

Geleneksel Türk Yoğurtlarından İzole Edilen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* Bakterilerinde İntra-/Ekstrasellüler Folat Üretimi

Meryem Nur ZEYDANLI¹, Zehranur YÜKSEKDAĞ², Berat ÇINAR ACAR³

¹Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, ²Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Ankara, ³Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Ankara

¹<https://orcid.org/0009-0006-8570-9810>, ²<https://orcid.org/0000-0002-0381-5876>, ³<https://orcid.org/0000-0003-4662-0865>

✉: zehranur@gazi.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada, zengin folat içerikli yoğurt yapımında starter kültür olarak kullanılacak bakterilerin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla Türkiye'nin çeşitli ilçelerindeki (Keçiören, Yenimahalle, Çankaya, Sincan, Altındağ/Ankara, Orta/Çankırı, Merzifon/Amasya, Gülşehir/Nevşehir, Göynük/Bolu, Silifke/Mersin, Sungurlu/Çorum) geleneksel yöntemlerle yapılan yoğurtlardan 31 *Lactobacillus* spp. ve 32 *Streptococcus* spp. olmak üzere toplam 63 bakteri izole edilmiştir. Elde edilen bakterilerin API 50 CH kiti ile biyokimyasal tanımlaması gerçekleştirilmiştir. Tesadüfen seçilen 4 Laktobasil ve 4 Streptokok izolatının 16S rDNA gen bölgesi ile moleküler tanımlaması gerçekleştirilmiştir. Folat içermeyen kültür ortamı (FACM), yağsız süt ve MRS/Elliker besi ortamlarında üç farklı tampon uygulamasında (potasyum fosfat, sodyum fosfat ve sodyum asetat) bakterilerin hücre içi ve hücre dışı folat üretim miktarları tespit edilmiştir. Kullanılan besiyerleri ve tampon çözeltiler arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığı istatistiksel olarak incelenmiştir. Yağsız süt besiyerinde potasyum fosfat tamponu uygulamasında, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN1181 suşu 105,6 µg L⁻¹ değeri ile en yüksek intrasellüler folat üretimine sahip olduğu tespit edilirken, *Streptococcus thermophilus* Z651 suşu FACM besiyeri ve potasyum fosfat tamponunda en yüksek ekstrasellüler folat üretimi (79,9 µg L⁻¹) gösterdiği belirlenmiştir.

Production of Intra-/Extracellular Folate in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* Bacteria Isolated from Traditional Turkish Yoghurts

ABSTRACT

This study was aimed at examining the bacteria that can be used as starter cultures in the generation of yoghurt with rich folate content. For this purpose, 31 *Lactobacillus* spp. and 32 *Streptococcus* spp.—a total of 63 bacteria were isolated from yogurt made with traditional methods in various districts of Turkey (Kecioren, Yenimahalle, Cankaya, Sincan, Altindag/Ankara, Orta/Cankiri, Merzifon/Amasya, Gulsehir/Nevsehir, Goynuk/Bolu, Silifke/Mersin, Sungurlu/Corum). Biochemical identification of the obtained bacteria was made with the API 50 CH kit. Molecular identification of four randomly selected *Lactobacillus* and four *Streptococcus* isolates with 16S rDNA gene regions was performed. Intracellular and extracellular folate production amounts of bacteria were designated in three different buffer applications (potassium phosphate, sodium phosphate, and sodium acetate) in folate-free culture medium (FACM), skim milk, and MRS/Elliker broth. It was statistically examined whether there was a significant difference between the media and buffer solutions used. In the application of potassium phosphate buffer in skim milk medium, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN1181 strain was found to have the highest intracellular folate production with a value of 105.6 µg/L, while *Streptococcus thermophilus* Z651 strain showed the highest extracellular folate production (79.9 µg L⁻¹) in FACM medium

Gıda Bilimi

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi

Geliş Tarihi : 11.05.2023

Kabul Tarihi : 28.11.2023

Anahtar Kelimeler

Intrasellüler folat

Ekstrasellüler folat

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*

Streptococcus thermophilus

Food Science

Research Article

Article History

Received : 11.05.2023

Accepted : 28.11.2023

Keywords

Intracellular folate

Extracellular folate

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*

Streptococcus thermophilus

and potassium phosphate buffer. rpose, 31 *Lactobacillus* spp. and 32 *Streptococcus* spp.—a total of 63 bacteria were isolated from yogurt made with traditional methods in various districts of Turkey (Kecioren, Yenimahalle, Cankaya, Sincan, Altındag/Ankara, Orta/Cankırı, Merzifon/Amasya, Gulsehir/Nevsehir, Goynuk/Bolu, Silifke/Mersin, Sungurlu/Corum). Biochemical identification of the obtained bacteria was made with the API 50 CH kit. Molecular identification of four randomly selected *Lactobacillus* and four *Streptococcus* isolates with 16S rDNA gene regions was performed. Intracellular and extracellular folate production amounts of bacteria were designated in three different buffer applications (potassium phosphate, sodium phosphate, and sodium acetate) in folate-free culture medium (FACM), skim milk, and MRS/Elliker broth. It was statistically examined whether there was a significant difference between the media and buffer solutions used. In the application of potassium phosphate buffer in skim milk medium, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN1181 strain was found to have the highest intracellular folate production with a value of 105.6 µg/L, while *Streptococcus thermophilus* Z651 strain showed the highest extracellular folate production (79.9 µg L⁻¹) in FACM medium and potassium phosphate buffer.

Atıf Şekli: Zeydanlı, M.N., Yüksekdağ, Z., & Çınar Acar, B., (2024) Geleneksel Türk Yoğurtlarından İzole Edilen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* Bakterilerinde İntra-/Ekstrasellüler Folat Üretimi. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg* 27 (3), 704-717. <https://doi.org/10.18016/ksutarim.doga.1295846>.

To Cite : Zeydanli, M.N., Yuksekdağ, Z., & Cinar Acar, B., (2024) Production of Intra-/Extracellular Folate in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* Bacteria Isolated from Traditional Turkish Yoghurts. *KSU J. Agric Nat* 27 (3), 704-717. <https://doi.org/10.18016/ksutarim.doga.1295846>.

GİRİŞ

Vitaminler, yaşamımızda birçok fizyolojik fonksiyon için gerekli olan organik bileşiklerdir. Folat (B9) gibi bazı vitaminler, biyolojik işlevleri nedeniyle fonksiyonel gıda bileşenleri olarak kabul edilmişlerdir (İyer ve Tomar 2009; Levit ve ark., 2020). Folat metabolik enzimlerin kofaktörleri olarak, deoksiribonükleik asit replikasyonu, hücre bölünmesi, onarım ve metilasyon, nükleotidlerin biosentezi ve amino asit metabolizması gibi önemli yollarda yer almaktadır (Greppi ve ark., 2017; Albano ve ark., 2020). Ayrıca nöral tüp defektleri, megaloblastik anemiler, alzheimer ve koroner hastalıklar, kolorektal, meme ve pankreas kanseri, bebek bilişsel eksiklikleri, otizm, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve rektal neoplazmalar gibi ölümcül ve kronik hastalıkların önlenmesinde de etkili rol oynamaktadır (Da Silva ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2020; Agagunduz ve ark., 2022).

Folat açısından zengin gıda kaynakları başlıca yeşil yapraklı sebzeler, baklagiller, kuruyemişler, meyveler, karaciğer, yumurta sarısı, turunçgiller, bazı peynirler ve fermente süt ürünleridir. İnsanlar vitaminleri sentezleyemedikleri için dışarıdan almaları gerekmektedir (Greppi ve ark., 2017; Khalili ve ark., 2020). Folatlar çeşitli gıdalarda bulunmasına rağmen, bu vitaminin diyet yoluyla alınması günlük ihtiyaçları karşılamada yetersiz kalabilir. Bu sorunu gidermek için folik asit ilavesiyle güçlendirilmiş

gıdalar geliştirilmiştir (Levit ve ark., 2020). Bazı ülkelerde belirli gıda ürünlerinde zorunlu folik asit takviye programları olmasına rağmen özellikle hamile veya doğurganlık çağındaki kadınlarda ve sosyo ekonomik açıdan düşük gruplarda folat eksikliği hala yüksek oranlarda gözlenmektedir. Folik asit, folatın kimyasal olarak sentezlenmiş şeklidir ve yaygın olarak gıda takviyesi için kullanılmaktadır. Folik asit (pteroylglutamik asit) monoglutamat formu iken, tamamen doğal vitamin formları poliglutamatlardır (Hildebrand ve ark., 2021). Gıdalarda bulunan veya belirli mikroorganizmalar tarafından üretilen folatların bireylerde olumsuz sağlık etkilerine neden olmadığı bildirilmiştir (Wright ve ark., 2007). Bu nedenle folat takviyesi yerine, fermente gıda ürünlerinin üretiminde folat sentezleyebilen laktik asit bakterilerinin kullanılması ve bu şekilde folat tüketiminin doğal olarak artırılması önerilmektedir (Saubade ve ark., 2017).

Laktik asit bakterilerinin (LAB) hem fermente edilmiş hem de fermente edilmemiş çeşitli gıdalarda mevcut olduğu bilinmektedir (Mahara ve ark., 2021; Kızılyıldırım ve Köksal, 2023). LAB'lerinin çeşitli gıdaların fermantasyonu için starter kültür olarak yaygın kullanımlarının yanı sıra, fermente ürünlerin güvenliği, raf ömrü, besin değeri ve genel kalitesinin iyileştirilmesinde oldukça etkili rolleri bulunmaktadır (Levit ve ark., 2020). Çoğunlukla *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerine ait olan probiyotik

bakterilerin konakçı için vitamin üretimi, enflamasyon ve kansere karşı daha etkili koruma gibi çeşitli faydalı etkileri bulunmaktadır (Haghshenas ve ark., 2014; Khalili ve ark., 2020). Bu nedenle birçok çalışma, laktik asit bakterileri tarafından üretilen yoğurt, ayran ve peynir gibi bazı fermente süt ürünlerinde folatın sıklıkla arttığını göstermiş ve birçok araştırmacı laktik asit bakterileri suşlarını kullanarak folatın biyosentezine odaklanmıştır (Le Blanc ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2020). Mikroorganizmaların folat üretme yeteneği suşa özgüdür ve büyüme koşullarından etkilenmektedir (Saubade ve ark., 2017; Levit ve ark., 2020; Mahara ve ark., 2021). Birçok laktik asit bakteri suşu (*Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus*) folat biyosentezini gerçekleştirebilirken, bazı suşların (*Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*) folat biyosentez sürecini denetleyen genleri bulunmadığından folat üretmedikleri gözlenmiştir (LeBlanc ve ark., 2007; Yuksekdag ve Zeydanlı, 2013; Agagunduz ve ark., 2022).

Süt ürünleri, özellikle yoğurt, folat biyoyararlanımını artıran folat bağlayıcı proteinleri içermesi nedeniyle folatın biyoyüçlendirilmesi için oldukça önemlidir. Folatların nükleotit sentezi, DNA replikasyonu ve onarımı gibi hücre için önemli roller oynamaktadır ve folat eksikliği sonucu çeşitli sağlık sorunları gözlenebilmektedir. Bakteriyel folat, düşük folat durumlarını önlemek ya da tedavi etmek için potansiyel bir beslenme kaynağı olarak görülmektedir (Pompei ve ark., 2007b; Rossi ve ark., 2011; Engevik ve ark., 2019). Bu çalışmada, folat eksikliği nedeniyle oluşan hastalıkların engellenmesi, gıda ürünlerinin folat içeriğince zenginleştirilmesi ve folat eksikliğini doğal yollarla gideriminin sağlanabilmesi amacıyla yüksek folat üretim kapasiteleri sergileyen mikroorganizmaları belirlemek hedeflenmiştir. Bu amaçla geleneksel yöntemlerle yapılan yoğurtlardan 63 bakteri (31 *Lactobacillus* spp. 32 *Streptococcus* spp.) izole edilmiş ve izolatların API 50 CH kiti ile biyokimyasal tanımlamaları yapılmıştır. Folat üretimine kullanılan besiyerlerinin ve tamponların etkisini belirlemek amacıyla, izolatların farklı besi ortamı ve tampon çözeltilerindeki intra-/ekstrasellüler folat üretimleri tespit edilmiştir.

