

**GELENEKSEL YOĞURTLARDAN STARTER
BAKTERİLERİN İZOLASYONU, MOLEKÜLER
TANIMLAMASI VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

**ISOLATION, MOLECULAR IDENTIFICATION AND
DETERMINATION OF SOME PROPERTIES OF STARTER
BACTERIA IN TRADITIONAL YOGHURT**

RİZA TABAK

PROF. DR. SAİT AYKUT AYTAÇ
Tez Danışmanı

PROF. DR. NURAY YAZIHAN
Eş Danışman

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2018

RIZA TABAK' ın hazırladığı “**Geleneksel Yoğurtlardan Starter Bakterilerin İzolasyonu, Moleküler Tanımlanması ve Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'** nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kadir HALKMAN
Başkan

.....
Kadir Halkman

Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ
Danışman

.....
Sait Aykut Aytaç

Prof. Dr. Barbaros ÖZER
Üye

.....
Barbaros Özer

Doç. Dr. Ali TOPCU
Üye

.....
Ali Topcu

Doç. Dr. Birce TABAN
Üye

.....
Birce Taban

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin / raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren Ay ertelenmiştir.
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

08 /08 /2018


Rıza TABAK

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

08/08/2018



RİZA TABAK

ÖZET

GELENEKSEL YOĞURTLARDAN STARTER BAKTERİLERİN İZOLASYONU, MOLEKÜLER TANIMLANMASI VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Riza TABAK

Doktora, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ

İkinci Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nuray YAZIHAN

Ağustos 2018, 152 sayfa

Sütün yoğurda dönüşümü sırasında meydana gelen kimyasal, fiziksel ve biyolojik değişikliklerin en önemli etkenlerinden biri kullanılan starter kültürlerin fermantasyon sürecidir. Bu tez çalışmasında, ekonomik ve toplumsal faydanın, besinsel kalitenin üst düzeyde olduğu ürünlerin elde edilmesinde kullanılacak starter kültürlerin, yerel kaynaklardan izole edilerek, genotipik/proteomik olarak tanımlanması ve bazı özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bolu, Mersin, Amasya, Isparta ve Kayseri bölgelerinde, geleneksel yöntemlerle üretilen 39 yoğurt örneğinden besiyerlerine yapılan ilk ekimde 283 *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, 101 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* şüpheli kolonisi elde edilmiştir. Daha sonra incelenmek üzere tekrar besiyerlerinde aktive edilen kolonilerden 153 *S. thermophilus* ve 28 *Lb. bulgaricus* şüpheli izolatu tespit edilmiştir. MALDI-TOF MS ile yapılan analizlere göre 53 *S. thermophilus*, 23 *Lb. bulgaricus*, gerçek-zamanlı PZR ile yapılan analiz sonuçlarına göre 49 *S. thermophilus*, 22 *Lb. bulgaricus* suşu tanımlanmıştır. Daha sonra MALDI-TOF MS ve gerçek-zamanlı PZR ile aynı sonucu

veren suşlar, 16S rRNA sekans analizine gönderilmiş, 1 *S. thermophilus*, 9 *Lb. bulgaricus* belirlenmiştir.

MALDI-TOF MS ve/veya gerçek-zamanlı PZR ile tanımlanan toplam 61 *S. thermophilus* ve 21 *Lb. bulgaricus* suşunun, streptomisin, gentamisin, penisilin G, kloramfenikol, linkomisin, klortetrasiklin, tetrasiklin, ampisilin ve roksitromisin antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları, makro dilüsyon tüp yöntemi ile minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) saptanarak tespit edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre, en yüksek duyarlılık *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* suşlarının sırasıyla %98.4'ü ve %81'i tespit edilerek ampisiline karşı olduğu bulunmuştur. *S. thermophilus* suşlarının hepsinin gentamisine, *Lb. bulgaricus* suşlarının ise streptomisin ve kloramfenikole dirençli olduğu saptanmıştır. Tetrasikline *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* suşlarının sırasıyla %26.2'sinin ve %42.9'unun duyarlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Üç yöntemle tanımlaması yapılan, 1 *S. thermophilus* (St27) ve 7 *Lb. bulgaricus* (Lb25, Lb29, Lb46, ML4-1, ML7-6, ML9-5 ve ML9-6) izolatının doğal bağışıklık sistemine, alerjik yanıt ve immün sistem hücrelerine etkisi araştırılmıştır. THP-1 makrofaj ve K562 (doğal katil hücreler) hücre dizilerinin kullanıldığı çalışmada; seçili LAB ile hücrelerin uyarımı sonrası TNF- α , IL-8 ve IL-10 sitokin yanıtları değerlendirilmiştir.

S. thermophilus izolatının, K562 hücre dizisi ile etkileşiminde TNF- α ve IL-8 sitokin düzeyinde artış, THP-1 hücre dizisi ile etkileşiminde ise IL-8 sitokin düzeyinde artış ve IL-10 sitokin düzeyinde azalış tespit edilmiştir. Elde edilen veriler, iki çalışma sonucunun birbiriyle uyumlu olduğunu göstermiştir.

Bunun yanı sıra, seçilen LAB izolatlarının her iki hücre tipinde uyardıkları cevapların farklı olduklarını, monositer ve doğal katil hücrelerinde proliferasyonu arttırdıkları belirlenmiştir. Bazı LAB'nin, THP-1 monositer hücre dizilerinde TNF- α sitokin düzeyinde, 2 LAB'si izolatının ise K562 doğal katil hücre dizisinde IL-8 sitokin düzeyinde düşüş tespit edilmiştir. ML7-6 ve ML4-1 izolatlarının THP-1 hücre dizisi ile etkileşiminde ise IL-10 sitokin düzeyinde artışa neden olmuştur. Elde edilen sonuçlar, bu dört izolatın immün sistemi destekleyici etkileri olduğu ve alerjik yanıtı baskıladığını düşündürmüştür.

Anahtar kelimeler: Laktik asit bakterileri, moleküler tanımlama, antibiyotik direnci, makrofaj, doğal katil hücre, sitokin, immün sistem.

ABSTRACT

ISOLATION, MOLECULAR IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF SOME PROPERTIES OF STARTER BACTERIA IN TRADITIONAL YOGHURT

Riza TABAK

Doctor of Philosophy, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ

Co-supervisor: Prof. Dr. Nuray YAZIHAN

August 2018, 152 pages

The fermentation process of starter cultures is one of the most important factors of chemical, physical and biological changes that occur during the transformation of milk into yoghurt. In this thesis, it was aimed to identify genotypic/proteomic and some characteristics of starter cultures, which will be used for production of high-nutritional-value functional foods with high economic and social benefits. For this purpose 39 local yoghurt samples produced by traditional methods in Bolu, Mersin, Amasya, Isparta and Kayseri regions, were collected and inoculated and into the agar media. After incubation period 283 *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and 101 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suspected isolates have been isolated.

These colonies were stored for further analysis but 153 *S. thermophilus* and 28 *Lb. bulgaricus* suspected isolates were reactivated. 53 *S. thermophilus*, 23 *Lb. bulgaricus* and 49 *S. thermophilus*, 22 *Lb. bulgaricus* strains were identified according to the results of MALDI-TOF MS and real-time PCR analyses, respectively. Strains identified by MALDI-TOF MS and real-time PCR were

subjected to 16S rRNA sequence analysis and 1 *S. thermophilus*, 9 *Lb. bulgaricus* were confirmed.

A total of 61 *S. thermophilus* and 21 *Lb. bulgaricus* strains identified by MALDI-TOF MS or/and real-time PCR were used in order to determine their sensitivity to antibiotics such as streptomycin, gentamicin, penicillin G, chloramphenicol, linkomycin, chlortetracycline, tetracycline, ampicillin and roxithromycin with the minimal inhibitor concentration (MIC) by macro dilution tube method. The results showed that the highest sensitivity was found to be 98.4% and 81% of the strains of *S. thermophilus* and *Lb. bulgaricus* against ampicillin, respectively. All strains of *S. thermophilus* were resistant to gentamicin while *Lb. bulgaricus* strains were resistant to streptomycin and chloramphenicol. It was concluded that 26.2% of *S. thermophilus* and 42.9% of *Lb. bulgaricus* strains were sensitive to tetracycline. One *S. thermophilus* (St27) and 7 *Lb. bulgaricus* (Lb25, Lb29, Lb46, ML4-1, ML7-6, ML9-5 ve ML9-6) isolates which were identified with three methods, have been researched their effect on the natural immune system, allergic response and immune system cells.

In the study using THP-1 macrophages and K562 (natural killer cells) cell lines; TNF- α , IL-8 and IL-10 cytokine responses were evaluated after stimulation of cells with selected LAB. Increase in TNF- α and IL-8 cytokine levels in the interaction of *S. thermophilus* isolate with K562 cell line and increase in IL-8 level and decrease in IL-10 cytokine level in interaction with THP-1 cell line were detected. The obtained data showed that the two study results are compatible with each other.

Besides that, it has been determined that the selected LAB isolates are different from the responses they stimulate in both cell types and increase the proliferation of monocytes and natural killer cells. A decrease in the level of IL-8 cytokine was detected in some LABs, TNF- α cytokine levels in THP-1 monocytic cell lines and 2 LABs isolates in K562 natural killer cell line. The interaction of ML7-6 and ML4-1 isolates with the THP-1 cell line leads to an increase in IL-10 cytokine levels. The obtained results, which suggest that these four isolates have promoting effects of the immune system and suppress the allergic response.

Keywords: Lactic acid bacteria, molecular identification, antibiotic resistance, macrophage, natural killer cell, cytokine, immunological system.

TEŞEKKÜR

Doktora tez konumun belirlenmesinden, çalışmaların yürütülmesi, elde edilen sonuçların yorumlanması aşamalarında, akademik ve hayat tecrübesi ile sonsuz destek veren tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Aykut AYTAÇ'a en derin şükranlarımı sunarım.

Araştırmamda, değerli önerileri ile destek vererek yanımda olan ve tecrübelerinden her zaman faydalanma imkanı bulduğum eş danışmanım Sayın Prof. Dr. Nuray YAZIHAN'a (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümleri), Sayın Prof. Dr. Kadir HALKMAN'a (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü), Sayın Prof. Dr. Barbaros ÖZER'e (Ankara Üniversitesi Süt Teknolojisi Anabilim Dalı) ve Sayın Doç. Dr. Birce TABAN'a (Ankara Üniversitesi Süt Teknolojisi Anabilim Dalı),

Çalışmam boyunca göstermiş oldukları anlayış ve sabırdan dolayı, İrem UZUNSOY'a, Yeliz ÖZTÜRK'e, iş yerindeki değerli yöneticilerim ile mesai arkadaşlarıma,

Ayrıca hayatımın her aşamasında maddi manevi desteklerini esirgemeyen, varlıklarıyla cesaretimi arttıran çok sevdiğim anneme, babama ve canım oğluma teşekkür ederim.

Tez çalışması, Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı/TÜBİTAK tarafından desteklenen "Geleneksel Yoğurt Örneklerinden İzole Edilen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* Suşlarının Endüstriyel Yoğurt Üretimine Uygunluğunun Saptanarak Starter Kombinasyonlarının Geliştirilmesi" isimli ve 112D052 kodlu SAN-TEZ projesi tarafından desteklenmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalara katkılarından dolayı Farmapark AR-GE Biyoteknoloji'ye teşekkür ediyorum.

Riza TABAK

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER	viii
ŞEKİLLER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1.GİRİŞ	1
2.LİTERATÜR ÖZETİ	5
3.MATERYAL VE METOT	41
3.1.Materyal	41
3.1.1. Yoğurt Örnekleri	41
3.1.2. Besiyeri, Kimyasallar ve Antibiyotikler	41
3.1.3. DNA İzolasyonu	43
3.1.4.Gerçek-zamanlı PZR ile Tanımlama	44
3.1.5. Antibiyotik Dirençlilik Testi	46
3.2.Metot	47
3.2.1. Besiyerlerinin Hazırlanması	47
3.2.2. <i>Streptococcus thermophilus</i> ve <i>Lactobacillus bulgaricus</i> Bakterilerinin İzolasyonu ve Stok Kültür Hazırlanması	47
3.2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması	48
3.2.4. İzolatların MALDI-TOF MS ile Tanımlanması	49
3.2.5. LAB Kültürlerinden DNA İzolasyonu	51
3.2.5.1. Lizozim (liyofilize formdan) Hazırlanması	51
3.2.5.2. Lambda Buffer Hazırlanması	52
3.2.5.3. PBS (Fosfat Tamponlu Su) Hazırlanması.....	52
3.2.6. İzolatların Gerçek-Zamanlı PZR ile Tanımlanması	54
3.2.6.1. Primer Seçimi	56
3.2.6.2. Gerçek-zamanlı PZR Master Mix Hazırlanması.....	56

3.2.6.3. Örnek DNA'nın Eklenmesi	56
3.2.7. Sekans Analizi	57
3.2.8. %6.5 NaCl Testi	58
3.2.9. Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi.....	58
3.2.9.1. Magnezyum Stok Çözelti Hazırlanması	58
3.2.9.2. Kalsiyum Stok Çözelti Hazırlanması	59
3.2.9.3. Katyon Ayarlı Müller Hinton Broth Hazırlanması.....	59
3.2.9.4. Antibiyotik Stok Çözeltisinin Hazırlanması	59
3.2.10. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Protokolü.....	63
3.2.11. THP-1 Makrofaj Hücre Kültürü	63
3.2.12. THP-1 Hücrelerinin Makrofajlara Farklılaşmasının Belirlenmesi	64
3.2.13. Sitokin Düzeylerinin Ölçümü	64
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	65
4.1. Örneklem ve İzolasyon	65
4.2. MALDI-TOF MS ile Tanımlama	70
4.3. %6.5 NaCl Testi	75
4.4. Gerçek-Zamanlı PZR ile Tanımlama	76
4.5. 16S rRNA Sekans Analizi ile Tanımlama	79
4.6. Antibiyotik Duyarlılık Testi	90
4.7. İmmün Sistem Yanıtları	102
4.8. İzolatların NK Hücreleri ve THP-1 Makrofajları ile Etkileşimi Sonuçları.....	103
4.9. Sitokin Yanıtları	111
5. SONUÇLAR.....	117
KAYNAKLAR.....	120
EKLER.....	134
ÖZGEÇMİŞ.....	152

ÇİZELGELER

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Dünya genelinde yoğurt ve yoğurt benzeri ürünler [10]	6
Çizelge 2.2. Yoğurt ve sütün bileşiminin karşılaştırılması [17]	8
Çizelge 2.3. Uluslararası saf kültür üreten bazı firmalar [25]	10
Çizelge 3.1. Alınan yoğurt örneklerinin bölgelere göre dağılımı	41
Çizelge 3.2. İzolasyon ve antibiyotik testinde kullanılan besiyerleri	42
Çizelge 3.3. İmmün sistem testlerinde kullanılan malzemeler	42
Çizelge 3.4. DNA izolasyon kitinin içeriği [128]	43
Çizelge 3.5. DNA ekstraksiyonunda kullanılan diğer malzemeler	44
Çizelge 3.6. Cihazda kullanılan karışımın içeriği [130, 131]	45
Çizelge 3.7. Çalışmada belirlenen gen bölgesinin özellikleri [87, 88, 91]	45
Çizelge 3.8. Primerlerin ve taqman probunun özellikleri.....	46
Çizelge 3.9. Analizde kullanılan antibiyotikler	46
Çizelge 3.10. Antibiyotiklerin hazırlanmasında kullanılan çözücü ve sulandırıcılar	47
Çizelge 3.11. Tanımlamada belirlenen programın basamakları [131].....	56
Çizelge 3.12. Antibakteriyel maddelerin test konsantrasyonlarını hazırlama tablosu [138].....	60
Çizelge 4.1. Yoğurt örneklerinin alım noktaları ve izolat sayıları.....	67
Çizelge 4.2. Şüpheli <i>Streptococcus</i> spp. izolatlarının elde edildiği bölgeler.....	68
Çizelge 4.3. Şüpheli <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının elde edildiği bölgeler.....	70
Çizelge 4.4. MALDI-TOF MS analizi ile doğrulanan <i>S. thermophilus</i> izolatları...71	
Çizelge 4.5. MALDI-TOF MS analizi ile doğrulanan <i>Lb. bulgaricus</i> izolatları.....73	
Çizelge 4.6. Şüpheli <i>S. thermophilus</i> izolatlarının tuz testi sonuçları.....75	
Çizelge 4.7. Gerçek-zamanlı PZR ile <i>S.thermophilus</i> olarak tanımlanan izolatlar.....76	
Çizelge 4.8. Gerçek-zamanlı PZR ile <i>Lb. bulgaricus</i> olarak tanımlanan izolatlar.....78	
Çizelge 4.9. 16S rRNA sekans analizi ile <i>Lb. bulgaricus</i> olarak tanımlanan izolatlar.....80	
Çizelge 4.10. 16S rRNA sekans analizi ile tanımlanan <i>S. thermophilus</i> ve <i>Lb. bulgaricus</i> izolatlarına ait sonuçlar	81

Çizelge 4.11. EFSA 2008 antibiyotik sınır değerleri (>, µg/mL) [141].....	91
Çizelge 4.12. <i>S. thermophilus</i> izolatlarının makrodilüsyon tüp yöntemiyle elde edilen MİK sonuçları.....	92
Çizelge 4.13. <i>S. thermophilus</i> antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarının değerlendirilmesi.....	96
Çizelge 4.14. <i>Lb. bulgaricus</i> izolatlarının makrodilüsyon tüp yöntemiyle elde edilen MİK sonuçları.....	98
Çizelge 4.15. <i>Lb. bulgaricus</i> antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarının değerlendirilmesi.....	100



ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1.	Yoğurt üretim akım şeması [27].....	11
Şekil 2.2.	<i>S. thermophilus</i> 'un elektron mikroskopunda görüntüsü [40].....	15
Şekil 2.3.	<i>Lb.bulgaricus</i> 'un elektron mikroskopunda görüntüsü [48].....	16
Şekil 2.4.	DNA polimerazının polimerizasyonla ilişkili 5'—3' nükleaz aktivitesi, PCR reaksiyonu sırasında raportörü söndürücüden ayırır [75].....	20
Şekil 2.5.	Gerçek-zamanlı PZR amplifikasyon eğrisindeki eşik seviyesi [76].....	22
Şekil 2.6.	Bir <i>Leishmania promastigote</i> 'u saran bir makrofaj beyaz kan hücresinin renkli taramalı elektron mikrografisi [114].....	35
Şekil 2.7.	Bir kanser hücresine (kırmızı) saldıran iki doğal öldürücü hücrenin (sarı) taramalı elektron mikroskobu görüntüsü [117].....	36
Şekil 2.8.	Kemik iliğinin hematopoietik sistemi [112].....	36
Şekil 3.1.	LightCycler® 480 cihazı	44
Şekil 3.2.	Laktik asit bakterilerini tanımlama şeması.....	49
Şekil 3.3.	MALDI-TOF MS cihazı ile tanımlama işleminin basamakları [132]	50
Şekil 3.4.	MALDI plakalarının görünümü.....	51
Şekil 3.5.	Bakteriden DNA izolasyonu ve saflaştırma işlemi akış şeması [135]....	53
Şekil 3.6.	Gerçek-zamanlı PZR ile tanımlama işleminin akış şeması [136].....	55
Şekil 3.7.	Sekans analizi ile bakterileri tanımlamanın şematik gösterimi [137].....	57
Şekil 3.8.	Makrodilüsyon yöntemiyle yapılan antibiyotik dirençlilik testinin işlem akış şeması [138].....	61
Şekil 3.9.	Makrodilüsyon tüp yönteminde MİK değerinin tespitini gösteren deney sonucu	62
Şekil 3.10.	Belirlenen MİK değerinin Müller Hinton Agar besiyerine ekim yaparak sonucunun doğrulamasının gösterilmesi.....	63
Şekil 4.1.	MRS Agarda gelişen şüpheli <i>Lb. bulgaricus</i> koloni görünüşü.....	65
Şekil 4.2.	M17 Agarda gelişen şüpheli <i>S. thermophilus</i> koloni görünüşü.....	66
Şekil 4.3.	Şüpheli <i>S. thermophilus</i> izolatların MALDI-TOF MS tekniğine göre tanımlama sonuçları.....	70
Şekil 4.4.	MALDI-TOF MS ile tanımlaması yapılan <i>S. thermophilus</i> izolatlarının örnek alım noktalarına göre dağılımı.....	72

Şekil 4.5. Şüpheli <i>Lb. bulgaricus</i> izolatların MALDI-TOF MS tekniğine göre tanımlama sonuçları.....	73
Şekil 4.6. MALDI-TOF MS ile tanımlaması yapılan <i>Lb. bulgaricus</i> izolatlarının örnek alım noktalarına göre dağılımı.....	74
Şekil 4.7. 1 <i>S. thermophilus</i> ve 7 <i>Lb. bulgaricus</i> izolatının gerçek-zamanlı PZR ile tanımlama görüntüsü.....	77
Şekil 4.8. Gerçek-zamanlı PZR ile tanımlaması yapılan <i>S. thermophilus</i> izolatlarının örnek alım noktalarına göre dağılımı.....	77
Şekil 4.9 Gerçek-zamanlı PZR ile tanımlaması yapılan <i>Lb. bulgaricus</i> izolatlarının örnek alım noktalarına göre dağılımı	78
Şekil 4.10. Gerçek zamanlı PZR’de negatif sonuç görüntüsü.....	79
Şekil 4.11. 16S rRNA sekans analizi sonuçlarına göre oluşan dendogramlar.....	86
Şekil 4.12. Tanımlanan <i>Lb. bulgaricus</i> izolatlarına ait 16S rRNA PZR ürünlerinin %1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüleri	90
Şekil 4.13. Monositik hücrelerin PMA ile uyarılarak CD14 ekspresyonunda artışın flowstometrik olarak gösterilmesi	102
Şekil 4.14. Normal THP-1 (A), PMA uyarımı ile makrofaja dönüşen THP-1 hücrelerinin 48-72. saat (B,C) faz kontrast görüntüleri	103
Şekil 4.15. Normal K-562 hücreleri.....	103
Şekil 4.16. Lb25 nolu izolatın K-562 hücre dizisi ile etkileşimi.....	103
Şekil 4.17. Lb25 nolu izolatın THP-1 hücre dizisi ile etkileşimi.....	104
Şekil 4.18. Lb29 nolu izolatın K-562 hücre dizisi ile etkileşimi.....	104
Şekil 4.19. Lb29 nolu izolatın THP-1 hücre dizisi ile etkileşimi.....	105
Şekil 4.20. ML9-6 nolu izolatın K-562 hücre dizisi ile etkileşimi.....	105
Şekil 4.21. ML9-6 nolu izolatın THP-1 hücre dizisi ile etkileşimi.....	106
Şekil 4.22. ML7-6 nolu izolatın K-562 hücre dizisi ile etkileşimi.....	106
Şekil 4.23. ML7-6 nolu izolatın THP-1 hücre dizisi ile etkileşimi.....	107
Şekil 4.24. Lb46 nolu izolatın K-562 hücre dizisi ile etkileşimi.....	107
Şekil 4.25. Lb46 nolu izolatın THP-1 hücre dizisi ile etkileşimi.....	108
Şekil 4.26. ML4-1 nolu izolatın K-562 hücre dizisi ile etkileşimi.....	108
Şekil 4.27. ML4-1 nolu izolatın THP-1 hücre dizisi ile etkileşimi.....	109
Şekil 4.28. ML9-5 nolu izolatın K-562 hücre dizisi ile etkileşimi.....	109
Şekil 4.29. ML9-5 nolu izolatın THP-1 hücre dizisi ile etkileşimi.....	110
Şekil 4.30. St27 nolu izolatın K-562 hücre dizisi ile etkileşimi.....	110

Şekil 4.31. St27 nolu izolatin THP-1 hücre dizisi ile etkileşimi.....	111
Şekil 4.32. LAB izolatlarının THP-1 hücre dizisinde TNF- α sekresyonuna etkisi..	112
Şekil 4.33. LAB izolatlarının THP-1 hücre dizisinde IL-8 sekresyonuna etkisi.....	112
Şekil 4.34. LAB izolatlarının THP-1 hücre dizisinde IL-10 sekresyonuna etkisi..	113
Şekil 4.35. LAB izolatlarının K-562 hücre dizisinde TNF- α sekresyonuna etkisi..	114
Şekil 4.36. LAB izolatlarının K-562 hücre dizisinde IL-8 sekresyonuna etkisi.....	114
Şekil 4.37. LAB izolatlarının K-562 hücre dizisinde IL-10 sekresyonuna etkisi....	115



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

C	Konsantrasyon
C _p	Eşik Döngüsü
g	Gram
IU	International Unit
kob	Koloni Oluşturan Birim
L	Litre
mbp	Megabit
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
P	Potens
rpm	Dakikada Devir Sayısı
T _m	Primer Erime Sıcaklığı
V	Hacim
W	Ağırlık
µg	Mikrogram

Kısaltmalar

AOÇ	Atatürk Orman Çiftliği
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	Sitozin
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Media
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EMP	Embden-Meyorhoff Yolu
EPO	Eritropoietik
etOH	Etanol
FAO	Food and Agriculture Organization

FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FRET	Flüoresan Rezonans Enerji Transferi
G	Guanin
GRASS	Generally Recognise As Safe
HCCA	α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid
IL	İnterlökin
INF	İnterferon
KFG	Kalite Fonksiyon Göçerimi
LAB	Laktik Asit Bakterileri
LPS	Lipopolisakkarid
MALDI-TOF MS	Matriks Aracılı Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisi
MHA	Müller Hinton Agar
MHB	Müller Hinton Broth
MİK	Minimal İnhibitör Konsantrasyonu
MÖ	Milattan Önce
MRS	deMan Ragosa Sharpe
NK	Natural Killer
PBS	Fosfat Tamponlu Su
PE	Fitoeritrin
PKMH	Periferik Kan Mononükleer Hücreleri
PMA	Propidium Monoazidenin
PMA	Forbol Ester
PZR	Polimer Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribo Nükleik Asit
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TA	Titre edilebilir asitlik
TGK	Türk Gıda Kodeksi
TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü
Tris	Hidroksimetil
TS	Türk Standartları
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
WHO	World Health Organization

1. GİRİŞ

Gıdalarda meydana gelen biyolojik değişimlerde, mikroorganizmaların aktif rol oynadığı uzun yıllardan beri bilinmektedir. Eski çağlarda toplumlar, gıdalarını ağaç ve topraktan yaptıkları malzemelerde muhafaza ettiklerinde, zamanla lezzetlerinde ve aromasında, hoşlandıkları değişimin meydana geldiğini görmüşlerdir. Fermantasyon kavramı, gıdalarda bazı biyolojik değişikliklerle ilk ortaya konduktan sonra, yıllar geçtikçe daha bilinçli ve belirli bir teknik yapılarak geliştirilmiştir.

Arkeologların yaptığı çalışmalar, Mısır ve Mezopotamya arasındaki bölgede, 10000 yıl öncesinde üzüm suyunun şarap yapımında kullanıldığını, bazı gıdaların üretiminde ve korunmasında fermantasyondan yararlanıldığını göstermektedir [1, 2].

Mikroorganizmaların kullanıldığı biyoteknolojik süreç olan fermantasyon; gıdaların tat, aroma ve tekstür yapısını geliştirmekte, besin değeri, raf ömrü ve mikrobiyel güvenilirliğini arttırmaktadır.

Günümüzde dünyada pek çok yerde, farklı yapı ve bileşimlerde sunulan ve sayıları yaklaşık birkaç bin ile tahmin edilen çeşitlilikteki, ürün kalitesi ve besin değeri arttırılmış, fermente ürün tüketilmektedir.

Laktik asit fermantasyonu ile meydana gelen bir fermente süt ürünü olan yoğurdun, ilk defa nasıl, nerede ve ne zaman yapıldığı henüz tam olarak bilinmemektedir. Birçok farklı kültür, yoğurdu ilk bulanın kendileri olduğunu ortaya koysalarda; Kaşgarlı Mahmut'un Divan-ı Lugat-ı Türk ve Balasugunlu Yusuf Hacıb'ın Kutatku-Bilig isimli yapıtlarında günümüzde kullandığımız "yoğurt" kelimesi geçmektedir [3, 4].

Yoğurt asırlardır, Türk egemenliğinin hakim olduğu Balkanlar'dan Orta Doğu'ya, Avrupa'dan Asya'ya pek çok yere yayılarak, tanınan bir ürün olmuştur [5].

İsviçre'nin Cenevre kentinde 19. asrın sonlarında, Ilya Metchnikoff isimli Bulgar doktorun araştırmaları sonunda, *Lactobacillus bulgaricus* bakterisinin varlığını ortaya koymuştur. Bu sebeple, özellikle Avrupa ve Amerika'da yoğurt, bulgar sütü olarak anılmaktadır [6].

Yoğurt sütün elde edilmekle birlikte bileşim açısından; B1 (tiyamin), B2 (riboflavin) ve B12 vitaminleri, protein, kalsiyum ve fosfor içeriği bakımından zengin bir yapıya sahiptir.

Son yıllarda, fermente süt ürünleri, özellikle de yoğurt, insanın dengeli beslenmesinde ve sağlık yönünden önem kazanmaya başlamış ve yoğurda olan talepte hızlı bir artış gözlemlenmiştir. Talepteki artış ile oluşan üretim artışı, yoğurtta belirli bir kalitenin oluşturulması, devam ettirilmesi ve geliştirilmesi çabalarını da yoğunlaştırmıştır.

TS 1330'da yoğurdun tanımı, "İnek sütü (TS 1018), koyun sütü (TS 11044), manda sütü (TS11045), keçi sütü (TS 11046) veya karışımlarının pastörize edilmesi veya pastörize sütün (TS 1019) gerektiğinde süt tozu ilavesiyle (TS 1329) homojenize edilip veya edilmeden *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*'dan oluşan yoğurt kültürünün ilave edilmesi ve TS 10935-Yoğurt Yapım Kuralları Standardı'na uygun işlemlerden sonra elde edilen mamuldür." şeklindedir [7].

2009/25 Türk Gıda Kodeksi (TGK) Fermente Süt Ürünleri Tebliğinde'de yoğurt; "fermantasyonda spesifik olarak *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*)'un simbiyotik kültürlerinin kullanıldığı fermente süt ürününü ifade eder" şeklinde, FAO/WHO (1977) tarafından ise yoğurt, sütün *Lb. bulgaricus* ve *S. thermophilus* kullanılarak laktik asit fermentasyonu ile elde edilen bir süt ürünü olarak tanımlanmaktadır [8].

Tüm bu tanımlara ve yapılan araştırma sonuçlarına göre; yoğurt yapımında sadece *Lb. bulgaricus* ile *S. thermophilus* bakterlerinin gerekli olduğunu, diğer mikroorganizmaların yoğurdun karakteristik tat, aroma, yapı ve görünüşünü bozduğu ortaya konmuştur.

Bu sebeple, ülkemizde ve gelişmiş ülkelerde süt endüstrisinde, yoğurt üretim standardında bu iki bakteri dışında mikroorganizmanın olması yasaklanmıştır.

Günümüzde yoğurt üretiminde, küçük kapasiteli ve ilkel koşullarda çalışan işletmeler hariç, istenilen düzeyde teknoloji kullanılması, yetişmiş insan gücünün çalıştırılması, mevzuatta bazı problemlerin aşılmış olması ile istenilen düzeyde hijyenik şartları taşıyan ürünler tüketime sunulmaktadır.

Ancak son yıllarda artan sağlıklı yaşam bilinci ve teknoloji, toplumları zenginleştirmiş ve ihtiyaçları çeşitlendirerek yaşam kalitesi beklentilerini arttırmıştır. Bu amaçla son yıllarda fermantasyon işleminin daha iyi incelenmesi ve kontrol edilmesi amacıyla, yüksek konsantrasyonlarda ve sadece istenen canlı mikroorganizmaları içeren ve starter kültür olarak adlandırılan saf kültürler kullanılmaya başlanmıştır.

Gelişmiş ülkelerdeki gibi yeterli düzeyde yoğurt tüketiminin sağlanabilmesi amacı ile en düşük fiyatta ve uygun kalitede yoğurdun halka sunulması gerekmektedir.

Ülkemizde olduğu gibi dünyada pek çok ülkede fermente süt ürünleri üretiminde starter kültür kullanımı zorunluluğu, starter kültüre olan talebi arttırmış ve starter kültür üretimi bir endüstri haline gelmiştir. Günümüzde ABD ve bazı Avrupa ülkelerinin başını çektiği uluslararası ticaret yapan saf kültür üretim laboratuvarları bulunmaktadır.

Ülkemizde starter kültür üretimi konusundaki çalışmalar, özellikle 1970'li yıllarda ve 1980'li yılların başında yoğunlaşmıştır. İlk yerli starter kültür üretimi, 2011 yılında AOÇ (Atatürk Orman Çiftliği) ve Ankara Üniversitesi'nin koordineli yürüttüğü çalışmalarda hayat bulmuştur. Piyasaya yerli starter kültür ile üretilen yoğurtlar, ilk 2012 yılında tüketime sunulmuştur [9].

Günümüzde oluşan yeni küresel pazar ile tüketim alışkanlıkları içerisinde pek çok yenilik dahil olmaya başlamıştır.

