Bernardi, T., Michaud, P. (2011). New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnol Adv*, 29(1), 54-66.

Bai, K., Huang, Q., Zhang, J., He, J., Zhang, L., Wang, T. (2016). Supplemental effects of probiotic *Bacillus subtilis* fmbJ on growth performance, antioxidant capacity, and meat quality of broiler chickens. *Poult Sci*, 96(1), 74-82.

Baldwin, S.; Hughes, R.J.; Van, T.T.H.; Moore, R.J.; Stanley, D. (2018). At-hatch administration of probiotic to chickens can introduce beneficial changes in gut microbiota. *PLoS ONE*, 13, e0194825.

Bennani, S, Mchiouer, K., Rokni, Y., Meziane, M. (2017). Characterisation and identification of lactic acid bacteria isolated from Moroccan raw cow's milk. *J Mater Environ Sci*, 8(S), 4934-4944.

Caly, D.L.; D'Inca, R.; Auclair, E.; Drider, D. (2015). Alternatives to antibiotics to prevent necrotic enteritis in broiler chickens: A microbiologist's perspective. *Front Microbiol*, 6, 1336.

Chen, C. Y., Chen, S. W., Wang, H. T., (2017). Effect of supplementation of yeast with bacteriocin and *Lactobacillus* culture on growth performance, cecal fermentation, microbiota composition, and blood characteristics in broiler chickens. *Asian-Australas J Anim Sci*, 30(2); 211.

Clavijo, V., Flórez, M. J. V. (2017). The gastrointestinal microbiome and its association

with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. *Poult Sci*, 97(3), 1006-1021.

El-Shall, N.A., Awad, A.M., El-Hack, M.E.A., Naiel, M.A., Othman, S.I., Allam, A.A., Sedeik, M.E. (2020). The simultaneous administration of a probiotic or prebiotic with live salmonella vaccine improves growth performance and reduces fecal shedding of the bacterium in salmonella-challenged broilers. *Anim*, 10, 70.

Gadde, U., Kim, W.H., Oh, S.T., Lillehoj, H.S. (2017). Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: A review. *Anim Health Res Rev*, 18, 26-45.

Han, G.G., Kim, E.B., Lee, J., Lee, J.Y., Jin, G., Park, J., Huh, C.S., Kwon, I.K., Kil, D.Y., Choi, Y.J., Kong, C. (2016). Relationship between the microbiota in different sections of the gastrointestinal tract, and the body weight of broiler chickens. *Springerpl*, 5(1), 911.

Hidalgo-Cantabrana, C., Delgado, S., Ruiz, L., Ruas-Madiedo, P., Sanchez, B., Margolles, A. (2017). *Bifidobacteria* and their health-promoting effects. *Microbiol Spect*, 5(3).

Ibrahim, R.A., Cryer, T.L., Lafi, S.Q., Basha, E., Good, L., Tarazi, Y.H. (2019). Identification of *Escherichia coli* from broiler chickens in Jordan, their antimicrobial resistance, gene characterization and the associated risk factors. *BMC Vet Res*, 15(159), 2- 16.

Kıran, F., Osmanağaoğlu, Ö. (2011). Laktik asit bakterilerinin (LAB) identifikasyonunda/tiplendirmesinde kullanılan moleküler yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 27(1), 62-74.

Kobierecka, P. A., Wszyńska, A. K., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Kuczkowski, M., Tuzimek, A., Piotrowska, W., Jagusztyn-Krynicka, E. K. (2017). *In vitro* characteristics of *Lactobacillus* spp. strains isolated from the chicken digestive tract and their role in the inhibition of *Campylobacter* colonization. *Microbiol*, 6(5), e00512.

Korakli, M., Gänzle, M. G., Vogel, R. F. (2002). Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye,

- and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *J Appl Microbiol*, 92(5), 958-965.
- Madej, J.P., Stefaniak, T., Bednarczyk, M. (2015). Effect of in ovo-delivered prebiotics and synbiotics on lymphoid-organs' morphology in chickens. *Poult Sci*, 94, 1209-1219.
- Reuben R.C, Roy P.C., Sarkar S.L., Alam R., Jahid K.I. (2019). Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics. *BMC Microbiol*, 19:253.
- Salazar, N., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilan, C. G., Ruas-Madiedo, P. (2016). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and bifidobacteria as fermentable substrates by the intestinal microbiota. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 56(9), 1440-1453.
- Sarikaya, H., Aslim, B., Yuksekdog, Z. N. (2017). Assessment of anti-biofilm activity and bifidogenic growth stimulator (BGS) effect of lyophilized exopolysaccharides (L-EPSs) from *Lactobacilli* strains. *Int J Food Prop*, 20(2), 362-371.
- Shang, Y., Kumar, S., Oakley, B., Kim, W.K. (2018). Chicken gut microbiota: importance and detection technology. *Fron Vet Sci*. 5.
- Shao, Y., Zhang, W., Guo, H., Pan, L., Zhang, H., Sun, T. (2015). Comparative studies on antibiotic resistance in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Food Control*, 50, 250-258.
- Tarabees, R., Gafar, K. M., EL-Sayed, M. S., Shehata, A. A., Ahmed, M. (2018). Effects of dietary supplementation of probiotic mix and prebiotic on growth performance, cecal microbiota composition, and protection against *Escherichia coli* O78 in broiler chickens. *Probio Antimicrob Proteins*, 10, 1-9.
- Tayeri, V., Seidavi, A., Asadpour, L., Phillips, C.J.C. (2018). A comparison of the effects of antibiotics, probiotics, synbiotics and prebiotics on the performance and carcass characteristics of broilers. *Vet Res Commun*, 42, 195-207.
- Toghyani, M. and Faghan, N. (2017). Effect of Sumac (*Rhus Coriaria* L.) Fruit powder as an antibiotic growth promoter substitution on growth performance, immune responses and serum lipid profile of broiler chicks. *Indian J Pharm Educ Res*, 51(3), S295-S298.
- Tsuda, H., Hara, K., Miyamoto, T. (2008). Binding of mutagens to exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* mutant strain 301102S. *J Dairy Sci*, 91(8), 2960-2966.
- Wang, J., Zhao, X., Yang, Y., Zhao, A., Yang, Z. (2015). Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *Int J Biol Macromol*, 74, 119-126.
- Yonezawa, S., Xiao, J. Z., Odamaki, T., Ishida, T., Miyaji, K., Yamada, A., Yaeshima, T., Iwatsuki, K. (2010). Improved growth of bifidobacteria by cocultivation with *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*. *J Dairy Sci*, 93(5), 1815-1823.