MATERYAL ve METOD

İzolasyon

Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden (Keçiören, Yenimahalle, Çankaya, Sincan, Altındağ/Ankara, Orta/Çankırı, Merzifon/Amasya, Gülşehir/Nevşehir, Göynük/Bolu, Silifke/Mersin, Sungurlu/Çorum) elde edilen ve geleneksel yöntemlerle yapılan yoğurt örneklerinden 0,1 g alınmış 2 mL'lik steril fosfat tamponu (PBS, %0,02 KCl, %0,144 Na₂HPO₄, %0,8

NaCl, %0,024 KH₂PO₄, pH 7,2) ile süspansiyon edilmiştir. 10⁻¹⁰'a kadar dilüe edilen örnekler Man Ragosa-Sharp (MRS, Merck, Darmstadt, Almanya) ve Neutral Red Chalk Laktoz (NRCLA, HiMedia, USA) katı besiyerine ekilerek 42°C'da 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Tek koloni seçilen örneklerin daha iyi gelişmesi için sisteinli-MRS/Elliker (MRSC, Merck, Darmstadt, Almanya) sıvı besiyerlerine ekim yapılarak kültür yeniden inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri kültürlerinin morfolojileri incelenerek Gram (+) basiller ve koklar izole edilmiştir.

Tanımlama

Biyokimyasal tanımlama

Yoğurt numunelerinden izole edilen 31 *Lactobacillus* spp. ve 32 *Streptococcus* spp. örnekleri tanımlama için sırasıyla MRS ve Elliker besiyerlerinde 42°C'da 16-48 saat geliştirilmiştir. İzolatların biyokimyasal tanımlamaları için API 50 CHL (Bio-Meriéux) test kiti kullanılmıştır. Dehidrat substratlar bulunduran mikrotüpcüklere bakteri yoğunluğu [Laktobasiller için McFarland 2 (6×10⁸ cfu/mL); Streptokoklar için McFarland 4'e (12×10⁸ cfu/mL)] ayarlanan örneklerden eklenerek 42°C'de 48 saat inkübasyon işlemi uygulanmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde bakterilerin metabolik son ürünlerinde renk değişimi gözlenmiştir. Mor rengin sarıya dönüşmesi pozitif, aynı kalması ise negatif olarak değerlendirilmiştir. API WEB (NTSYSpc 2.0) programında izolatlar ile standart ATCC suşlarının API sonuçları karşılaştırılmıştır.

İzolatların moleküler tanımlaması için; tesadüfen seçilen 4 *Lactobacillus* ve 4 *Streptococcus* izolatının genomik DNA saflaştırma kiti (Thermo Scientific) kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından izole edilen genomik DNA'nın saflığı ve miktarı ELISA (Epoch) cihazında (OD_{260/280}) belirlenmiştir. 16S rDNA'nın amplifikasyonu, 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ve 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') evrensel primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir (dos Santos ve ark., 2019). Örneklerin DNA dizi analizi, Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde Genetic Analyzer Applied Biosystems, 3130 model genetik analizör cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar NCBI gen bankası ile karşılaştırılmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Folat Üretimi

Sybesma ve ark. (2003 a,b) ve Aswathy ve ark.'larının (2008) yöntemlerinde birtakım değişiklikler yapılarak bakterilerin folat üretimleri gerçekleştirilmiştir. Folat üretimlerinin tespit edilmesinde MRS (laktobasiller için), Elliker (streptokoklar için), %10'luk yağsız süt (Oxoid, İrlanda) ve Folik Asit Casei Medium (FACM,

HiMedia, USA) besiyerleri ve tampon olarak ise 0,1 M potasyum fosfat, sodyum asetat ve sodyum fosfat tamponları kullanılmıştır. Bakteriler besiyerlerine inoküle edilip, 42°C'da 16 saat geliştirildikten sonra 12000×g'de 10 dak santrifüj edilmiştir. İntrasellüler üretim için pellet kullanılırken, ekstrasellüler üretim için süpernatant kullanılmıştır. Ortamdaki besiyeri ve diğer kalıntıların uzaklaşması için örnekler PBS tamponu ile yıkanmıştır.

İntrasellüler folat üretimi

Bakteri yoğunluğu McFarland 5'e (15×10^8 cfu/mL) ayarlanan ve 50 MHz frekansında içerisine buz eklenen ultrasonikasyon (VibraCell) cihazında örnekler 5 dakika süresince sonikasyon işlemi uygulanmış ve numuneler sıcak su banyosunda 100°C'da 15 dak bekletilmiştir. Ardından 4000×g'de 10 dak 4°C'da santrifüj işlemi yapılmıştır. Sıcak su banyosunda 5 dak yeniden bekletilen örnekler ikinci santrifüj uygulamasının ardından elde edilen süpernatant 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek mikro-kuyucuklara aktarılmıştır. OD₅₈₀ nm dalga boyunda ölçüm yapılarak kültürlerin intrasellüler folat üretimleri tespit edilmiştir (Sybesma ve ark., 2003a,b; Aswathy ve ark., 2008).

Ekstrasellüler folat üretimi

Süpernatant ile tampon çözeltileri 1:1 oranında süspansiyon edilmiştir. Örnekler sıcak su banyosunda 100°C'da 15 dak tutularak folat bağlayıcı proteinlerin folattan ayrılması sağlanmıştır. Örnekler 4000×g'de 10 dak 4°C'da santrifüj edilmiştir. 2 mL'lik süpernatant, 0,4 mL insan plazması, 0,1 M 2-merkaptotanol, %0,5 sodyum askorbat solüsyonu ile muamele edilerek 37°C'da 1 saat çalkalamalı etüvde bekletilmiştir. Sıcak su banyosunda 5 dak bekletilen

örnekler santrifüj edilmiş ve süpernatant 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek mikro-kuyucuklara aktarılmıştır. OD₅₈₀ nm dalga boyunda ölçüm yapılarak kültürlerin ekstrasellüler folat üretimleri belirlenmiştir (Wilson ve Horne, 1982; Aswathy ve ark., 2008; Sybesma ve ark. 2003a,b).

İstatistiksel Analizler

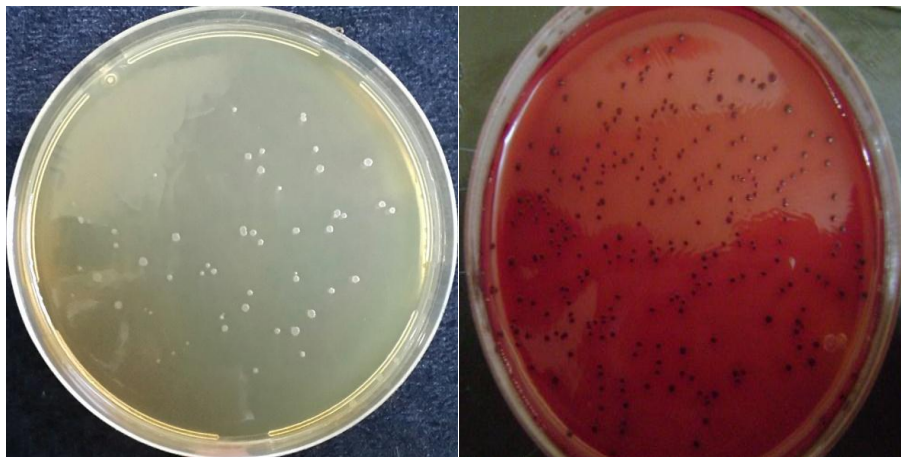
Tüm çalışmalar üç paralelli ve üç tekerrürlü olarak yapılmış ve çalışmaların ortalama sonuçları verilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen veriler bu tekrarların ortalaması ± standart sapma (SD) şeklinde verilmiştir. Her bir bakterinin farklı besiyeri ve tampon çözeltilerdeki intrasellüler ve ekstrasellüler folat üretimleri arasındaki farklılıkların istatistiksel önem değeri iki yönlü ANOVA ve Tukey's *post hoc* testi ile ve GraphPad Prism (www.graphpad.com) yazılımı kullanılarak belirlenmiştir. İstatistiksel önem değerleri $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Bakteri İzolasyonu

Çalışmada izolatların alındığı yer, örnek numarası ve kodu Çizelge 1'de gösterilmiştir. Bolu-Göynük ve Amasya-Merzifon dışındaki tüm bölgelerden 32 *Streptococcus* sp., Nevşehir-Gülşehir ve Mersin-Silifke dışındaki tüm bölgelerden 31 *Lactobacillus* sp. olmak üzere toplamda 63 izolat elde edilmiştir.

Laktobasil izolatlarının MRS katı besiortamında yassı ve krem renkli koloniler (Resim 1.a); Streptokok izolatlarının NRCLA katı besiortamında düzgün ve mor renkli koloniler oluşturdukları (Resim 1.b) gözlenmiştir.



Şekil 1. a. MRS katı besiortamında Laktobasillerin koloni morfolojisi
b. Neutral Red Chalk Laktöz katı besiortamında Streptokokların koloni morfolojisi
Figure 1. a. Colony morphology of Lactobacilli on MRS solid media
b. Colony morphology of Streptococci on Neutral Red Chalk Lactose solid media

Bakterilerin Tanımlanması

Biyokimyasal tanımlama

API 50 CHL test kiti kullanılarak (Resim 2) yapılan biyokimyasal tanımlama sonucunda laktobasil

izolatlarının *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'a benzerlik oranının % 53-97, streptokok izolatlarının *S. thermophilus*'a benzerlik oranının % 71-95 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 1. Yoğurttan izole edilen izolatların alındığı yerler, örnek numaraları ve kodları

Table 1. Locations sample numbers and codes of the isolates isolated from yoghurt

İzolatların Alındığı Yer	Örnek No	<i>Lactobacillus</i> sp. kodu	<i>Streptococcus</i> sp. kodu
1. Ankara-Keçiören	1.1	ZN141	Z14
	1.2	ZN142	Z15
	1.3	ZN171	Z151
	1.4	ZN172	Z171
	1.5	ZN18	Z173
	1.6	ZN19	Z18
2. Ankara-Yenimahalle	2.1	ZN251	Z261
	2.2	ZN252	Z271
	2.3	ZN272	Z272
	2.4	ZN281	Z351
3. Çankırı-Orta	3.1	ZN342	Z361
	3.2	ZN361	Z372
	3.3	ZN362	-
	3.4	ZN382	-
4. Ankara-Çankaya	4.1	ZN442	Z472
	4.2	ZN451	Z482
	4.3	ZN461	-
5. Amasya-Merzifon	5.2	ZN543	-
	5.3	ZN551	-
	5.4	ZN561	-
	5.5	ZN562	-
6. Ankara-Sincan	6.1	ZN641	Z662
	6.2	ZN652	Z651
	6.3	ZN661	Z672
	6.4	ZN662	Z682
7. Nevşehir-Gülşehir	7.1	-	Z743
	7.2	-	Z752
8. Ankara-Altındağ	8.1	ZN82	Z861
	8.2	-	Z862
9. Bolu-Göynük	9.1	ZN961	-
	9.2	ZN981	-
10. Mersin-Silifke	10.1	-	Z1051
	10.2	-	Z1052
	10.3	-	Z1061
	10.4	-	Z1062
	10.5	-	Z1081
	10.6	-	Z1082
11. Çorum-Sungurlu	11.1	ZN1151	Z1151
	11.2	ZN1171	Z1152
	11.3	ZN1181	Z1153
	11.4	-	Z1161
	11.5	-	Z1162
	11.6	-	Z1171

- İzolasyon gerçekleştirilememiştir.