Bu çerçevede uygun potansiyel starter kültürlerin belirlenmesi amacıyla geleneksel gıdalardan mikroorganizmalar izole edilmekte, klasik ve/veya moleküler yöntemlerle tanımlanarak, karakterizasyonuna yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Bunun sonrasında ise bu starterler ticari olarak ulusal ve uluslararası pazarlara sunulmaktadır.

Yeni starter kültürler geliştirme ve mevcut starter kültürlerin özelliklerini iyileştirme hem gelişmiş hemde gelişmekte olan ülkelerin güncel araştırma konuları arasındadır.

Tüketicinin beğenisini karşılayacak yüksek ve kaliteli bir ürün eldesi, sütün sağımından, işlenerek son ürün eldesine kadar geçen tüm aşamalarda gereken özenin gösterilmesine bağlıdır. Süt üreticilerinin çeşitliliği ve bilinçsiz olmaları ve gıda denetimlerdeki yetersizlik sonucunda, sütlerde antibiyotik varlığı tespit edilmektedir.

Antibiyotikler, laktik asit bakterilerinin gelişimlerini zorlaştırmakta hatta belirli bir konsantrasyondan sonra inhibe ederek, fermantasyonu engellemektedir. Ayrıca sütteki antibiyotik kalıntıları, insanların bağışıklık sistemine zarar vermekte, mide ve bağırsak sistemindeki patojen bakterilerin direncini arttırmaktadır.

Bu tez çalışmasında, ülkemizin çeşitli bölgelerinde üretilen ev yapımı yoğurt örneklerinden, laktik asit bakterileri, *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* izole edilmiş, proteomik yöntemlerden MALTI-TOF MS, moleküler yöntemlerden Gerçek-Zamanlı PZR ve 16S rRNA sekans analizi ile tanımlanmıştır. Sonucu pozitif çıkan izolatların, 9 antibiyotiğe karşı (penisilin G, gentamisin, kloramfenikol, linkomisin, streptomisin, klortetrasiklin, tetrasiklin, ampisilin, roksitrimosim) dirençliliği tespit edilerek, her bir izolatın antimikrobiyel aktivite düzeyini gösteren, MİK (minimal inhibitör konsantrasyonu) değeri belirlenmiştir.

Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı/TÜBİTAK tarafından desteklenen 112D052 kodlu SAN-TEZ projesi kapsamında desteklenen çalışma kapsamında, geleneksel yöntemlerle üretilen yoğurtlardan izole edilerek, her üç yöntemle tanımlanan *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* izolatlarının, endüstriyel yoğurt üretiminde performansları uygun olarak belirlenen 8'inin (St27, Lb25, Lb29, Lb46, ML4-1, ML7-6, ML9-5, ML9-6), immün sisteme etkileri değerlendirilmiştir. Değerlendirmede, insan çocukluk çağı akut monositik lösemi (M5 tip) derive olmuş monosit benzeri immortal hücre dizisi THP-1 (ATCC® TIB-202) ve insan myelojenik lösemi kökenli lenfoblast yapısındaki doğal katil (NK) hücrelerin aktivitesini ölçmek amacıyla faydalanılan K-562 (ATCC® CCL-243) hücre dizisi kullanılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Fermantasyon, tarih boyunca insanlar tarafından sütü korumak amacıyla kullanılmıştır. Fermente süt ürünlerinin kaynağı ile ilgili herhangi bir kayıt olmamasına rağmen, Fenikeliler döneminden önce Orta Doğu bölgesinde ortaya çıktığı düşünülmektedir. Yaklaşık MÖ. 7000 yıllarında Mısır'da, laban rayeb ve laban khad gibi geleneksel fermente sütlü içecekleri tüketilmekteydi. MÖ. 5000 yıl öncesine dayanan Vedalar (Hint-Aryan incelemeleri) yapıtında, dadhi (günümüz yoğurduna benzeyen bir fermente süt ürünü) adında tedavi edici özelliklere sahip olan bir süt ürününden bahseder. Dadhi veya dahi hala Güney Asya diyetinin önemli bir bileşenidir. Çoğu Hint hanesinde üretilir ve günlük tüketilir. Yoğurt kelimesinin, 8. yüzyılda Türkler tarafından ilk kez kullanıldığına inanılıyor. Bu nedenle Asya'daki Türk göçebelerin yoğurt yaptıkları varsayılmaktadır [10].

Osmanlı İmparatoru Kanuni Sultan Süleyman'ın, Fransa Kralı I. Fransuva'nın ateşli bir bağırsak hastalığına yakalandığını öğrendiğinde, doktorunu tedavi etmesi için gönderdiği, doktorun Kralın sağlığına yoğurt ile tedavi ederek kavuşturduğu bilgiler arasında yer almaktadır [11].

Bununla birlikte başka bir efsane, yoğurdun ilk olarak Balkan halkı tarafından hazırlandığını veya tüketildiğini belirtmektedir. Ekşi süt, prokish, koyun sütünden Trakya köylüleri tarafından hazırlanmıştır. Fars topluluklarında, Hz. İbrahim'in düzenli yoğurt tüketmesinden dolayı daha uzun yaşadığı düşünülmektedir. Güney Asya bölgeleri (Hindistan, Pakistan, Nepal ve Bangladeş) ve güneybatı Asya bölgeleri (İran, Irak, Balkanlar, Türkiye, Suriye), fermente süt ürünlerinin (yoğurt dahil) en büyük üreticileri ve tüketicileri arasındadır. Moğollar, Tatarlar ve diğer Asyalı hükümdarların Rusya ve Avrupa'ya işgali, aynı zamanda yoğurt ve fermente sütlerin dünyanın diğer bölgelerine yayılmasına da katkıda bulunmuştur [10].

Günümüzde yoğurt çok popüler bir ürün olmakla birlikte Avrupa, Avustralya ve dünyanın diğer birçok yerinde beslenme düzeninin önemli bir parçası olmuştur. Yoğurt ve fermente sütler çoğu büyük ülkede ticari olarak üretilmektedir. Günlük tüketim için geleneksel yöntemlerle yoğurt üretimi halen birçok bölgede devam etmektedir.

Çizelge 2.1. Dünya genelinde yoğurt ve yoğurt benzeri ürünler [10].

Geleneksel Adı	Ülkesi	Geleneksel Adı	Ülkesi
Busa	Türkistan	Mezzoradu	Sicilya
Cieddu	İtalya	Roba	Irak
Dahi/Dadhi/Dahee	Hindistan, Bangladeş, Nepal	Skyr	İzlanda
Filmjolk/Fillbunke/ Filbunk/Surmelk	İskandinavya	Taettem- jolk/Tettemelk/Tarho	Macaristan
Gioddu	Sardinya	Tiaourti	Yunanistan
Yoğurt/Ayran	Türkiye	Urgotnic	Balkan Dağları
Katyk	Transkafkasya	Villi	Finlandiya
Kissel Mleka	Balkanlar	Zabady	Mısır ve Sudan
Leben/Leban	Lübnan ve bazı Arap ülkeleri	Mast/Dough	İran ve Afganistan
Mazun/Matsoon	Ermenistan		

Doğduğumuz andan itibaren süt ve süt ürünlerinin yaşamımızda pek çok faydaları vardır. En verimli tüketim şeklinin içme sütü olarak kullanılması ifade edilmektedir. Ancak sütün yapısında bulunan laktoza bazı kişilerin duyarlı olması, sütün çabuk bozulabilen yapısının ve sürekli tüketim alışkanlığımızın olmaması sütün işlenerek tüketilmesini mecbur kılmaktadır. Ülkemizde özellikle yoğurt ve ayran tüketimi diğer süt ürünlerine göre daha fazladır ve üretilen sütün yaklaşık yarısı, yoğurt ve ayran üretiminde kullanılmaktadır. Yoğurt ve ayran, yapısındaki bileşenler ile vücudumuzdaki kan şekeri ve kolesterol düzeyini düzenlenmesine, laktik asit bakterileri (LAB) ile sindirim sisteminin çalışmasına yardımcı olmaktadır [11, 12].

Bağışıklık sistemi araştırmalarında öncülük etmiş olan Rus mikrobiyolog Ilya Metchnikoff, yoğurt tüketimi fazla olan toplumlarda ömrün uzadığı görüşünü ortaya koymuştur. Yoğurdu, “The Prolongation of Life-Yaşamın uzatılması” kaynağı olarak ifade etmiştir. Yoğurttaki LAB’nin fermentasyon sonucu, laktik asit ve diğer ürünler meydana getirdiğini, bu şekilde kalın bağırsakta sporlu anaerobik bakterileri inhibe ettiğini kanıtlamıştır [13].

Yoğurt yapısında, fermentasyon sırasında meydana gelen laktik asit, peptitler, aminoasitler, yağ asitleri ve antimikrobiyel maddeler ile laktoz ve canlı milyonlarca

LAB bulunması sebebiyle, hem sağlıklı bir yaşamın sŸrdŸrŸlmesinde hemde bazı hastalıkların oluşumunun engellenmesinde önemli bir yeri vardır [14].

Son yıllarda yaşanan teknolojik ilerleme ile Ÿretilen yoğurtların bileşenlerinin oranlarını değiştirme imkanı elde edilmiştir. İçerdiği sodyum, protein ve yağ miktarı ayarlanabilmekte, dışarıdan ilave vitamin, mineral maddeler eklenebilmekte, içerdiği laktoz miktarı değiştirilebilmekte ve aroması istenen şekilde oluşturularak sayısız çeşitte yoğurt Ÿretilenmektedir [14].

Yoğurt ve LAB gastrointestinal sistem Ÿzerine yararları konusunda, hayvanlar ve insanlar Ÿzerinde yapılan çalışmalar ile yoğurdun ve/veya LAB'nin, laktoz intolerans, kabızlık ve ishal hastalıklarında, kolon kanserinde, iltihaplı bağırsak rahatsızlıklarında, *Helicobacter pylori* enfeksiyonunda ve alerji de dahil olmak Ÿzere bazı gastrointestinal durumlarda, sağlığa faydalarının umut verici olduğu gösterilmiştir. Bu durumlarda bulunan hastaların iyileşmelerinde, yoğurt tŸketiminden faydalanabileceği ifade edilmiştir [15].

Yoğurdun fonksiyonel gıda olarak sağlık Ÿzerine yararlı etkileri, yŸksek dŸzeyde kalsiyum içermesi, iyi bir vitamin ve mineral kaynağı olması, sağlığa yararlı LAB içermesinden kaynaklandığı kabul edilmektedir [16].

SŸt ve yoğurt karşılaştırıldığında birbirine çok benzeyen bileşimde olduğu grŸlmektedir (izelge 2.2). Yoğurt dışındaki sŸt ŸrŸnlerinde, Ÿretim esnasında yapısına dışarıdan çeşitli maddeler katılması sebebiyle sŸt ile bileşim farkı oluşmaktadır. SŸtŸn, yoğurt eldesinde ısıl işlem sırasında özellikle şeker hariç diğer bileşenlerinde çok az bir yŸkselme olurken, fermentasyon işlemi sırasında şeker kullanıldığından, şeker miktarı oranı azalmaktadır [17, 18, 19].

Çizelge 2.2. Yoğurt ve sütün bileşiminin karşılaştırılması [17].

Ürün Adı	Su (g)	Protein (g)	Yağ (g)	Karbonhidrat (g)	Kalsiyum (mg)	Sodyum (mg)	Fosfor (mg)	Potasyum (mg)	Çinko (mg)
Yoğurt	81.9	5.7	3.0	7.8	200	80	92	280	0.7
Süt	87.8	3.2	3.9	4.8	115	55	170	140	0.4

Çağımızda oluşan rekabet ortamında başarılı olabilmek, piyasaya sürülen ürünlerin geliştirilmesi ve müşterilerin taleplerine karşılık verebilme gücü ve hızıyla doğru orantılıdır. Maliyetlerin mümkün olan en az seviyede tutularak, en kısa sürede isteklerin cevap bulması durumu süreklilik içeren kavramdır [20, 21].

Özellikle gıda sektörü yeni ürünlerin oluşumu ve gelişimine açık olan rekabetçi anlayışın kendini gösterdiği en önemli piyasalardandır. Satışa sunulan gıdanın raf ömrünün uzun olmaması, kaliteye daha çok dikkat eden müşteri istekleri, gıdalarda kalitenin geliştirilmesi adına planlamanın, yapılandırmanın ve metotlu gelişimin sağlanmasında ilave araçlara ihtiyaç duymaktadır [22].

Kalite güvence sistemlerinin uygulandığı bir süt ürünleri işletmesinde, piyasada daha büyük paya sahip olabilmek adına, her geçen yıl tüketim miktarı artan homojenize yoğurt ürünü için Kalite Fonksiyon Göçerimi (KFG) uygulaması çalışması yapılmıştır. KFG kavramı, müşterilerin istedikleri kalite düzeyinin karşılanması ve ürün kalitesinin geliştirilmesini daha yukarılara taşıyabilecek bir yöntemdir. Müşteri isteklerinin; kolay kullanım, geri dönüşümlü ve dikkat çekici ambalaj, aroma, kıvam ve renk, raf ömrü, hijyenik ürün, kalite, uygun fiyat ve yaygın dağıtım ana başlıkları altında toplandığı çalışmada, yoğurt kültürü çeşidi, aroma, kıvam ve renk oluşumunu etkileyen alt faktör olarak değerlendirilmiştir. KFG uygulaması sonucunda, aroma, kıvam ve renk yapısının birinci derecede önemli, yoğurt kültürü çeşidinin de aroma, kıvam ve renk oluşumunda, en önemli faktör olduğu belirlenmiştir [20].

Fermente gıdaların üretiminde starter kültür kullanımı ile her zaman standart, yüksek kalitede ve sağlıklı ürün elde edilebilirken, doğal fermentasyonda hammaddeden gelen çok farklı tür ve suş, çok nitelikli ürün elde edilmesine neden

olabileceği gibi, çok kötü ve sağlık açısından yüksek derecede riskli ürün elde edilmesine de yol açabilir. Bu durumda starter kültürün çok önemli olduğu açıktır. Ancak, fermente süt ürünleri üretiminde hammadde olan süt pastörize edilirken, zararlı mikroflora yanında ürün oluşumu sırasında yararlı olabilecek bakteriler de yok edilir. Bunların yerine genellikle 2 türden oluşan starter kültür katılır ve ürünün duysal niteliklerini bu mikroorganizmalar sağlar. Bununla beraber, standart kalite ve sağlık riski dikkate alındığında starter kültür kullanılarak yapılmış ürünler tartışmasız bir şekilde tercih edilmektedir [23].

Günümüzde fermente gıdaların üretimi, hammaddenin hızlı asidifikasyonunu başlatan LAB gibi, starter kültürlerin kullanılması temeline dayanır. Starter kültürlerin önemli avantajı, kontrollü ve öngörülebilir fermentasyonu sağlayabilir olmasıdır.

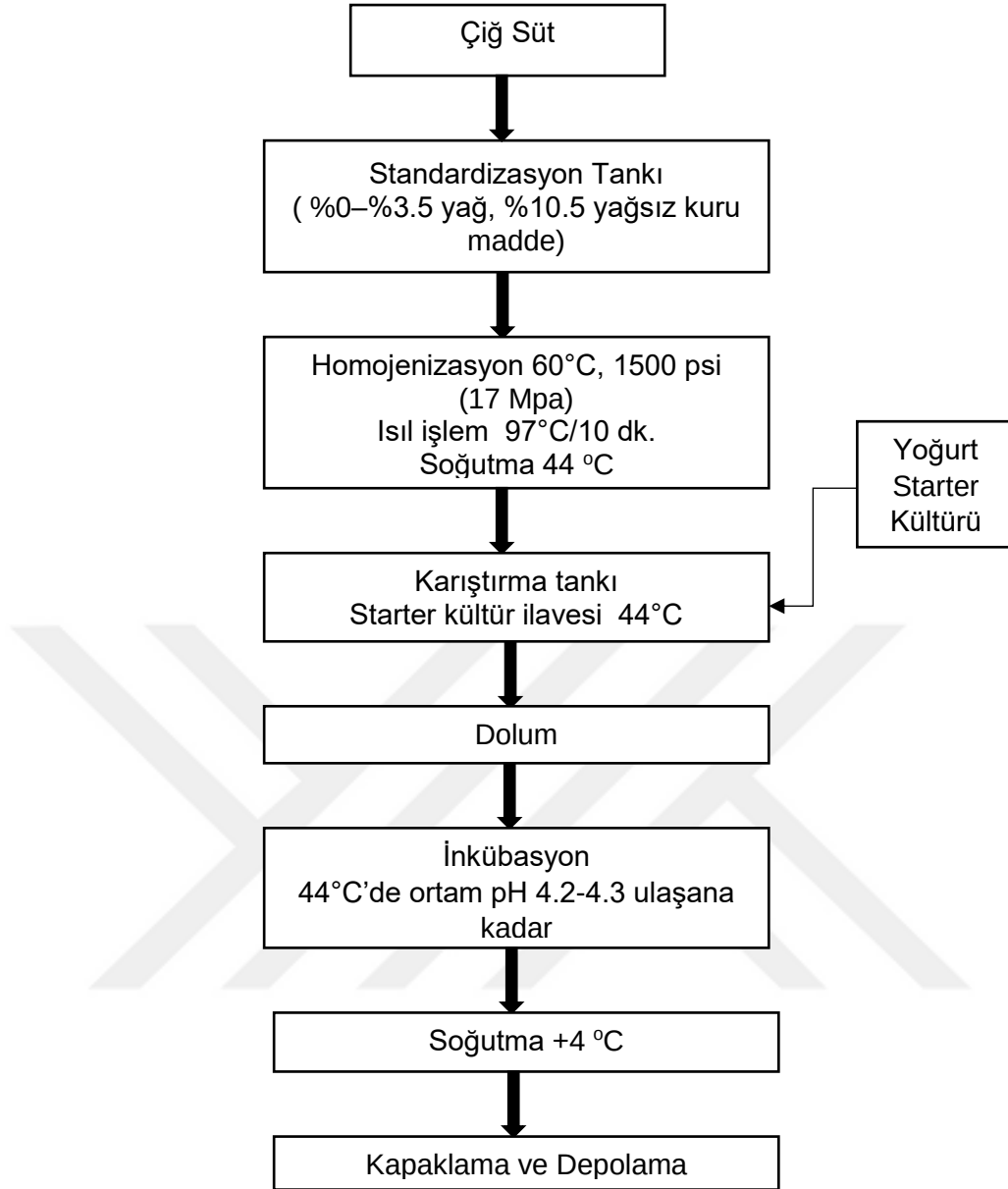
Starter LAB ürüne; mikrobiyel güvenlik, bir veya daha fazla teknolojik, duysal, besinsel veya sağlık açısından olumlu katkıda bulunabilirler [24].

Sürekli büyümekte olan starter kültür üretimi sektörü, süt endüstrisinin ayrılmaz bir parçasıdır. Yıllar içerisinde nüfus ile birlikte artan süt ürünlerine talep, tüketici pazarının hacmi ve büyüklüğü hakkında genel bir fikir vermektedir. Ciddi bir ekonomi potansiyeli olan starter kültür üretimi piyasasında, özellikle bilim ve araştırma alanlarında önemli yere sahip bazı firmalar aşağıda verilmiştir.

Çizelge 2.3. Uluslararası saf kültür üreten bazı firmalar [25].

Üretici Firma	Ülkesi
Chr. Hansen	Danimarka
DuoPont™ Danisco	Danimarka
DSM Food Specialties	Hollanda
Alce	İtalya
Centro Sperimenti del Latte	İtalya
Valio	Finlandiya
BioSource Flavors, Inc.	ABD
CSK Food Enrichment	Hollanda
BIOPROX	Fransa

LAB temelde, laktozdan laktik asit üretilir, pH'nın düşmesini sağlayarak, istenmeyen organizmaların inhibasyonuna yol açtığı, sağlığa faydalı olarak duyu ve yapısal özellikleri geliştirdiği için kullanılmaktadır. Starter kültürlerin süt ürünlerindeki en önemli görevi, peptidleri daha küçük peptidlere ve aminoasitlere parçalamasıdır. Starter kültürler kazeini parçalayabilirler ve aminoasitleri çeşitli tat bileşenlerine dönüştürebilirler [26].



Şekil 2.1. Yoğurt üretim akım şeması [27].

Yoğurt üretimi, ticari starter kültürler olan *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus*'un simbiyotik karma kültürü ile gerçekleşmektedir. Bu starter kültürler yoğurdun tipik lezzet ve yapısının oluşumundan sorumludur. Her ne kadar bağımsız olarak gelişebilselerde, birlikte kullanıldığında asit üretimi, bireysel olarak gelişiminden çok daha yüksek olmaktadır. Genel olarak, *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* fermantasyon tankına 1:1 oranında eklenir. Ortam 42 °C sıcaklıkta, 4-6 saat çalkalama yapılmadan koşullar altında tutulur. Bu sıcaklık iki mikroorganizmanın (optimum gelişme sıcaklıkları; *S. thermophilus* 37 °C; *Lb. bulgaricus* 45 °C) gelişimi için en uygun olan değerdir. Starter kültürler süte inoküle edildikten sonra

S. thermophilus, ortamdaki toplam bakteri sayısının % 90'nına ulaşıncaya kadar daha hızlı gelişir. Sonraki iki saat içinde, *S. thermophilus* tarafından ortamda oluşturulan laktik asit, karbon dioksit ve formik asit, *Lb. bulgaricus*'u sinerjik olarak uyarır. Streptokok yoğurdun başlangıç pH'sını yaklaşık 5'e kadar düşürür. Ortamda laktik asit arttıkça, sütteki asitlik düşerek, *Lb. bulgaricus* gelişmeye, *S. thermophilus* inhibe olmaya başlar. *Lb. bulgaricus*, pH'nın 4'e kadar azalmasından sorumludur. Öte yandan proteolitik aktiviteyle oluşturduğu peptidler ve amino asitler ile *S. thermophilus*'un gelişimini teşvik eder. Fermantasyon sırasında pH'nın düşmesi nedeniyle yoğurt karışımı pıhtılaşır ve 4 saat sonra popülasyon dengeye ulaşılır. Fermantasyon sonunda, ortamdaki asitlik % 1.2 - % 1.4 laktik asitliğe (pH 4.2 - 4.3) ulaşırken, her iki starter kültürün sayısı 2×10^7 hücre/mL üzerinde gerçekleşir. Asitliğin % 1.2 - % 1.4 laktik asit seviyesinde gelişmesi, çoğu tüketici için tercih edilen düzeydir. Titre edilebilir asitlik (TA) % 0.85 - % 0.90 olana kadar devam edilir. Fermantasyon işlemi genellikle 3-4 saat içinde, her iki tür tarafından laktozun, laktik aside dönüştürülmesiyle tamamlanır. Tek bir kültür ile laktozun aynı düzeyde laktik aside dönüşümü, 12-16 saat içinde gerçekleşebilmektedir. Yoğurtta istenen asitliğe ulaşıldığında, fermantasyon ve metabolik etkinliğini durdurmak için 5 °C'ye hızla soğutulur. Daha sonra ürün fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik bozulmayı yavaşlatmak için buzdolabı sıcaklığında (+4 °C) bekletilir [28].

Fermantasyon, 42 °C'den 44 °C'ya kadar olan sıcaklık değerleri arasında gerçekleştirilir. Genel olarak, 44 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda meydana gelen fermantasyonlarda, starter kültürün metabolizma hızı yüksek olduğundan, yoğurt daha tatlı olur. Daha hızlı kültür gelişimi, yoğurdun daha çabuk oluşumunu sağlar [28].

Her iki bakterinin fermantasyonda birlikte kullanılmasının daha faydalı olduğunu gösteren bir çalışmada, bakterilerin yoğurt üretiminde süt proteinlerini kullanımı, MALDI-MS ile fermantasyonun 3. ve 6. saatlerinde yapılan ölçümlerle belirlenmiştir. Ölçümlerde, *Lb. bulgaricus* ve *S. thermophilus* bakterilerine ait 3 farklı suşun, tek olarak ve birlikte süte inokülasyonu sonucunda, elde edilen γ_2 -kazein miktarı tespit edilmiştir. Her iki bakteri kullanılarak üretilen yoğurtlarda, simbiyotik etkiden dolayı en yüksek γ_2 -kazein miktarı elde edilmiştir [29].

Yapılan çalışmalar, fermantasyon sırasında oluşan uçucu organik bileşenlerden yüksek konsantrasyonlardaki sadece birkaç tanesinin, yoğurdun karakteristik

aromasına etki ettiğini ortaya koymuştur [30]. Her iki yoğurt bakterisi de laktozu, glukoz ve galaktoza hidrolize eden β -galaktosidaz enzim sistemine sahiptir [31]. Glikoz, önce pyruvata Embden-Meyerhoff yolu (EMP) ile metabolize olur, daha sonra pyruvate laktat dehidrogenaz enzimi ile laktik aside dönüştürülür. Öte yandan galaktoz, *Lb. bulgaricus* suşları tarafından kısmen metabolize edilirken, *S. thermophilus* suşlarının, galaktozu metabolize edecek enzimleri yoktur. Bu nedenle, galaktoz ve laktik asit yoğurt ortamında birikir. Laktozun hidrolizinden sonra oluşan fermantasyon ürünleri; laktik asit, asetaldehit, asetik asit ve diasetil, yoğurdun lezzetinde etkilidir [32].

LAB, fermantasyon sonucunda karbonhidratlardan temelde laktik asit üreten ve heterojen bakterilerin de bulunduğu bir gruptur [33]. Gram-pozitif, spor oluşturmeyen, katalaz negatif, asidofilik ve asidürik özelliklere sahip, mikroaerofilik ve anaerobik ortamlarda gelişebilen mikroorganizmalardır. Birkaç türü hariç, LAB üyeleri genellikle GRAS (generally recognise as safe-genel olarak güvenilir/zararsız kabul edilen) patojenik olmayan organizmalardır [34, 35].

LAB'nin bazıları gastrointestinal sistemimizde yaşayabilme özelliğine sahip olup, probiyotik bakteri olarak değerlendirilmektedirler. Düşük pH seviyesinde, safra tuzlarının bulunduğu ortamlarda ve geniş sıcaklık aralığında gelişebilmektedirler. LAB, çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Metabolik faaliyetlerine göre taksonomisi, karbonhidratları kullanması sonucu başlıca laktik asit üretenler homofermentatif, laktik asidin yanı sıra etanol, karbondioksit, formik asit ve asetik asit üretenler heterofermentatif olarak sınıflandırılmaktadır. Ayrıca farklı tuz konsantrasyonlarına ve antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç, gelişebildikleri sıcaklıklara göre de taksonomik sınıflandırma yapılmaktadır [34, 36].

Fenotipik özellikleri dikkate alınarak yapılan taksonomi uzun yıllardan beri kullanılmakta olup, LAB; *Streptobacterium*, *Betabacterium* ve *Thermobacterium* olarak üç alt grupta değerlendirilmektedir. Bu gruplara ait en önemli cinsler, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Lactobacillus* ve *Pediococcus*'dur [34].

Bir başka sınıflandırma şekli, bakterilerin hücre duvarı yapılarında bulunan, şeker ile amino asitlerin kovalent bağlarla oluşturduğu peptidoglikan yapısı ile pentoz ve hekzozların fermantasyon şekli dikkate alınarak yapılmıştır [37].

S. thermophilus önceleri, *Streptococcus salivarius*'un bir alt türü olarak önerilmiş ve *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* adıyla sınıflandırılması kabul edilmiştir [38]. Ancak daha sonra yapılan DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları, *S. thermophilus*'un farklı bir tür olduğunu ortaya koymuştur [39]. Isıya karşı olan dirençlilik ve sınırlı sayıda karbonhidratı kullanabilmesi gibi büyük fenotipik farklılıklar tespit edilmiştir [40]. *S. thermophilus* viridans bir streptokoktur. Viridans streptokoklar; mutant, anginosus, sanguinus, mitis ve salivarius grubu (*S. thermophilus*, *S. salivarius* ile *S. vestibularis* dahil) olmak üzere beş ana gruptan oluşmaktadır [41].

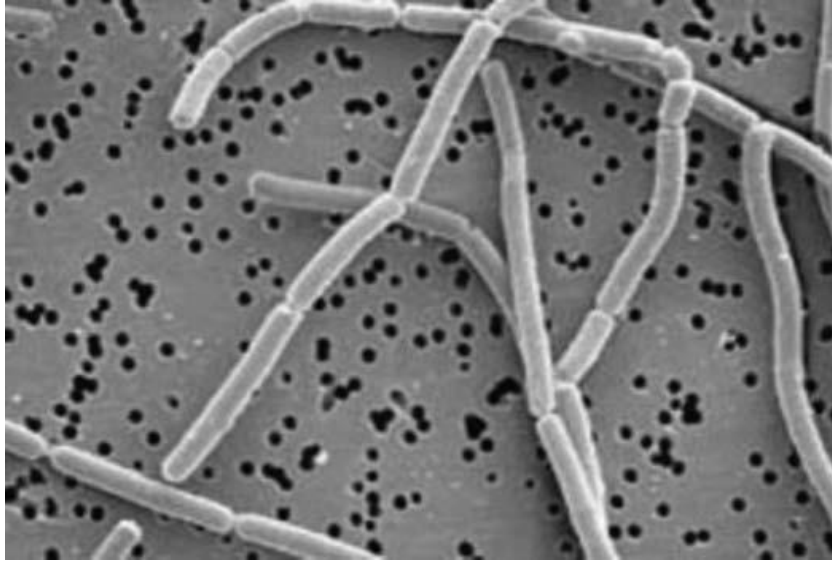
S. thermophilus, gıda teknolojisi ile ilişkili tek streptokok türüdür. Elektron mikroskobu altındaki görüntüsü Şekil 2.2'de gösterilmiştir [42]. Ortalama 45-52 °C'lerde canlılıklarını devam ettirebilen, optimum 6.0-6.5 pH'larda gelişebilen, fakültatif anaerob ve aerob özelliktedirler. DNA yapısındaki G (guanin)+C (sitozin) içeriği yaklaşık % 37-40 mol'dür. Zayıf proteolitik aktivite gösterirler [42, 43, 44]. Endospor üretmedikleri gibi oksidaz, katalaz ve sitokrom enzimleri bulunmamaktadır. Genom büyüklükleri 1.75-1.82 Mbp arasındadır. *S. thermophilus* suşları arasındaki en önemli farklılıklardan biri, plazmid varlığının çeşitlilik göstermesidir. *S. thermophilus*'un plazmid varlığı, diğer LAB'ne göre daha zayıftır. Pekçok *S. thermophilus* suşunda plazmid bulunmazken, saptananların da küçük boyutta olduğu tespit edilmiştir. Yapılarındaki plazmid varlığı, bakterinin antibiyotik direnci ve karbonhidratları fermente etme özelliklerinde etkili olmamasına karşın, faj direnci ve sütün koagülasyonu yeteneklerine etki ettiği belirlenmiştir. Ancak yapılan son çalışmalarda kesinleşmemekle birlikte, antibiyotik direnç mekanizmasına plazmid varlığının etki ettiğini göstermiştir [45, 46].



Şekil 2.2. *S. thermophilus*'un elektron mikroskopunda görüntüsü [40].

Lb. bulgaricus, 1984 yılına kadar ayrı bir cins olduğu değerlendirilirken, daha sonra yapılan çalışmalar sonucunda, *Lactobacillus delbrueckii*'nin alt türü olarak sınıflandırılmıştır [47]. *Lb. bulgaricus* cinsi Gram-pozitif ve çubuk şekilli bir morfolojiye sahip olup, elektron mikroskopundaki görüntüsü Şekil 2.3'te verilmiştir [48]. Katalaz negatif, hareketsiz, spor oluşturmeyen, anaerobik, mikroaerofilik ya da fakültatif anaerobiktir [37, 49]. Gelişmelerinde düşük pH seviyelerine ihtiyaç duyduklarından asidofilik sınıfında değerlendirilir. Ortalama 5.2-5.5 pH seviyelerinde gelişebilmektedirler [50].

Laktozu fermente ederek, yoğurdun temel aroma bileşeni olan asetaldehidin oluşumunu sağlar. Laktoz ile birlikte, früktoz, galaktoz ve gluktoz da kullanabilirler [51]. *Lb. bulgaricus*'un, DNA içeriğindeki, G+C düzeyi % 49-51, genom büyüklüğü 2.0 ila 2.3 Mbp arasında değişmektedir. Laktobasil türlerinde genelde bir ya da birkaç tane plazmid tespit edilmesine rağmen, yapılan bazı çalışmalarda da hiç plazmid bulunmadığı tespit edilmiştir. Yapılarındaki plazmidin antibiyotiklere karşı direnç profilleri üzerinde etkili olduğu da bildirilmektedir [52, 53].



Şekil 2.3. *Lb. bulgaricus*'un elektron mikroskobunda görüntüsü [48].

Bir mikroorganizmanın izolasyonu sonrası kimliklendirilmesi, tanımlama olarak değerlendirilmektedir. Tanımlama yöntemlerini, temelde fenotipik, genomik ve proteom yapılarına göre üç ana başlık altında toplayabiliriz. Fenotipik tanımlama, dış görünüş ve birçok kimyasal testin bir arada çalıştırıldığı sistemlerdir. Genomik kavramı, bir mikroorganizmanın işlevsel ve yapısal özelliklerini etkileyen genlerin belirlenmesidir. Proteom ise belirli bir ortamda analizin yapıldığı zamanda mikroorganizmanın yapısındaki proteinlerin tamamının ortaya konmasıdır.

Son yıllarda mikroorganizmalarla ilgili gerçekleştirilen araştırmalarda ve teknolojinin gelişiminde, genetik ve protein yapılarının daha fazla dikkate alındığı görülmektedir. Her üç yöntemde birlikte ya da tek başına kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır [54, 55, 56].

LAB'nin sadece fenotipik özellikleri dikkate alınarak yapılan bir çalışmada, 25 çiğ süt örneğinden, MRS besiyeri kullanarak, izole ettikleri kolonilerden, Gram-pozitif, hareketsiz ve katalaz (-) olan 83 suşu, şüpheli LAB'si olarak tanımlamışlardır. Doğrulama testi, belirledikleri 7 karbonhidratı fermente edebilme, 10, 15, 45 °C sıcaklıklarda ve % 2, 4, 6.5 NaCl konsantrasyonlarında gelişim testleri ile yapılmıştır. Çalışma sonucunda, çiğ sütün homofermentatif ve heterofermentatif LAB kaynağı olduğu belirtilmiştir [57].

Kütle spektrometrisinde gelişim sağlanmasına ve II. Dünya Savaşı'ndan sonra oldukça geniş çaplı bir ilgi oluşmasına rağmen, mikroorganizmalar üzerine yapılan ilk çalışma, 1970'li yıllarda Mars'a yapılan yolculuk sonrası alınan toprak

numunesinin analizinde gerçekleştirilmiştir [58, 59]. İlk gerçek ilerleme, Anhalt ve Fenselau tarafından 1975 yılında yapılan çalışma ile Koenzim Q, fosfolipid ve diğer uçucu bileşenlerin ölçümü yapılmıştır [60]. Desorpsiyon/İyonizasyon teknolojisinin 1980'li yıllarda gelişmesiyle, bakterilerde lipid biomarkırların ölçülmesi sağlanmıştır [61]. Analiz için örneklerin hazırlanmasının uzun zaman alması, mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılmasını engellemiştir. Zaman içindeki gelişim sayesinde belirgin olumsuzlukların ortadan kaldırılması sağlanmış ve 1996 yılından sonra kısa bir süre içerisinde mikroorganizmaların tanımlanması çalışmalarında öncülük etmeye başlamıştır [62, 63, 64].

MALDI-TOF MS (Matriks Aracılı Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon-Uçuş Zamanı-Kütle Spektrometresi), mikroorganizmaların tanımlanmasında faydalanan son teknolojik metotlardandır. Mikroorganizmaların yapısındaki şeker, protein, peptid gibi biyomoleküller ve polimer, makromolekül, dendrimer gibi büyük organik moleküllerin iyonizasyonu lazer atışı ile gerçekleştirilerek, elektromanyetik uçuş tüpünden geçirilmektedir. Meydana gelen spektrumların grafiksel görüntüleri, daha önceden cins ve tür düzeyinde tanımlanmış mikroorganizmaların veri tabanındaki sonuçları ile karşılaştırılarak değerlendirme yapılmaktadır [65, 66].

MALDI-TOF MS yöntemi, moleküler ve biyokimyasal yöntemlerden farklı olarak çalışmakta, mikroorganizmaya ait protein profili incelenmesi esasına dayalı proteomik bir yöntemdir. En fazla 48 saatlik kültürler çalışma için tercih edilmektedir. Eskiyeen kültürlerde, ayırt edici pik sayısı ve bu piklerin yoğunluğu düşmektedir [67].

Mikrobiyolojik çalışmalarda, kütle spektrometrisi ile hızlı bir şekilde sonuca ulaşmak mümkündür. Zarar görmemiş tek koloni hakkında, beş dakika içerisinde kapsamlı bilgi elde edilebilmektedir.

Kütle spektrometrisinin kullanıldığı bazı çalışmalara örnek verecek olursak, İtalya'da 1999 yılında aynı çalışma grubunun yaptığı iki çalışmada; MALDI-MS cihazı ile *Lb. bulgaricus* ve *S. thermophilus* bakterilerine ait 3'er suşun yapısal farklılıkları ile fermantasyonda, bakterilerin süt proteini kullanımı miktarının tespiti yapılmıştır. MALDI-MS ile herbir bakteri suşunun, farklı protein profillerinde olduğu belirlenirken, fermantasyonda bakterilerin süt proteinlerini parçalama miktarının tespiti ile ticari olarak üretilen yoğurtlarda besinsel kalitenin belirlenmesinde ve

inoküle edilecek bakteri oranlarının tespitinde MALDI-MS'in belirleyici olabileceği ifade edilmiştir [29, 67].

Japonya'da bulunan, Çevre Yönetim Teknolojisi Araştırma Enstitüsü ve Ulusal Gelişmiş Endüstriyel Bilim ve Teknoloji Enstitüsü koleksiyonlarından temin edilen, *S. thermophilus* (ATCC BAA-250 ve ATCC BAA-491) ve *Lb. bulgaricus* (ATCC BAA-365 ve NBRC 13953) bakterilerine ait 4 suşun MALDI-TOF MS cihazıyla proteomik analizi yapılmıştır. Çalışmada, bakterilerin ribozomal RNA'sından elde edilen proteinlerin saflaştırılarak ve hücre duvarının lize edilmesiyle elde edilen proteinlerin hiçbir işlem yapılmadan spektrumlarının tespiti şeklinde iki yöntem uygulanmıştır. Hücre duvarının lize edilerek proteinlerin herhangi bir işlem yapılmadan analiz edildiğinde, protein kaybı olmadığı, saflaştırma işlemi sırasında istenmeyen disülfid bağlarının meydana geldiği belirlenmiş, aynı örneğe ait spektrumların farklı olduğu gösterilmiştir. MALDI-TOF MS ile aynı bakteriye ait iki suşun farklı protein yapılarının olduğu ortaya konarak, bakterilerin suş düzeyinde, kimyasal sınıflandırılmasının belirlenebileceği belirtilmiştir [68].

Angelakis et al. [69] tarafından yapılan çalışmada, Fransa'da satışa sunulan 8 fonksiyonel gıda ve 5 farklı firmaya ait ticari yoğurt ürünlerinden izole edilen bakterilerin, hızlı ve doğru bir şekilde tanımlaması amaçlanmıştır. MALDI-TOF MS cihazının bakteri doğrulamasındaki etkinliği, q-PCR cihazı ile elde edilen değerlerle karşılaştırılarak yapılmış, MALDI-TOF MS ile yapılan tanımlamaların % 92 oranında q-PCR cihazı ile elde edilen değerlerle uyduğu tespit edilmiştir. Örneklerdeki bakteri sayıları MALDI-TOF MS ile tespit edilemediğinden, örneklerin bakteri yükü q-PCR ve klasik yöntemlerle belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, MALDI-TOF MS cihazının, fonksiyonel gıdalarda ve yoğurtlarda izole edilen bakterilerin tanımlanmasında faydalı olduğu bildirilmiştir.

Vietnam'da fermente bir et ürünü olan nem chua ve Hanoi şehrine özgü ürün olan fermente hardal ürünleriyle yapılan bir çalışmada, toplam 11 örnekten, 171 suş izole edilmiştir. Doğrulama ve sınıflandırma, (GTG)₅-PCR ve MALDI-TOF MS cihazları ile yapılmıştır. Analizler sonucunda; MALDI-TOF MS cihazı ile %72.3, (GTG)₅-PCR cihazı ile %56.4 oranında suş doğrulanarak sınıflandırılmış ve dendrogram şeması oluşturulmuştur. 100'den fazla örneğin analizine ihtiyaç duyulması durumunda, MALDI-TOF MS cihazının, zaman ve ekonomik olarak daha etkili şekilde gerçekleştirildiği vurgulanmıştır [70].

MALDI-TOF MS ve PZR cihazı ile Laktobasil tanımlama sonuçlarının karşılaştırıldığı bir diğer çalışmada, et ve süt ürünlerinden izole edilen 148 Laktobasil suş ile çalışılmıştır. Genotipik yöntem olarak PZR cihazları ile 148 izolatın 114'ü, 9 farklı alt tür olarak tanımlanırken, MALDI-TOF MS ile 148 izolatın 111'i, 10 farklı alt tür olarak tanımlanmıştır. Aynı alt türlerin her iki cihaz ile tanımlanması uyumu %74.3 olarak gerçekleşmiştir. MALDI-TOF MS cihazının ilk yatırım maliyetinin oldukça yüksek olmasına rağmen, analiz giderlerinin PZR cihazı ile karşılaştırıldığında daha ucuz olmasından dolayı, birkaç yıl içerisinde yatırım maliyetini telafi edeceği belirtilmiştir. Ancak, cihazın Laktobasil bakterilerinin tanımlanmasında yeni bir yöntem olması sebebiyle, şimdilik PZR cihazları ile karşılaştırılmalı çalışılmasının faydalı olacağı ifade edilmiştir [71].

Dec et al. [72] tarafından yapılan çalışmada, 3 haftalık-4 yaş arası kazlardan izole edilen Laktobasillerin, MALDI-TOF MS, ITS-PCR ve ITS-PCR/RFLP cihazlarıyla tanımlama sonuçlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Örneklerden 104 suş izole edilmiştir. Her üç cihaz ile yapılan doğrulama sonuçları değerlendirildiğinde, MALDI-TOF MS cihazında ölçülen ve log değeri 1.7-3.0 arasında olan suşların, PZR cihazları ile aynı sonuçları verdiği belirlenmiştir. PZR'nin türler arası ve tür içindeki doğrulamalarda daha güvenilir olduğu ancak MALDI-TOF MS ile analizin etkili, hızlı, maliyeti düşük olması ve bir seferde çok fazla örneğin analizinin yapılabilmesi gibi özelliklerinden dolayı alternatif bir yöntem olabileceği değerlendirilmiştir.

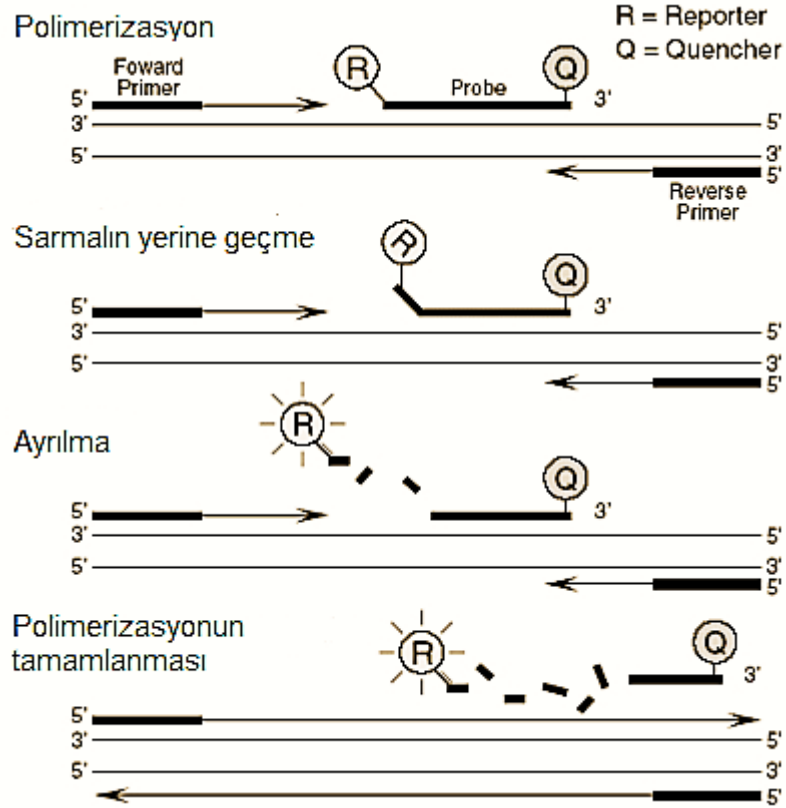
Polimeraz zincir reaksiyonu moleküler biyolojide en güçlü teknolojilerden biri olmakla birlikte, basit, çok yönlü, hassas, özgül ve tekrarlanabilir bir analizdir. Bir DNA parçasının üssel amplifikasyonundan oluşmakta ve DNA'nın *in-vitro* koşullarda enzimatik olarak kopyalanması temeline dayanmaktadır: Çift sarmal DNA, tek sarmal DNA'ya denatüre edilir, çoğaltılır ve bu işlem tekrarlanır.

Gerçek-Zamanlı PZR, 80'li yılların ortasında Kary Mullis ve arkadaşları tarafından geliştirilen, polimeraz zincir reaksiyonun gelişmiş bir formu olup, tekniğin potansiyelini en üst düzeye çıkarmaktadır.

Geleneksel PZR'de son döngüden sonra, çoğaltılmış dizinin saptanması ve miktarının belirlenmesi, jel elektroforezi ve görüntü analizi gibi PZR sonrası işlemler ile belirlenirken, Gerçek-Zamanlı PZR'de her bir döngüden sonra üretilen amplikonların sayısı, analizde kullanılan boyaların doğru orantılı olarak artan

floresanının, bir cihaz ile tespiti ile yapılır. Cihaz, PZR süresi boyunca bir amplikon grafiği oluşturur.

Gerçek-Zamanlı PZR'de, PZR ürünlerinin saptanması için iki temel yöntem vardır, ilki SYBR yeşili gibi herhangi bir çift iplikçikli DNA ile interkalasyon yapan özgül olmayan floresan boyalar, ikincisi floresan bir raportör ile işaretlenmiş oligonükleotidlerden oluşan diziye özgü olan TaqMan probudur.



Şekil 2.4. DNA polimerazının polimerizasyonla ilişkili 5'-3 'nükleaz aktivitesi, PCR reaksiyonu sırasında raportörü söndürücüden ayırır [75].

TaqMan testi, duyarlılığı ve özgüllüğünden dolayı yaygın olarak kullanılan bir gerçek-zamanlı PZR testidir. TaqMan testi, Taq DNA polimeraz 5' — 3' ekzonükleaz etkinliğine dayanır. TaqMan probu, 5' ucundan bir raportör (reporter) floresan boyasına ve 3' ucunda bir söndürücü (quencher) boyaya sahip, diziye özgü bir oligonükleotiddir. Prob, Taq DNA polimeraz enzimi tarafından hidrolize edilmediğinde, floresan rezonans enerji transferi (FRET) nedeniyle raportör boya tarafından yayılan floresan ışınım söndürücü boya tarafından emilir. Ancak prob, Taq DNA polimeraz ile hidrolize edildiğinde, 5' ucundaki raportör boya 3' ucundaki

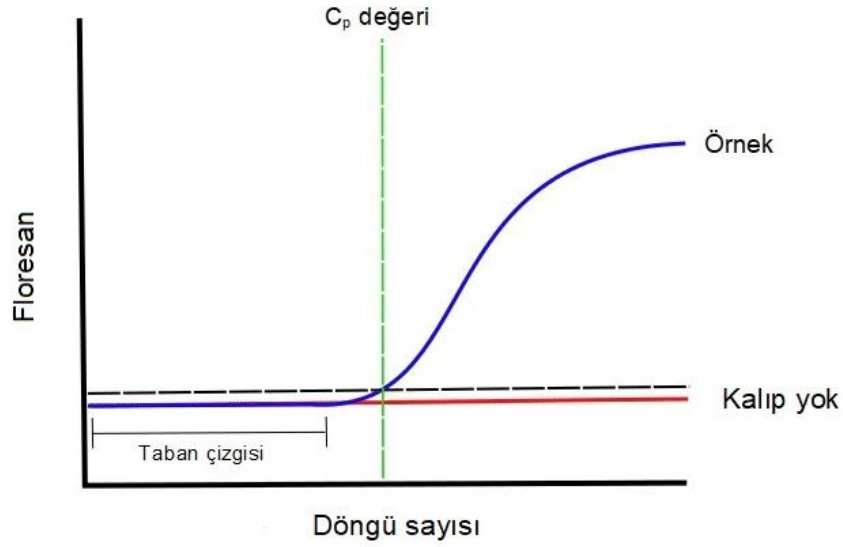
söndürücü boyadan ayrılarak söndürme etkisi engellenir ve bu nedenle gerçek-zamanlı PZR cihazı ile 5' raporör ucundaki boyanın floresan ışığı tespit edilir. Serbest bırakılan 5' raporör ucundaki boyanın sinyali, PZR ürünlerinin miktarı ile orantılıdır.

Gerçek-zamanlı PZR reaksiyonunda her bir döngüyü oluşturan üç ana adım vardır.

- 1- Denatürasyon (çift sarmalın ayrılması): Yüksek sıcaklıkta inkübasyon, çift iplikçikli DNA'yı tek iplikçikler haline dönüştürür. DNA polimerazın dayanabileceği en yüksek sıcaklık olan 95 °C, inkübasyonda kullanılır. Dizinin yapısındaki G-C miktarı yüksekliği denatürasyon süresini uzatır.
- 2- Bağlanma: Primerlerin erime sıcaklığında (T_m), ayrılmış tek iplikçikli DNA zincirleri üzerinde tamamlayıcı oldukları bölgelerle eşleşip, kalıp DNA zinciri ile primer arasında hidrojen bağları oluşur.
- 3- Uzama: 70-72 °C Taq DNA polimeraz enziminin ideal çalışma sıcaklığıdır. Bu sıcaklıkta primerler uzar ve tamamlayıcı zincir sentezi olur.

Gerçek-zamanlı PZR'de oluşan ürün miktarı reaksiyon seyri boyunca izlenir, oluşan ürün miktarı ile orantılı olarak reaksiyona giren boyalar ve probaların floresanı izlenerek, belirli miktarda DNA molekülü elde etmek için gereken amplifikasyon döngülerinin sayısı kaydedilir.

Genellikle amplifikasyon çevirimi başına molekül sayısının iki katına çıktığı belirli bir amplifikasyon verimliliği varsayılarak, başlangıçta numunede bulunan amplifiye DNA moleküllerinin sayısını hesaplamak mümkündür [73, 74].



Şekil 2.5. Gerçek-zamanlı PZR amplifikasyon eğrisindeki eşik seviyesi [76].

Şekil 2.5’de gösterilen reaksiyon eğrisi (mavi çizgi) ile eşik çizgisinin (kesikli çizgi) kesiştiği nokta C_p veya “eşik döngüsü” olarak tanımlanır. Bu nokta, örnekten gerçek bir sinyalin saptandığı döngü sayısını gösterir. Gerçek-zamanlı PZR ile yapılan çalışmalarda her bir örnek için farklı C_p değerleri elde edilir.

C_p değeri, örnekte bulunan nükleik asit miktarı ile ters orantılı olup, örnekteki kopya sayısı ile ilişkilidir. Düşük C_p değeri yüksek miktarda hedeflenen nükleik asidi gösterirken, yüksek C_p değeri hedef nükleik asidin düşük (hatta çok az) miktarda olduğunu ifade eder. Genel anlamda 30 döngünün altındaki C_p değerleri, yüksek miktarda nükleik asidi gösterirken, 38 döngünün üzerindeki C_p değerleri, çok düşük nükleik asit miktarını ve muhtemelen bir enfeksiyon veya çevresel kontaminasyonu belirtir [76].

Gerçek-zamanlı PZR, patojenlerin tespitinde, gen açılım analizlerinde, kromozom bozukluklarının belirlenmesinde kullanılmakta, ayrıca son zamanlarda gerçek-zamanlı immuno PZR ile antijen saptanmaya başlamıştır [73, 74].

PZR temelli yöntemle Laktobasili tanımlanmasının tür düzeyinde yapıldığı bir çalışma 2002 yılında Fransa’da gerçekleştirilmiştir. Daha önce tanımlanması ve kaynağı belli olan farklı tür ve alt türde olan 100 suş çalışma kapsamında çeşitli Enstitü ve Araştırma Birimlerinden, primerler (LbLMA-1, R16-1) Cergy Pontoise Üniversitesinden tedarik edilmiştir. Yapılan analizlerde, belirlenen primerlerle, Laktobasil grubundaki bakterilerin DNA’sı amplifiye olurken, diğer grup bakterilerde amplifiye gerçekleşmemiştir. Üç filogenetik grup içerisinde ve fermentatif olan

21 Laktobasil türüne ait 23 suşun tanımlanması yapılmıştır. LbLMA-1 tabanlı PZR'nin, Laktobasil türüne ait bakterilerin tanımlanmasında yararlı olabileceği gösterilmiştir [77].

Yapılan başka bir çalışmada, fermente sütlerde bulunan *S. thermophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. paracasei* ve *B. lactis* bakterilerini, antibiyotik içermeyen farklı bileşenlere sahip yeni selektif besiyerleri geliştirerek, farklı inkübasyon koşullarında izolasyon, sayım ve tanımlamanın yapılabileceği alternatif yöntem belirlemek amaçlanmıştır. *S. thermophilus*, M17 broth+%2 laktoz, Laktobasil türü ve *B. lactis*, MRS broth+%0.05 L-sistin hidroklorid besiyerlerinde gelişim, farklı inkübasyon sıcaklığı ve süreleri denenmiştir. İnkübasyonlar sonunda gelişen kolonilerin tanımlamaları, PZR ve DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis-Değişken Alanlı Jel Elektroforezi) ile yapılmıştır. Çalışmada kullanılan primerler sırasıyla, Thermfor-GC/Thermrev (*S. thermophilus*), Bulgfor/Bulgrev (*Lb. bulgaricus*), Acidfor-GC/Acidrev (*Lb. acidophilus*), Casfor/Casrev (*Lb. paracasei*), Forlac/Revlac-GC (*B. lactis*) olarak belirlenmiştir. Bakterilerin gelişim ortamlarının farklılaştırılması ve inkübasyon koşullarının değiştirilmesi kombinasyonuyla belirlenen yeni yöntemin etkinliği; doğruluk, tekrarlanabilirlik, seçicilik ve özgüllük gibi istatistiksel parametreler ve türe-özgü PZR ve DGGE analizlerinin sonuçlarıyla ortaya konmuştur [78].

Fransa'da 2004 yılında, fermente süt ürünlerinden izole edilen *S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. paracasei* ve *Lb. rhamnosus* bakterilerinin kantitatif gerçek-zamanlı PZR ile tespiti ve sayımı yapılmış, yöntemin etkinliğinin değerlendirilmesi klasik yöntemlerle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak ortaya konmuştur. Çalışmada, 6 farklı firmanın, 8 fermente süt ürünü analiz edilmiş ve PZR analizlerinde, La1 (*Lb. acidophilus*), Lj1 (*Lb. johnsonii* ve *Lb. gasseri*), Ld1 (*Lb. delbrueckii*), Lc1 (*Lb. casei*), Lc4 (*Lb. casei* grubu), Lp1 (*Lb. paracasei*), Lr1 (*Lb. rhamnosus*) ve St1 (*S. thermophilus* ve *S. salivarius*) primerleri kullanılmıştır. Analizler sonucunda; bazı ürünlerde elde edilen sayım sonuçları arasında farklılıklar tespit edilmiştir. PZR ile sayımın etkinliğinin, bakterilerin hücre duvarlarının tam olarak lize edilmesine bağlı olarak, DNA ekstraksiyonunun etkinliğine ve PZR inhibitörlerinin ekstraksiyon sonunda elde edilen DNA çözeltisinde bulunmasıyla ilgili olduğu belirlenmiştir [79].

Yoğurt kültürlerinin, LAB ve Bifidobakterilerle kombinasyonu sonucu üretilen fermente süt ürünlerinde, Uluslararası Gıda Kodeksine göre her bir bakteriden en az 10^6 kob/g canlı bakteri olması gerekmektedir [80].

Bakteriler bulundukları ortamlarda canlılıklarını kaybettikten sonra bile yapılarındaki DNA, ortamda varlığını devam ettirmektedir. PZR ile yapılan bakteri sayımlarında, hücreler ölmesine rağmen DNA'ları amplifiye olmakta, analizler yanlış pozitif sonuçlar vermektedir [81]. Yanlış pozitif sonuçları ortadan kaldırmak amacıyla, canlı bakteriler için toksik olmayan, ortamdaki ölü ya da hasarlı hücrelere selektif olarak giren ve DNA'larına bağlanarak, amplifikasyonu engelleyen propidium monoazidenin (PMA) kullanılmaktadır [82].

Bir çalışmada, *S. thermophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei*, *Lb. acidophilus* ve *B. lactis* bakterisi içeren fermente süt ürünlerinde, gerçek-zamanlı PZR ile PMA kullanılarak canlı bakteri sayımı yapılmıştır. Sayım sonuçları antibiyotik içermeyen besiyerleri kullanılarak klasik yöntemlerle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Bakteriler uygun besiyerlerinde canlandırıldıktan sonra, PMA ile işleme tabi tutularak, ölü ya da aşırı zarar görmüş bakterilerin DNA'larının yapısına girmesi sağlanmıştır. Tespit edilecek bakterilerin primerleri belirlendikten sonra, kantitatif gerçek-zamanlı PZR ile tanımlamaları ve sayımları tespit edilmiştir. Klasik yöntemlerle 72 saat gibi bir sürede sonuca ulaşılırken, PZR ile 3 saat gibi kısa sürede işlemin tamamlandığı belirtilmiştir [83].

Herbel et al. [84], Almanya'nın Berlin şehrinde satışa sunulan, içeriğinde *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. helveticus* ve *Lb. reuteri* bakterileri bulunan probiyotik yoğurt örneklerinden, negatif ve pozitif kontrol olarak kullanılmak amacıyla toplam 77 laktobasil, bifidobakteri ve diğer probiyotik bakteriler izole edilmiştir. Hedef bakterilerin tanımlanması amacıyla primerler, laktobasil bakterisinin protein 60 gen (hsp 60) bölgesi, alt türe göre farklı bölümleri kullanılarak belirlenmiştir. Suşların tanımlanması ve ürün içerisindeki sayılarının tespiti, LightCycler 480® gerçek-zamanlı PZR ile yapılmıştır. Sonuçların karşılaştırılmasında, MALDI-TOF MS cihazı ve klasik yöntemler kullanılmıştır. Çalışmada; klasik yöntemlerin, tanımlama ve kantitatif ölçümün uzun zaman alması ve standardize etmenin zorluğundan dolayı, etkinliğinin yeterli olmadığı, MALDI-TOF MS cihazının ise etkinliğinin yeterli, ancak ürünlerdeki bakteri yükü tespitinin

mümkün olmaması nedeniyle, kantitatif gerçek-zamanlı PZR'nin gıdalarda laktobasil tespit ve sayımında kullanılmasının daha uygun olduğu bildirilmiştir.

Probiyotik ürünlerde Laktobasili cinsine ait bakterilerin, eş zamanlı PZR ve erime eğrisi analizi ile tanımlanması konusunda bir çalışma, 2007 yılında Tayvan'da yapılmıştır. 10 yoğurt ve süt tozu ile 4 besin takviyesi ürünü olmak üzere toplam 14 örnek analiz edilmiştir. İzolasyon, MRS besiyerinde, anaerobik koşullarda, 35°C'de 48 saat inkübasyona bırakılarak yapılmıştır. İnkübasyon sonrası morfolojileri farklı 5 ila 10 koloni alınmış, Gram boyama testi ve API 50 CHL kiti ile tanımlanmıştır. Fenotipik ve biyokimyasal yapıları birbirinin yakını olan *Lb. paracasei* ve *Lb. rhamnosus* gibi suşların ayrışımının güç olduğu görülmüştür. Ancak 16S rRNA'nın farklı sekans bölgelerine göre tasarlanan, Acido (*Lb. acidophilus*), Delbr (*Lb. delbrueckii*), Para (*Lb. paracasei*), Casei (*Lb. casei*) ve Rhamn (*Lb. rhamnosus*) primerleri ile gerçek-zamanlı PZR ve erime eğrisi analizi yapılarak, *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* ve *Lb. rhamnosus* kolayca belirlenerek tanımlanmıştır. Çalışmada, gerçek-zamanlı PZR ve erime eğrisi yönteminin etkinliğinin yanı sıra, tanımlamanın 40 dakika gibi kısa sürede sonuçlandığı, karmaşık mikrofloralarda hızlı ve doğru sonucun alındığı ifade edilmiştir [85].

Satışa sunulan 6 kırmızı şaraptan, heterofermentatif laktik asit bakterileri, *Lb. brevis*, *Lb. hilgardii* ve *Lb. plantarum* izolasyonunda sırasıyla, MRS, ROGOSA ve Tomato Juice besiyerleri kullanılmış, inkübasyon koşulları mikroaerofilik ortamda, 37 °C'de 72 saat olarak belirlenmiştir. Tanımlamada kullanılacak primerler, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool-Temel Yerel Hizalama Arama Aracı) veritabanı kullanılarak tasarlanmıştır. Şarap kalitesinde önemli etkisi olan *Lb. brevis*, *Lb. hilgardii* ve *L. plantarum*, gerçek-zamanlı PZR ile doğrulanarak, örneklerdeki sayıları 4×10^3 kob/mL ila 1×10^5 kob/mL arasında bulunmuştur. Çalışmada, gerçek-zamanlı PZR cihazının şarapların kalite kontrolünde kullanılabileceği bildirilmiştir [86].

S. thermophilus'un, primer-özgü PZR ile hızlı tanımlanmasına yönelik başka bir çalışmada, bakterinin temel β -galaktosidaz aktivitesine bağlı olarak, lacZ gen bölgesi baz alınmıştır. Farklı 35 suş örneği, primer-özgü PZR ile analiz edilmiş, ayrıca sonuçların kontrolü amacıyla, *S. thermophilus* için spesifik oligonükleotid prob ile hibridizasyon yöntemi kullanılmıştır. Her iki yöntem ile aynı paralellikte, 8

suş *S. thermophilus* olarak tanımlanmıştır. Çalışmada, lacZ geninin *S. thermophilus* için spesifik olduğu, her iki yöntemin de güvenilir ve hassas sonuçlar verdiği ortaya konmuştur [87].

Çiğ süt, peynir ve yoğurt örneklerinden izole edilen *S. thermophilus* suşlarının, genotipik ve fenotipik çeşitliliğinin ortaya konması amaçlanan bir çalışmada, temel fizyolojik testler (morfolojik değerlendirme, farklı sıcaklıklarda gelişme, NaCl'e dirençlilik ve 60 °C'de 30 dakika ısıtma işlemi uygulaması) ile suşların varsayımsal tanımlaması yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan *S. thermophilus* DSM 20617 suşu ile birlikte toplam 39 suşun karbonhidrat fermentasyon profilleri, API 50 CHL kiti ile belirlenmiştir. Tanımlama lacZ primeri kullanılarak, türe-özgü PZR ile gerçekleştirilmiş ve genotipik farklılıkları belirlenmiştir. Suşların, yağsız süt ve galaktoz ile asitleştirme, aminopeptidaz ile peptidaz aktiviteleri tespit edilerek, sonuçların istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır. Çalışma sonucunda, suşların genotipik ve fenotipik çeşitliliği ile süt teknolojisindeki işlevselliklerinin farklılığı ortaya konmuştur [88].

Yüksek kalitede ev yoğurdu üretimiyle ünlünen, Bulgaristan'ının 4 bölgesinden, toplanan sağlıklı bitki örneklerinden, *Lb. bulgaricus* ve *S. thermophilus* izole edilerek, özelliklerinin belirlenmesi amaçlanan çalışmada, bakterilere, Gram boyama, hücre morfolojisi, glukozdan gaz oluşumu, yüksek tuz konsantrasyonuna dayanıklılık (% 6.5 NaCl), litmuslu süt testi ile 10, 15, 45 ve 50 °C'de gelişim testleri yapılmıştır. Daha sonra API 50 CH sistemi ile sınıflandırılmıştır. Sınıflandırmanın doğrulaması, LB1/LLB1 (*Lb. bulgaricus*) ve ThI/ThII (*S. thermophilus*) primerleri belirlenerek, alttür-özgü PZR ile yapılmıştır. Analizler sonucunda, her iki bakteriden de 20'şer suş tanımlanmıştır. Ayrıca, DGGE ile *Lb. bulgaricus*'un 7 ve *S. thermophilus*'un 13 gruptan oluşan dendrogramı oluşturulmuştur. Suşların karakterizasyonu, asidifikasyon özelliklerinin, kinematik viskozitelerinin ve üreaz aktivitelerinin ölçümleri ile ortaya konmuştur. Çalışmayla, birincisi *Lb. bulgaricus* ve *S. thermophilus* bakterilerinin kaynağının bitkiler olabileceği, ikincisi mikrobiyolojik ve fermentasyon özelliklerinin ticari yoğurt kültürlerinden farkı olmadığı, bu sebeple yoğurdun tarihsel gelişimi içerisinde, diğer ülkelerde ticari yoğurt yapımında kullanılan starter kültürlerin bir kaynağının da buradan gelebileceği ihtimali belirtilmiştir [89].