Çizelge 2. *Lactobacillus* sp. ve *Streptococcus* sp. izolatlarının API 50 CHL tanımlaması ve % benzerliği
 Table 2. *Lactobacillus* sp. and *Streptococcus* sp. of isolates API 50 CHL identification and % similarity

Kod	API 50 CHL Tanımlama	% Benzerlik	Kod	API 50 CHL Tanımlama	% Benzerlik
ZN171	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	88	Z15	<i>S. thermophilus</i>	87
ZN19	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	81	Z14	<i>S. thermophilus</i>	92
ZN141	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	73	Z18	<i>S. thermophilus</i>	95
ZN172	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	53	Z1171	<i>S. thermophilus</i>	82
ZN18	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	80	Z173	<i>S. thermophilus</i>	72
ZN142	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	90	Z171	<i>S. thermophilus</i>	79
ZN252	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	90	Z272	<i>S. thermophilus</i>	83
ZN272	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	81	Z682	<i>S. thermophilus</i>	67
ZN251	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	84	Z752	<i>S. thermophilus</i>	88
ZN281	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	75	Z743	<i>S. thermophilus</i>	80
ZN362	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	84	Z861	<i>S. thermophilus</i>	91
ZN382	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	92	Z862	<i>S. thermophilus</i>	75
ZN342	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	71	Z1062	<i>S. thermophilus</i>	90
ZN361	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	90	Z1083	<i>S. thermophilus</i>	79
ZN461	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	96	Z261	<i>S. thermophilus</i>	90
ZN442	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	55	Z271	<i>S. thermophilus</i>	91
ZN551	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	79	Z372	<i>S. thermophilus</i>	79
ZN561	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	81	Z361	<i>S. thermophilus</i>	82
ZN562	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	82	Z351	<i>S. thermophilus</i>	90
ZN543	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	93	Z472	<i>S. thermophilus</i>	75
ZN451	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	83	Z482	<i>S. thermophilus</i>	67
ZN662	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	94	Z662	<i>S. thermophilus</i>	95
ZN661	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	86	Z651	<i>S. thermophilus</i>	80
ZN652	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	55	Z672	<i>S. thermophilus</i>	92
ZN641	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	70	Z1061	<i>S. thermophilus</i>	89
ZN82	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	67	Z1081	<i>S. thermophilus</i>	93
ZN981	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	97	Z1051	<i>S. thermophilus</i>	80
ZN1181	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	53	Z1162	<i>S. thermophilus</i>	89
ZN961	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	95	Z1161	<i>S. thermophilus</i>	71
ZN1151	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	76	Z1152	<i>S. thermophilus</i>	90
ZN1171	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	91	Z1151	<i>S. thermophilus</i>	85
			Z1153	<i>S. thermophilus</i>	91



Resim 2. API 50 CHL testi
Picture 2. API 50 CHL test

Moleküler tanımlama

Biyokimyasal olarak tanımlamaları yapılmış numunelerden rastgele seçilen 4 laktobasil ve 4 streptokok izolatının 16S rDNA moleküler tanımlamaları gerçekleştirilmiştir. Laktobasillerden izole edilen DNA'nın saflık ($OD_{260/280}$ nm) derecesi 1,72-1,90 aralığında, streptokokların DNA'sının ise 1,72-1,85 aralığında tespit edilmiştir. Örneklerin

DNA'larının dizi analizi sonuçları BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) fonksiyonu ile NCBI (National Center for Biotechnology Information) Gen Bankası'nda taranarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan tüm bakterilerin moleküler tanımlaması sonucunda model suşlara %99 oranında benzerlik gösterdiği bulunmuş ve sonuçlar Çizelge 3'te verilmiştir.

Çizelge 3. Bakterilerin 16S rDNA sekanslarının NCBI Gen bankası sonuçlarına göre benzerlik oranları ve saflık dereceleri ($OD_{260/280}$ nm)

Table 3. Similarity rates and purity levels of 16S rDNA sequences of bacteria according to NCBI Genbank results ($OD_{260/280}$ nm)

Kod	İzolat	EMBL/GenBank Numarası	% Benzerlik	$OD_{260/280}$ nm
ZN281	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	HM218006.1	99	1.81
ZN382	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	HM058989.1	99	1.76
ZN551	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	JX839763.1	99	1.72
ZN652	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	HM058547.1	99	1.90
Z173	<i>S. thermophilus</i>	GU195647.1	99	1.72
Z361	<i>S. thermophilus</i>	HQ721278.1	99	1.74
Z351	<i>S. thermophilus</i>	HQ721251.1	99	1.83
Z1161	<i>Enterococcus faecium</i>	JN542513.1	99	1.85

Biyokimyasal yöntemlerde, enzim substrat ilişkisine bağlı olarak gözlenen renk değişimi ya da gaz oluşumu ile elde edilen sonuçlar tanı çizelgeleri ile karşılaştırılmakta ve bakteri tanımlaması gerçekleştirilmektedir. İnsan gücü ve çalışma alanından tasarruf sağlama, kısa sürede hızlı sonuç verme ve düşük maliyetli olma gibi önemli avantajları da bulunmaktadır. Ancak, API, Enterotube, Minitex, Vitek gibi biyokimyasal tanı yöntemleri çalışılacak bakteri türü hakkında önemli bilgiler sunan yöntemler olsalar da, kültürlerin

identifikasyonlarının daha doğru yapılabilmesi için bilgisayarlı otomatik okuyuculara ihtiyaç duyulmaktadır (Aras, 2011). Moleküler tanımlama teknikleri, bakterilerin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanmasında yüksek bir potansiyel göstermektedir. Bu tür yöntemlerin, fenotipik olarak yakından ilişkili olan ancak epidemiyolojik etkide önemli farklılıklar gösteren türlerin ve/veya alt türlerin farklılaştırılması gibi önemli uygulama alanları bulunmaktadır (Frey ve Nicolet, 1997). 16S ribozomal RNA (rRNA) gen dizilemesi, bakteriler

arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesi için önemli bir araç olarak hizmet etmekte ve bakteri izolatlarının tanımlanmasında etkin olarak kullanılmaktadır. Sekans tanımlaması, yavaş büyüyen, olağandışı ve güç üreyen bakterilerin yanı sıra geleneksel yöntemlerle zayıf bir şekilde farklılaşan bakteriler için de kullanılan bir yöntemdir (Patel, 2001). Moleküler tanımlama teknikleri potansiyel olarak bakteri türlerinin tespiti ve tanımlanmasının yanı sıra bir bakteri türü içindeki suşların karşılaştırılmasına da olanak tanımaktadır. Çalışmada, hem biyokimyasal hem de moleküler tanımlama testleri gerçekleştirilen *Lactobacillus* sp. ve *Streptococcus* sp. izolatlarının, tanımlama sonuçlarının birbirinden farklılık gösterdiği ve moleküler tanımlama sonuçlarının *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus*'a daha yüksek oranda (%99) benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada tesadüfen seçilen 8 izolatın moleküler tanımlaması yapılarak moleküler tanımlamanın daha doğru sonuçlar verdiği ispatlanmıştır.

Folat Üretimi

Folatın kimyasal olarak sentezlenmiş formu olan folik asidin yüksek oranda alınması, B12 vitamini eksikliğinin erken hematolojik belirtilerinin maskelenmesi, hepatik dihidrofolat redüktaz enziminin aktivitesinde değişiklik ve kanserin teşvik edilmesi gibi olumsuz sağlık sorunlarına neden olabilmektedir (Bailey ve Ayling 2009; Baggott, ve ark., 2012; Da Silva ve ark., 2016; Albano ve ark., 2020). Yoğurt, ayran, peynir gibi bazı fermente süt ürünlerinde laktik asit bakterilerinin (LAB) biyosenteziyle folat miktarında artış gözlenmesi sonucu folatın biyosentezine yönelik çalışmalara ilgi artış göstermiştir (LeBlanc ve ark., 2011).

Doğal folat formları üretilebilen LAB, olumsuz etkilere neden olmadan folat eksikliğini önlemek için gıdalara dâhil edilebilmektedir. Sentetik folik asitle zenginleştirmeye alternatif olarak LAB tarafından üretilen folat, bağırsak patolojilerine karşı terapötik ve anti-enflamatuar/anti-neoplastik tedavilerde tamamlayıcı olarak kullanılabilir (Levit ve ark., 2021).

İntrasellüler folat üretim miktarının yüksek çıkması bakterinin metabolik aktivite etkinliği hakkında bilgi verirken, ekstrasellüler folat miktarındaki artış tüketilen gıdaların folat içeriği bakımından zenginliği hakkında fikir vermektedir (Sybesma ve ark., 2003a). Sybesma ve ark. (2003a), *Leuconostoc lactis* ve *L. paramesenteroides* suşları ile gerçekleştirdikleri araştırmalarında bakterilerin ürettikleri total folat miktarını 43-45 µg/L olarak bildirmişlerdir. Laiño ve ark. (2012) Arjantin yoğurtlarından elde ettikleri 4 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* kültürünün hücre içi ve hücre dışı folat üretim miktarlarını belirlemek amacıyla, folat içermeyen

kültür ortamında (FACM) ve yağsız sütte kültürleri geliştirmişlerdir. FACM ortamında, suşların hücre içi folat üretimlerinin 8,6-16,2 µg/L, hücre dışı folat üretimlerinin ise 3,6-86,2 µg/L arasında değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir. Cucick ve ark. (2020) Brezilya keçi süt ürünlerinden elde ettikleri beş *S. thermophilus* (34v, 170v, 268v, 361v ve 341pc) bakterisinin folat üretim miktarını belirlemiştir. Analiz sonuçlarına göre en iyi folat üreten bakteriler sırasıyla *S. thermophilus* 34v (0,208 µg/mL) ve *S. thermophilus* 268v (0,167 µg/mL) olarak rapor edilmiştir. Yoğurttan izole edilen 4 *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* ve 4 *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* kullanıldığı başka bir çalışmada bakterilerin folat üretimleri 21,2-31,9 µg/mL olarak tespit edilmiştir (Zahed ve ark., 2022). Liu ve ark., (2022) çiğ inek sütünden folat üreten altı *Lactobacillus* suşu izole etmişler ve altı izolatın folat veriminin 0,0055 ile 0,239 µg/mL arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Elde edilen suşlardan folat üretim potansiyeli en yüksek olan izolatın *Lactilactobacillus sakei* LZ217 (0,239 µg/mL) olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmada, üç farklı besiyeri tampon uygulamasının intrasellüler ve ekstrasellüler folat üretimi üzerindeki etkisi incelenmiştir. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşlarının farklı besiyerlerinde intrasellüler ve ekstrasellüler folat üretimleri Çizelge 4-7'de verilmiştir.

MRS besiyerinde *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşları için en yüksek intrasellüler folat üretiminin ZN561 suşunda potasyum fosfat tamponunda (83,3 µg/L) en düşük üretimin ise sodyum asetat tamponunda (6,9 µg/L) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4). Ekstrasellüler folat üretimine bakıldığında ZN1151 suşu potasyum fosfat tamponunda (74,9 µg/L) en yüksek değeri gösterirken, ZN961 suşu sodyum asetat tamponunda (1,1 µg/L) en düşük değeri göstermiştir (Çizelge 6). *S. thermophilus* suşlarında; Elliker besiyerinde en yüksek intrasellüler ve ekstrasellüler folat üretimleri sırasıyla Z482 ve Z862 suşlarında potasyum fosfat tamponunda (103,8 ve 72,5 µg/L) belirlenirken, en düşük folat üretimi sırasıyla Z1161 suşunda sodyum fosfat tamponunda (7,9 µg/L) ve Z1051 suşunda sodyum asetat tamponunda (4,5 µg/L) bulunmuştur (Çizelge 5 ve 7).