Kolombiya piyasasında satışı sunulan 7 biyoyogurt örneğinde, canlı probiyotiklerin ve starter bakterilerin tanımlanması ve sayılarının tespiti, safra asidine dirençliklerinin, patojenlere (*Salmonella enterica* serotip Typhimurium) karşı etkinliklerinin, insan bağırsak epitel dokusuna (Caco-2 hücreleri) tutunma kabiliyeti gibi özelliklerinin belirlenmesi üzerine bir çalışma yapılmıştır. Tanımlamada kullanılmak üzere, primerler, BSF8/20 ve BSR1541/20 (LAB için), B11 ve B12 (Bifidobakteri için) belirlenmiştir. Toplam 17 farklı suş ve canlı hücre sayıları en az 10^7 kob.mL⁻¹ olarak bulunmuştur. En çok *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* izole edilirken, sadece bir üründe canlı Bifidobakteri tespit edilmiştir. Toplam 13 suş, çeşitli düzeylerde antogonistik etki gösterirken, 10 suşun Caco-2 hücrelerine tutunma kabiliyeti olduğu, 6 suşun safra asidini tolere edebildiği belirlenmiştir. İzole edilen 17 suşun yalnızca 4'ünün probiyotik özelliklere tatmin edici düzeyde sahip olduğu bildirilmiştir [90].

Sürekli yogurt tüketenlerin dışkılarındaki LAB varlığının tespitine yönelik İspanya'da yapılan araştırmada, sağlıklı 114 gönüllü; 48, 48 ve 18 kişilik üç gruba ayrılmış, 48'li gruplar 15 gün boyunca sırasıyla ticari taze yogurt ve pastörize yogurt tüketirken, 15 günün sonunda tüketim sırası değiştirilmiştir. 18 kişilik grup hiç yogurt tüketmemiştir. 15 günlük periyotlar sonunda, insan dışkısında yogurt LAB varlığının tanımlanması, PZR ve DNA hibridizasyon ile yapılmış, primerler, add (*Lb. bulgaricus*) ve lacZ (*S. thermophilus*) olarak tasarlanmıştır. Dışkı örneklerinde, PZR ile LAB tanımlama denemelerinde sürekli negatif sonuç alınırken, hibridizasyon ile pastörize yogurt tüketenlerin 10'unda (%10.52), taze yogurt tüketenlerin 2'sinde (%2.10) yogurt bakterisi tespit edilmiştir [91].

İran'da farklı yöntemler kullanılarak, 60 yogurt örneğinde, baskın olan LAB'nin morfolojik, biyokimyasal ve moleküler özelliklerinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmada, toplam 137 izolat elde edilmiştir. İzolatlara fenotipik yöntemlerden, glukozdan CO₂ üretimi, 15 ve 45 °C sıcaklıklar ile % 4 ve % 6.5 NaCl konsantrasyonunda gelişimi ve 13 karbonhidratı fermente edebilme biyokimyasal testleri uygulanmıştır. Genotipik sınıflandırma, 16S-FA ve 16S-RA primerleri kullanılarak PZR ve 16S rDNA sekans analizi ile ortaya konmuştur. Fenotipik analizler sonucunda; izolatların %28.8'i *S. thermophilus* ve %34'ü *Lb. bulgaricus* tespit edilirken, genotipik analizler ile % 3'ü *S. thermophilus* ve % 50'si *Lb. bulgaricus* olarak tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçların büyük farklılık

göstermesi sebebiyle, değerlendirmenin tanımlanan izolatların yoğurt üretimde uçucu bileşikler üretim kabiliyeti ve starter kültür olarak değerlendirilebilme sonuçlarının tespiti ile yapılması gerektiği ifade edilmiştir [92].

DNA sekans analiziyle, hedeflenen canlının genomik yapısıyla ilgili pek çok bilgi elde edilmesi mümkündür. DNA saflaştırma yöntemlerinin gelişmesiyle birlikte, DNA sekansının belirlenmesinde önemli adımlar atılmıştır. İlk 1953 yılında DNA'nın üç boyutlu yapısı ortaya konduktan sonra sekans analizi çalışmaları 1960'lı yıllarda hız kazanmış, 74 nükleotidlik tRNA moleküllerinin, 1965 yılında Robert Holley tarafından DNA dizisi çıkarılmıştır.

Allan Maxam ile Walter Gilbert ve Frediric Sanger yaptıkları araştırmalarla, 1977 yılında iki farklı DNA sekans analizi yöntemi belirlemişlerdir. Akiyoshi Wada ile başlayan otomatik olarak sekans analizi yapılması çalışmaları sonunda, 1986 yılında Kaliforniya Teknolojisi Enstitüsü'nden Leroy Hood ve Llyod Smith tam otomatik cihaz geliştirmişlerdir. Grail adında ilk gen tanımlama programı da Edward Uberbacher tarafından 1990 yılında yazılmıştır.

Yıllar içerisinde araştırmaların ilerlemesiyle, 1992 yılında 21. kromozomun, 1995 ve 1996 yıllarında sırasıyla *Haemophilus influenzae* ve *Saccharomyces cerevisiae*'nin, 1998 yılında *Caenorhabditis elegans*'in ve 1999 yılında 22. kromozomun DNA sekans analizleri gerçekleştirilmiştir [93].

2000'li yıllara gelindiğinde artık insanın gen haritasının taslak şekilde belirlendiği ifade edilmiş ve *Arabidopsis thaliana* DNA dizisi belirlenen ilk bitki olmuştur. David Page ve çalışma arkadaşları, 2003 yılında Y cinsiyet kromozomuna ait sekans analizini açıklamışlardır [94, 95].

Geçmişten günümüze geçen zaman içerisinde sekans analizi teknolojisinin değişimiyle ve yapılan bilimsel araştırmalar çok farklı gelişmelere kaynak olmuştur. Teknolojik olarak elde edilen değişimler, genetik yapının belirlendiği çalışmalarda, daha verimli ve yenilikçi alt yapı oluşturmuştur. Üçüncü nesil teknoloji sayesinde 24 saatten az bir zamanda, maliyetleri azaltarak, daha kesin, net ve uzun gen haritalarını ortaya konma imkanı elde edilmiştir [95].

Bir örnekten izolasyon sonrası elde edilen izolatların tüm genomuna ait dizileme pratik olmaması sebebiyle çok sıkı korunuma sahip olan 16S rRNA bölgesine ait dizileme bilgilerine dayalı veri tabanı meydana getirilmekte, tanımlama da bu

bilgilerle karşılaştırılarak yapılmaktadır. Bakterinin 16S rRNA bölgesi her bir suşa ait özel parçası olup, elde edilen sonuçlara göre bakteri türlerinin dendrogram şemaları ve filogenetik ilişkileri ortaya konabilmektedir. Diğer gen bölgelerine ait farklı metotlarla sekans analizi yapılmasına rağmen en sık kullanılan yöntem, “Sanger” metodudur [96, 97].

Sekans analizi yöntemi ile bakterilerin tanımlanmasında karşılaşılan en büyük sıkıntı, 16S rRNA bölgesinin fonksiyonel olarak korunmalı olmasından dolayı, birbirine yakın alttürlerin ayırımında bazen yetersiz kalabilmektedir. Bu konuya örnek olarak, Çin’in Mongolya bölgesinde, kendine has özelliklere sahip, geleneksel fermente süt ürünü olan tarag’ın mikroflorasında bulunan LAB’lerinin izolasyonu ve tanımlanması çalışmasını verebiliriz. 198 tarag örneğinden, 790 izolat elde edilmiş, izolatların tanımlanması, 16S rRNA sekans analizi ve DGGE ile yapılmıştır. Sekans analizinde 27f ve 1495 R primerleri kullanılırken, DGGE analizinde, DNA belirteci (ladder marker), referans suşlardan ekstrakte edilen DNA’lar kullanılarak hazırlanmış, R518 ve F357-GC primerleri kullanılmıştır. Sekans analizi ile izolatların filogenetik şeması çıkartılmış, ancak birbirine yakın olan izolatların ayırımı ancak DGGE ile gerçekleştirilmiştir [98].

Bir başka çalışmada, çiğ süt ve peynirlerden izole edilerek oluşturulan LAB kültür koleksiyonundan rastgele seçilen 29 izolatın, cins ve tür düzeyinde tanımlanmak üzere fenotipik ve moleküler analizi yapılmıştır. 16S rDNA sekans analizi, türe-özü PZR, API 50 CH ve BioLog yöntemlerinin karşılaştırıldığı çalışmada, türe-özü PZR’nin güvenilirliği % 100 olduğu göz önünde tutularak, BioLog sonuçlarının % 74-99.9, API 50 CH sonuçlarının % 78.2-99.9 arasında güvenilir olduğu belirtilmiştir. 16S rDNA sekans analizi ile en az cins düzeyinde tanımlama yapılabilsede, 16S rDNA bölgesinin çok korunumlu olmasından dolayı, LAB ile *Enterococcus* spp. ayırımının net ortaya konamadığı belirtilmiştir [99].

Ancak yapılan pek çok çalışmada da sekans analizi yöntemi başarıyla sonuç vermiştir. Bu çalışmalardan bazılarına örnek verecek olursak, 50 Mengen peyniri örneğinin kullanıldığı bir araştırmada, 117 LAB izole edilmiş, sonrasında elde edilen izolatların morfolojik, fenotipik ve biyokimyasal yöntemlerle ön tanımlanması yapılmıştır. İzolatların cins bazında sınıflandırılması, gram reaksiyonu, katalaz reaksiyonu, glikozdan gaz oluşturma, farklı tuz konsantrasyonlarında (% 2, % 4 ve % 6) ve farklı sıcaklıklarda (10 °C, 15 °C ve 45 °C) gelişimi testleri ile belirlenmiştir.

16S rDNA dizi analizi ile moleküler olarak tanımlanması işleminde 1492R ve 27F genel primerleri kullanılarak önce PZR işlemi gerçekleştirilmiş ve son olarak 16S rRNA gen bölgesinin baz dizisini belirlenmesi başarıyla DNA dizi analizi ile yapılmıştır [100].

Hindistan'ın Mumbai şehrinin süt ürünleri pazarından temin edilen süt pıhtısı ve çiğ süt örneklerinden, MRS agar besiyeri kullanılarak izole edilen LAB'nin ön tanımlaması, katalaz, hareketlilik ve jelatin hidrolizasyon testi ile yapılmıştır. DNA sekansında, 519F primeri kullanılarak, süt pıhtısı ve çiğ süttten izole edilen suşların filogenetik yapısı belirlenmiştir. Çalışmada, yöreye özgü süt ürünlerinin endemik probiyotik organizmaların kaynağı olabileceği, laktobasillerin süt pıhtısından, çiğ süte göre daha fazla izole edilebileceği vurgulanmıştır [101].

Antibiyotik direnci, bir bakterinin antibiyotiklere karşı hayatta kalabilme yeteneğidir. Antibiyotik direnci, doğal, mutasyonlarla ve gen transferleriyle kazanılan olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Doğal veya mutasyonlar sonucu oluşan direnç bakterinin doğal yapısında bulunan, ancak sonradan kazanılan direnç, bakterileri cinsleri arasında plazmidler, transpozonlar ve integronlar gibi hareketli genetik elemanlarının yayılması ile oluşmaktadır.

Bakterilerde antibiyotik direnci gelişimi kavramı, 1945 yılında penisilinin keşfi ile Nobel ödülü alan Alexander Fleming'in, mikroorganizmaların öldürmeyen dozlarda laboratuvar ortamında, penisiline belirli bir zaman maruz kalması halinde, penisilin direnci kazanacaklarını, aynı durumun vücudumuz içinde geçerli olduğunu belirtmesiyle ortaya konmuştur [102].

LAB ile ilgili en önemli problem, antibiyotik direnç genlerinin başta patojenler olmak üzere diğer türlere aktarımıdır. Günümüzün ve geleceğin, önemli sağlık problemlerinden biri olan bakterilerin antibiyotik direnci, teknolojik ve ekonomik koşullarında yardımıyla, çok kısa sürede tüm dünyayı kapsayan boyuta ulaşmakta, patojenlerin direnç kazanmasıyla, hastalık oranında artış, hastalık sürelerinde uzama, tedavi maliyetlerinin ve ölüm oranlarının artması gibi sonuçlara yol açmaktadır [102, 103, 104].

Ammor et al. [103] tarafından yapılan bir çalışmada, süt ve bağırsak kaynaklı 143 LAB ve Bifidobakterinin 6 farklı antibiyotiğe (kloramfekol, klindamisin, eritromisin, streptomisin, tetrasiklin, vankomisin) duyarlılığı, E-test yöntemiyle tespit edilmiştir.

Tüm suşların, kloramfenikole duyarlı, suşların çoğunun eritromisin ve klindomisinde orta düzeyde duyarlı olduğu tespit edilirken, streptomisine duyarlı oldukları ifade edilmiştir. Heterofermentatif laktobasiller vankomisine güçlü şekilde dirençli iken, zorunlu homofermentatif LAB ve Bifidobakterilerin duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Danimarka'da, *Lactobacillus* türü için bazı antibiyotiklere karşı MİK değerlerinin oluşturulmasının amaçlandığı bir çalışmada, Chr. Hansen kültür koleksiyonundan alınan 62 *Lactobacillus* suşunun, 25 antibiyotiğe karşı duyarlılığının tespiti yapılmıştır. Hücre duvarındaki β -laktamları etkileyenler (amoksisilin, ampisilin, benzilpenisilin, oksasilin, sefalotin, sefoksitin, imipenem), hücre duvarının yapısını etkileyenler (basitrasin, vankomisin ve teikoplanin), protein veya mRNA sentezini etkileyenler (kloramfenikol, klindamisin, eritromisin, rifampisin, tetrasiklin, gentamisin, kanamisin ve streptomisin) ve diğer antibiyotikler (sülfadiazin, trimetoprim-sülfametoksazol, siprofloksasin, norfloksasin, nitrofurantoin ve metronidazol) olarak dört grupta değerlendirilmiştir. Çalışmada, MİK değeri ($\mu\text{g/mL}$) E-test (ABBIodisk) ile tespit edilmiştir. Laktobasili'lerin birinci gruptaki, penisiline duyarlı olduğu, oksasilin, sefoksitin, sefalotin ve imipenem'e dirençli olduğu tespit edilmiştir. İkinci grupta olan glikopeptid (vankomisin ve teikoplanin) antibiyotiklerine önceki yapılan çalışmalarla uyumlu olarak dirençli olduğu belirlenmiştir. Üçüncü grup içerisindeki antibiyotiklerin test edilen mikroorganizmaların protein sentezini inhibe ettiği, çok azının sınır MİK değerinin üzerinde kaldığı, dördüncü gruptaki antibiyotiklerin test sonuçlarının daha önce yapılan çalışmalarla benzer sonuçlar elde edildiği ifade edilmiştir [105].

Hollanda, İngiltere, Belçika, İspanya, İsveç, Fransa, Almanya ve Finlandiya'da satışa sunulan 55 probiyotik üründen suşlar izole edilerek etiket bilgilerinin kontrol edildiği ve izolatların disk difüzyon yöntemiyle bazı antibiyotiklere karşı duyarlılığının belirlendiği bir çalışma yapılmıştır. Çalışma sonucunda; ürünlerin içerisinde olduğu belirtilen bazı bakterileri içermediği, izole edilen 187 suşun antibiyotiklerden kanamisine %79'unun, vankomisine %65'inin, tetrasikline %26'sının, penisilin G'ye %23'ünün, eritromisine %16'sının ve kloramfenikole % 11'inin dirençli olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, tüp dilüsyon ve PZR ile vanA ve vanB genlerinin belirlenmesi yöntemleriyle, Enterokok'ların vankomisine duyarlılığı test edilmiş, disk difüzyon yöntemiyle elde edilen sonuçlardan farklı olarak dirençli olmadığı belirlenerek, disk difüzyon yönteminin sınırlı düzeyde güvenilirliği ortaya konmuştur [106].

Çin’de üretilen yoğurtlardan izole edilen 43 LAB’nin (25 *S. thermophilus* ve 18 *Lb. bulgaricus*), 11 antibiyotiğe (ampisilin, penisilin G, roksitrimosin, kloramfenikol, tetrasiklin, klortetrasiklin, linkomisin, kanamisin, streptomisin, neomisin ve gentamisin) dirençliliği test edilmiştir. *S. thermophilus* suşlarının penisilin G ve roksitrimosine duyarlı, *Lb. bulgaricus*’un %23.5’i penisilin G’ye, %64.7’si roksitrimosine dirençli olduğu belirlenmiştir. *Lb. bulgaricus*’un %29.4’ü, *S. thermophilus*’un %44.4’ü ampisiline, sırasıyla %47.1 ve %27.8’i klortetrasikline orta düzeyde dirençli olduğu tespit edilmiştir. Tetrasikline dirençlilik, %88.2 *Lb. bulgaricus*, %44.4 *S. thermophilus*’ta bulunmuştur. Kloramfenikole ve linkomisine sırasıyla *Lb. bulgaricus* suşlarının, %88.2 ve %94.1’inin dirençli olduğu, *S. thermophilus* suşlarının %88.9 güçlü şekilde dirençli olduğu belirlenmiştir. *Lb. bulgaricus*’un % 5.9’u streptomisin, neomisin ve gentamisine duyarlı iken, *S. thermophilus* suşlarının %33.3’ü streptomisine, %11.1’i gentamisine duyarlı olduğu tespit edildiği bildirilmiştir [107].

İtalya’da probiyotik bakterilerin antibiyotik direncinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, 21 yoğurt ve yoğurt tipi fermente süt ürününden, 11 *Lb. bulgaricus*, 22 *Bifidobacterium* spp., 10 *S. thermophilus*, 6 *Lb. acidophilus* ve *Lb. casei* olmak üzere 55 suş izole edilmiştir. İzole edilen suşların 24 antibiyotiğe direncinin tespitinin amaçlandığı çalışmada, MİK değeri, sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle saptanmıştır. Laktobasiller, nalidiksik asit, aztreonam, sisloserin, kanamisin, metronidazol, polimiksin B, spektinomisine dirençli, rifampisin, basitrasin, klindomisin, eritromisin, novobiosin ve penisiline duyarlı olduğu belirlenmiştir. Bifidobakteriler, kanamisin, gentamisin, streptomisin, polimiksin B, nalidiksik asit, paromomisin, neomisine güçlü şekilde dirençli, penisilin G, baitrain, kloramfenikol, eritromisin, linkomisin ve vankomisine duyarlı olduğu tespit edilmiş ve önceki çalışmalarda elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu bildirilmiştir [108].

Konya bölgesinde yapılan bir çalışmada, 17 ticari, 2 ev yoğurdu olmak üzere 19 örnekten, 19’ar *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* suşu izole edilmiştir. Antibiyotik dirençliliği tespiti disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır. Kloramfenikol, vankomisin, gentamisin, rifampin, trimetoprin-sülfametoksazol, sefotaksim, ampisilin, oflaksın, tetrasiklin, eritromisin antibiyotikleri kullanılmıştır. Streptokokların %84.21’i trimetoprin-sülfametoksazole, %31.57’si sefotaksime ve %26.35’i gentamisine karşı dirençli iken, Laktobasillerin trimetoprin-sülfametoksazol ve oflatoksine %100’ü,

%52.6'sı gentamisine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Kloramfenikol, vankomisin, ampicilin ve eritromisine her iki bakterinin de duyarlı olduğu tespit edilmiştir [109].

Daha önce tanımlaması yapılmış, kaşar ve beyaz peynirlerden izole edilen 123 LAB'nin, Isparta ve bölgesinde sıklıkla kullanılan eritromisin, tetrasiklin, vankomisin, siprokloksasin, kloramfenikol, gentamisin, nitrofurantoin, rifampisin, ampicilin, oleandomisin, novobiosin, oksitetrasiklin ve penisilin antibiyotiklerine karşı dirençlikleri, disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışma sonucunda LAB, kloramfenikol ve ampisiline duyarlı, tetrasiklin, vankomisin, siprofloksasin, novobiosin ve penisiline karşı daha dirençli oldukları belirlenmiştir [110].

Klasik yöntemler ve biyokimyasal testlerle, karışık kültürlerde farklılıkların ortaya konması zor olmakla birlikte, tanımlama genellikle tür düzeyinde olmaktadır. Bakterilerin suş düzeyinde ayırımını gösteren bilgiler oldukça azdır [111].

Süt endüstrisinin büyük bir endüstri ve ekonomik faaliyet alanının olduğu düşünüldüğünde, üretimde LAB'ne ait hangi suşun kullanılacağına doğru ve hızlı bir şekilde belirlenmesi önem teşkil etmektedir. Bu sebeple, kullanılacak suşun belirgin ve spesifik özelliklerine ait farklılıklarını ortaya koyan metotların uygulanması gerekmektedir. Teknolojik gelişmelere bu doğrultuda yön verilmekte, özellikle DNA ve protein yapısına dayalı yöntemler, klasik ve biyokimyasal uygulamaların doğrulayıcısı ve tamamlayıcısı olmaktadır.

İmmün sistemin yapısı, organizmaya ait olmayanı belirleyerek savunma mekanizması ile yıkıma uğratmak üzerine kurulmuştur. NK hücreler ve makrofajlar, doğuştan var olan doğal direncin elemanlarındanır.

Mononükleer-fagosit sistemi, doku makrofajları ve bunların öncü hücreleri olan monositlerden oluşmaktadır. Bu hücreler, ortak kökenleri, benzer morfolojileri ve hızlı fagositoz da dahil olmak üzere ortak işlevleri nedeniyle bir "sistem" olarak düşünülür. Bu sistem, dinamiktir ve doku homeostasisinde, immünolojik ve inflamatuvar yanıtlarda modülasyon rolü üstlenme potansiyeline sahiptir ve tüm dokularda bulunmaktadır [112].

İmmün cevapta monositer ve makrofaj hücre dizilerinin cevapları farklı yöntemlerle değerlendirilir. Bu çalışmalarda gönüllü insan dönerlerinden elde edilen lökositlerin alt gruplarından olan monosit hücreleri izole edilerek kullanılmaktadır. İnsan

dönor bulumundaki ve dönörleri optimizasyonundaki zorluklar, kan örneklerinin hızla alınması, deney ortamına nakli, izolasyonunun doğru yapılabilmesi için gerekli ortam koşullarının yaratabileceği zorluklar ve insan çalışmasının bir gereği olan etik kurul için süreci gibi pek çok faktör nedeniyle monosit/makrofaj fonksiyonlarının değerlendirilebilmesi için gene insan kökenli hücre hatları kullanılmaya başlanmıştır. İnsan lösemik monositer hücre dizisi THP-1 en sık kullanılan ve uluslararası alanda en çok kabul gören hücre hatlarından biridir. Bunun yanı sıra U-937 ve HL-60 da bu amaçla kullanılabilen monositer hücre hatlarıdır. Bu hücre hatlarının sitokin sekresyon cevapları ve reseptörleri farklılık gösterir. THP-1 hücre dizileri, monosit yapısının ve fonksiyonun araştırılmasında, olgunlaşma ve farklılaşmanın değişik aşamalarında kısmen homojen hücre gruplarının incelenmesine olanak tanımaktadır [112, 113].

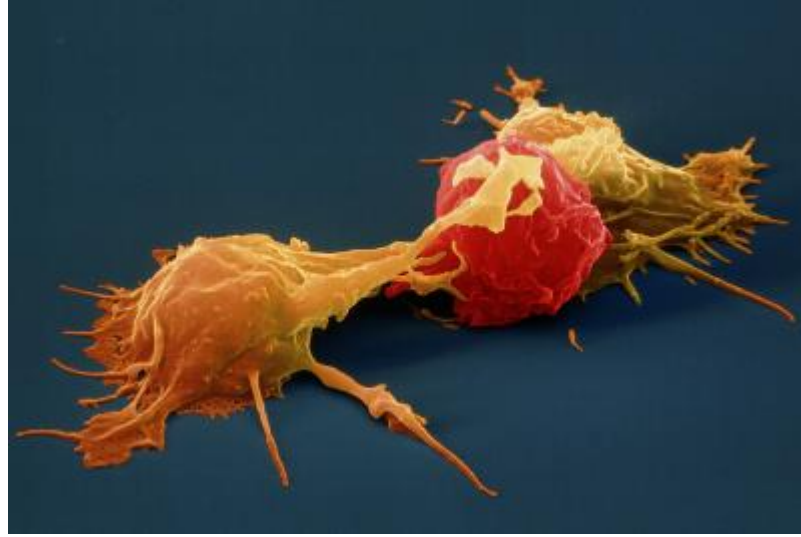
Morfoloji, sekretuvar ürünler, onkogen tanımlanması, zar antijenlerinin ve lipit metabolizmasına katılan genlerin ekspresyonu gibi sayısız kritere göre insan monositini andıran THP-1 hücre dizini, ilk defa Tsuchiya ve çalışma arkadaşları tarafından akut monositik lösemili bir hastadan izole edilmiştir. Doğal insan monositlerinin aksine, THP-1 hücre dizisi daha ileri biyokimyasal çalışmalara imkan sağlamaktadır. Monositer hücreler farklı uyaranlarla makrofaja farklılaştırılarak fenotipik/morfolojik yapı değerlendirilmesi yapılır. Monositer-makrofaj farklılaşmasının CD14 ekspresyon artışı ile de gösterilmesi gerekir. Forbol esterinin (PMA) etkisi altında, THP-1 hücreleri çoğalmayı durdurur ve makrofaj benzeri hücrelere değişime uğrar. Bu değişim sürecinin başlamasından sonra, hücreler çeşitli şekiller kazanır, çekirdeği düzensizleşir ve sitoplazmalarında birçok fagositik vakuol belirlenebilir [112].



Şekil 2.6. Bir *Leishmania promastigote*'u saran bir makrofaj beyaz kan hücresinin renkli taramalı elektron mikrofrafisi [114].

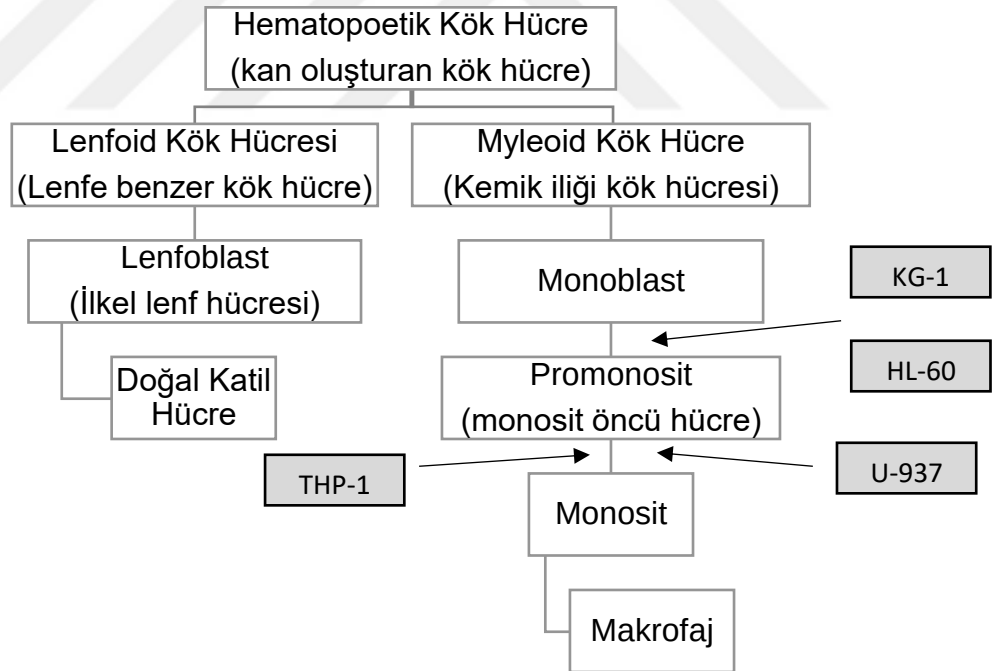
Doğal immunitenin diğer önemli bir üyesi de doğal katil (NK) hücreleridir. Periferel monositer serinin yaklaşık % 10-15 ini oluştururlar. Genellikle NK hücrelerinin, B hücrelerine ve miyeloid kaynaklı hücrelere benzer şekilde öncelikle kemik iliğinde geliştiği kabul edilmesine rağmen son çalışmalar NK hücrelerinin aynı zamanda lenf nodlarında ve karaciğerde gelişebileceğini göstermektedir. Hematopoietik kök hücrelerden, NK hücrelerinin üretilmesi sürekli bir süreçtir. NK hücrelerine farklılaşacak, NK hücrelerinin öncülleri hematopoietik popülasyonda tanımlanır. Bu işlemi fenotipik ve fonksiyonel NK hücresi olgunlaşması izler. Nihai adımda NK hücreleri homeostazise girer. NK hücresi gelişimini ve olgunlaşmasını düzenleyen birçok transkripsiyon faktörü yanı sıra çözünür ve membran faktörleri tanımlanmıştır.

NK hücreler, viral olarak enfekte olmuş ve neoplastik hücreleri tanıma ve öldürme gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahiptir. Hedef hücrelerin öldürülmesinde, antikor ve antijenik stimülasyona ihtiyaç duymazlar. Dolaşımdaki NK hücreleri çoğunlukla dinlenme fazındadır ancak IFN- γ , IL-18, IL-12, IL-1, IL-15 gibi sitokinler ve spesifik olmayan mitojenler ile aktive olurlar. NK hücreleri ayrıca, hücre yüzeyi reseptörleri ile ligand etkileşimini takiben, interferon (IFN)- γ gibi birkaç sitokin salgılayarak, bir bağışıklık düzenleyici role sahiptirler [115, 116].



Şekil 2.7. Bir kanser hücreğine (kırmızı) saldıran iki doğal öldürücü hücrenin (sarı) taramalı elektron mikroskobu görüntüsü [117].

Monositler, makrofajlar ve NK hücrelerinin hepsi hematopoetik kök hücrelerden üretilir.



Şekil 2.8. Kemik iliğinin hematopoietik sistemi [112].

Sitokinler, kendilerini salgılayan hücrelerin mikro ortamında en güçlü aktiviteye sahip hormona benzer, hücreler arası habercidir. Çoğunun bağışıklığı düzenleyici

bir etkisi vardır. Sitokin adı, hücresel akışta rolünü ima eden (örneğin, enfeksiyon bölgesine doğru), Yunanca cyto (hücre) ve kinos (hareket) kelimelerinden türetilmiştir. Yapısal ve genetik olarak, mikro ortamdaki diğer bazı habercilerden, prostaglandinler gibi farklı yapıya sahiptir ve polipeptitler, proteinler ve glikoproteinler olarak tanımlanırlar. Fizyolojik rolü genel olarak doku homeostazı, hücresel aktifleştirme, rölakasyon ve farklılaşmadır. Travmaya, inflamasyona ve enfeksiyona karşı bağışıklık sisteminin tepkisini düzenlemekte işlevleri arasındadır [118].

Tümör nekroz faktörü (TNF- α) insan vücudunda makrofaj olarak bilinen fagositik hücreler tarafından üretilen ve kaşektin olarak bilinen bir proteindir. İlk kez 1968 yılında Kaliforniya Üniversitesi'nden Dr. Gale A. Granger tarafından sitokin ailesinin bir üyesi olduğu keşfedilmiş ve lenfotoksin olarak adlandırılmıştır. Bakterilerde endotoksin olarak bilinen zehirli maddeyle karşılaştıklarında makrofajlar tarafından üretilirler. Hipotalamusu etkileyerek ateş oluşumunu sağlarlar ve akut faz proteinlerinin üretimini rahatlatırlar. İnsanlardaki septik şok belirtilerinin pek çoğunda negatif fizyolojik etkilerine rağmen TNF- α vücudun her yerinde proinflamatuvar ve bağışıklık tepkilerinin düzenlenmesinde olumlu görev almaktadır [118,119].

Hücre yüzey reseptörlerine bağlanan ve lökositler arasındaki iletişimde rol oynayan gizli proteinlere "İnterlökin (IL)" adı verilir. Hücrelerin farklılaşmasını, hareketliliğini ve çoğalmasını interlökinler düzenler. İnflamasyon gibi immün tepkilerin indüklenmesinde özellikle önem taşırlar. Sitokinlerin bir alt grubu olan interlökinler hücresel davranış modülatörüdürler. İnterlökinler diğer sitokinler gibi depolanmazlar ancak enfeksiyöz etkene karşı uyarıya tepki olarak hızlı bir şekilde ve kısa sürede salgılanırlar. İnterlökin üretildikten sonra hücre yüzeyindeki alıcı molekül aracılığıyla bağlanmak üzere hedef hücreye doğru gider. Bağlanma sonrası meydana gelen iletişim ile hedef hücrede bir dizi sinyal başlatarak hücrenin davranışını etkiler. İmmün sistem içerisinde olmayan diğer hücreler tarafından da üretildiği birçok fizyolojik fonksiyonda rol alarak bu hücreler ile etkileşim içerisinde olduğu da bilinmektedir [120,121].

IL-8, ilk olarak nötrofillere özgü kemotaktik bir faktör olarak ifade edilmiş, daha sonra CXC kemokin ailesinin bir üyesi olarak sınıflandırılmıştır. IL-8; TNF- α , IL-1, IL-17 veya toll benzeri reseptörler ile uyarıldıktan sonra monositler ve makrofajlar, nötrofiller, lenfositler ve endotel ve epitel hücreleri gibi çeşitli hücreler tarafından

üretir. IL-8'in başlıca etkileyici fonksiyonları, nötrofillerin enfeksiyon veya yaralanma bölgesine aktifleştirilmesi ve alınmasıdır. Nötrofillerle birlikte IL-8 ayrıca NK hücreleri, T hücreleri, bazofiller ve eozinofilleri de çeker. Proinflamatuvar bir sitokindir [121].

IL-10, bağışıklık tepkilerinin farklı yönlerinin önemli bir düzenleyicisi olan anti-inflamatuvar bir sitokindir. İkili işlevsel olarak hem immünosüpresif (bağışıklık baskılayıcı) hem de immünostimülatör (bağışıklık uyarıcı) sitokin olma özelliğine sahiptir. IL-10, çeşitli immün hücre alt gruplarının işlevini değişik şekillerde etkileyerek, bağışıklık tepkileri üzerinde derin tesir yaratır. Bu nedenle, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi ve konakçı savunmasında görevli efektör moleküldür. Ana biyolojik fonksiyonun inflamatuvar tepkisinin sınırlandırılması ve sona erdirilmesi, T hücreleri, B hücreleri, NK hücreleri ve bağırsak hücreleri gibi çeşitli immün sistemi hücrelerinin farklılaşması ve çoğalmasını düzenlemesiyle immünosüpresif bir molekül olarak değerlendirilir.

IL-10, inflamatuvar veya spesifik hücrel bağışıklık tepkisini (Th1, makrofajlar tarafından sitokin proinflamatuvar sekresyonu ve Th2 modülasyonu) etkiler ve doğuştan gelen bağışıklığın (NK hücresi aktivitesi, fagositozu uyarak partiküllerin, hücrelerin ve mikroorganizmaların uzaklaştırılması sürecinde inflamatuvar cevabın düzenlenmesi) ve Th2 ile ilgili bağışıklık fonksiyonlarını dengeleyerek immünmodulatuvar olarak düşünülür [122,123].

Gelen etkiler üzerine çeşitli hücre kültürlerinin kullanıldığı incelemeler ve üretilen sitokinlerin araştırıldığı, bakterilerin probiyotik özelliklerinin belirlendiği çalışmalar yapılmıştır.

Canlı üç *Lactobacillus* suşu (*Lb. rhamnosus* (E509 ve E522) ve *Lb. bulgaricus* (E585)) ile bir patojenik *S. pyogenes* suşunun, insan periferik kan mononükleer hücrelerinde (PKMH), Th1 tipi sitokinlerle ilişkili olarak, sitokin üretimini indükleme kabiliyeti analiz edildiği bir çalışmada, PKMH izole edilerek laboratuvar ortamında oluşturulmuş, bireyler arası farklılıkları en aza indirmek amacıyla, 4 ila 10 kan veren kişiden elde edilen hücreler kullanılmıştır. Analiz sonucunda, tüm bakterilerin IL-1 β , IL-6 ve TNF- α ekspresyonunu kuvvetli şekilde indüklediği, *S. pyogenes*'in IL-12 ve IFN- γ sekresyonunun en etkili uyarıcısıyken üç laktobasil suşunun sadece ikisinin (E509 ve E522) indükleyebildiği tespit edilmiştir. Ayrıca, IL-18 protein üretimi tüm

suşlar tarafından gerçekleştirilirken, IL-10'nun zayıf şekilde ve IL-4 üretiminin hiç olmadığı belirlenmiştir [124].

Yapılan bir diğer çalışmada, *L. acidophilus*, *L. casei*, *Lb. bulgaricus* ve *S. thermophilus* laktik asit bakterilerinin (LAB), farelerin bağırsak immün sistemi üzerine antijenik etkisi araştırılmıştır. Bağırsak bağ dokusunda sitokin üreten hücrelerin analizinde, TNF- α ve INF- γ değerlerinin tüm LAB için yükseldiği gözlemlenmiştir. *Lb. bulgaricus* ve *L. casei* suşları IL-10 ve IL-4 interlökinlerde önemli artış sağlarken, sadece *L. acidophilus* ile IL-12 ve IL-2 indüksiyonu tespit edilmiştir. Ayrıca LAB'lerinin yüzey özelliklerinin bağışıklık cevabının belirlenmesinde önemli olduğu, hücre duvarı yapısının da farklı bağışıklık yanıtlarına neden olduğu ileri sürülmüştür. Oral yolla alınan canlı LAB'nin ortaya çıkan sitokin profillerine göre sistematik bağışıklık tepkisinin modüle edilebildiği ve elde edilen immün yanıtın uygulanan dozla yüksek oranda ilişkili olduğu ortaya konmuştur [125].

İki LAB (*B. breve* ve *S. thermophilus*) tarafından üretilen metabolitlerin anti-inflamatuvar etkisinin belirlenmesi ve insan bağırsak mikroflorasından izole edilen üç Gram-pozitif bakteriyle (*B. bifidum*, *R. gnavus* ve tanımlanmamış *Streptococcus* suşu) elde edilen değerlerin karşılaştırılması yapılmıştır. LAB'leri, LPS ile uyarılmış PKMH'ne eklendiğinde, insan mikroflorasından elde edilen Gram-pozitiflere göre TNF- α sekresyonunda daha çok azalma tespit edilmiş, THP-1 pro-monosit hücrelerle yapılan analizlerde de aynı sonuçlar elde edilmiştir. Probiyotik bakteriler tarafından salınan metabolitlerin geçiş sırasında anti-inflamatuvar etki gösterdiği belirlenmiş, bazal koşullarda bağırsak makro ortamının baskılayıcı şartlarına destek olduğu ve patolojik şartlarda inflamasyonu azalttığı tespit edilmiştir. Bu şekilde, immüno modülasyon bağırsak ile ilişkili; lenfoid doku, sindirim sistemi inflamasyonu tedavisinde adjuvanlar olarak probiyotik bakterilerin yararlı etkisi ortaya konmaya çalışılmıştır [126].

Diyaliz hastalarının anemi tedavisinde kullanılan ve hematopoietik uyarıcı bir protein olan eritropoietik (EPO)'nun monosit/makrofajlar üzerine doğrudan immün modülatör bir etkisi olduğu ileri sürülen bir araştırmada, U-937 insan histiyositik lenfoma hücre dizini kullanılmıştır. LPS ile uyarılan midkine sekresyonu, immüno histokimyasal olarak ölçümü ve TNF- α , IL-6 ve midkine sekresyonunun miktarı ELISA ile belirlenmiştir. Araştırma sonucunda, EPO tedavisinin, LPS'nin

U-937 hücreleri üzerindeki doğrudan toksik etkisini engellediği, tedaviye yanıt olarak U-937 hücrelerinde, TNF- α , IL-6 ve midkine sekresyonunun arttığı tespit edilmiştir [127].



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Yoğurt Örnekleri

Çalışma kapsamında Karaman (Ermenek), Isparta (Merkez), Kayseri (Pınarbaşı), Mersin (Sertavul, Mut), Bolu (Merkez, Yuvaköy, Geçitveren, Dörtdivan, Çömlekçiler, Bulanık köyü, Göynükören, Çepni köyü) ve Amasya (Merzifon) bölgelerinden, geleneksel yollarla üretilen 39 adet yoğurt örneği toplanmıştır. Aseptik koşullarda soğuk zincir bozulmadan hızla mikrobiyolojik analizlerin gerçekleştirileceği Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü mikrobiyoloji laboratuvarına getirilmiştir. Alınan yoğurt örnekleri görsel değerlendirmelerden geçirilmiş ve izolasyon çalışmalarına başlanılmış, yoğurt örnekleri izolasyon işlemi sonlanıncaya kadar 2-4 °C'de buzdolabında bekletilmiştir.

Çizelge 3.1. Alınan yoğurt örneklerinin bölgelere göre dağılımı.

Bölge Adı	Örnek Sayısı
Bolu-Geçitveren	1
Bolu Dörtdivan	1
Bolu-Çömlekçiler	1
Bolu-Bulanık köyü	1
Bolu-Göynükören	1
Bolu-Merkez	1
Bolu-Çepni köyü	1
Bolu-Yuvaköy	5
Karaman-Ermenek	7
Mersin-Sertavul	3
Mersin-Mut	6
Isparta-Merkez	1
Kayseri-Pınarbaşı	1
Amasya-Merzifon	9
Toplam	39

3.1.2. Besiyeri, Kimyasallar ve Antibiyotikler

Yoğurtlardan izole edilen bakterilerin izolasyonu, tanımlanması ve antibakteriyel maddelere dirençliğinin tespitinde kullanılan besiyerleri ve antibiyotikler Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. İzolasyon ve antibiyotik testinde kullanılan besiyerleri.

Besiyeri Adı	Kullanım Amacı
Buffered Peptone Water (BPW, Merck 107728)	Seyreltme çözeltisi
Ringer Çözeltisi (1/4 kuvvetinde, Merck, 115525)	Dilüsyon hazırlanmasında
MRS Agar (De Man Rogosa Sharpe Agar, Merck, 110660)	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> izolasyonu
MRS Broth (Merck, 110661)	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> izolasyonu
M17 Agar (Merck,115108)	<i>Streptococcus thermophilus</i> izolasyonu
M17 Broth (Merck, 115029)	<i>Streptococcus thermophilus</i> izolasyonu
Müller Hinton Broth (Merck, 1.10293)	Kültürlerin Minimal İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) Analizinde
Müller Hinton Agar (Merck, 1.05437)	Kültürlerin Minimal İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) Analizinde

Çizelge 3.3. İmmün sistem testlerinde kullanılan malzemeler.

Kullanılan Besiyeri/Kimyasal/Hücre Kültürü Adı	Kullanım Amacı/Tanımı
RPMI 1640 (roswell park memorial institute) (Sigma-Aldrich)	Hemapoetik sistem hücrelerinin üretilmesinde kullanılır
FBS (fetal bovine serum) (PAA Laboratories Inc.)	Hücre kültür çalışmalarında hücrelerin çoğalması için kullanılan zengin protein çözeltisi
FCS (fetal calf serum) (PAA Laboratories Inc.)	Hücre kültür çalışmalarında hücrelerin çoğalması için kullanılan zengin protein çözeltisi
DMEM (dulbecco's modification of eagles medium) (Sigma-Aldrich)	Memeli hücrelerinin üremesini desteklemek
PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (Sigma-Aldrich)	Hücrelerin farklılaşması için kullanılır
K-562 (ATCC® CCL-243)	Kronik miyeloid lösemisinin blastik kriz evresinden kaynaklı bir miyeloid seri hücre dizisi
THP-1 (ATCC® TIB-202)	Akut monositik lösemiden türetilen bir insan monositik hücre dizisi
Penisilin (Sigma-Aldrich)	İşlemler sırasında herhangi bir mikroskopik kontaminasyonu önlemek
Streptomisin (Sigma-Aldrich)	İşlemler sırasında herhangi bir mikroskopik kontaminasyonu önlemek
L-Glutamin (Sigma-Aldrich)	Amino asit takviyesi olarak hücre kütlelerinin arttırılmasına yardımcı olmak

3.1.3. DNA İzolasyonu

Bakterilerin DNA izolasyonunda ROCHE firmasına ait DNA ekstraksiyon kiti (REF:11 796 828001) kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. DNA izolasyon kitinin içeriği [128].

Malzeme Adı	Açıklama	Depolama Sıcaklığı
Bağlama tamponu (binding buffer)	6 M guanidin-HCl, 10 mM üre, 10 mM Tris-HCl, %20 Triton X-100 (v/v), pH 4.4 (kullanıma hazır)	+ 25 °C
Proteinaz K	Liyofilize, 4.5 mL steril deiyonize su ile karıştırılarak hazırlanır	-18 °C
İnhibitör uzaklaştırma tamponu (inhibitör removal buffer)	5 M guanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6.6 (20 mL saf etanol ilave edilerek hazırlanır)	+25 °C
Yıkama tamponu (washing buffer)	20 mM NaCl, 2 mM Tris HCl, pH 5.5 (80 mL saf etanol ilave edilerek hazırlanır)	+25 °C
Elüsyon (arıtma) tamponu (elution buffer)	10 mM Tris-HCl, pH 8.5 (kullanıma hazır)	+25 °C
Yüksek saflıkta filtre tüpler (high pure filter tubes)		+25 °C
Toplama tüpleri (collection tubes)		+25 °C

Çizelge 3.5. DNA ekstraksiyonunda kullanılan diğer malzemeler.

Malzeme Adı	Kullanım Amacı	Açıklama ve Depolama Sıcaklığı
Lambda tamponu	Ortamin tamponlanması	+4 °C
PBS (fosfat tamponlu tuz) (pH:7.4)	Ortamin tamponlanması	+2 - +25 °C
Lizozim (Roche, 10153516103)	Hücre ve çekirdek duvarlarının parçalanması	Kristal toz, tavuk yumurta beyazından, +2 - +8 °C
İzopropanol (Merck, 109634)	DNA'ların çöktürülmesi amacıyla	+18 - +25 °C

3.1.4. Gerçek-Zamanlı PZR ile Tanımlama



Şekil 3.1. LightCycler® 480 cihazı

Piyasaya çıkan en yeni enstrümanlardan biri olan Roche LightCycler® 480, kuartz tungsten-halojen lambasına kıyasla daha yüksek bir ışık yoğunluğuna sahip olan ve benzer bir spektral aralığı kapsayan bir ksenon lambasına sahiptir. Cihaz, potansiyel olarak tek bir alanda 6 farklı tahlil sağlayarak, 6 emisyon filtresine bağlı 5 uyarma filtresine sahiptir. Herhangi bir cihazın en iyi termal özelliklerine sahip olduğu bildirilen Peltier bazlı bir ısı döngüleyici olarak hem 96 hemde 384 kuyulu levhaları desteklemektedir [129].

Çizelge 3.6. Cihazda kullanılan karışımın içeriği [130, 131].

Reaksiyon Karışımının içeriği	Konsantrasyon	Miktar (µL)	Son Konsantrasyon	Açıklama
H ₂ O, PCR Grade (Nuclease free water) (Roche, 03315932001)	-	3.8	-	
Primer (GOI) forward	20 µM	0.4	400 nM	
Primer (GOI) reverse	20 µM	0.4	400 nM	
UPL probe (GOI) (Roche, 04707494001)	10 µM	0.4	200 nM	
LightCycler® 480 Probes Master (Roche, 04707494001)	2xkonsantrasyon	10.0	1xkonsantrasyon	FastStart Taq DNA polimeraz, reaksiyon tamponu, dNTP karışımı ve 6.4 mM MgCl ₂
Örnek DNA (kalıp DNA)	-	5.0	-	
Toplam	-	20.0	-	

Çizelge 3.7. Çalışmada belirlenen gen bölgesinin özellikleri [87, 88, 91].

Bakteri Adı	Gen Bölgesinin Sembolü	Gen Bölgesinin Adı	Gen Bölgesinin Uzunluğu (baz çifti)
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	add	Adenosine deaminase	1.864.998
<i>Streptococcus thermophilus</i>	lacZ	Beta-galactosidase (Lactase)	1.929.905

Çizelge 3.8. Primerlerin ve taqman probunun özellikleri.

	DNA 5' → 3'	OD	nmol	Uzunluk	Molekül Ağırlığı	Tm (°C)	GC Bileşimi (%)
<i>Streptococcus thermophilus</i>							
Left	taaaccaggcgaagaagca	260	28.5	19	5863.9	54.3	47.4
Right	ttcagaattgaagcctcgac	260	27.4	21	640.2	53.1	42.9
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>							
Left	tctctgacaatcagacgcaag	260	22.1	21	6399.2	54.7	47,6
Right	gttcgactcccctgtcct	260	34.7	20	5985.9	56.8	55

3.1.5. Antibiyotik Dirençlilik Testi

Çizelge 3.9. Analizlerde kullanılan antibiyotikler.

Antibiyotik Adı	Antibiyotiğin Bulunduğu Sınıf	Etki Mekanizması
Klortetrasiklin hidroklorid (5 G) (Sigma, C4881-5G)	Tetrasiklinler	Bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek
Kristalize Streptomisin Sülfat (1 G) (İ.E. Ulagay ilaç San.T.A.Ş., J01GA01)	Aminoglikozidler	Bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek
Penicilin G potasyum (1.000.000 IU) (İ.E. Ulagay ilaç San.T.A.Ş., J01CE01)	Penisilinler (doğal penisilinler)	Bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek ve otolitik enzimlerini aktive ederek
Linkomisin HCl (600 mg) (İ.E. Ulagay ilaç San.T.A.Ş., J01FF01)	Linkozamidler	Bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek
Kloramfenikol (5 mg) (Oxoid, SR0078)	Kloramfenikol	Bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek
Tetrasiklin ≥98,0 % (NT) (25 G) (Sigma-Aldrich, 87128)	Tetrasiklinler	Bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek
Roksitromisin ≥90% (HPLC) (1 G) (Sigma-Aldrich, R4393)	Makrolidler	Bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek
Gentamisin (160 mg) (İ.E. Ulagay ilaç San.T.A.Ş., J01GB01)	Aminoglikozidler	Bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek
Amfisilin sodyum tuzu (Sigma, A0166, toz, bioreagent, hücre kültürleri için uygun)	Penisilinler (amino penisilinler)	Bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek ve otolitik enzimlerini aktive ederek

Çizelge 3.10. Antibiyotiklerin hazırlanmasında kullanılan çözücü ve sulandırıcılar.

Antimikrobiyel Ajan	Çözücü	Sulandırıcı
Klortetrasiklin hidroklorid (5 G)	1 M NaOH	Distile Su
Kristalize Streptomisin Sülfat (1 G)	Distile Su	Distile Su
Penicilin G potasyum (1.000.000 IU)	Distile Su	Distile Su
Linkomisin HCl (600 mg.)	Distile Su	Distile Su
Kloramfenikol (5 mg)	% 95 etil alkol	Distile Su
Tetrasiklin $\geq 98,0$ % (NT) (25 G)	% 95 etil alkol	Distile Su
Roksitromisin $\geq 90\%$ (HPLC) (1 G)	Kloroform	Distile Su
Gentamisin (160 mg)	Distile Su	Distile Su
Amfisilin sodyum tuzu (Sigma, A0166, toz, bioreagent, hücre kültürleri için uygun)	Fosfat tamponu, pH 8.0, 0.1 mol/L	Fosfat tamponu, pH 8.0, 0.1 mol/L

3.2. Metot

3.2.1. Besiyerlerinin Hazırlanması

S. thermophilus ve *Lb. bulgaricus* izolasyonu ve tanımlanması öncesi analizlerde kullanılacak besiyerleri hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan besiyerleri, hazırlanma protokollerinde belirtilen miktarlarda tartılmış, üzerlerine distile su ilave edilerek eritilmiştir. Karışımlar otoklavda 121 °C’de, 15 dakika steril edilmiştir. İçeriğinde agar bulunan besiyerleri, sterilizasyon işlemi sonrası 50 °C’ye soğutulmuş ve 9 cm çapındaki petrilere 15 mL olarak dağıtılmıştır.

3.2.2. *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* Bakterilerinin İzolasyonu ve Stok Kültür Hazırlanması

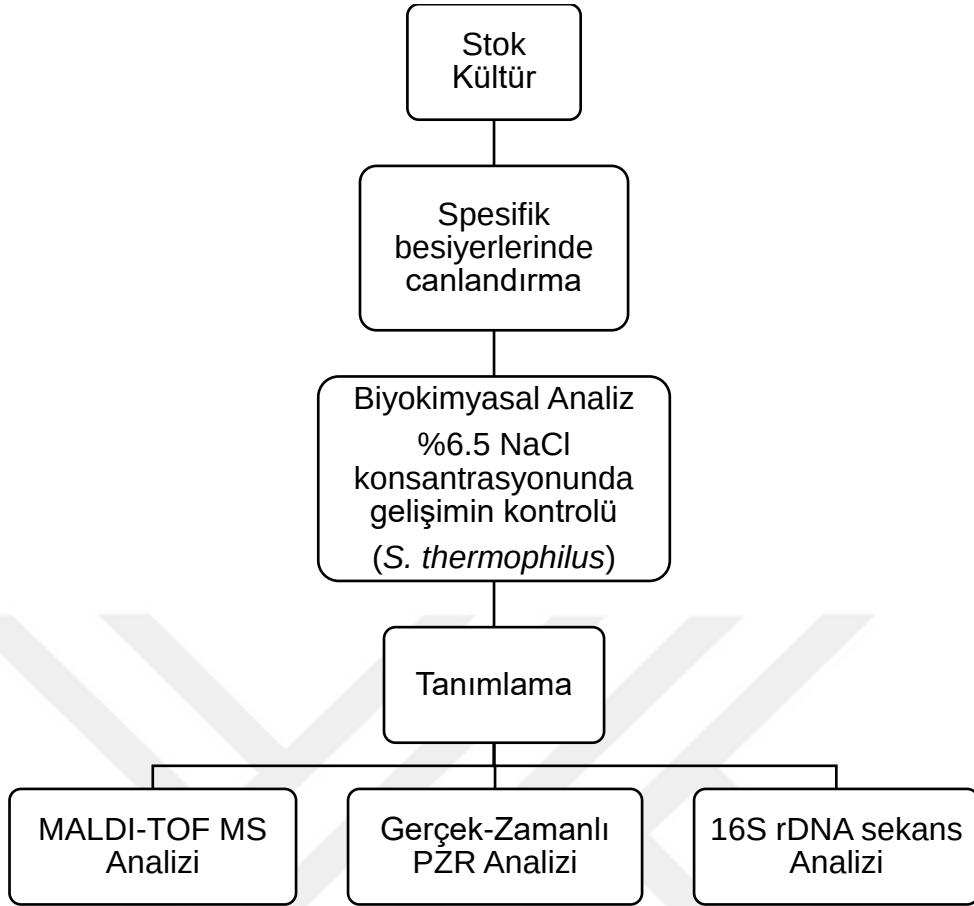
Laboratuvara getirilen yoğurt örneklerinden 25’şer mL steril Stomacher torbalarına aktarılmış ve üzerlerine 225’şer mL tamponlanmış peptonlu su eklenerek Stomacher cihazında homojenize edilmiştir. Daha sonra örneklerden 1’er mL alınarak, 10^{-9} ’a kadar seri ardaşık dilüsyonları hazırlanmıştır.

Bunu takiben her bir dilüsyondan, *Lactobacillus* spp. izolasyonu için MRS agar, *Streptococcus* spp. izolasyonu için M17 agar içeren petri kaplarına yüzeye yayma yöntemi kullanılarak paralel inokülasyonlar gerçekleştirilmiştir. İnokülasyon yapılan

MRS agar içeren petri kutuları 45°C'de 72 saat mikraerofilik koşullarda, M17 agar içeren petri kutuları ise 37°'de 24 saat aerobik koşullarda inkübe edilmişlerdir [109]. İnkübasyonların sonunda her bir örnek için iki besiyerinden de ayrı ayrı tipik koloniler seçilmiş ve bunlar *Lactobacillus* spp. için MRS Broth'a, *Streptococcus* spp. için M17 Broth'a inoküle edilmiş ve yine yukarıda belirtilen koşullarda inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda gelişme gözlenen tüplerden *Streptococcus* spp. için M17 agar, *Lactobacillus* spp. için ise MRS agara tek koloni düşürme yöntemi kullanılarak inokülasyon yapılmış ve aynı koşullarda inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonunda potansiyel *Lactobacillus* spp. izolatları doğrudan seçilirken, potansiyel *Streptococcus* spp. izolatları %6.5 NaCl içeren M17 Broth'a ekilmiş ve gelişim gösteren tüpler elenerek (muhtemel *Enterococcus* spp.) kalan izolatlar, çalışmanın ilerleyen basamaklarında tanımlanmaları yapılmak üzere, MRS Broth-Gliserol (%50-%50)(*Lactobacillus* spp.) ve M17 Broth-Gliserol (%50-%50)(*Streptococcus* spp.) karışımlarda -80 °C'de saklanmıştır. Dondurulmuş bu stoklar çalışmada ileriki aşamalarda herhangi bir kontaminasyon ve aktivite kaybına karşı önlem olarak, 2 kopya halinde hazırlanmış ve yalnızca 1 tanesi tanımlamada kullanılmıştır.

3.2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması

İzole edilerek saflaştırılan LAB kültürlerinin tanımlanması, biyokimyasal, proteomik ve moleküler yöntemler kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 3.2. Laktik asit bakterilerinin tanımlama  eması.

3.2.4. İzolatların MALDI-TOF MS ile Tanımlanması

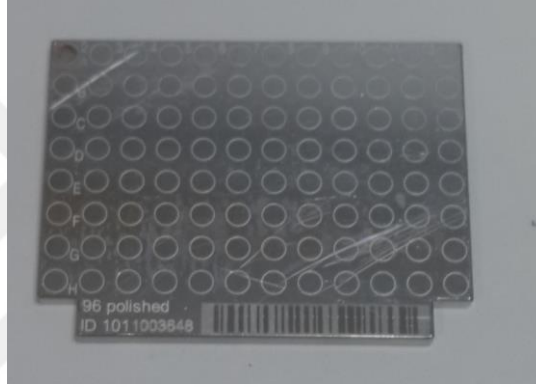
MALDI-TOF MS ile bakterilerin tanımlanmasının basamakları  ekil 3.3'de gösterilmektedir.



Şekil 3.3. MALDI-TOF MS cihazı ile tanımlama işleminin basamakları [132].

İzolatların alttür düzeyinde ön tanımlamalarında MALDI-TOF MS tekniğinden yararlanılmıştır (Brucker marka Microflex MALDI Biotyper, Brucker Daltonik GmbH, Bremen, Almanya). Kısaca; 250 μ L standard solvent çözeltisi (50 μ L acetonitrile+ 47.5 μ L ultra saf su+ 2.5 μ L trifluoroacetic acid) HCCA (α -Cyano-4-hydrocynnamicacid) tüplerine aktarılmış ve vorteks yardımıyla HCCA'nın çözünmesi sağlanmıştır. Bakteri izolatlarının hücre duvarı protein yapısının belirlenmesinde Formik Asit Ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Buna göre; 300 μ L saf su içeren Eppendorf tüplerine 5-10 mg arasında bakteri izolatu ilave edilmiş ve vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Karışımın üzerine 900 μ L etanol (EtOH) ilave edilmiş yeniden karıştırılmıştır. Tüpler daha sonra 10.000 rpm hızda 2 dakika süre

ile santrifüjlenmiş ve pelet elde edilmiştir. EtOH-pelet karışımı 2-3 dakika oda sıcaklığında kurutulmuş ve 80 µL karışıma 1 µL %70'lik formik asit ilave edilerek karıştırılmıştır. 80 µL karışıma 1 µL acetonitrile ilave edilerek tekrar karıştırılmış ve karışım 15.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. 1 µL süpernatant MALDI plakalarına (Şekil 3.2) ilave edilmiş ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra üzerine 1 µL HCCA solüsyonu konulmuş ve oda sıcaklığında 1 saat kurumaya bırakılmıştır. Ardından MALDI plakaları cihaza yerleştirilerek okuma yapılmış ve sonuçlar cihazın kütüphane verileri ile karşılaştırılarak tabloya dökülmüştür.



Şekil 3.4. MALDI plakalarının görünümü

3.2.5. LAB Kültürlerinden DNA İzolasyonu

Çalışmada izole edilen LAB izolatlarına ait DNA molekülü, ROCHE firmasına ait DNA ekstraksiyon kiti (REF:11 796 828001) kullanılarak yapılmıştır.

3.2.5.1. Lizozim (liyofilize formdan) Hazırlanması

1 M Tris-HCl (pH 7.4)'ten öncelikle stok 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) hazırlanır. Daha sonra eppendorf tüpüne 0.01 g. liyofilize lizozim tartılarak üzerine 1 mL 10 mM Tris-HCl eklenerek vortekslenir. Karışım -18 °C'de saklanır.

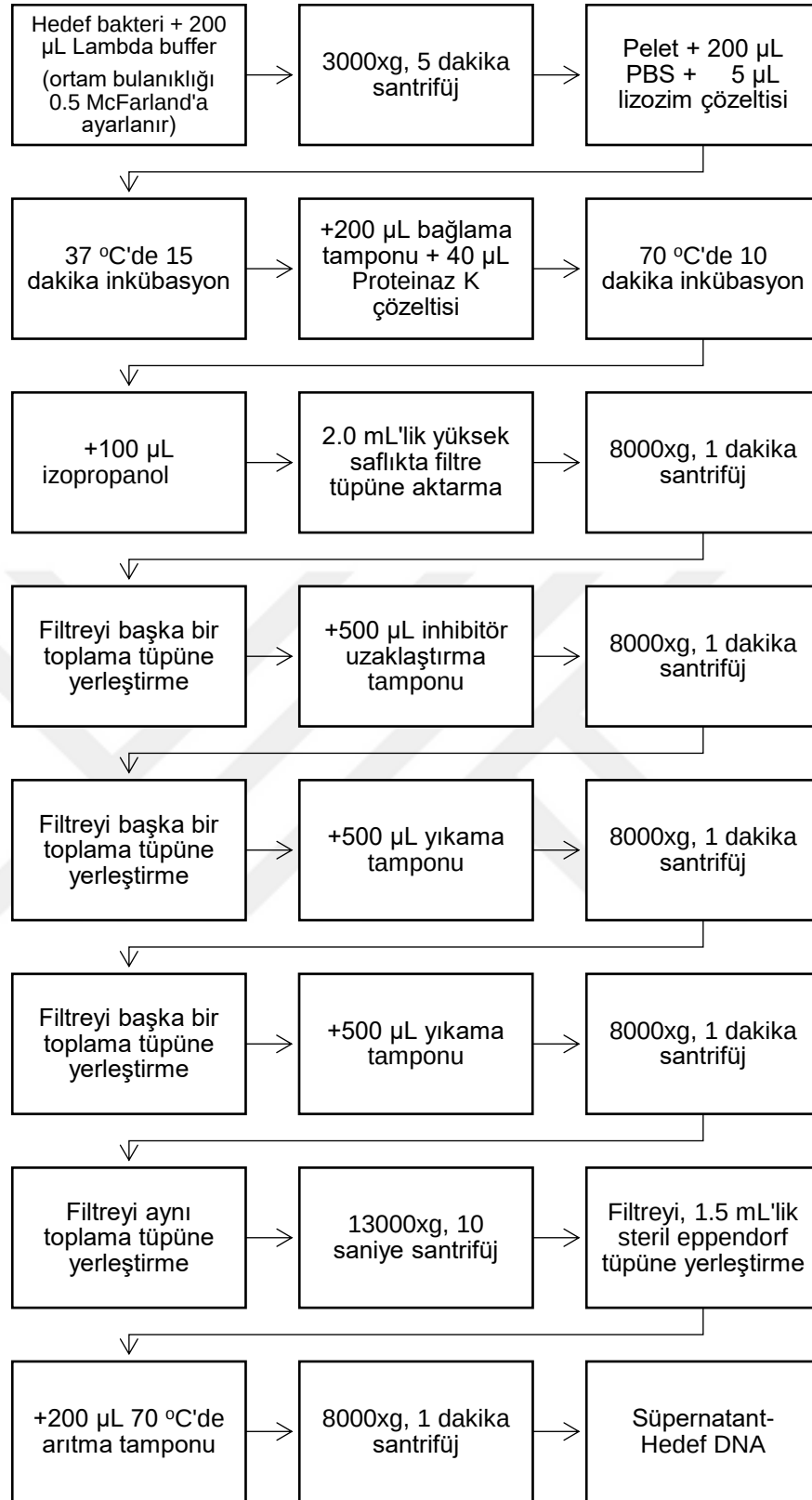
3.2.5.2. Lambda Buffer Hazirlanmasi

1000 mL suya, 5.8 g NaCl, 2 g MgSO₄.7H₂O, 50 mL 1 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 g Jelatin (%0.01) tartilarak çözdürölür. Daha sonra 121 °C'de 15 dk. otoklavlanır. Karışım oda sıcaklığında saklanır [133].

3.2.5.3. PBS (fosfat tamponlu su) Hazirlanmasi

800 mL distile suya, 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g. Na₂HPO₄, 0.124 g KH₂PO₄ eklenerek çözdürölür ve pH'sı 7.4'e ayarlanır. Daha sonra 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak, oda sıcaklığında saklanır [134].