FACM besiyerinde intrasellüler folat üretimi *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarında 8,5 µg/L (ZN172)-88,5 µg/L (ZN543) arasında değişirken (Çizelge 4), *S. thermophilus* suşlarında ise; 87,7 µg/L (Z861)-9,5 µg/L (Z682) aralığında değişkenlik göstermiştir (Çizelge 5). Ekstrasellüler folat üretimi ise *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarında 2,9 µg/L (ZN562)-50,9 µg/L (ZN561 ve ZN1151) (Çizelge 6), *S. thermophilus* suşlarında 3,4 µg/L (Z351)-79,9 µg/L (Z651) (Çizelge 7) aralığında tespit edilmiştir. FACM besiyerinde potasyum fosfat tamponunun

intraseküler ve ekstraseküler folat üretimi için en uygun tampon olduğu belirlenmiştir.

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşlarının yağsız süt besiyerindeki en yüksek intraseküler folat üretimi ZN1181 (105,6 µg/L) ve Z1162 (95,8 µg/L) suşlarında bulunmuştur (Çizelge 4 ve 5). Ekstraseküler folat üretimlerine bakıldığında

ise; suşların 66,3 µg/L (ZN641) ve 73,9 µg/L (Z272) değerleri ile en yüksek hücre dışı folat üretim yeteneği gösterdikleri tespit edilmiştir. Yağsız süt besiyerinde potasyum fosfat tamponunun intraseküler ve ekstraseküler folat üretimi için en iyi sonuç veren tampon çözeltisi olduğu belirlenmiştir (Çizelge 6 ve 7).

Çizelge 4. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarının farklı besiyerlerinde (MRS, FACM ve yağsız süt) ve farklı tamponlarda (potasyum fosfat, sodyum fosfat ve sodyum asetat) intraseküler folat üretimleri (µg/L)

Table 4. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains in different media (MRS, FACM and skim milk) and buffers (potassium phosphate, sodium phosphate and sodium acetate) intracellular folate production (µg/L)

Bakteri Kodu	MRS			FACM			Yağsız süt		
	Potasyum Fosfat Tamponu	Sodyum Fosfat Tamponu	Sodyum Asetat Tamponu	Potasyum Fosfat Tamponu	Sodyum Fosfat Tamponu	Sodyum Asetat Tamponu	Potasyum Fosfat Tamponu	Sodyum Fosfat Tamponu	Sodyum Asetat Tamponu
ZN171	78.5±4.6 ^a	17.5±0.4 ^b	9.3±0.1 ^b	53.9±3.4 ^a	25.3±0.3 ^b	21.8±0.9 ^b	35.9±1.3 ^a	38.3±3.2 ^a	6.9±0.1 ^{bc}
ZN19	47.2±1.6 ^a	22.9±0.6 ^b	11.9±0.1 ^{bc}	55.4±1.3 ^a	25.1±0.1 ^b	29.9±1.1 ^b	34.4±4.4 ^a	28.3±1.3 ^a	16.8±0.1 ^{bc}
ZN141	26.1±3.1 ^a	20.2±0.4 ^a	13.8±0.6 ^b	55.3±4.3 ^a	25.6±1.1 ^b	33.4±0.6 ^b	49.2±4.1 ^a	43.4±1.0 ^a	16.6±0.1 ^{bc}
ZN172	39.4±4.1 ^a	19.2±0.4 ^b	9.6±0.0 ^b	8.5±4.6 ^a	23.7±0.9 ^b	19.3±1.1 ^a	44.8±2.9 ^a	41.1±2.2 ^a	11.7±0.0 ^{bc}
ZN18	25.7±2.4 ^a	19.1±0.7 ^b	14.5±0.3 ^b	51.9±5.3 ^a	18.8±0.6 ^b	32.9±0.9 ^{bc}	70.8±5.5 ^a	65.2±4.4 ^a	25.3±0.1 ^{bc}
ZN142	54.5±6.1 ^a	18.7±0.3 ^b	6.9±0.0 ^b	62.4±0.1 ^a	28.2±1.2 ^b	18.8±0.4 ^{bc}	72.1±3.7 ^a	17.4±0.1 ^b	6.6±0.1 ^{bc}
ZN252	11.7±0.4 ^a	18.2±0.3 ^b	8.0±0.1 ^{bc}	29.6±3.7 ^a	22.3±0.6 ^a	19.7±0.1 ^b	38.2±0.6 ^a	51.8±2.2 ^b	13.2±0.3 ^{bc}
ZN272	35.4±6.5 ^a	21.7±0.4 ^a	11.1±0.1 ^b	38.8±2.2 ^a	28.4±0.4 ^b	18.9±0.4 ^{bc}	24.9±1.5 ^a	23.9±4.6 ^a	7.6±0.3 ^{bc}
ZN251	60.7±3.7 ^a	21.9±0.1 ^b	10.9±0.1 ^b	64.7±1.1 ^a	22.9±0.6 ^b	15.9±0.4 ^{bc}	75.1±2.4 ^a	61.4±1.9 ^b	16.9±2.9 ^{bc}
ZN281	42.9±1.5 ^a	19.2±0.4 ^b	14.3±0.1 ^{bc}	51.2±5.7 ^a	23.7±0.1 ^b	21.5±0.6 ^b	56.8±1.3 ^a	55.7±1.8 ^a	6.4±0.1 ^{bc}
ZN362	22.1±3.7 ^a	17.7±0.6 ^a	10.0±0.0 ^b	14.4±3.1 ^a	13.2±2.2 ^a	14.7±0.3 ^a	43.9±1.9 ^a	39.5±1.3 ^a	14.5±0.3 ^{bc}
ZN382	27.1±1.9 ^a	23.2±0.3 ^a	12.4±0.1 ^{bc}	32.9±2.9 ^a	27.2±0.3 ^a	21.9±1.9 ^b	33.8±2.7 ^a	25.8±2.5 ^a	7.6±0.1 ^{bc}
ZN342	20.0±0.6 ^a	17.8±0.3 ^b	11.6±0.1 ^{bc}	60.9±1.1 ^a	29.2±0.6 ^b	24.6±0.0 ^{bc}	51.3±4.1 ^a	18.6±0.6 ^b	16.1±0.4 ^b
ZN361	40.9±0.6 ^a	24.7±0.7 ^b	8.9±0.0 ^{bc}	27.6±1.2 ^a	27.4±0.9 ^a	22.9±0.6 ^{bc}	48.8±1.6 ^a	45.5±3.5 ^a	8.5±0.0 ^{bc}
ZN461	26.5±2.5 ^a	23.5±1.5 ^a	9.5±0.1 ^{bc}	28.1±2.5 ^a	22.4±0.1 ^a	21.5±0.4 ^b	52.2±1.3 ^a	47.6±1.8 ^a	6.2±0.1 ^{bc}
ZN442	37.4±0.3 ^a	23.9±0.1 ^b	12.1±0.0 ^{bc}	19.3±1.1 ^a	19.0±1.6 ^a	19.6±0.0 ^a	10.9±1.2 ^a	14.5±0.7 ^a	15.9±0.6 ^b
ZN451	27.2±0.3 ^a	22.4±0.7 ^b	10.3±0.1 ^{bc}	18.1±3.4 ^a	25.1±0.3 ^a	12.7±0.4 ^{bc}	34.3±0.3 ^a	29.8±2.1 ^a	8.5±1.1 ^{bc}
ZN551	54.2±4.6 ^a	27.9±1.3 ^b	10.9±0.3 ^{bc}	66.4±3.4 ^a	36.2±0.3 ^b	21.2±0.1 ^{bc}	86.7±4.6 ^a	63.7±6.5 ^b	14.1±1.5 ^{bc}
ZN561	83.3±1.9 ^a	26.3±0.4 ^b	8.9±0.0 ^{bc}	72.9±4.4 ^a	34.3±1.5 ^b	23.7±0.3 ^b	92.5±1.9 ^a	79.9±2.2 ^b	25.0±0.4 ^{bc}
ZN562	20.7±4.7 ^a	17.0±0.7 ^a	12.5±0.0 ^a	16.2±0.9 ^a	27.7±1.9 ^b	21.9±0.1 ^{bc}	29.2±1.2 ^a	26.2±1.9 ^a	21.3±0.0 ^b
ZN543	65.2±2.9 ^a	27.8±0.1 ^b	14.7±0.1 ^{bc}	88.5±7.1 ^a	27.7±0.6 ^b	23.5±0.3 ^b	96.9±2.4 ^a	92.2±1.1 ^a	35.9±1.2 ^{bc}
ZN662	24.8±1.2 ^a	18.3±0.0 ^b	10.1±0.1 ^{bc}	23.9±3.1 ^a	28.2±1.2 ^a	18.5±0.3 ^c	60.9±4.3 ^a	18.7±0.7 ^b	24.3±0.3 ^b
ZN661	21.8±0.1 ^a	26.1±1.6 ^b	11.9±0.0 ^{bc}	20.4±0.2 ^a	18.9±1.1 ^a	19.5±0.1 ^a	61.7±1.8 ^a	58.9±2.8 ^a	17.6±0.1 ^{bc}
ZN652	72.2±3.8 ^a	23.5±0.9 ^b	10.7±0.3 ^{bc}	68.9±0.9 ^a	18.1±0.0 ^b	10.1±0.1 ^{bc}	94.9±4.6 ^a	75.6±0.4 ^b	14.9±0.1 ^{bc}
ZN641	68.3±4.4 ^a	27.1±0.4 ^b	8.1±0.0 ^{bc}	69.8±2.9 ^a	25.4±0.6 ^b	21.4±0.3 ^b	68.5±0.7 ^a	65.8±0.9 ^a	26.7±0.0 ^{bc}
ZN82	63.4±1.8 ^a	20.9±0.4 ^b	10.2±0.0 ^{bc}	67.3±0.6 ^a	32.2±1.1 ^b	18.9±0.1 ^{bc}	33.1±5.2 ^a	19.7±1.3 ^a	27.1±0.1 ^a
ZN981	66.5±2.9 ^a	19.7±0.3 ^b	10.3±0.0 ^{bc}	34.8±4.6 ^a	18.8±0.6 ^b	21.8±0.3 ^b	60.7±0.3 ^a	56.1±1.6 ^b	30.8±0.7 ^{bc}
ZN961	54.9±0.7 ^a	21.8±0.1 ^a	13.8±0.6 ^{bc}	53.4±4.7 ^a	25.6±1.1 ^b	20.6±1.1 ^b	82.9±0.4 ^a	61.7±0.4 ^b	11.3±0.3 ^{bc}
ZN1151	54.1±1.9 ^a	18.8±0.6 ^b	14.4±0.0 ^b	66.3±3.5 ^a	25.4±1.5 ^b	35.5±0.1 ^{bc}	60.6±4.6 ^a	55.9±1.2 ^a	25.2±1.1 ^{bc}
ZN1171	34.5±0.9 ^a	29.1±0.3 ^a	11.9±0.1 ^{bc}	53.9±2.7 ^a	33.9±1.9 ^b	13.2±0.3 ^{bc}	16.4±1.3 ^a	14.2±1.2 ^a	6.8±0.1 ^{bc}
ZN1181	61.5±3.9 ^a	63.2±1.2 ^a	15.9±0.1 ^{bc}	71.7±3.7 ^a	19.2±0.6 ^b	36.1±2.2 ^{bc}	105.6±1.9 ^a	66.4±1.3 ^b	37.4±0.9 ^{bc}

±: Standart sapma şeklinde sunulmuştur.

a,b,c Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen değerler Tukey testine göre P<0.05 düzeyinde istatistiksel olarak önemlidir.