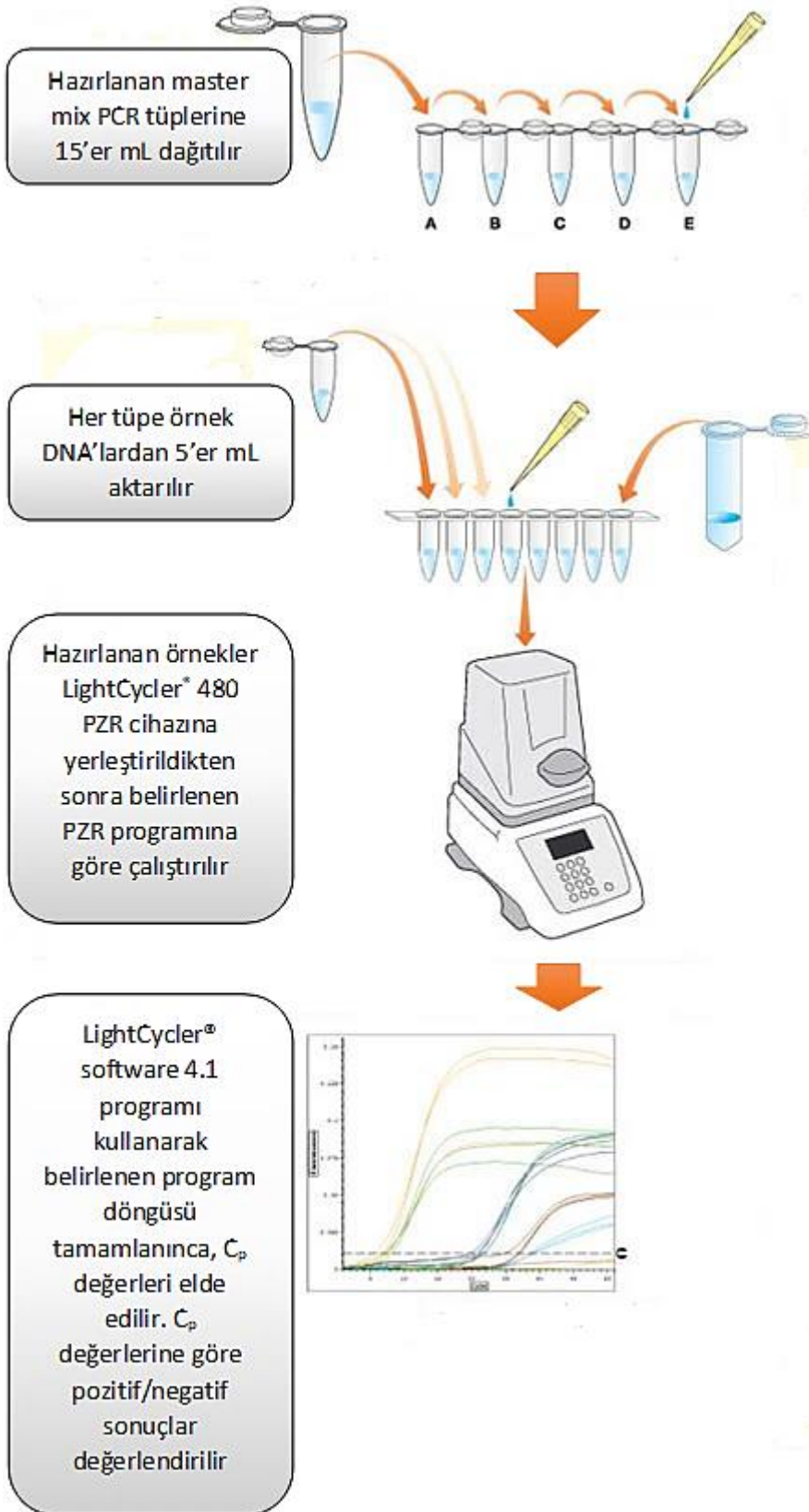


Şekil 3.5. Bakteriden DNA izolasyonu ve saflaştırma işlemi akış şeması [135].

DNA izolasyonuna başlamadan önce işlem için gerekli hacimde elüsyon tamponu alınmış ve son adıma kadar 72 °C'ye ayarlanmış su banyosunda bekletilmiştir. Ekstraksiyonun ilk basamağında 200 µL Lambda buffer içeren Eppendorf tüpüne katı besiyerindeki bakteriden öze ile aktarılır. Ortamın bulanıklığı 0.5 McFarland değerine ayarlanır. Daha sonra 9175 rpm (8000xg)'de 5 dk santrifüjlenir. İşlem sonrası peletin üzerine, 200 µL PBS (fosfat tampon solüsyonu) ve 5 µL lizozim çözeltisi ilave edilerek, 37 °C'de 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası, bağlama tamponundan 200 µL ve proteinaz-K çözeltisinden 40 µL aktararak iyice karıştırılmış, karışım 72°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Inkübasyon tamamlanınca üzerine 100 µL izopropanol eklenerek karışım yüksek saflıkta filtre tüpe aktarılmış ve 9175 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası toplama tüpü atılarak yenisi alınmış ve üstteki yüksek saflıkta filtre tüpün üzerine inhibitör uzaklaştırma tamponundan 500 µL aktararak, tekrar aynı hız ve süre santrifüj edilmiştir. Santrifügasyon sonrası her işlem sonrası yeni toplama tüpü kullanılacak şekilde iki tekrar olarak yıkama tamponundan 500 µL eklenerek, 9175 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. İkinci işlem sonrası sadece toplama tüpü değiştirilerek bu sefer 11696 rpm'de 10 saniye santrifüj edilmiştir. Son basamakta yüksek saflıkta filtre tüp alınarak, bir Eppendorf tüpünün üzerine konmuş ve su banyosunda bekletilen elüsyon tamponunda 200 µL aktararak, 9175 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. İşlem bitince üstteki tüp atılarak, hedef DNA'nın bulunduğu Eppendorf tüpü, gerçek-zamanlı PZR'de tanımlanmak üzere -20 °C'de stoklanmıştır [135].

3.2.6. İzolatların Gerçek-Zamanlı PZR ile Tanımlanması

İzolatların tanımlanması işlemi Roche LightCycler® 480 gerçek-zamanlı PZR cihazı (Roche Molecular Systems, Almanya) ile yapılmış, master mix'in hazırlanmasında LightCycler Taqman Master kiti (Roche Katolog no:04535286001) kullanılmıştır.



Şekil 3.6. Gerçek-zamanlı PZR ile tanımlama işleminin akış şeması [136].

3.2.6.1. Primer Seçimi

Streptococcus thermophilus ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'a ait türe özel gen bölgelerini tanımlayan primerler, Roche Diagnostics A.Ş. tarafından hazırlanmıştır. Seçilen gen bölgeleri ile ilgili bilgiler Çizelge 3.7'de verilmiştir.

3.2.6.2. Gerçek-Zamanlı PZR Master Mix Hazırlanması

Gerçek-zamanlı PZR cihazında gerçekleşecek reaksiyonun olumsuz etkilenmemesi amacıyla, master mix hazırlanırken pipet kayıpları dikkate alınmış, standart kit protokülünde belirtilen miktarların (Çizelge 3.6) %10 oranında fazlası hazırlanmıştır. Daha sonra master mix vortekslenmeden elde iyice karıştırılmış ve 15 µL hacimde LightCycler® kapilerlere dağıtılmıştır [131].

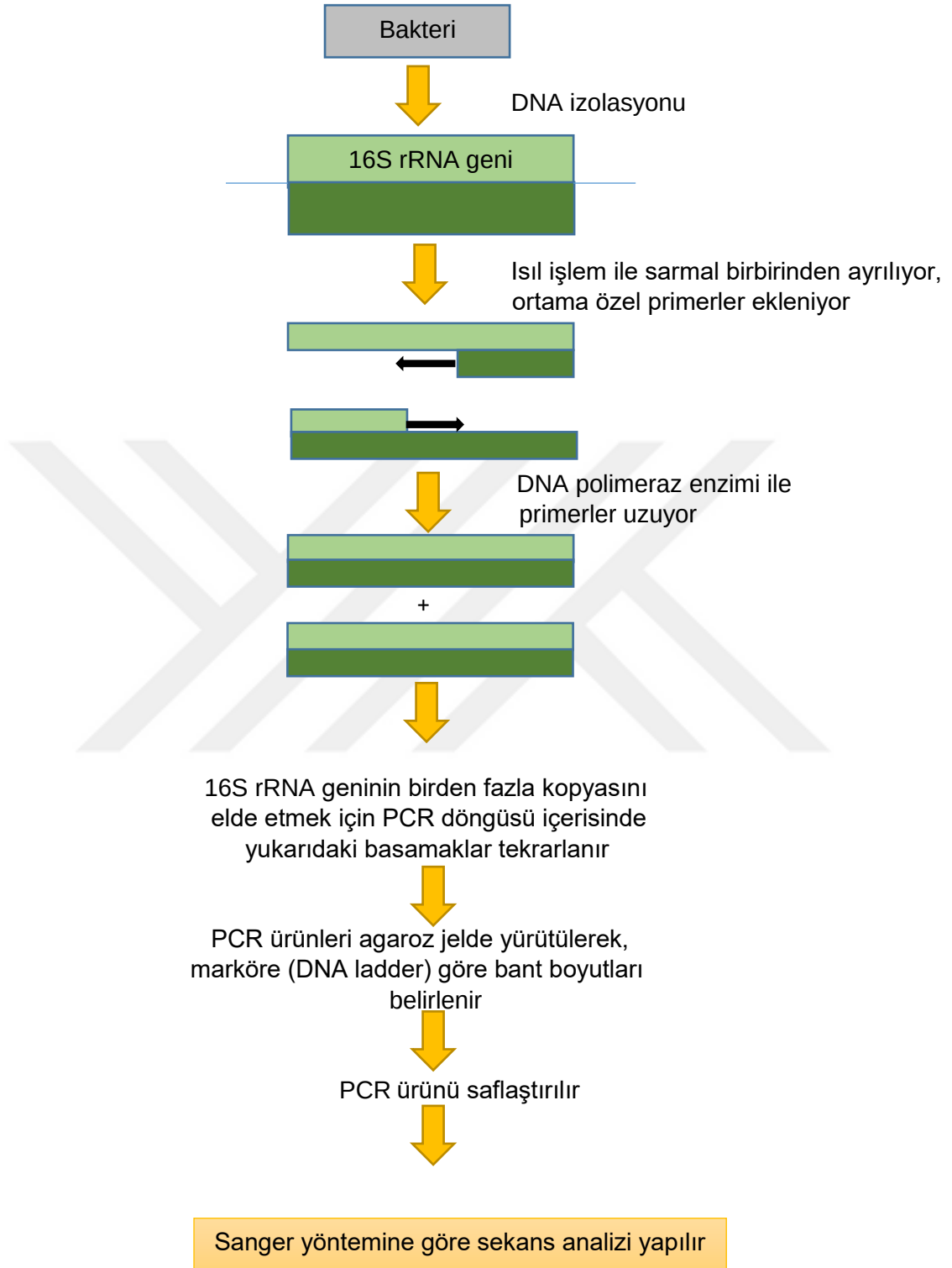
3.2.6.3. Örnek DNA'nın Eklenmesi

Herbir LightCycler® kapilere 5 µL hacimde örnek DNA (cDNA) eklenmiştir. Kapilerler içlerinde oluşabilecek hava kabarcıklarının uzaklaştırılması amacıyla, 3975 rpm'de 2 dakika santrifüj işleminden sonra çok kuyulu plaka diskine aktarılmıştır. LightCycler® 480 PZR cihazına diskin yerleştirilmesinden sonra Çizelge 3.11'de verilen PZR programına göre cihaz çalıştırılmıştır.

Çizelge 3.11. Tanımlamada belirlenen programın basamakları [131].

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön inkübasyon	95	10 dk.	1
Amplifikasyon			45
Denatürasyon	95	10 sn	
Bağlanma	60	30 sn	
Uzama	72	1 sn	
Soğuma	40	30 sn	1

3.2.7. Sekans Analizi



Şekil 3.7. Sekans analizi ile bakterileri tanımlamanın şematik gösterimi [137].

İzolatların tanımlanmasında daha detaylı moleküler tanımlama yapabilmek için hizmet alımı ile DNA sekans analizi yapılmıştır. Sanger metoduyla yapılan sekans analizinde, izole edilen bakteriye ait DNA ilk olarak yüksek sıcaklıklara çıkarılarak sarmal yapısı bozulur ve tekli iplik hedef DNA kalıbı elde edilir. DNA kalıbının bulunduğu örnek dörde ayrılır ve her biri işaretli bir primer, DNA polimeraz, dört tip dNTP ile birlikte her bir reaksiyon karışımında, dört farklı nükleotidin modifiye formu dideoksi dNTP (ddNTP)'lerden biri konularak inkübe edilir. Yeni zincir sentezi primerlerde başlar ve ddNTP gelinceye kadar devam eder, geldiği noktada sentez engellenir. Arada bir rastgele normal nükleotid yerine bir ddNTP takılır. Sonuçta farklı uzunluklarda bir seri işaretli zincir meydana gelir.

Her bir reaksiyon karışımındaki DNA zincirleri, bir nükleotidlik farklılıkları bile ayırabilen jel elektroforez ile ayrılır. Sonra oluşan bantları belirleyebilmek için otoradyografi uygulanır. Yeni sentezlenen zincirin dizisi otoradyograf üzerindeki bantlardan doğrudan okunur ve buradan orijinal kalıp zincirinin dizisi çıkarılır. Elde edilen sonuç veri tabanındaki bilgilerle karşılaştırılarak tanımlama yapılır [97].

3.2.8. %6.5 NaCl Testi

Elde edilen *S. thermophilus* izolatlarının gelişimine, tuz konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacıyla, %6.5 NaCl içeren M17 Broth besiyerlerinde, 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası ortamda gelişimleri incelenmiştir [89].

3.2.9. Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi

İzole edilen LAB izolatlarında antibiyotik direncini gösteren minimum inhibitör konsantrasyonunu (MİK) belirlemek amacıyla, makrodilüsyon tüp yöntemi kullanılmıştır [138]. İzolatların; ampisilin, penisilin G, roksitrimosin, kloramfenikol, klortetrasiklin, tetrasiklin, linkomisin, streptomisin ve gentamisin antibiyotiklerine karşı dirençlikleri analiz edilmiştir.

3.2.9.1. Magnezyum Stok Çözelti Hazırlanması

MgCl₂.6H₂O'den 100 mL distile su içerisine 8.36 g tartılarak çözündürülür ve filtre ile steril edilir. Stok çözelti 2-8 °C'de saklanır [138].

3.2.9.2. Kalsiyum Stok Çözelti Hazırlanması

CaCl₂.2H₂O'den 100 mL distile su içerisine 3.68 g tartılarak çözündürülür ve filtre ile steril edilir. Stok çözelti 2-8 °C'de saklanır [138].

3.2.9.3. Katyon Ayarlı Müller Hinton Broth Hazırlanması

Antibiyotiklerin istenen derişimlerini hazırlayabilmek amacıyla steril edilen Müller Hinton Broth (MHB) besiyerinin katyonunun ayarlanması işlemi yapılmıştır. İşlem hazırlanan stok magnezyum ve kalsiyum çözeltilerinden, litrede 1 mg artış sağlamak için litre başına 0.1 mL eklenerek sağlanmıştır. MHB besiyerinde katyon ayarlaması, magnezyum miktarı 10-12.5 mg/L, kalsiyum miktarı 20-25 mg/L düzeyinde olacak şekilde ayarlanmıştır [138].

3.2.9.4. Antibiyotik Stok Çözeltisinin Hazırlanması

İzole edilen izolatların antimikrobiyel maddelere direncinin makrodilüsyon tüp yöntemi ile belirlemek amacıyla öncelikle her bir antibiyotiğin stok çözeltisi hazırlanmıştır. Çalışılacak konsantrasyon aralığı 512-0.125 µg/mL olarak belirlenmiştir [104]. Yöntem gereği tüplere antimikrobiyel madde ve bakteri kültürü 1:1 oranında konmuştur. Test tüplerinde mevcut derişimin yarısı oranında azalma olacağından, test edilecek konsantrasyonlar iki kat olacak şekilde hazırlanmıştır. Stok antimikrobiyel madde çözeltisinin konsantrasyonu, en yüksek derişim olan 1024 µg/mL değerinin on katı 10240 µg/mL olarak gerçekleştirilmiştir.

Gereken toz miktarını veya çözücü miktarını hesaplamada aşağıdaki formüller kullanılmıştır;

$$W = \frac{V \times C}{P} \quad \text{veya} \quad V = \frac{W \times P}{C}$$

P: Potens (µg/mg)

V : Hacim (mL)

C : Konsantrasyon (µg/mL)

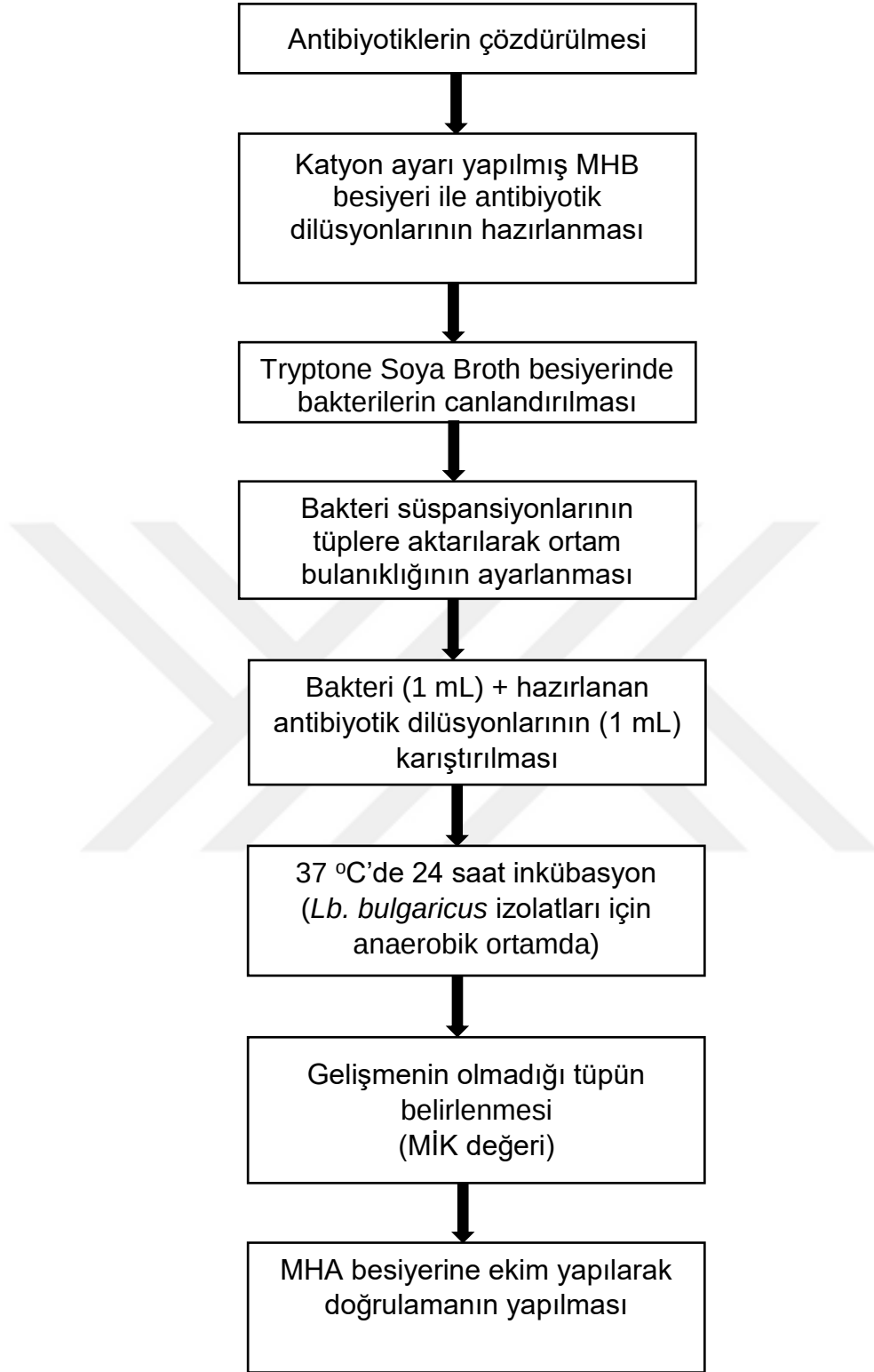
W : Ağırlık (mg)

Yapılan hesaplamalar sonrası antibiyotikler aşağıdaki tabloda belirtilen ve firmanın belirttiği protokol çerçevesinde toz halde olanlar çözdürüldükten sonra sulandırılarak stok çözeltileri hazırlanır [138, 139, 140].

Hazırlanan stok çözeltilerden Çizelge 3.12’de belirtilen şekilde test edilecek derişimler hazırlanır.

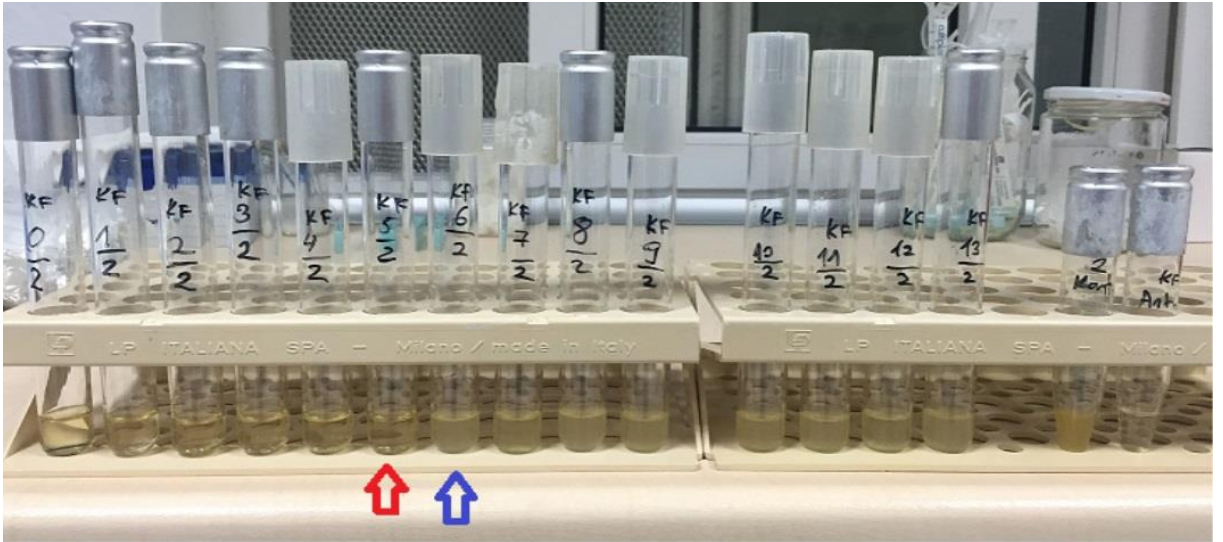
Çizelge 3.12. Antibakteriyel maddelerin test konsantrasyonlarını hazırlama tablosu [138].

Konsantrasyon (µg/mL)	Antibiyotik (mL)	Kasyon Ayarlı MHB (mL)	Son Konsatrasyon (µg/mL)
10240 (stok çözelti)	1	9	1024
1024	1	1	512
1024	1	3	256
1024	1	7	128
128	1	1	64
128	1	3	32
128	1	7	16
16	1	1	8
16	1	3	4
16	1	7	2
2	1	1	1
2	1	3	0.5
2	1	7	0.25

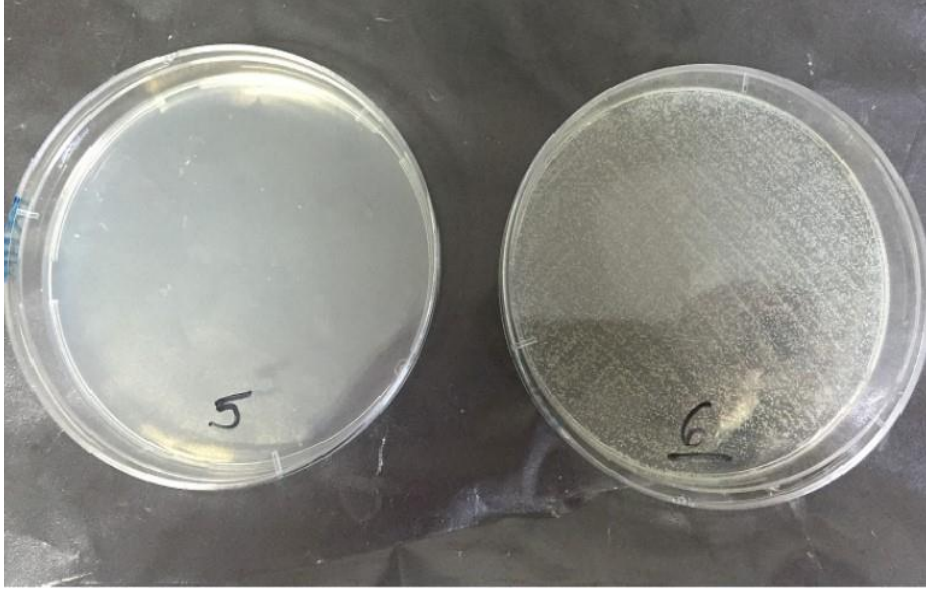


Şekil 3.8. Makrodilüsyon yöntemiyle yapılan antibiyotik dirençlilik testinin işlem akış şeması [138].

Analizde kullanılacak antibiyotikler Çizelge 3.10'da verilen çözücüler ile çözdürülerek, katyon ayarı yapılmış MHB besiyeriyle Çizelge 3.12'de verilen tabloya göre 0.25-1024 µg/mL arası konsantrasyonlarda dilüsyonları hazırlanmıştır. Tryptone Soya Broth besiyerinde, *Streptococcus thermophilus* (37 °C'de 24 saat inkübasyon) ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (43 °C'de 72 saat, mikroaerofilik ortamda inkübasyon) izolatları canlandırılarak, ayrı tüplere aktarılmış ve ortamın bulanıklığı 0.5 McFarland'a (spektrofotometrede 625 nm'de 0.08-0.13) ayarlanmıştır. Daha sonra ortam bulanıklığı ayarlanmış bakteri süspansiyonlarından ve hazırlanan antibiyotik dilüsyonlarından 1'er mL tüplere dağıtılmıştır. Her iki bakteriye ait izolatlar 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası gözle görülür şekilde üremesi tamamen inhibe olmuş tüplerdeki konsantrasyon, MİK değeri olarak belirlenmiştir. Sonuçların doğrulaması, inhibasyonun belirlendiği konsantrasyondaki süspansiyondan, MHA besiyerine ekimi yapılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.9. Makrodilüsyon tüp yönteminde MİK değerinin tespiti gösteren deney sonucu.



Şekil 3.10. Belirlenen MİK değerinin Müller Hinton Agar besiyerine ekim yaparak sonucun doğrulamasının gösterilmesi.

3.2.10. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Protokolü

K-562 ve THP-1 hücre dizileri 75 cm² yüzeyli hücre flasklarında üretildikten sonra hücreler 100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin, 2 mM L-glutamik asit ve %10 Fetal Bovin Serum (FBS) içeren RPMI 1640 ve DMEM besi yeri içerisinde steril koşullar altında % 5 CO₂ ihtiva eden etüvlerde 37°C de kültüre edilmiştir. Tek tabaka halinde üreyen hücreler mL'de 1x10⁵ canlı hücre olacak şekilde %10 FCS içeren DMEM içerisinde 24 ve 6 kuyucuklu plakalarda kültüre edilerek deneyler gerçekleştirilmiştir.

3.2.11. THP-1 Makrofaj Hücre Kültürü

THP-1 (İnsan lösemi monosit hücre kültürü) hücreleri makrofaj benzeri hücrelere farklılaştırmak için 2x10⁵ monosit/mL süpsansiyonu 20 ng/mL PMA ile 72 saat inkübe edilmiştir. PMA ile muameleden sonra hücreler PMA'nın etkisini uzaklaştırmak için 3 kez taze besiyeri ile yıkanmış ve hücreler deney öncesinde %5 CO₂ içeren 37°C etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hücre kazıyıcısı ile kaldırılan hücreler mL'de 1x10⁵ canlı hücre olacak şekilde %10 FCS içeren DMEM içerisinde süspanse edilerek 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Mikroorganizma ile uyarım öncesi 3 saat süreyle %5 CO₂ içeren 37°C etüvde hücrelerin tutunması için inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.12. THP-1 Hücrelerinin Makrofajlara Farklılaşmasının Belirlenmesi

CD14 yüzey ekspresyonu, hücre aktivasyonunun ve miyelomonositik hücre farklılaşmasının önemli bir işaretidir. Bundan dolayı, uyarılmamış (monosit) ya da PMA tarafından uyarılan (makrofajlar) THP-1 hücrelerindeki CD14 ekspresyon seviyeleri akış sitometrisi ile değerlendirilmiştir. Bunu gerçekleştirmek için bu hücreler fitoeritrin (PE) ile işaretlenmiş CD14 antikorlarla birlikte inkübe edilmiştir. İşaretleme, +4 °C'de 60 dakikada gerçekleştirilmiştir. Fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandıktan sonra, hücreler RPMI ortamında süspanse edilmiş, CD14 ifade eden hücreler akış sitometrisi ile belirlenmiştir. Sonuçlar, numunelerin PE log floresanının bir izotip kontrol antikor (fare IgG1) ve birincil PE-konjüge edilmiş antikor ile arka plan boyanmasına karşı gösterilmesi ile analiz edilmiştir. Floresan, 488 nm'lik bir uyarım dalga boyunda ve 575 nm'lik bir emisyon dalga boyunda ölçülmüştür. CD14 boyama prosedürlerinin özgüllüğünü sağlamak için, her PE-işaretleli monoklonal antikorun bağlanması, etiketlenmemiş monoklonal antikor fazlasıyla bloke edilmiştir. Tüm deneyler üç tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Morfolojik muayene için hücreler 6 cm çaplı plastik petri kaplarında hücre kültürü inkübe edilmiş, faz kontrast mikroskobu (Leica DMR epifluorescence microscope, Germany) altında farklılaşmamış THP-1 hücreleri ve makrofaja dönüşmüş hücreler belirlenmiştir.

3.2.13. Sitokin Düzeylerinin Ölçümü

İçerisinde ayrı ayrı 1×10^5 canlı NK hücresi ve THP-1 makrofaja dönüşmüş hücre bulunan, % 10 FCS ve DMEM içeren 24 ve 6 kuyucuklu plaklara, her bir izolattan 2×10^5 kob/mL olacak şekilde 500 µl ilave edilmiştir. Sitokin analizleri için % 5 CO₂ içeren ve 37 °C etüvde, 24 saat inkübe edilmiş sonrasında hücre kültür süpernatantları hasatlanarak, ELISA kitleriyle TNF-α, IL-8 ve IL-10 seviyeleri üçlü olarak analiz edilmiştir. Kontrol olarak, NK ve THP-1 makrofaj hücreleri tek başına kullanılmıştır.

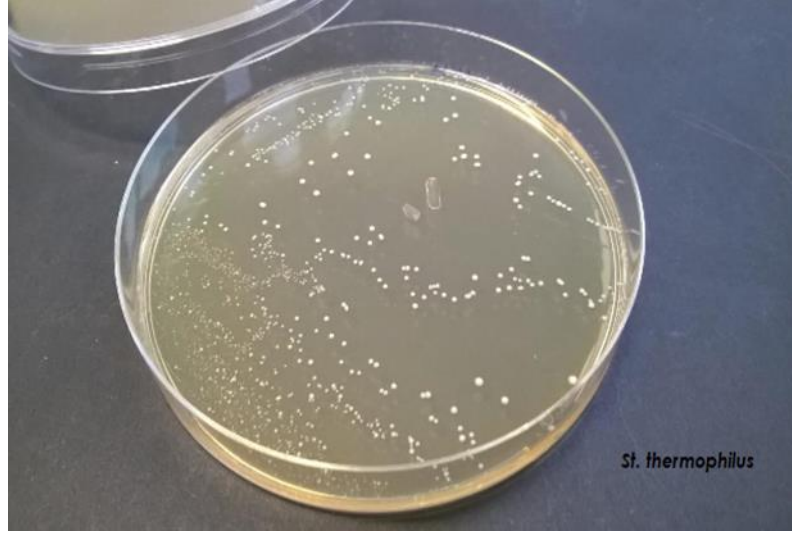
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Örnekleme ve İzolasyon

Örnek alım noktaları ve izolat sayıları Çizelge 4.1’de sunulduğu gibidir. LAB’nin M17 ve MRS agarda gelişerek oluşturdukları koloniler morfolojilerine göre ön değerlendirmeye tutulmuştur. Bu amaçla, MRS agarda gelişen beyaz renkli, düzgün şekilli koloniler (Şekil 4.1) *Lb. bulgaricus*, M17 agarda gelişen beyaz renkte, büyük ve düzgün şekilli koloniler (Şekil 4.2) ise olası *S. thermophilus* şüpheli kolonileri olarak belirlenmiş ve toplanmıştır.



Şekil 4.1. MRS Agarda gelişen şüpheli *Lb. bulgaricus* koloni görünüşü.



Şekil 4.2. M17 Agarda gelişen şüpheli *S. thermophilus* koloni görünüşü.

İzolatların koloni görünüşlerine göre yapılan değerlendirmeler sonucunda, şüpheli toplam 153 *S. thermophilus* ve 28 *Lb. bulgaricus* izolatı ile çalışmalara başlanmıştır. Tüm streptokok izolatları 37 °C'de 24 saat (aerobik), laktobasil izolatları da 43 °C'de 72 saat (mikroaerofilik) süre ile ardışık iki pasajlamaya tabi tutulmuş ve ikinci pasajlama sonunda gelişimleri değerlendirilmiştir. Bolu (Çepni köyü ve merkez), Isparta (merkez), Kayseri (Pınarbaşı)'den getirilen yoğurtlarda *S. thermophilus* olduğu varsayılan izolatlar ikinci pasajlama sonunda gelişim özelliğini önemli ölçüde yitirmiştir. Benzer şekilde, potansiyel *Lb. bulgaricus* izolatlarından yalnızca Karaman (Ermenek köyleri), Mersin (Mut, Sertavul yaylası köyleri), Merzifon (merkeze bağlı 6 farklı köy) ve Bolu (Geçitveren köyü)'dan getirilen yoğurtlardan izole edilenler iki pasajlama sonunda gelişim özelliklerini koruyabilmiştir.