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* suşlarının folat üretiminde farklı besiyerleri ve tampon uygulamaları arasında farklılığın olup olmadığını tespit etmek amacıyla Tukey's testi uygulanmıştır. Birçok suş için tamponlar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmiştir (p<0,05). Ancak, intraseküler folat üretiminde MRS besiyerinde ZN562 suşunda (Çizelge 4), FACM besiyerinde ZN172, ZN362, ZN442 ve ZN661 suşlarında (Çizelge 6) anlamlı bir farklılığa rastlanılmamıştır. Yağsız süt besiyerinde intraseküler folat üretim çalışmalarında tüm suşlarda tampon uygulamalarında anlamlı bir fark gözlenmiştir (p<0,05) (Çizelge 7). Ekstraseküler folat üretiminde ise MRS besiyerinde ZN18, ZN451 ve

ZN1171 suşlarında (Çizelge 4), FACM besiyerinde ZN19, ZN18, ZN252, ZN281, ZN442, ZN551 ve ZN661 suşlarında (Çizelge 6) anlamlı bir farklılığa rastlanılmamıştır. FACM besiyerinde intraseküler folat üretiminde ise Z18 suşu hariç tüm suşların besiyerlerinde uygulanan tamponlar arasında anlamlı bir farklılık olduğu gözlenmiştir (p<0,05). Yağsız süt besiyerinde ise ZN981 suşunda (Çizelge 7) tamponlar arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir (p<0,05).

Çalışmada en yüksek folat üretim kapasitesi gösteren *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN1181 suşunun (105,6 µg/L) Sybesma ve ark. (2003a) (45 µg/L), Laiño

ve ark. (2020) (86,2 µg/L) çalışmalarında kullandıkları en yüksek folat üretimine sahip bakterilerden daha yüksek değerde üretim yeteneği gösterdiği belirlenirken, Cucick ve ark. (2020) (31,9 µg/mL), Liu ve ark. (2022) (239 µg/L), ve Zahed ve ark. (2022) (208 µg/L)'nin çalışmalarında kullandıkları bakterilerin folat miktarından daha

düşük değerde üretim sergilediği tespit edilmiştir. Folat üretim miktarındaki farklılığın kullanılan mikroorganizmaların ve izolasyon kaynaklarının aynı olmaması, farklı besiyeri ve tampon çözeltilerin kullanılması gibi gelişme koşullarına bağlı olarak değişkenlik göstermiş olabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 5. *S. thermophilus* suşlarının farklı besiyerlerinde (Elliker, FACM ve yağsız süt) ve farklı tamponlarda (potasyum fosfat, sodyum fosfat ve sodyum asetat) intrasellüler folat üretimleri (µg/L)

Table 5. *S. thermophilus* strains in different media (Elliker, FACM and skim milk) and buffers (potassium phosphate, sodium phosphate and sodium acetate) intracellular folate production (µg/L)

Bakteri Kodu	Elliker			FACM			Yağsız süt		
	Potasyum Fosfat Tamponu	Sodyum Fosfat Tamponu	Sodyum Asetat Tamponu	Potasyum Fosfat Tamponu	Sodyum Fosfat Tamponu	Sodyum Asetat Tamponu	Potasyum Fosfat Tamponu	Sodyum Fosfat Tamponu	Sodyum Asetat Tamponu
Z15	24.4±3.7 ^a	27.5±0.6 ^a	10.9±0.3 ^{b,c}	30.9±7.4 ^a	41.8±4.4 ^a	14.6±0.1 ^c	25.6±4.4 ^b	63.1±4.4 ^a	36.2±0.4 ^c
Z14	75.4±0.4 ^a	18.4±2.1 ^b	11.7±0.1 ^{b,c}	82.2±2.8 ^a	20.9±0.9 ^b	13.1±0.7 ^{b,c}	26.3±1.2 ^b	40.5±0.7 ^a	25.5±1.8 ^c
Z18	54.4±6.6 ^a	37.2±1.1 ^b	11.1±0.3 ^{b,c}	54.0±0.2 ^a	47.8±3.8 ^a	16.6±0.3 ^{b,c}	41.1±0.7 ^b	47.8±0.3 ^a	12.7±1.9 ^{b,c}
Z173	30.2±1.5 ^a	19.1±0.7 ^b	10.5±0.1 ^{b,c}	48.3±1.3 ^a	18.2±0.3 ^b	12.5±0.4 ^{b,c}	38.7±1.5 ^b	67.2±1.8 ^a	21.1±0.6 ^{b,c}
Z171	48.6±1.6 ^a	45.1±4.3 ^a	11.8±0.4 ^{b,c}	51.4±2.4 ^a	27.8±2.7 ^b	16.3±0.6 ^{b,c}	77.8±0.7 ^a	47.1±2.7 ^b	23.1±0.9 ^{b,c}
Z272	58.8±1.1 ^a	25.1±0.1 ^b	13.1±0.3 ^{b,c}	60.6±1.1 ^a	35.5±0.1 ^b	17.9±1.2 ^{b,c}	78.5±0.0 ^a	37.9±1.5 ^b	15.2±0.9 ^{b,c}
Z261	50.9±0.3 ^a	26.3±3.7 ^b	11.5±0.1 ^{b,c}	48.7±1.9 ^a	32.1±1.6 ^b	17.7±0.0 ^{b,c}	43.1±3.9 ^b	60.5±0.6 ^a	35.1±0.1 ^c
Z271	58.8±3.2 ^a	21.9±0.6 ^b	10.6±0.4 ^{b,c}	43.7±0.3 ^a	30.7±1.1 ^b	15.7±0.3 ^{b,c}	73.3±1.5 ^a	40.9±0.1 ^b	18.4±2.2 ^{b,c}
Z372	71.8±2.9 ^a	21.9±0.1 ^b	11.6±0.7 ^{b,c}	70.3±0.1 ^a	22.9±0.6 ^b	16.5±0.2 ^{b,c}	61.6±0.9 ^a	61.5±2.2 ^a	32.5±0.6 ^{b,c}
Z361	29.7±6.3 ^a	50.9±1.8 ^a	14.1±0.9 ^{b,c}	34.4±1.6 ^b	48.1±0.9 ^a	19.4±1.2 ^{b,c}	19.9±4.7 ^b	59.1±1.8 ^a	24.1±1.2 ^{b,c}
Z351	52.3±3.1 ^a	17.7±0.4 ^a	10.7±0.1 ^{b,c}	50.4±3.9 ^a	26.7±1.2 ^b	16.7±0.1 ^{b,c}	61.3±0.0 ^b	70.7±0.7 ^a	29.8±0.4 ^{b,c}
Z472	44.9±0.4 ^a	31.5±0.1 ^b	13.1±0.7 ^{b,c}	41.5±1.8 ^a	29.9±0.1 ^b	17.6±0.7 ^{b,c}	65.6±0.4 ^a	28.3±1.3 ^b	24.9±3.2 ^b
Z482	103.8±1.1 ^a	33.9±0.6 ^b	14.5±0.3 ^{b,c}	70.2±1.1 ^a	38.4±1.6 ^b	17.3±0.6 ^{b,c}	80.1±4.9 ^a	43.6±0.7 ^b	29.2±2.2 ^{b,c}
Z662	56.9±1.3 ^a	32.1±0.6 ^b	11.1±0.1 ^{b,c}	59.5±1.3 ^a	31.4±1.8 ^b	15.3±0.3 ^{b,c}	38.7±0.3 ^a	33.6±2.2 ^a	19.9±1.5 ^{b,c}
Z651	34.3±2.4 ^a	36.4±0.4 ^a	10.6±2.4 ^{b,c}	32.2±1.1 ^a	23.6±1.1 ^b	12.6±1.2 ^{b,c}	32.8±0.1 ^a	24.5±0.9 ^b	20.9±0.6 ^{b,c}
Z672	72.3±1.6 ^a	10.5±0.6 ^a	13.9±0.6 ^{b,c}	62.5±3.2 ^a	19.0±0.2 ^b	17.2±0.3 ^b	50.5±0.6 ^a	40.7±3.2 ^b	25.9±1.1 ^{b,c}
Z682	48.2±0.6 ^a	31.2±1.9 ^b	10.7±0.1 ^{b,c}	9.5±2.4 ^b	48.7±4.8 ^a	16.8±0.5 ^c	68.1±2.1 ^a	69.9±0.4 ^a	21.7±2.5 ^{b,c}
Z752	71.9±2.8 ^a	15.2±1.9 ^a	10.3±0.1 ^{b,c}	79.2±1.6 ^a	18.8±0.6 ^b	14.9±0.1 ^b	91.6±0.9 ^a	17.1±0.1 ^b	30.1±1.3 ^{b,c}
Z743	61.5±2.1 ^a	21.9±1.8 ^a	14.9±7.2 ^{b,c}	55.9±3.2 ^a	20.7±1.6 ^b	19.8±0.4 ^b	79.1±2.9 ^a	26.7±2.7 ^b	21.1±0.7 ^{b,c}
Z861	82.6±2.7 ^a	25.1±0.6 ^b	11.6±0.3 ^{b,c}	87.7±0.4 ^a	26.3±0.1 ^b	14.3±0.4 ^{b,c}	58.2±0.1 ^a	26.2±0.4 ^b	19.6±0.1 ^{b,c}
Z862	76.9±4.3 ^a	27.1±1.2 ^b	14.4±0.6 ^{b,c}	71.1±2.1 ^a	34.4±1.5 ^b	19.4±0.6 ^{b,c}	74.1±2.9 ^a	79.9±2.2 ^a	17.1±1.1 ^{b,c}
Z1062	74.3±2.8 ^a	32.7±1.1 ^b	16.6±0.9 ^{b,c}	59.1±0.9 ^a	40.7±3.1 ^b	19.4±1.1 ^{b,c}	63.8±2.7 ^a	64.1±2.4 ^a	18.2±0.3 ^{b,c}
Z1083	55.7±2.2 ^a	33.3±0.4 ^b	11.8±0.7 ^{b,c}	48.5±0.3 ^a	22.1±1.9 ^b	19.5±0.3 ^b	84.2±3.7 ^a	27.8±4.9 ^b	17.6±3.8 ^{b,c}
Z1061	53.6±1.1 ^a	17.6±2.2 ^a	11.9±0.3 ^{b,c}	9.6±2.1 ^a	26.5±1.6 ^b	22.9±0.4 ^b	56.7±2.1 ^a	31.1±1.6 ^b	19.5±1.9 ^{b,c}
Z1081	70.5±1.6 ^a	37.3±0.4 ^b	11.2±0.4 ^{b,c}	52.7±1.1 ^a	18.2±1.2 ^b	15.5±0.3 ^b	63.5±2.4 ^a	24.9±0.4 ^b	22.1±3.4 ^b
Z1051	36.8±1.1 ^a	24.9±0.2 ^b	14.9±1.3 ^{b,c}	69.8±0.4 ^a	17.5±1.6 ^b	18.1±0.9 ^b	46.3±0.7 ^a	38.4±0.7 ^b	22.3±2.5 ^{b,c}
Z1161	48.1±3.4 ^a	7.9±0.9 ^b	17.2±1.2 ^b	33.8±2.7 ^a	12.4±0.1 ^b	12.5±1.6 ^b	60.1±1.3 ^a	6.4±0.3 ^b	21.6±0.3 ^{b,c}
Z1152	37.7±1.1 ^a	28.1±0.0 ^b	10.7±1.2 ^{b,c}	68.8±0.6 ^a	27.8±0.7 ^b	14.5±0.9 ^{b,c}	40.7±1.8 ^a	30.7±0.3 ^b	32.8±0.1 ^b
Z1171	56.8±0.4 ^a	19.5±0.9 ^b	12.2±0.3 ^{b,c}	53.8±1.6 ^a	20.8±0.4 ^b	25.1±0.3 ^{b,c}	74.2±2.7 ^a	34.9±0.9 ^b	37.9±0.6 ^b
Z1151	37.9±0.1 ^a	30.6±1.5 ^b	12.2±0.3 ^{b,c}	68.4±4.1 ^a	33.5±1.5 ^b	17.7±0.9 ^{b,c}	44.5±1.8 ^a	31.6±0.7 ^b	19.7±0.3 ^{b,c}
Z1153	62.1±1.1 ^a	40.6±0.4 ^b	28.1±0.9 ^{b,c}	38.1±2.1 ^a	37.3±1.5 ^a	31.8±0.7 ^a	25.2±1.8 ^a	11.7±0.2 ^b	23.1±0.9 ^c
Z1162	69.5±4.7 ^a	8.9±0.4 ^b	29.8±1.1 ^{b,c}	74.7±1.5 ^a	15.7±0.6 ^b	17.9±1.1 ^b	95.8±1.9 ^a	6.3±0.6 ^b	19.9±1.5 ^{b,c}

± Standart sapma şeklinde sunulmuştur.