Çizelge 4.1. Yoğurt örneklerinin alım noktaları ve izolat sayıları.

Bölge	M17 agardan elde edilen izolat sayısı		MRS agardan elde edilen izolat sayısı	
	1. Ekim	2. Ekim	1. Ekim	2. Ekim
Ermenek (Karaman)	87	55	21	7
Sertavul (Mersin)	25	17	8	7
Mut (Mersin)	60	24	20	9
Dörtdivan (Bolu)	8	2	0	0
Çömlekçiler (Bolu)	7	4	2	0
Çepni (Bolu)	6	0	3	0
Bulanık (Mudurnu)	9	9	3	0
Geçitveren (Bolu)	8	5	2	1
Yuva (Kıbrıscık)	25	1	5	0
Merkez (Bolu)	6	0	5	0
Göynükören (Gerede)	6	6	1	0
Merzifon (Amasya)	20	30	20	4
(9 farklı köy)				
Isparta (Merkez)	10	0	5	0
Kayseri (Pınarbaşı)	6	0	6	0
Toplam	283	153	101	28

Çizelge 4.2. Şüpheli *Streptococcus* spp. izolatlarının elde edildiği bölgeler.

İzolat no	Bölge	İzolat no	Bölge	İzolat no	Bölge
0	Ermenek	7	Ermenek	11	Ermenek
1	Ermenek	8	Ermenek	11-2	Bolu
2	Ermenek	9	Ermenek	12	Çömlekçiler
4-2	Dörtdivan	9-2	Bolu	14-2	Ermenek
6	Ermenek	10	Çömlekçiler	15	Bolu
6-2	Dörtdivan	10-2	Ermenek	15-2	Çömlekçiler
16-2	Mudurnu	52-2	Ermenek	127	Ermenek
	Bulanık				Mut
17-2	Mudurnu	53	Ermenek	128	Mut
	Bulanık				
18	Ermenek	53-2	Ermenek	129	Mut
18-2	Mudurnu	54	Ermenek	132	Mut
	Bulanık				
19	Ermenek	54-2	Ermenek	133	Mut
19-2	Mudurnu	55	Ermenek	134	Mut
	Bulanık				
20	Ermenek	56	Ermenek	136	Mut
20-2	Mudurnu	58	Ermenek	139	Mut
	Bulanık				
21	Ermenek	59	Ermenek	141	Mut
21-2	Mudurnu	63	Ermenek	142	Mut
	Bulanık				
22	Ermenek	64	Ermenek	149	Ermenek
22-2	Mudurnu	65	Ermenek	155	Mut
	Bulanık				
23	Ermenek	66	Ermenek	158	Mut
23-2	Mudurnu	67	Ermenek	MS1-1	Merzifon
	Bulanık				
24-2	Mudurnu	68	Ermenek	MS1-3	Merzifon
	Bulanık				
25	Ermenek	69	Ermenek	MS1-4	Merzifon
25-2	Gerede	70	Sertavul	MS1-5	Merzifon
	Göynükören				
26	Ermenek	71	Sertavul	MS2-1	Merzifon
26-2	Gerede	72	Sertavul	MS5-5	Merzifon
	Göynükören				
27	Gerede	73	Sertavul	MS6-1	Merzifon
	Göynükören				
27-2	Gerede	74	Sertavul	MS6-2	Merzifon
	Göynükören				
28	Ermenek	75	Sertavul	MS6-4	Merzifon
29	Ermenek	77	Sertavul	MS6-5	Merzifon

Çizelge 4.2. Şüpheli *Streptococcus* spp. izolatlarının elde edildiği bölgeler (devam).

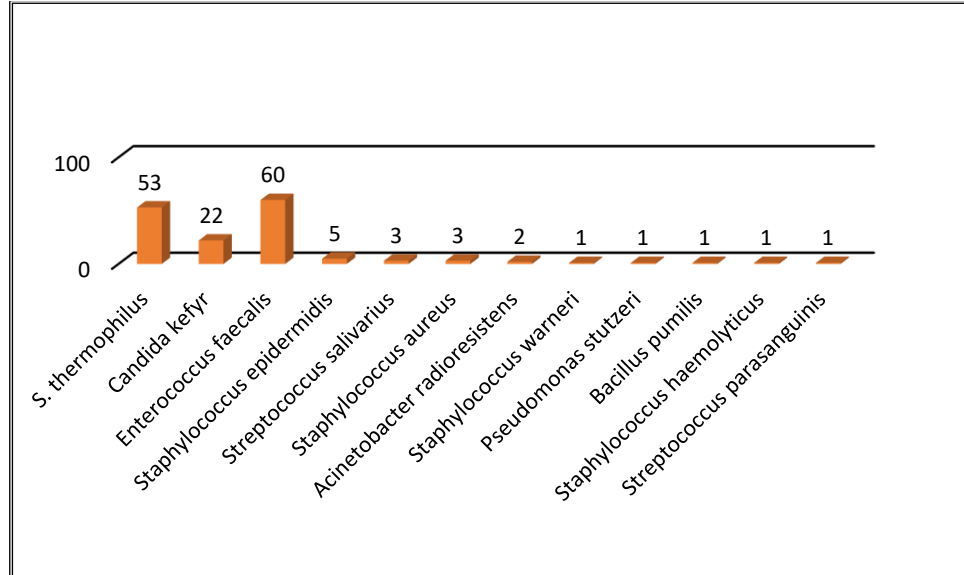
İzolat no	Bölge	İzolat no	Bölge	İzolat no	Bölge
29-2	Gerede Göynükören	79	Sertavul	MS6-3	Merzifon
30-2	Gerede Göynükören	80	Sertavul	MS8-2	Merzifon
31-2	Bolu Geçitveren	81	Sertavul	MS9-1	Merzifon
32	Ermenek	84	Sertavul	MS9-5	Merzifon
32-2	Bolu Geçitveren	88	Sertavul	MS3-4	Merzifon
33	Ermenek	89	Sertavul	MS3-5	Merzifon
33-2	Bolu Geçitveren	90	Sertavul	MS4-1	Merzifon
36	Ermenek	93	Sertavul	MS4-2	Merzifon
36-2	Bolu Geçitveren	94	Sertavul	MS4-3	Merzifon
37-2	Bolu Geçitveren	95	Sertavul	MS4-4	Merzifon
39	Ermenek	100	Ermenek	MS4-5	Merzifon
40-2	Kıbrıscık Yuva	107	Mut	MS5-1	Merzifon
42	Ermenek	109	Mut	MS2-2	Merzifon
43	Ermenek	110	Mut	MS2-3	Merzifon
43-2	Ermenek	111	Mut	MS2-4	Merzifon
44	Ermenek	112	Mut	MS2-5	Merzifon
44-2	Ermenek	113	Mut	MS2-6	Merzifon
46-2	Ermenek	116	Mut	MS3-1	Merzifon
47	Ermenek	120	Mut	MS3-2	Merzifon
48	Ermenek	121	Mut	MS3-3	Merzifon
48-2	Ermenek	124	Mut		
49	Ermenek	125	Mut		
51	Ermenek	126	Mut		

Çizelge 4.3. Şüpheli *Lactobacillus* spp. izolatlarının elde edildiği bölgeler.

İzolat no	Bölge	İzolat no	Bölge	İzolat no	Bölge
8	Bolu	23	Sertavul	42	Mut
	Geçitveren				
11	Ermenek	24	Sertavul	44	Mut
12	Ermenek	25	Sertavul	46	Mut
13	Ermenek	26	Sertavul	52	Mut
14	Ermenek	27	Sertavul	ML4-1	Merzifon
15	Ermenek	29	Mut	ML7-6	Merzifon
16	Ermenek	30	Mut	ML9-5	Merzifon
17	Ermenek	37	Mut	ML9-6	Merzifon
20	Sertavul	39	Mut		
21	Sertavul	41	Mut		

4.2. MALDI-TOF MS ile Tanımlama

İki kademeli saflaştırma sonucunda elde edilen toplam 153 potansiyel *S. thermophilus* izolatının ilk önce MALDI-TOF MS analizi ile tanımlaması yapılmıştır.

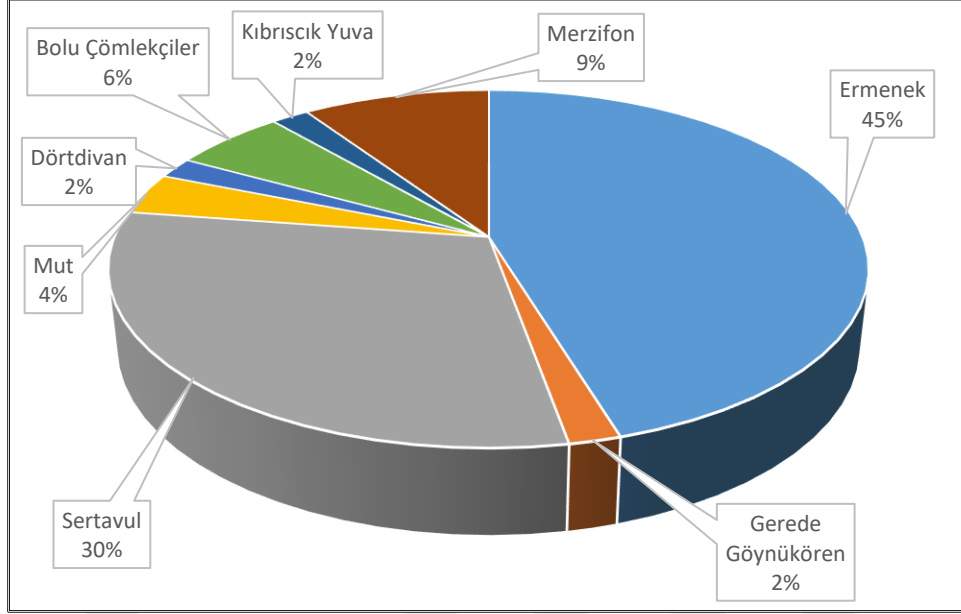


Şekil 4.3. Şüpheli *S. thermophilus* izolatların MALDI-TOF MS tekniğine göre tanımlama sonuçları.

Analiz sonuçlarına göre, 53'ünün (%34.6) *S. thermophilus*, 22'sinin (%14.4) *Candida kefyr* (ikinci güçlü seçenek: *Kluyveromyces marxianus*), 60'ının (%39.2) *Enterococcus faecalis*, 5'inin (%3.3) *Staphylococcus epidermidis*, 3'ünün (%3.2) *Streptococcus salivarius*, 3'ünün (%3.2) *Staphylococcus aureus*, 2'sinin (%1.3) *Acinetobacter radioresistens* ve 1'er adedinin (%0.7) de *Staphylococcus warneri*, *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus pumilis*, *Staphylococcus haemolyticus* ve *Streptococcus parasanguinis*'e ait olduğu belirlenmiştir.

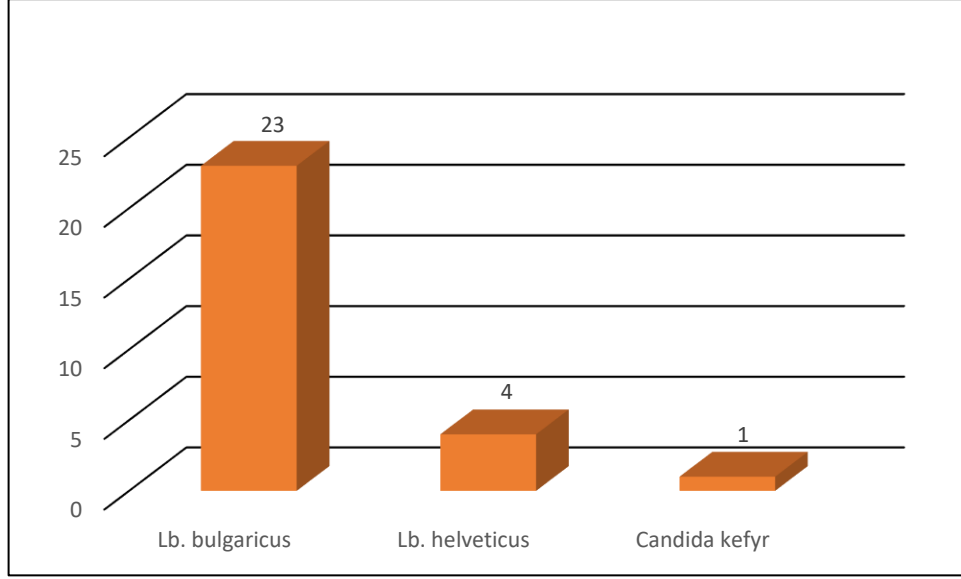
Çizelge 4.4. MALDI-TOF MS analizi ile doğrulanmış *S. thermophilus* izolatları.

İzolat no	Bölge	İzolat no	Bölge	İzolat no	Bölge
0	Ermenek	51	Ermenek	90	Sertavul
1	Ermenek	53	Ermenek	93	Sertavul
2	Ermenek	55	Ermenek	94	Sertavul
6	Ermenek	56	Ermenek	95	Sertavul
8	Ermenek	58	Ermenek	100	Ermenek
9	Ermenek	64	Ermenek	124	Mut
10	Ermenek	70	Sertavul	139	Mut
11	Ermenek	71	Sertavul	6-2	Dörtdivan
12	Ermenek	72	Sertavul	11-2	Bolu
23	Ermenek	73	Sertavul	14-2	Çömlekçiler
26	Ermenek	74	Sertavul	19-2	Bolu
27	Bolu	75	Sertavul	40-2	Çömlekçiler
33	Göynükören	77	Sertavul	MS1-1	Kıbrısık
43	Ermenek	79	Sertavul	MS1-4	Yuvaköy
44	Ermenek	80	Sertavul	MS2-1	Merzifon
47	Ermenek	81	Sertavul	MS2-2	Merzifon
48	Ermenek	88	Sertavul	MS5-1	Merzifon
49	Ermenek	89	Sertavul		



Şekil 4.4. MALDI-TOF MS ile tanımlaması yapılan *S. thermophilus* izolatlarının örnek alım noktalarına göre dağılımı.

MALDI-TOF MS ile tanımlaması yapılan 53 *S. thermophilus* izolatının, 24'ü (%45.3) Karaman Ermenek, 16'sı (%30.2) Mersin Sertavul, 5'i (%9.4) Amasya Merzifon, 3'ü (%5.7) Bolu Çömlekçiler, 2'si (%3.8) Mersin Mut ve 1'er (%1.9) adedi de Bolu Göynükören, Dörtdivan, Kırıscık Yuvaköy bölgesinden alınan ev tipi yoğurtlardan izole edilmiştir.

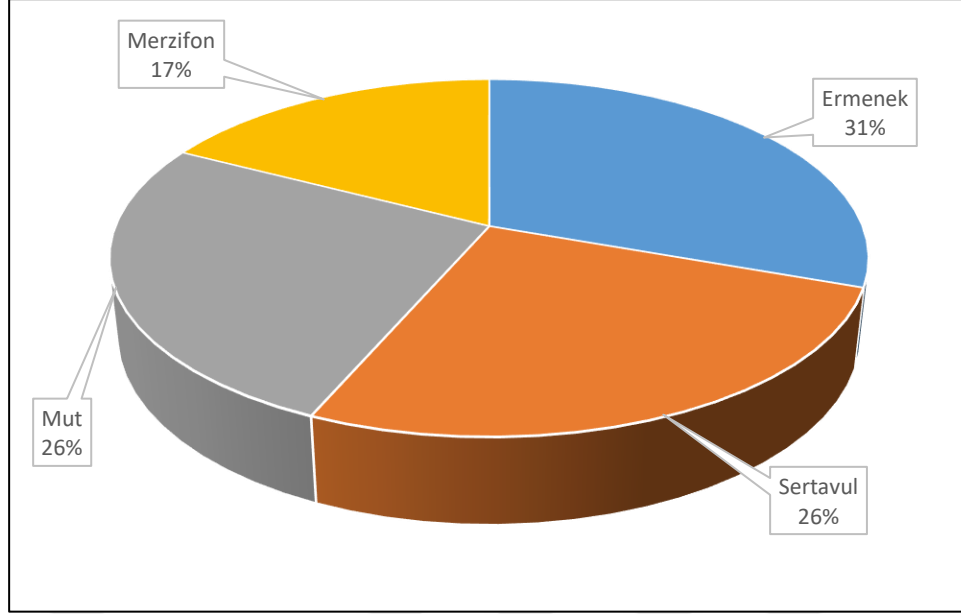


Şekil 4.5. Şüpheli *Lb. bulgaricus* izolatların MALDI-TOF MS tekniğine göre tanımlama sonuçları.

Ayrıca, potansiyel toplam 28 *Lactobacillus* spp. izolatın analizi sonucunda, 23'ü (%82.1) *Lb. bulgaricus* olarak tanımlanmış, 4 (%14.3) izolatın *Lactobacillus helveticus*, 1 (%3.6) adedinin ise *Candida kefyr* [ana] (*Kluyveromyces marxianus*) [teleo] türüne ait olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5. MALDI-TOF MS analizi ile doğrulanan *Lb. bulgaricus* izolatları.

İzolat no	Bölge	İzolat no	Bölge	İzolat no	Bölge
11	Ermenek	21	Sertavul	42	Mut
12	Ermenek	23	Sertavul	44	Mut
13	Ermenek	24	Sertavul	52	Mut
14	Ermenek	25	Sertavul	ML4-1	Merzifon
15	Ermenek	27	Sertavul	ML7-6	Merzifon
16	Ermenek	29	Mut	ML9-5	Merzifon
17	Ermenek	30	Mut	ML9-6	Merzifon
20	Sertavul	41	Mut		



Şekil 4.6. MALDI-TOF MS ile tanımlaması yapılan *Lb. bulgaricus* izolatlarının örnek alım noktalarına göre dağılımı.

MALDI-TOF MS ile tanımlaması yapılan 23 *Lb. bulgaricus* izolatının, 7'si (%30.4) Karaman Ermenek, 6'sar (%26.1) adedi Mersin Sertavul ve Mersin Mut, 4'ü (%17.4) Amasya Merzifon bölgesinden alınan ev tipi yoğurtlardan izole edilmiştir.

MRS ve M17 agar besiyerlerinde benzer morfolojilerde oluşan kolonilerin, MALDI-TOF MS yöntemiyle yapılan analizlerinde, yoğurt bakterilerinin yanı sıra farklı bakteri ve mayaların tespit edilmesinin sebebinin, alınan yoğurt örneklerinin tekstür ve aromasının oluşumunda diğer mikroorganizmalarında etkisinin olduğu ve kültürlerin zamanla bu florayı taşıdığı şeklinde değerlendirilmiştir.

Elde edilen veriler doğrultusunda, seçilen izolatlar gerçek-zamanlı PZR tekniği ile tür bazında doğrulama çalışmalarına tabi tutulmuş ve ardından seçilen izolatlar sekans analizine alınmıştır.

4.3. % 6.5 NaCl Testi

MALDI-TOF MS analizi ile doğrulananan *Streptococcus* spp. izolatlarının sadece 2'sinin (27 ve MS5-1) %6.5 NaCl+M17 Broth varlığında gelişemediği (olası *S. thermophilus*) görülmüştür.

Çizelge 4.6. Şüpheli *S. thermophilus* izolatlarının tuz testi sonuçları.

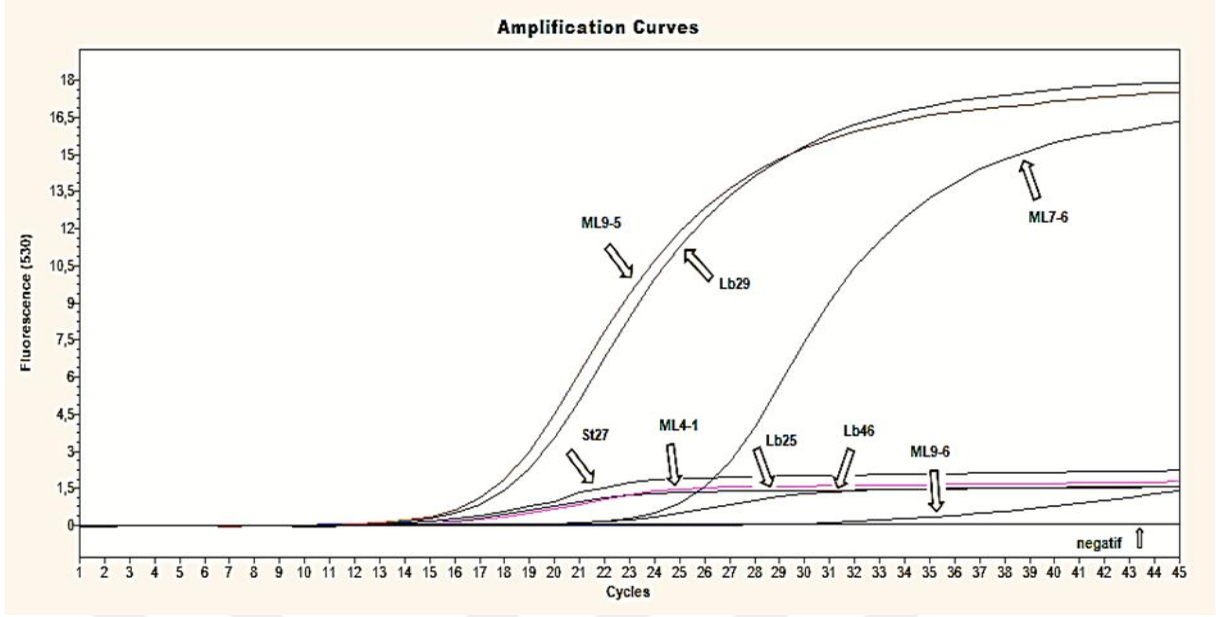
İzolat no	Bölge	M17 Broth+ %6.5 NaCl gelişme	İzolat no	Bölge	M17 Broth+ %6.5 NaCl gelişme
0	Ermenek	Pozitif	73	Sertavul	Pozitif
1	Ermenek	Pozitif	74	Sertavul	Pozitif
2	Ermenek	Pozitif	75	Sertavul	Pozitif
6	Ermenek	Pozitif	77	Sertavul	Pozitif
8	Ermenek	Pozitif	79	Sertavul	Pozitif
9	Ermenek	Pozitif	80	Sertavul	Pozitif
10	Ermenek	Pozitif	81	Sertavul	Pozitif
11	Ermenek	Pozitif	88	Sertavul	Pozitif
12	Ermenek	Pozitif	89	Sertavul	Pozitif
23	Ermenek	Pozitif	90	Sertavul	Pozitif
26	Ermenek	Pozitif	93	Sertavul	Pozitif
27	Gerede	Negatif	94	Sertavul	Pozitif
	Göynükören				
33	Ermenek	Pozitif	95	Sertavul	Pozitif
43	Ermenek	Pozitif	100	Ermenek	Pozitif
44	Ermenek	Pozitif	124	Mut	Pozitif
47	Ermenek	Pozitif	139	Mut	Pozitif
48	Ermenek	Pozitif	6-2	Dörtdivan	Pozitif
49	Ermenek	Pozitif	11-2	Bolu	Pozitif
				Çömlekçiler	
51	Ermenek	Pozitif	14-2	Bolu	Pozitif
				Çömlekçiler	
53	Ermenek	Pozitif	19-2	Bolu	Pozitif
				Çömlekçiler	
55	Ermenek	Pozitif	40-2	Kıbrıscık	Pozitif
				Yuvaköy	
56	Ermenek	Pozitif	MS1-1	Merzifon	Pozitif
58	Ermenek	Pozitif	MS1-4	Merzifon	Pozitif
64	Ermenek	Pozitif	MS2-1	Merzifon	Pozitif
70	Sertavul	Pozitif	MS2-2	Merzifon	Pozitif
71	Sertavul	Pozitif	MS5-1	Merzifon	Negatif
72	Sertavul	Pozitif			

4.4. Gerçek-Zamanlı PZR ile Tanımlama

Olası 153 *Streptococcus spp.* izolatının gerçek-zamanlı PZR ile yapılan analizi sonucunda, *S. thermophilus* olarak tanımlanan izolatların izole edildiği yoğurt örneklerinin alındığı bölgeler ile C_p değerleri Çizelge 4.7’de sunulmuştur.

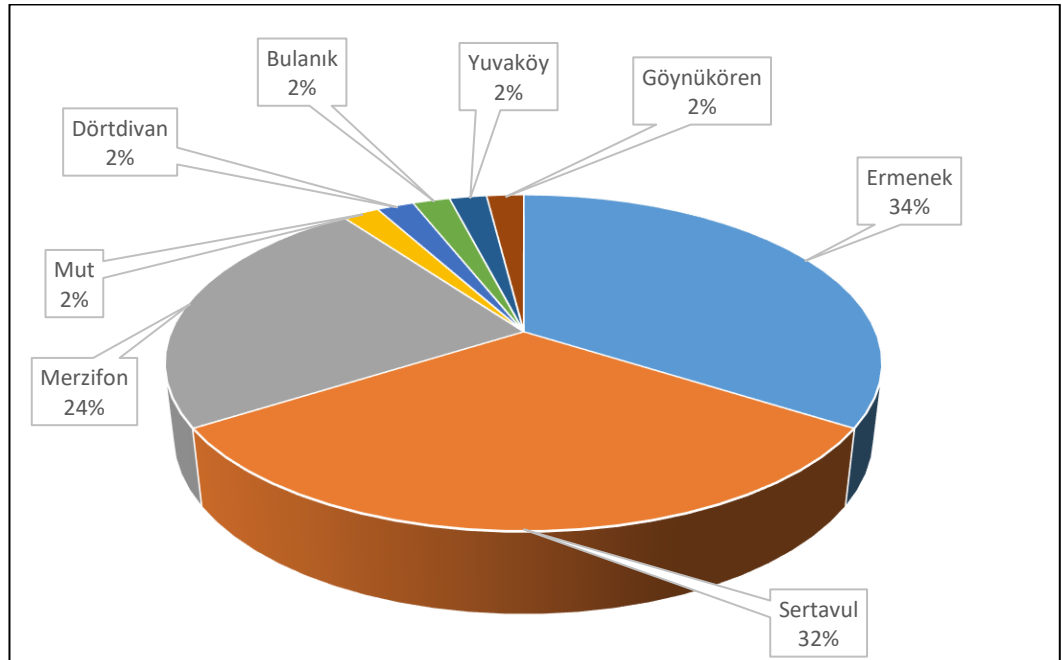
Çizelge 4.7. Gerçek-zamanlı PZR ile *S. thermophilus* olarak tanımlanan izolatlar.

İzolat no	Bölge	Cp Değeri	İzolat no	Bölge	Cp Değeri
0	Ermenek	29.32	80	Sertavul	22.78
1	Ermenek	17.76	81	Sertavul	18.70
6	Ermenek	23.71	88	Sertavul	18.88
10	Ermenek	20.30	89	Sertavul	19.25
11	Ermenek	29.23	90	Sertavul	24.84
12	Ermenek	22.12	93	Sertavul	22.32
23	Ermenek	13.99	94	Sertavul	22.55
26	Ermenek	18.56	95	Sertavul	29.12
27	Gerede	15.82	100	Ermenek	22.80
	Göynükören				
33	Ermenek	29.47	139	Mut	16.62
43	Ermenek	29.08	6-2	Bolu	18.63
				Dörtdivan	
49	Ermenek	29.75	19-2	Mudurnu	15.79
				Bulanık	
51	Ermenek	21.54	40-2	Kıbrısçık	13.57
				Yuva	
53	Ermenek	26.85	MS1-1	Merzifon	29.84
55	Ermenek	17.34	MS2-3	Merzifon	29.57
58	Ermenek	26.62	MS2-4	Merzifon	25.99
64	Ermenek	19.65	MS2-5	Merzifon	29.37
70	Sertavul	29.81	MS3-1	Merzifon	27.38
71	Sertavul	15.96	MS3-3	Merzifon	29.88
72	Sertavul	17.86	MS3-4	Merzifon	29.66
73	Sertavul	20.66	MS3-5	Merzifon	28.86
74	Sertavul	17.24	MS4-1	Merzifon	26.59
75	Sertavul	16.57	MS4-2	Merzifon	27.41
77	Sertavul	23.25	MS4-4	Merzifon	29.21
79	Sertavul	16.84			



Şekil 4.7. 1 *S. thermophilus* ve 7 *Lb. bulgaricus* izolatının gerçek-zamanlı PZR ile tanımlama görüntüsü.

Her üç yöntemle tanımlaması yapılmış, *S. thermophilus* (St27) ve *Lb. bulgaricus* (Lb25, Lb29, Lb46, ML4-1, ML7-6, ML9-5 ve ML9-6) izolatlarının gerçek-zamanlı PZR'deki görüntüleri Şekil 4.7'de, diğer *S. thermophilus* izolatlarına ait görüntüler Ek-I'de verilmiştir.



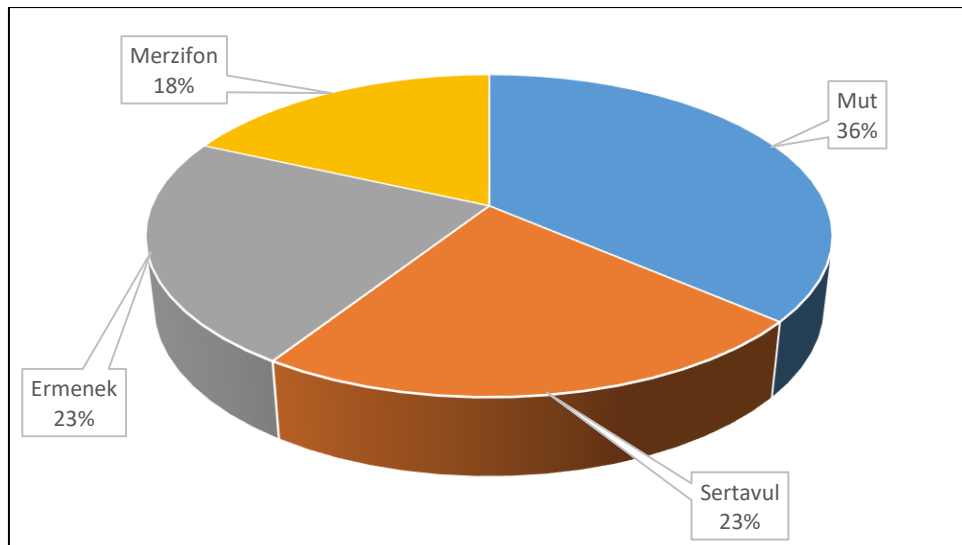
Şekil 4.8. Gerçek-zamanlı PZR ile tanımlaması yapılan *S. thermophilus* izolatlarının örnek alım noktalarına göre dağılımı.

Gerçek-Zamanlı PZR ile 153 izolatın 49'u (%32) *S. thermophilus* olarak tanımlanmıştır. Doğrulaması yapılan izolatların, 17'si (%34.7) Karaman Ermenek, 16'sı (%32.7) Mersin Sertavul, 11'i (%22.4) Amasya Merzifon ve 1'er adedi (%2'şer) Mersin Mut, Bolu Dörtdivan, Yuvaköy, Bulanıkköy bölgesinden alınan ev tipi yoğurtlardan izole edilmiştir.

Şüpheli toplam 28 *Lactobacillus* spp. izolatın gerçek-zamanlı PZR ile yapılan analizi sonucunda, *Lb. bulgaricus* olarak tanımlanan izolatların izole edildiği yoğurt örneklerinin alındığı bölgeler ile C_p değerleri Çizelge 4.8'de diğer *Lb. bulgaricus* izolatlarına ait görüntüler Ek-II'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Gerçek-zamanlı PZR ile *Lb. bulgaricus* olarak tanımlanan izolatlar.

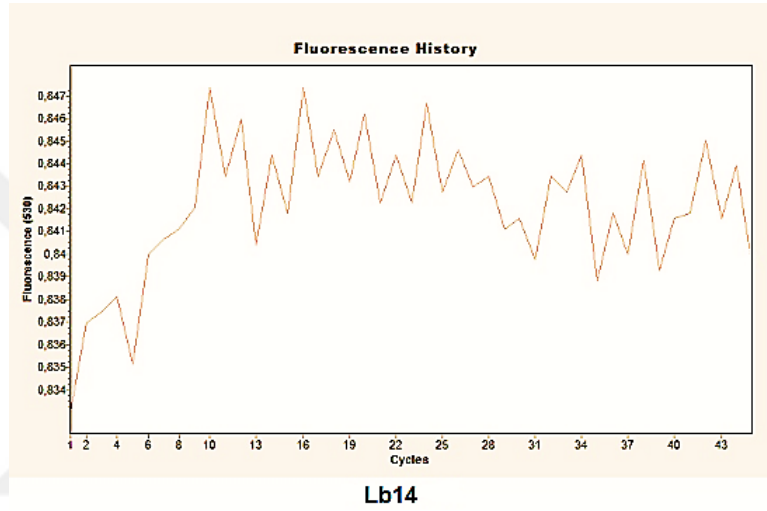
İzolat no	Bölge	Cp Değeri	İzolat no	Bölge	Cp Değeri
11	Ermenek	14.73	30	Mut	16.33
12	Ermenek	17.67	37	Mut	15.30
13	Ermenek	15.59	39	Mut	14.84
15	Ermenek	15.75	41	Mut	17.45
17	Ermenek	17.59	42	Mut	15.80
21	Sertavul	16.85	44	Mut	15.00
23	Sertavul	16.68	46	Mut	21.65
24	Sertavul	17.83	ML4-1	Merzifon	14.83
25	Sertavul	16.05	ML7-6	Merzifon	26.64
27	Sertavul	17.54	ML9-5	Merzifon	16.01
29	Mut	17.50	ML9-6	Merzifon	28.03



Şekil 4.9. Gerçek-zamanlı PZR ile tanımlaması yapılan *Lb. bulgaricus* izolatlarının örnek alım noktalarına göre dağılımı.