^{a,b,c} Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen değerler Tukey testine göre P<0.05 düzeyinde istatistiksel olarak önemlidir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

LAB'nin fermente ürünlerde folat konsantrasyonunu artırmadaki rolü yaygın olarak rapor edilmektedir (Laiño ve ark., 2012, Da Silva ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2020). LAB arasında *S. thermophilus*, suşa bağlı olarak fermentasyon sırasında büyük miktarlarda folat üretme kabiliyeti gösteren önemli starter kültürlerden birisidir (Laiño ve ark., 2012; Albuquerque ve ark., 2019). LAB tarafından üretilen folatın, gıda işleme sırasında kullanılmasıyla daha sağlıklı gıda ürünlerinin elde edildiği bildirilmiştir (Rad ve ark., 2016; Meucci ve ark., 2018). Çoğu LAB, birçok vitamin için oksotrofik olmasına karşın bazı suşların B grubu vitaminleri sentezleme yeteneği

bulunmaktadır. Bu durum LAB ile fermente edilmiş gıdaların tüketilmesinin önemini arttırmaktadır (Albuquerque ve ark., 2019).

Bu çalışmada, yerel gıda kaynaklarından (yoğurt) elde edilen *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşlarının farklı besiyeri ve tampon uygulamalarının hücre içi ve hücre dışı folat üretimine etkisi incelenmiştir. Ayrıca kullanılan besiyerleri ve tampon çözeltiler arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığı istatistiksel olarak incelenmiştir. Yapılan literatür taramaları neticesinde yüksek folat üretimine sahip probiyotik mikroorganizmaların tüketimiyle dışarıdan folik asit takviyesine gerek duyulmadan folat eksikliğinin

doğal yollarla gideriminin mümkün olabileceği belirlenmiştir (Laiño ve ark., 2019; Fayemi ve ark., 2023). *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bakterileri arasından yüksek folat üretim yeteneği gösteren suşların, canlının metabolik faaliyetlerini yerine getirebilmesi ve çeşitli

hastalıkların oluşumunun engellenmesi açısından gıda uygulamalarında tercih edilebileceği, ayrıca starter özellikleri detaylı olarak belirlendikten sonra yoğurt yapımında alternatif starter kültür olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.

Çizelge 6. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarının farklı besiyerlerinde (MRS, FACM ve yağsız süt) ve farklı tamponlarda (potasyum fosfat, sodyum fosfat ve sodyum asetat) ekstrasellüler folat üretimleri (µg/L)
Table 6. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains in different media (MRS, FACM and skim milk) and in different buffers (potassium phosphate, sodium phosphate and sodium acetate) extracellular folate production (µg/L)

Bakteri Kodu	Elliker			FACM			Yağsız süt		
	Potasyum Fosfat Tamponu	Sodyum Fosfat Tamponu	Sodyum Asetat Tamponu	Potasyum Fosfat Tamponu	Sodyum Fosfat Tamponu	Sodyum Asetat Tamponu	Potasyum Fosfat Tamponu	Sodyum Fosfat Tamponu	Sodyum Asetat Tamponu
ZN171	30.9±1.6 ^a	18.2±0.0 ^b	7.2±0.5 ^{bc}	11.6±0.5 ^a	28.2±1.1 ^b	23.1±1.8 ^b	40.5±1.7 ^a	21.5±0.9 ^b	1.9±1.1 ^{bc}
ZN19	9.7±0.6 ^a	9.2±0.1 ^a	3.3±0.2 ^{bc}	21.9±2.1 ^a	20.5±1.7 ^a	17.7±0.0 ^a	16.1±0.5 ^a	13.6±0.2 ^a	2.4±1.3 ^{bc}
ZN141	12.7±0.0 ^a	15.6±0.5 ^b	1.5±0.1 ^{bc}	33.0±0.5 ^a	28.4±2.9 ^a	12.9±1.9 ^{bc}	32.7±1.5 ^a	17.9±0.6 ^b	1.1±0.2 ^{bc}
ZN172	2.9±0.1 ^a	14.7±0.8 ^b	6.7±0.2 ^{bc}	28.9±3.9 ^a	23.9±2.1 ^a	15.5±0.5 ^b	19.7±0.6 ^a	7.2±0.0 ^b	1.6±0.6 ^{bc}
ZN18	7.6±3.3 ^a	8.6±1.4 ^a	2.1±0.2 ^a	12.3±3.3 ^a	13.9±1.5 ^a	16.8±0.2 ^a	17.9±1.4 ^a	8.2±0.2 ^b	1.5±0.9 ^{bc}
ZN142	37.7±0.3 ^a	35.4±1.8 ^a	1.9±0.1 ^{bc}	46.0±1.5 ^a	24.4±0.6 ^b	21.3±0.8 ^b	40.5±1.1 ^a	8.2±1.3 ^b	0.9±0.1 ^{bc}
ZN252	16.2±0.1 ^a	20.4±2.1 ^a	4.2±1.0 ^{bc}	25.4±2.1 ^a	25.9±0.1 ^a	24.0±0.1 ^a	3.0±1.8 ^a	4.7±0.1 ^a	1.1±0.3 ^a
ZN272	29.3±1.6 ^a	31.5±1.7 ^a	3.6±0.3 ^{bc}	34.0±0.6 ^a	23.7±0.6 ^b	22.3±0.1 ^b	38.2±1.4 ^a	7.1±0.1 ^b	0.3±0.2 ^{bc}
ZN251	22.3±1.4 ^a	26.7±0.8 ^b	3.3±0.2 ^{bc}	42.4±3.9 ^a	26.8±1.1 ^b	16.5±0.6 ^{bc}	30.9±0.5 ^a	7.3±0.9 ^b	1.3±0.1 ^{bc}
ZN281	8.5±1.8 ^a	8.9±0.2 ^a	1.2±0.0 ^{bc}	21.5±0.2 ^a	19.3±0.3 ^a	19.5±1.1 ^a	17.5±2.1 ^a	6.6±0.3 ^b	2.1±0.8 ^b
ZN362	22.7±1.9 ^a	20.5±1.6 ^a	3.9±0.0 ^{bc}	31.1±1.3 ^a	28.0±0.5 ^a	4.9±0.1 ^{bc}	8.3±1.3 ^a	8.0±0.8 ^a	2.1±0.1 ^{bc}
ZN382	36.1±1.1 ^a	30.5±6.2 ^a	5.3±1.7 ^{bc}	10.5±1.1 ^a	23.9±1.4 ^b	18.1±0.1 ^{bc}	14.4±0.6 ^a	7.1±0.3 ^b	2.7±0.5 ^{bc}
ZN342	29.5±1.1 ^a	21.5±2.3 ^b	4.8±0.3 ^{bc}	45.9±0.5 ^a	29.5±0.5 ^b	21.9±0.3 ^{bc}	15.9±1.1 ^a	8.8±0.2 ^b	2.4±0.3 ^{bc}
ZN361	22.3±0.6 ^a	20.7±2.3 ^a	1.6±0.1 ^{bc}	13.6±0.9 ^a	19.8±0.5 ^b	19.1±0.3 ^b	10.2±0.1 ^a	7.6±1.6 ^a	1.2±0.0 ^{bc}
ZN461	8.7±0.6 ^a	8.2±0.6 ^a	2.3±0.1 ^{bc}	33.7±1.1 ^a	25.7±0.1 ^b	16.3±2.1 ^{bc}	16.5±0.7 ^a	9.1±0.7 ^a	1.5±0.1 ^{bc}
ZN442	13.1±0.6 ^a	14.8±0.8 ^a	5.5±0.1 ^{bc}	18.9±7.2 ^a	22.7±2.3 ^a	22.7±1.1 ^a	25.3±3.1 ^a	10.6±1.5 ^a	2.9±0.8 ^{bc}
ZN451	46.1±0.2 ^a	46.4±4.2 ^a	36.0±1.4 ^a	45.9±2.5 ^a	26.8±0.6 ^b	16.5±0.9 ^{bc}	27.0±0.5 ^a	11.8±1.6 ^b	14.6±0.2 ^b
ZN551	42.3±0.2 ^a	31.1±6.9 ^a	4.9±0.0 ^{bc}	38.5±4.9 ^a	27.7±3.6 ^a	25.6±0.8 ^a	14.9±3.4 ^a	6.8±0.3 ^a	2.4±0.6 ^b
ZN561	58.2±0.6 ^a	44.3±0.8 ^b	6.7±0.0 ^{bc}	50.9±2.6 ^a	30.5±0.8 ^b	24.9±0.0 ^b	61.4±0.7 ^a	10.8±1.3 ^b	1.7±0.5 ^{bc}
ZN562	11.3±2.2 ^a	23.4±1.1 ^b	5.0±0.2 ^{bc}	2.9±0.7 ^a	24.0±1.1 ^b	26.2±0.6 ^b	3.7±1.4 ^b	8.2±0.3 ^a	2.2±0.2 ^c
ZN543	47.4±0.5 ^a	33.3±0.1 ^b	3.6±0.3 ^{bc}	48.8±0.7 ^a	27.1±1.1 ^b	20.9±0.0 ^{bc}	39.8±1.8 ^a	8.9±0.1 ^b	2.0±0.2 ^{bc}
ZN662	10.7±0.6 ^a	9.5±0.3 ^a	5.7±0.7 ^{bc}	30.4±2.3 ^a	29.5±0.0 ^a	24.2±0.9 ^b	19.3±0.8 ^a	8.7±0.3 ^b	3.5±1.4 ^{bc}
ZN661	19.9±0.5 ^a	18.7±1.3 ^a	4.7±0.9 ^{bc}	22.8±2.2 ^a	20.4±0.1 ^a	21.8±0.6 ^a	12.1±1.3 ^a	7.6±1.6 ^a	2.6±1.4 ^b
ZN652	45.9±0.2 ^a	38.5±3.1 ^a	8.3±0.7 ^{bc}	46.3±1.9 ^a	21.0±0.7 ^b	23.9±0.1 ^b	45.3±2.7 ^a	11.1±1.3 ^b	4.7±0.1 ^b
ZN641	70.2±0.9 ^a	39.3±2.9 ^b	5.3±0.6 ^{bc}	38.8±1.0 ^a	24.2±0.8 ^b	18.9±0.1 ^{bc}	66.3±0.3 ^a	9.2±1.3 ^b	3.2±0.6 ^{bc}
ZN82	28.4±4.1 ^a	15.8±0.5 ^b	6.6±0.1 ^b	49.3±0.2 ^a	27.3±0.1 ^b	29.4±0.6 ^{bc}	27.9±0.9 ^a	15.2±0.3 ^b	4.5±1.1 ^{bc}
ZN981	41.0±2.5 ^a	31.1±6.9 ^a	4.4±0.3 ^{bc}	40.7±0.6 ^a	27.7±3.6 ^a	21.6±0.1 ^b	27.4±0.1 ^a	10.2±1.5 ^a	3.7±0.1 ^a
ZN961	14.9±1.3 ^a	13.7±1.6 ^b	1.1±0.1 ^{bc}	29.7±1.6 ^a	20.6±1.3 ^b	21.1±0.1 ^b	23.9±0.2 ^a	8.9±1.5 ^b	0.9±0.1 ^{bc}
ZN1151	74.9±0.7 ^a	27.8±0.6 ^b	1.6±0.5 ^{bc}	50.9±1.1 ^a	23.6±0.6 ^b	14.0±0.2 ^{bc}	29.1±0.2 ^a	12.3±0.6 ^b	0.9±0.1 ^{bc}
ZN1171	33.2±0.6 ^a	30.1±3.4 ^a	33.6±1.8 ^a	21.6±0.8 ^a	26.8±0.1 ^b	17.2±0.2 ^{bc}	19.8±1.1 ^a	6.5±0.6 ^b	6.3±0.9 ^b
ZN1181	44.7±2.7 ^a	33.1±0.6 ^b	1.8±0.1 ^{bc}	37.7±1.6 ^a	37.8±5.1 ^a	16.7±0.3 ^{bc}	36.9±2.5 ^a	40.6±0.7 ^a	1.0±0.2 ^{bc}

±: Standart sapma şeklinde sunulmuştur.

a,b,c Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen değerler Tukey testine göre P<0.05 düzeyinde istatistiksel olarak önemlidir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında, 2014 yılında tamamlanan "Geleneksel Yöntemlerle Yapılan Yoğurtlardan İzole Edilen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* Türlerinde Folat Üretimi" isimli yüksek lisans tezinden türetilmiştir. Ayrıca, çalışmamız Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 05/2013-07 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Meryem Nur Zeydanlı: Literatür taraması, deneylerin

yapılması, malzemelerin temin edilmesi Zehranur Yüksekdağ: Fikir/Kavram, planlama ve tasarım, kaynak sağlama, denetleme ve danışmanlık Berat Çınar Acar: Literatür taraması, makalenin yazımı, istatistiksel analizlerin yürütülmesi

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Araştırma ve Yayın Etiği Kararı

Yazarlar bu çalışmanın araştırma ve yayın etiğine uygun olarak yapıldığını beyan ederler.

Çizelge 7. *S. thermophilus* suşlarının farklı besiyerlerinde (Elliker, FACM ve yağsız süt) ve farklı tamponlarda (potasyum fosfat, sodyum fosfat ve sodyum asetat) ekstrasellüler folat üretimleri (µg/L)
Table 7. *S. thermophilus* strains in different media (Elliker, FACM and skim milk) and in different buffers (potassium phosphate, sodium phosphate and sodium acetate) extracellular folate production (µg/L)

Bakteri Kodu	Elliker			FACM			Yağsız süt		
	Potasyum Fosfat Tamponu	Sodyum Fosfat Tamponu	Sodyum Asetat Tamponu	Potasyum Fosfat Tamponu	Sodyum Fosfat Tamponu	Sodyum Asetat Tamponu	Potasyum Fosfat Tamponu	Sodyum Fosfat Tamponu	Sodyum Asetat Tamponu
Z15	44.7±0.6 ^a	11.7±1.4 ^b	6.1±1.6 ^{b,c}	11.9±0.3 ^a	9.5±0.5 ^a	16.1±1.3 ^{b,c}	29.4±0.6 ^a	6.7±0.7 ^b	6.4±0.7 ^b
Z14	53.6±0.9 ^a	11.3±1.7 ^b	5.4±1.4 ^b	49.1±2.5 ^a	8.8±0.6 ^b	15.5±0.9 ^{b,c}	50.2±0.0 ^a	6.2±0.1 ^b	4.9±0.9 ^b
Z18	12.6±0.2 ^a	7.9±0.3 ^b	4.8±0.0 ^{b,c}	9.9±0.8 ^a	10.5±3.2 ^a	8.9±3.9 ^a	18.7±0.3 ^a	6.2±0.2 ^b	4.7±0.5 ^b
Z173	38.3±1.5 ^a	28.2±1.6 ^b	8.1±0.6 ^{b,c}	27.0±1.6 ^a	22.5±0.2 ^a	12.9±0.2 ^{b,c}	46.8±0.6 ^a	8.1±0.2 ^b	5.5±0.6 ^b
Z171	32.7±1.3 ^a	12.6±0.2 ^b	10.1±2.5 ^b	6.6±1.1 ^a	10.9±0.5 ^b	13.9±0.7 ^b	27.0±0.7 ^a	8.5±0.5 ^b	5.9±0.5 ^b
Z272	48.9±3.5 ^a	46.6±2.1 ^a	5.3±0.5 ^{b,c}	52.7±0.8 ^a	25.0±0.1 ^b	15.1±0.1 ^{b,c}	73.9±6.4 ^a	8.1±0.2 ^b	3.9±0.2 ^b
Z261	25.5±0.1 ^a	21.2±0.9 ^b	4.8±0.0 ^{b,c}	64.5±0.5 ^a	25.9±0.1 ^b	12.7±0.8 ^{b,c}	70.1±2.7 ^a	6.5±0.2 ^b	6.1±0.5 ^b
Z271	8.4±0.2 ^b	54.6±3.8 ^a	5.6±1.1 ^c	19.1±2.9 ^a	19.6±0.6 ^a	14.3±0.2 ^{b,c}	53.2±0.5 ^a	7.1±0.0 ^b	4.7±0.3 ^b
Z372	49.9±3.5 ^a	28.2±1.5 ^b	5.7±0.1 ^{b,c}	52.5±0.6 ^a	28.4±1.4 ^b	16.2±0.2 ^{b,c}	58.6±3.8 ^a	6.1±0.1 ^b	4.8±0.8 ^b
Z361	36.1±0.8 ^a	9.5±0.6 ^b	9.2±0.1 ^b	3.5±0.6 ^a	12.9±0.6 ^b	11.4±0.3 ^b	3.6±0.5 ^a	6.6±0.1 ^b	5.9±0.7 ^b
Z351	7.6±1.7 ^b	31.9±0.9 ^a	7.5±0.3 ^c	3.4±1.4 ^a	27.2±0.7 ^b	14.9±0.5 ^{b,c}	42.8±2.2 ^a	6.5±0.9 ^b	4.4±1.3 ^b
Z472	28.8±0.3 ^b	40.8±9.1 ^a	5.8±0.6 ^c	47.7±1.1 ^a	22.8±0.6 ^b	10.1±1.7 ^{b,c}	40.1±0.3 ^a	8.3±0.7 ^b	4.4±0.6 ^b
Z482	55.7±2.1 ^a	17.2±1.8 ^b	9.2±0.8 ^{b,c}	55.4±1.1 ^a	10.8±0.5 ^b	13.2±0.5 ^{b,c}	57.3±2.9 ^a	7.3±0.2 ^b	6.9±0.3 ^b
Z662	64.5±1.3 ^a	36.9±3.9 ^b	5.7±0.1 ^{b,c}	39.8±0.3 ^a	27.0±1.0 ^b	10.2±1.4 ^{b,c}	49.7±0.8 ^a	7.8±0.1 ^b	6.4±0.3 ^b
Z651	13.3±1.7 ^b	21.4±0.5 ^a	6.8±0.6 ^{b,c}	79.9±0.2 ^a	37.2±4.2 ^b	11.8±0.8 ^{b,c}	15.8±0.1 ^a	7.2±0.3 ^b	6.3±0.6 ^b
Z672	57.4±0.1 ^a	12.5±2.2 ^b	8.7±0.1 ^b	47.5±1.5 ^a	11.5±2.1 ^b	15.1±1.1 ^b	54.0±0.5 ^a	11.4±0.5 ^b	3.9±0.6 ^{b,c}
Z682	3.0±0.8 ^b	25.6±0.3 ^a	5.4±1.4 ^b	42.2±0.2 ^a	11.8±1.4 ^b	14.4±0.5 ^b	59.9±4.1 ^a	9.9±0.2 ^b	6.3±0.6 ^b
Z752	55.4±1.5 ^a	10.9±0.8 ^b	5.8±0.5 ^{b,c}	65.0±0.1 ^a	12.3±0.9 ^b	9.4±1.1 ^b	60.7±0.9 ^a	9.4±0.5 ^b	6.3±0.5 ^b
Z743	56.9±3.9 ^a	6.7±1.5 ^b	5.1±0.7 ^b	57.0±1.3 ^a	9.1±0.1 ^b	6.9±0.5 ^b	56.6±3.1 ^a	6.5±0.2 ^b	6.5±1.3 ^b
Z861	52.3±2.4 ^a	43.2±2.6 ^b	9.4±0.6 ^{b,c}	15.2±1.7 ^b	29.9±0.3 ^a	19.3±0.8 ^c	44.2±3.6 ^a	7.5±0.3 ^b	7.8±0.1 ^b
Z862	72.5±2.9 ^a	44.6±1.5 ^b	6.4±0.7 ^{b,c}	61.6±0.9 ^a	30.5±0.8 ^b	5.9±0.5 ^{b,c}	51.3±0.0 ^a	6.1±0.1 ^b	4.7±1.4 ^b
Z1062	56.7±2.2 ^a	27.0±1.1 ^b	5.8±0.8 ^{b,c}	51.9±0.8 ^a	25.9±0.1 ^b	9.5±0.3 ^{b,c}	51.0±0.2 ^a	6.7±0.3 ^b	4.8±1.1 ^b
Z1083	37.7±1.1 ^a	6.1±0.1 ^b	4.8±0.5 ^b	5.7±0.6 ^a	9.9±0.3 ^b	16.5±0.2 ^{b,c}	38.4±0.1 ^a	7.2±0.0 ^b	6.7±0.7 ^b
Z1061	33.9±0.3 ^a	24.8±0.7 ^b	6.5±0.7 ^{b,c}	12.6±0.5 ^a	24.1±1.0 ^b	16.6±0.3 ^{b,c}	4.2±0.6 ^a	8.5±0.7 ^b	6.1±0.1 ^b
Z1081	37.6±0.8 ^a	25.3±0.5 ^b	8.3±0.6 ^{b,c}	64.1±2.6 ^a	15.2±2.6 ^b	16.8±0.8 ^{b,c}	40.1±4.1 ^a	11.4±1.1 ^b	5.5±0.1 ^b
Z1051	53.3±0.7 ^a	9.3±0.9 ^b	4.5±0.9 ^{b,c}	28.3±1.1 ^a	16.1±0.7 ^b	6.3±1.6 ^{b,c}	28.2±0.3 ^a	7.7±1.3 ^b	4.4±0.6 ^b
Z1161	4.6±0.5 ^a	8.9±0.2 ^a	6.2±0.3 ^a	26.1±1.5 ^a	14.6±0.2 ^b	5.9±0.7 ^{b,c}	31.8±0.7 ^a	34.9±1.7 ^a	5.3±0.3 ^{b,c}
Z1152	53.0±1.6 ^a	27.4±2.3 ^b	6.1±0.1 ^{b,c}	67.8±1.8 ^a	23.3±0.3 ^b	13.7±0.5 ^{b,c}	59.4±2.6 ^a	9.7±0.1 ^b	4.7±0.5 ^b
Z1171	36.4±0.3 ^a	20.3±1.2 ^b	6.5±1.3 ^{b,c}	61.6±0.1 ^a	12.1±0.8 ^b	9.9±0.8 ^b	60.0±1.8 ^a	7.6±0.6 ^b	3.5±0.3 ^b
Z1151	55.4±1.1 ^a	28.6±1.3 ^b	5.3±0.5 ^{b,c}	57.1±1.1 ^a	23.4±1.4 ^b	15.3±0.3 ^{b,c}	51.7±0.6 ^a	6.8±0.5 ^b	4.1±1.3 ^b
Z1153	53.2±0.9 ^a	10.4±0.2 ^b	9.4±0.6 ^{b,c}	54.3±2.3 ^a	11.9±0.6 ^b	7.2±0.2 ^b	28.1±0.5 ^a	29.2±0.5 ^a	4.9±0.3 ^{b,c}
Z1162	50.6±0.0 ^a	7.8±0.1 ^b	7.3±1.8 ^b	56.3±0.1 ^a	17.8±0.6 ^b	6.5±0.5 ^{b,c}	62.5±3.1 ^a	25.2±0.9 ^b	5.9±0.8 ^{b,c}

±: Standart sapma şeklinde sunulmuştur.

^{a,b,c} Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen değerler Tukey testine göre $P<0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemlidir.

KAYNAKLAR

- Agagunduz, D., Sahin, T.O., Ayten, S., Yılmaz, B., Güneşliol, B.E., Russo, P., Spano, G., & Ozogul, F. (2022). Lactic acid bacteria as pre-technological, bioprotective and health-promoting cultures in the dairy food industry. *Food Bioscience*, 47, 101617. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101617>.
- Albano, C., Silvetti, T., & Brasca, M. (2020). Screening of lactic acid bacteria producing folate and their potential use as adjunct cultures for cheese bio-enrichment. *FEMS Microbiology Letters*, 367, 9. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa059>.
- Aras, Z. (2011). Rapid diagnostic methods in microbiology. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68(2), 97–104.
- Aswathy, R.G., Ismail, B., John, R.P., & Nampoothiri, K.M. (2008). Evaluation of the probiotic characteristics of newly isolated lactic acid bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151, 244-255. [10.1007/s12010-008-8183-6](https://doi.org/10.1007/s12010-008-8183-6).
- Albano, C., Silvetti, T., & Brasca, M. (2020). Screening of lactic acid bacteria producing folate and their potential use as adjunct cultures for cheese bio-enrichment. *FEMS Microbiology Letters*, 367. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa059>.
- Albuquerque, M.A.C., Yamacita, D.S., Bedani, R., LeBlanc, J.G., & Saad, S.M.I. (2019). Influence of passion fruit by-product and fructooligosaccharides on the viability of *Streptococcus thermophilus* TH-4 and *Lactobacillus rhamnosus* LGG in folate bio-enriched fermented soy products and their effect on probiotic survival and folate bio-accessibility under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 292, 126-136. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.012>.
- Baggott J.E., Oster R.A., & Tamura T. (2012). Meta-analysis of cancer risk in folic acid

- supplementation trials. *Cancer Epidemiology*, 36, 78-81. 10.1016/j.canep.2011.05.003.
- Bailey S.W., & Ayling J.E. (2009). The extremely slow and variable activity of dihydrofolate reductase in the human liver and its implications for high folic acid intake. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*, 106(36), 15424-9. 10.1073/pnas.0902072106.
- Cucick, A.C.C., Gianni, K., Todorov, S.D., de LeBlanc, A.M., LeBlanc, J., & Franco, B.D.G.M. (2020). Evaluation of the bioavailability and intestinal effects of milk fermented by folate producing lactic acid bacteria in a depletion/repletion mice model. *Journal of Functional Foods*, 66, 103785. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103785>.
- Da Silva, F.F.P., Biscola, V., LeBlanc, J.G., & de Melo Franco, B.D.G. (2016). Effect of indigenous lactic acid bacteria isolated from goat milk and cheeses on folate and riboflavin content of fermented goat milk. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 155-161. ISSN: 0023-6438.
- dos Santos, H.R.M., Argolo, C.S., Argolo-Filho, R.C., & Loguercio, L.L.A. (2019). 16S rDNA PCR based theoretical to actual delta approach on culturable mock communities revealed severe losses of diversity information. *BMC Microbiology*, 19, 74. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1446-2>.
- Engevik, M.A., Morra, C.N., Röth, D., Engevik, K., Spinler, J.K., Devaraj, S., Crawford, S.E., Estes, M.K., Kalkum, M., & Versalovic, J. (2019). Microbial metabolic capacity for intestinal folate production and modulation of host folate receptors. *Frontiers in Microbiology Microbial Physiology and Metabolism*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02305>.
- Fayemi, O.E., Akanni, G.B., Sobowale, S.S., Oelofse, A., & Buys, E.M. (2023). Potential for increasing folate contents of traditional African fermented sorghum gruel (Motoho) using presumptive probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Food Composition and Analysis*, 115, 104850. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104850>.
- Frey, J., & Nicolet, J. (1997). Molecular identification and epidemiology of animal mycoplasmas. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 109(14-15), 600-603.
- Greppi, A., Hemery, Y., Berrazaga, I. Almaksour, Z., & Humblot, C. (2017). The ability of lactobacilli isolated from traditional cereal-based fermented food to produce folate in culture media under different growth conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 86, 277-84. 10.1016/j.lwt.2017.08.007.
- Haghshenas, B., Abdullah, N., Nami, Y., Radiah, D., Rosli, R., & Khosroushahi, A.Y. (2014). Different effects of two newly-isolated probiotic *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 44 Lac strains from traditional dairy products on cancer cell lines. *Anaerobe*, 30, 51-59. 10.1016/j.anaerobe.2014.08.009.
- Hildebrand, L.A., Dumas, B., Milrod, C.J., & Hudspeth, J.C. (2021). Folate deficiency in an urban safety-net population. *The American Journal of Medicine*, 134(10), 1265-1269. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2021.04.028>.
- Iyer, R., & Tomar, S.K. (2009). Folate: A functional food constituent. *Journal of Food Science*, 74(9), R114-R122. 10.1111/j.1750-3841.2009.01359.x.
- Khalili, M., Rad, A.H., Khosroushahi, A.Y., Khosravi, H., & Jafarzadeh, S. (2020). Application of probiotics in folate bio-fortification of yoghurt. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12, 756-763. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09560-7>.
- Kızılyıldırım, S., Köksal, F. (2023). Investigation of the antibiotic profiles and phlogenetic relationships of the lactobacillus species isolated from goat's and cow's milk. *KSU Journal of Agriculture and Nature*. 26 (5), 1021-1026. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdogava.vi.1178550>.
- Laiño, J.E., LeBlanc, J.G., De Giori, & G.S. (2012). Production of natural folates by lactic acid bacteria starter cultures isolated from artisanal Argentinean yogurts. *Canadian Journal of Microbiology*, 58, 581-588. <https://doi.org/10.1139/w2012-026>.
- LeBlanc, J.G., de Giori, G.S., Smid, E.J., Hugenholtz, J., & Sesma, F. (2007). Folate production by lactic acid bacteria and other food-grade microorganisms. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 1, 329-339.
- LeBlanc, J.G., Laino, J.E., del Valle, M.J., Vannini, V., van Sinderen, D., Taranto, M.P., de Valdez, G.F., de Giori, G.S., Sesma, F. (2011). B-Group vitamin production by lactic acid bacteria - current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology*, 111(6), 1297-1309. 10.1111/j.1365-2672.2011.05157.x.
- Levit, R., Savoy de Giori, G., de Moreno de LeBlanc, A., & LeBlanc, J.G. (2021). Recent update on lactic acid bacteria producing riboflavin and folates: Application for food fortification and treatment of intestinal inflammation. *Journal of Applied Microbiology*, 130, 1412-1424. ISSN 1364-5072.
- Liu, M., Chen, Q., Su, Y., Zeng, L., Wu, H., Gu, Q., Ping Li, P., Mahara, F.A., Nuraida, L., & Lioe, H.N. (2021). Folate in milk is fermented by lactic acid bacteria from different food sources. *Preventive Nutrition and Food Science*, 26(2), 230-240. <https://doi.org/10.3746/pnf.2021.26.2.230> Rydon 2016.
- Mahara, F.A., Nuraida, L., & Lioe, H.N. (2021). Folate in milk is fermented by lactic acid bacteria from different food sources. *Preventive Nutrition and Food Science*, 26(2), 230-240. <https://doi.org/10.3746/pnf.2021.26.2.230> Rydon 2016.

- Meucci, A., Rossetti, L., Zago, M., Monti, L. Giraffa, G., Carminati, D., & Tidona, F. (2018). Folate biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* during growth in milk. *Food Microbiology*, *69*, 116-122. 10.1016/j.fm.2017.08.001.
- Patel, J.B. (2001). 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis*, *6*(4), 313-21. 10.1054/modi.2001.29158.
- Pompei, A., Cordisco, L., Amaretti, A., Zanoni, S., Raimondi, S., Matteuzzi, D., & Rossi, M. (2007). Administration of folate-producing *Bifidobacteria* enhances folate status in Wistar rats. *Journal of Nutrition*, *137*(12), 2742-2746. 10.1093/jn/137.12.2742.
- Rad, A.H., Khosroushahi, A.Y., Khalili, M., & Jafarzadeh, S. (2016). Folate bio-fortification of yoghurt and fermented milk: A review. *Dairy Science and Technology*, *96*(4), 427-441. 10.1007/s13594-016-0286-1.
- Rossi, M., Amaretti, A., & Raimondi, S. (2011). Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients*, *3*, 118-134. 10.3390/nu3010118.
- Saubade, F., Hemery, Y.M., Guyot, J.P., & Humblot, C. (2017). Lactic acid fermentation is a tool for increasing the folate content of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(18), 3894-3910. 10.1080/10408398.2016.1192986.
- Sybesma, W., Starrenburg, M., Tijsseling, L., Hoefnagel, M.H.N., & Hugenholtz, J. (2003a). Effect of cultivation conditions on folate production by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(8), 4542-4548. 10.1128/AEM.69.8.4542-4548.2003.
- Sybesma, W., Starrenburg, M., Kleerebezem, M., Mierau, I., de Vos W.M., & Hugenholtz, J. (2003b). Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(6), 3069-3076. 10.1128/AEM.69.6.3069-3076.2003.
- Wilson, S.D., & Horne, D.W. (1982). Use of glycerol-cryoprotected *Lactobacillus casei* for microbiological assay of folic acid. *Clinical Chemistry*, *28*(5), 1198-1200. <https://doi.org/10.1093/clinchem/28.5.1198>.
- Wright A.J.A, Dainty J.R., & Finglas P.M. (2007). Folic acid metabolism in human subjects revisited: potential implications for proposed mandatory folic acid fortification in the UK. *The British Journal of Nutrition*, *98*(4), 667-75. 10.1017/S0007114507777140.
- Yuksekdag Z.N., Zeydanlı, M. (2013). Folat eksikliği ve probiyotikler. *Neşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, *2*(2), 21-36.
- Zahed, O., Khosravi-Darani, K., Mortazavian, A.M., & Mohammadi, A. (2022). Effects of cultivation conditions on biofortification of yogurt with natural folate by *Propionibacterium freudenreichii*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *39*, 102267. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102267>.
- Zhang, J., Cai, D., Yang, M., Hao, Y., Zhu, Y., Chen, Z., Aziz, T., Sarwar, A., & Yang, Z. (2020). Screening of folate-producing lactic acid bacteria and modulatory effects of folate-biofortified yoghurt on gut dysbacteriosis of folate-deficient rats. *Food Function*, *11*, 6308-6318. 10.1039/d0fo00480d.