Gerçek-zamanlı PZR ile 28 izolatın 22'si (%78.6) *Lb. bulgaricus* olarak tanımlanmıştır. Doğrulaması yapılan izolatların, 8'i (%36.3) Mersin Mut, 5'er adedi (%22.7'şer) Karaman Ermenek ve Mersin Sertavul, 4'ü (%18.1) Amasya Merzifon bölgesinden alınan ev tipi yoğurtlardan izole edilmiştir.

Gerçek-zamanlı PZR ile yapılan analiz sonucunda; C_p değerinin 30'un üzerinde olması veya herhangi bir C_p değeri tespit edilememesi durumunda, sonucun negatif yani tanımlamanın yapılamadığı şeklinde değerlendirilmiştir.



Şekil 4.10. Gerçek-zamanlı PZR'de negatif sonuç görüntüsü.

4.5. 16S rRNA Sekans Analizi ile Tanımlama

MALDI-TOF MS analizi ile tanımlanan 53 *S. thermophilus* ve 23 *Lb. bulgaricus* izolatının ilk yapılan 16S rRNA sekans analizi sonucu ancak 28'inin *S. thermophilus* ve 15'inin *Lb. bulgaicus* olduğu teyit edilmiştir. Ayrıca bu izolatlardan sadece 2 adedinin (27 ve MS5-1) %6.5 NaCl+M17 Broth varlığında gelişemediği (potansiyel *S. thermophilus*) görülmüştür. Biyokimyasal test, MALDI-TOF MS, gerçek-zamanlı PZR ve 16S rRNA sekans analiz sonuçları arasında bu kısmi uyumsuzluk nedeniyle, 112D052 kodlu "Geleneksel Yoğurt Örneklerinden İzole Edilen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* izolatlarının Endüstriyel Yoğurt Üretimine Uygunluğunun Saptanarak Starter Kombinasyonlarının Geliştirilmesi" SAN-TEZ projesi kapsamında, tüm izolatların asit oluşturma, aroma geliştirme, proteoliz, tekstür geliştirme, ve gelişim yeteneklerinin test edilmesine karar verilmiştir. Bu testler sonucunda yetersiz

bulunan izolatlar elenmiş ve kalan izolatlar için bir kez daha 16S rRNA sekans analizi uygulanmıştır.

Çizelge 4.9. 16S rRNA sekans analizi ile *Lb. bulgaricus* olarak tanımlanan izolatlar.

İzolat no	Bölge	İzolat no	Bölge
25	Sertavul	ML4-1	Merzifon
29	Mut	ML7-6	Merzifon
41	Mut	ML9-5	Merzifon
42	Mut	ML9-6	Merzifon
46	Mut		

Yapılan analiz sonucunda, 1 izolatın (27 nolu) *S. thermophilus* ve 9 izolatın (Çizelge 4.9) *Lb. bulgaricus* olduğu tespit edilmiştir. 16S rRNA sekans analizi sonuçlarının gen bankası karşılaştırmaları Çizelge 4.10'da, dendogramlar Şekil 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.10. 16S rRNA sekans analizi ile tanımlanan *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* izolatlarına ait sonuçlar.

Örnek kodu	EMBL / Gen Bank No	Bakteri Türleri	% Homoloji
27	CP016026.1	<i>Streptococcus thermophilus</i> strain KLDS SM, complete genome	100
27	KT724045.1	<i>Streptococcus thermophilus</i> strain S.t 0# 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
27	KT724043.1	<i>Streptococcus thermophilus</i> strain S.t 79 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
27	KT724042.1	<i>Streptococcus thermophilus</i> strain S.t 63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
27	KT724041.1	<i>Streptococcus thermophilus</i> strain S.t 60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
Örnek kodu	EMBL / Gen Bank No	Bakteri Türleri	% Homoloji
25	KP764119.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain IMAU11365 (YM49-2) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
25	KJ776841.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain YML013 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100
25	KJ939318.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> strain SH3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
25	KJ939317.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> strain SP1.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
25	KJ939316.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> strain CH9-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100

Çizelge 4.10. 16S rRNA sekans analizi ile tanımlanan *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* izolatlarına ait sonuçlar (devam).

Örnek kodu	EMBL / Gen Bank No	Bakteri Türleri	% Homoloji
29	CP013610.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain MN-BM-F01, complete genome	99
29	KP764119.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain IMAU11365 (YM49-2) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
29	KJ776841.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain YML013 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99
29	KJ939318.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> strain SH3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
29	KJ939317.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> strain SP1.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
Örnek kodu	EMBL / Gen Bank No	Bakteri Türleri	% Homoloji
41	KP764119.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain IMAU11365 (YM49-2) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
41	KJ776841.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain YML013 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99
41	KJ939318.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> strain SH3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
41	KJ939317.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> strain SP1.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
41	KJ939316.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> strain CH9-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99

Çizelge 4.10. 16S rRNA sekans analizi ile tanımlanan *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* izolatlarına ait sonuçlar (devam).

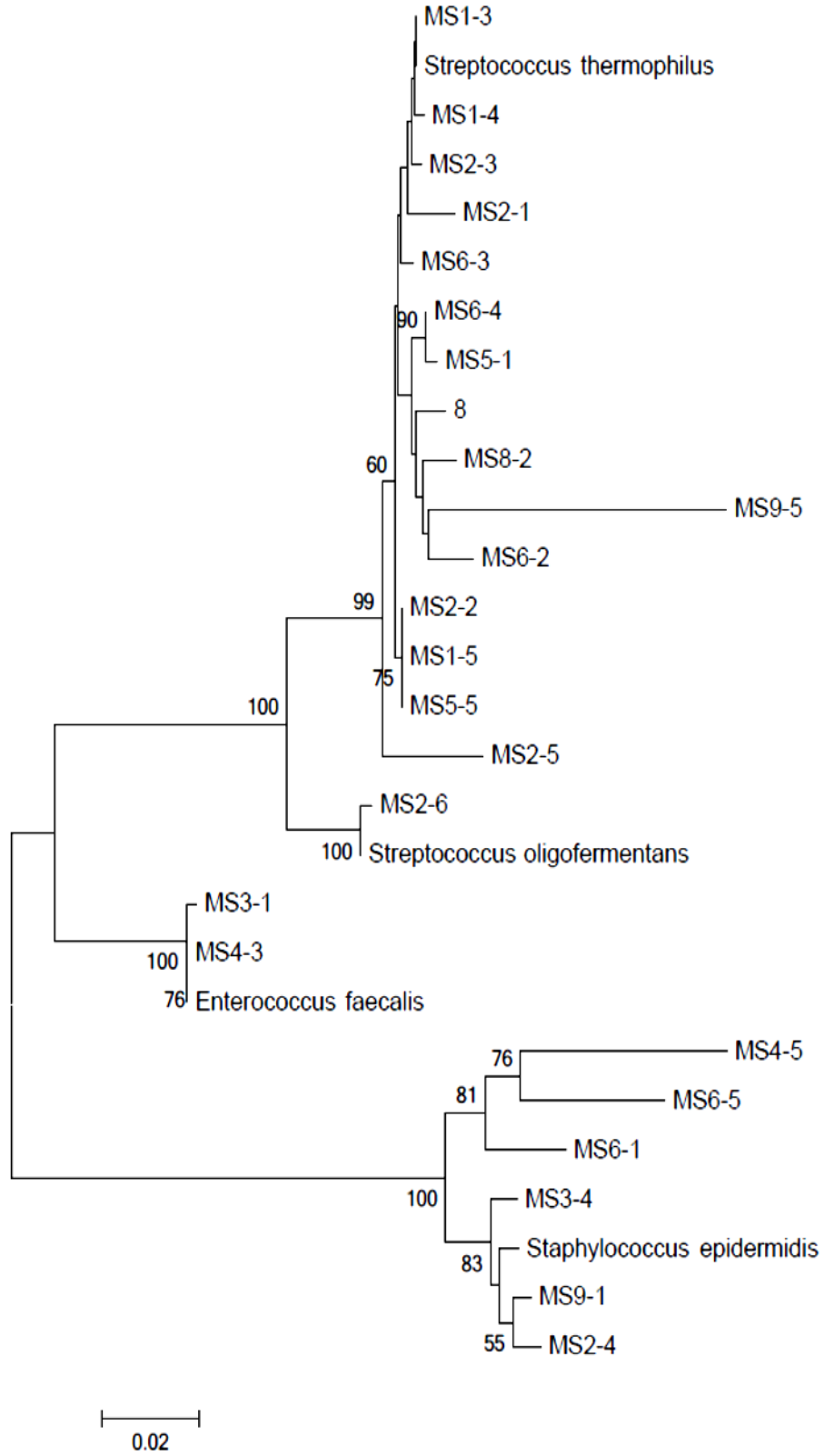
Örnek kodu	EMBL / Gen Bank No	Bakteri Türleri	% Homoloji
42	CP013610.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain MN-BM-F01, complete genome	99
42	KP764119.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain IMAU11365 (YM49-2) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
42	KJ776841.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain YML013 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99
42	KJ939318.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> strain SH3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
42	KJ939317.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> strain SP1.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
Örnek kodu	EMBL / Gen Bank No	Bakteri Türleri	% Homoloji
46	KP764119.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain IMAU11365 (YM49-2) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
46	KJ776841.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain YML013 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99
46	KJ939318.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> strain SH3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
46	KJ939317.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> strain SP1.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
46	KJ939316.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> strain CH9-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99

Çizelge 4.10. 16S rRNA sekans analizi ile tanımlanan *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* izolatlarına ait sonuçlar (devam).

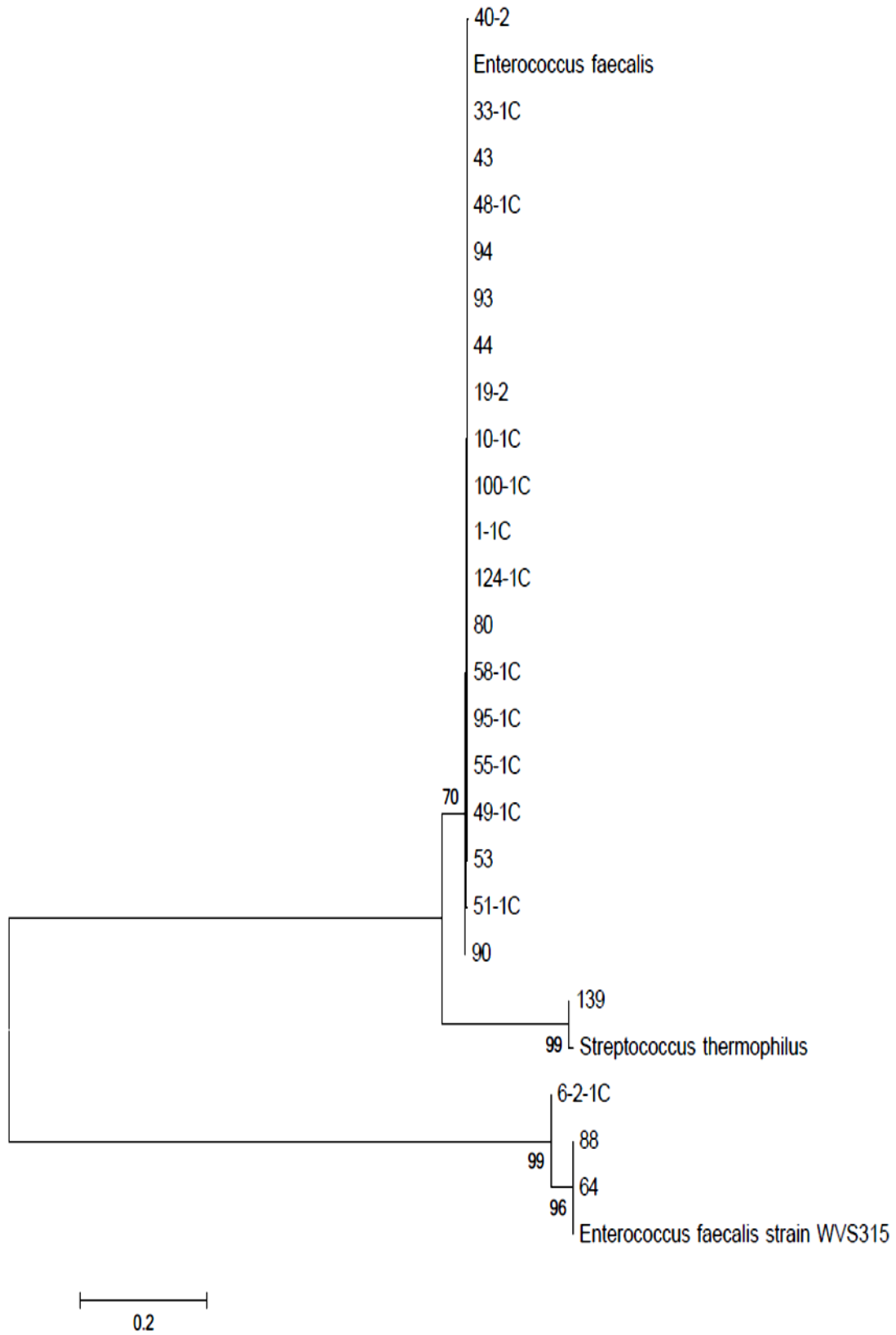
Örnek kodu	EMBL / Gen Bank No	Bakteri Türleri	% Homoloji
ML4/1	KP764123.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain IMAU11369 (YM50-4) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
ML4/1	KP764121.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain IMAU11367 (YM50-2) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
ML4/1	LC063162.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: JCM 1002	100
ML4/1	KJ776841.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain YML013 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100
ML4/1	KJ868760.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> strain SB25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
Örnek kodu	EMBL / Gen Bank No	Bakteri Türleri	% Homoloji
ML7/6	LC094439.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: B37	100
ML7/6	CP013610.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain MN-BM-F01, complete genome	100
ML7/6	KP764123.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain IMAU11369 (YM50-4) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
ML7/6	KP764122.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain IMAU11368 (YM50-3) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
ML7/6	KP764121.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain IMAU11367 (YM50-2) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100

Çizelge 4.10. 16S rRNA sekans analizi ile tanımlanan *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* izolatlarına ait sonuçlar (devam).

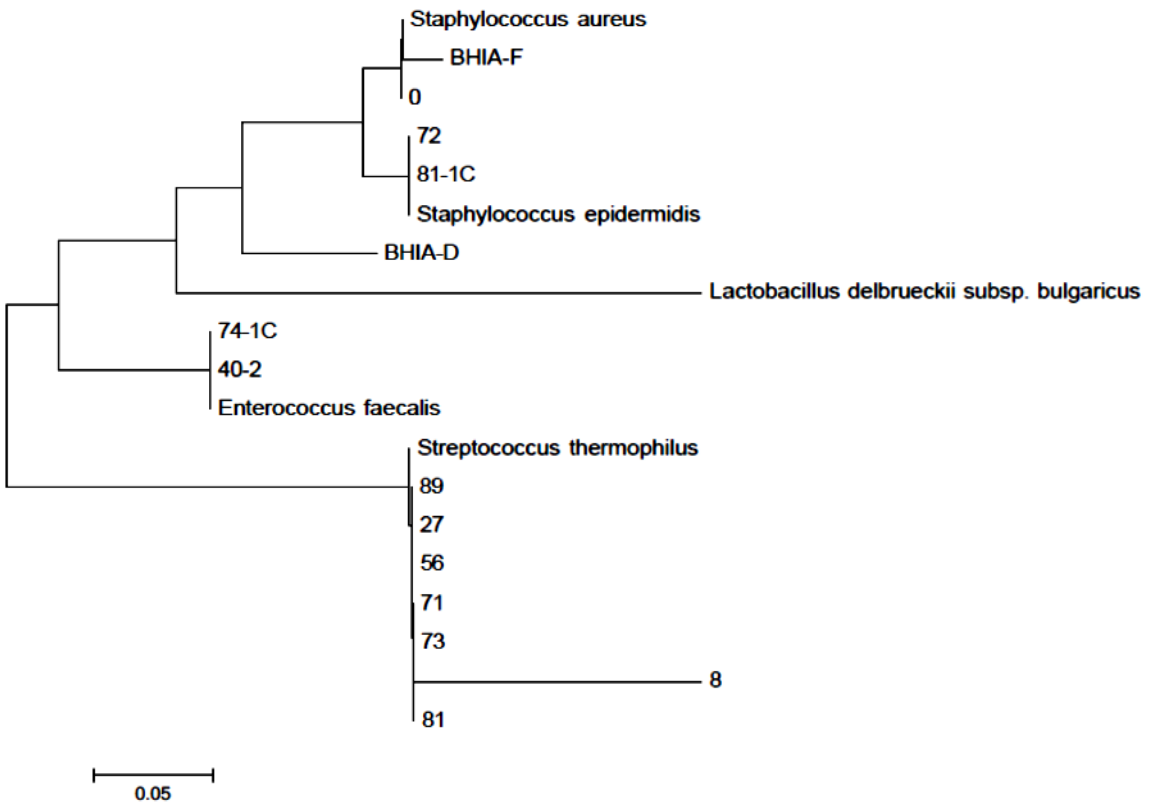
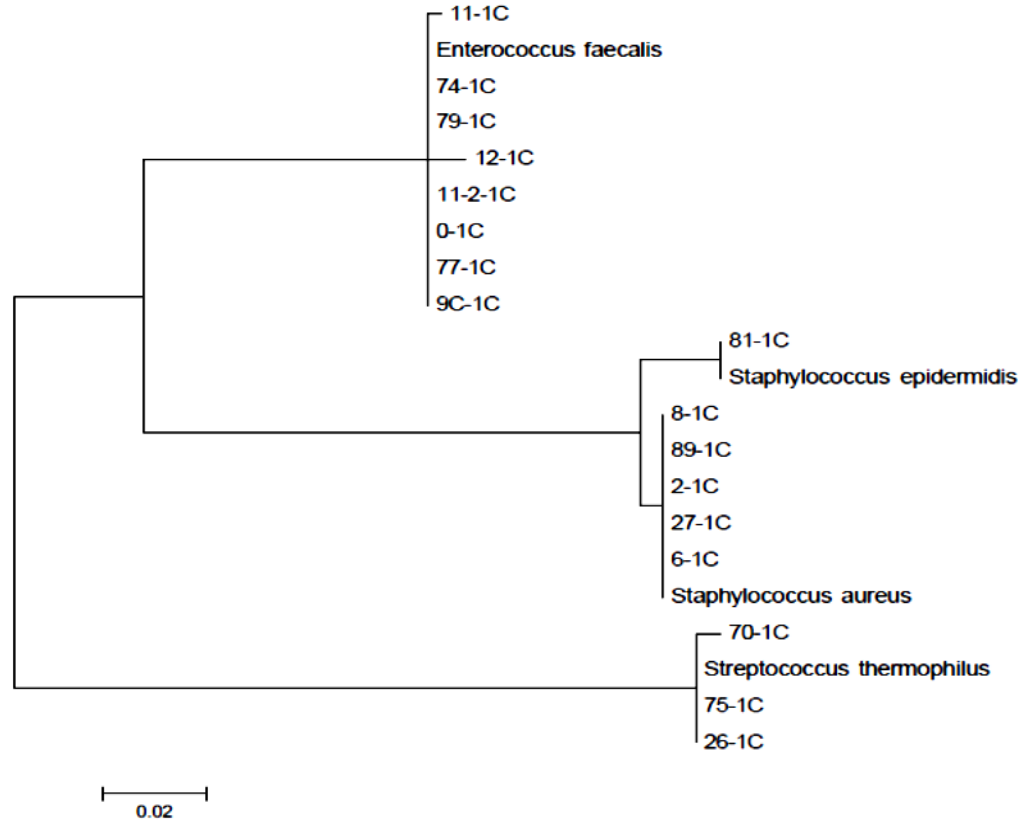
Örnek kodu	EMBL / Gen Bank No	Bakteri Türleri	% Homoloji
ML9/5	KP764119.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain IMAU11365 (YM49-2) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
ML9/5	LC063162.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: JCM 1002	100
ML9/5	KJ776841.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain YML013 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100
ML9/5	KJ939318.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> strain SH3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
ML9/5	KJ939317.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> strain SP1.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
Örnek kodu	EMBL / Gen Bank No	Bakteri Türleri	% Homoloji
ML9/6	LC063162.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: JCM 1002	100
ML9/6	KJ776841.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain YML013 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100
ML9/6	KJ939318.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> strain SH3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
ML9/6	KJ939317.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> strain SP1.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
ML9/6	KJ939316.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> strain CH9-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100



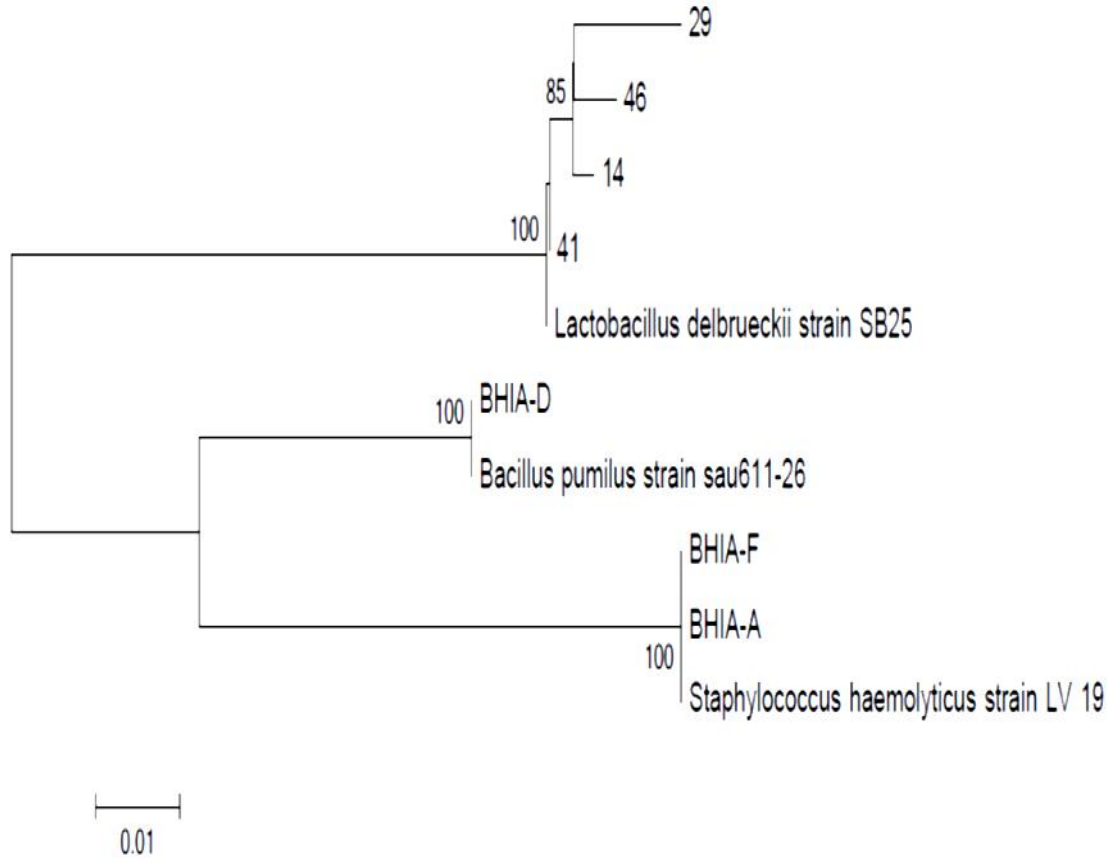
Şekil 4.11. 16S rRNA sekans analizi sonuçlarına göre oluşan dendogramlar.



Şekil 4.11. 16S rRNA sekans analizi sonuçlarına göre oluşan dendogramlar (devam).



Şekil 4.11. 16S rRNA sekans analizi sonuçlarına göre oluşan dendogramlar (devam).

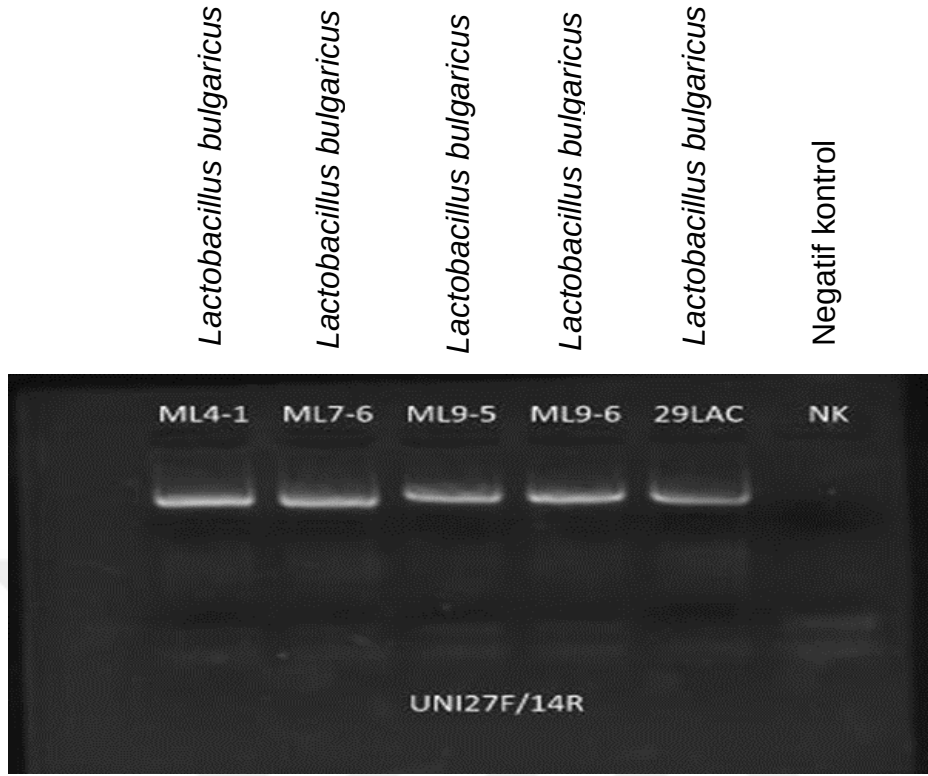


Şekil 4.11. 16S rRNA sekans analizi sonuçlarına göre oluşan dendogramlar (devam).

Dendogramlar incelendiğinde, St27 nolu izolatin, *Streptococcus thermophilus* olarak tanımlandığı ve St89, St56, St71, St73, St81 ve St8 ile birlikte grup oluşturduğu, diğer analizi yapılan örneklerin oluşturduğu gruplardan uzak mesafelerde bir araya geldiği ve düşük düzeyde benzerliği olduğu gösterilmiştir.

Aynı şekilde Lb14, Lb46, Lb29 ve Lb41 nolu izolatların *Lb. thermophilus* olarak tanımlandığı, Lb14, Lb46 ve Lb29'un Lb41'den farklı olarak birbirlerine daha çok benzerlik göstererek ayrı bir grup oluşturduğu görülmektedir. Analizi yapılan diğer örnek gruplarıyla ise farklılıklarının yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir.

ML4-1, ML7-6, ML9-5, ML9-6 ve Lb29 nolu izolatlara ait %1.5 agaroz jel üzerindeki elektroforetogramları Şekil 4.12'de yer almaktadır.



Şekil 4.12. Tanımlanan *Lb. bulgaricus* izolatlarına ait 16S rRNA PZR ürünlerinin % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüleri.

4.6. Antibiyotik Duyarlılık Testi

Gerek MALDI-TOF MS gerekse gerçek-zamanlı PZR analizi ile tanımlanan 61 *S. thermophilus* ve 21 *Lb. bulgaricus* izolatının, 9 farklı antibiyotiğe (gentamisin, tetrasiklin, kloramfenikol, penisilin G, klortetrasiklin, ampisilin, roksitrimosin, linkomisin ve streptomisin) karşı dirençliliği araştırılmıştır. İzolatların antibiyotik dirençliliği, makrodilüsyon tüp yöntemiyle, MİK (Minimum İnhibasyon Konsantrasyonu) değeri belirlenerek tespit edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.12 ve 4.14’de verilmiş, Çizelge 4.11’de verilen EFSA 2008 antibiyotik sınır değerleri ile karşılaştırılarak, izolatların ampisilin, gentamisin, streptomisin, tetrasiklin ve kloramfenikole karşı dirençliliği değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.11. EFSA 2008 antibiyotik sınır değerleri (>, µg/mL) [141].

LAB	Antibiyotik Adı				
	Ampisilin	Gentamisin	Streptomisin	Tetrasiklin	Kloramfenikol
<i>Lactobacillus</i> zorunlu	1	16	16	4	4
homofermentatif <i>S. thermophilus</i>	2	32	64	4	4

Çizelge 4.12. *S. thermophilus* izolatlarının makrodilüsyon tüp yöntemiyle elde edilen MİK sonuçları.

Kültür No	Bölge Adı	Klortetrasiklin	Tetrasiklin	Ampisilin	Roksitrimosin	Penisilin G	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Streptomisin
0	Ermenek	1	32	0.25	2	4	64	4	8	512
1	Ermenek	0.5	32	4	0.25	4	128	32	4	512
2	Ermenek	1	16	2	1	4	64	16	4	256
6	Ermenek	1	32	2	1	4	128	16	32	512
8	Ermenek	0.5	16	0.25	1	4	64	16	>512	>512
9	Ermenek	0.25	32	1	0.5	4	128	16	4	512
10	Ermenek	≤0.125	8	1	0.5	8	64	4	32	64
11	Ermenek	≤0.125	4	1	2	16	128	32	16	64
12	Ermenek	0.25	16	0.5	1	4	128	16	4	>512
23	Ermenek	1	32	≤0.125	0.25	4	512	64	32	>512
26	Ermenek	1	4	≤0.125	0.25	16	128	64	16	256
27	Ermenek	1	16	0.5	1	4	64	16	8	256
33	Ermenek	0.5	8	1	1	>512	64	4	4	512
43	Ermenek	0.25	8	0.5	1	4	128	4	16	512
44	Ermenek	0.25	2	0.25	2	16	128	16		256
48	Ermenek	≤0.125	16	2	2	4	64	16	32	512
49	Ermenek	≤0.125	8	0.5	4	4	128	128	16	512
51	Ermenek	0.5	16	2	4	4	64	4	16	512

Çizelge 4.12. *S. thermophilus* izolatlarının makrodilüsyon tüp yöntemiyle elde edilen MİK sonuçları (devam).

Kültür No	Bölge Adı	Klortetrasiklin	Tetrasiklin	Ampisilin	Roksitrimosin	Penisilin G	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Streptomisin
39	53	Ermenek	≤0.125	32	1	1	>512	>512	>512	>512
	55	Ermenek	1	2	≤0.125	0.5	>512	>512	>512	>512
	56	Ermenek	≤0.125	32	≤0.125	0.5	16	128	16	512
	58	Ermenek	1	8	0.5	0.25	16	128	16	8
	64	Ermenek	0.25	2	0.5	1	>512	>512	>512	>512
	70	Sertavul	0.5	16	1	2	4	128	16	>512
	71	Sertavul	0.25	16	2	4	>512	>512	>512	256
	72	Sertavul	0.25	32	2	0.5	16	128	16	512
	73	Sertavul	0.25	4	1	2	>512	>512	>512	>512
	74	Sertavul	1	8	1	1	4	64	32	4
	75	Sertavul	1	8	1	0.25	4	256	8	>512
	77	Sertavul	0.5	8	≤0.125	1	>512	128	>512	256
	79	Sertavul	≤0.125	8	≤0.125	0.5	256	>512	>512	>512
	80	Sertavul	≤0.125	16	≤0.125	1	>512	>512	>512	>512
	81	Sertavul	≤0.125	32	≤0.125	2	4	>512	16	128
	88	Sertavul	1	4	2	0.25	4	64	4	8
	89	Sertavul	0.5	16	1	2	>512	>512	>512	>512
	90	Sertavul	0.5	16	1	2	>512	>512	>512	>512

Çizelge 4.12. *S. thermophilus* izolatlarının makrodilüsyon tüp yöntemiyle elde edilen MİK sonuçları (devam).

Kültür No	Bölge Adı	Klortetrasiklin	Tetrasiklin	Ampisilin	Roksitrimosin	Penisilin G	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Streptomisin
93	Sertavul	0.5	32	≤0.125	2	>512	>512	>512	>512	>512
94	Sertavul	0.125	4	1	4	>512	>512	>512	>512	>512
95	Sertavul	0.125	8	0.5	1	128	256	>512	256	>512
100	Ermenek	0.5	16	≤0.125	0.5	8	512	>512	>512	>512
124	Mut	1	4	0.5	2	4	128	64	64	>512
139	Mut	1	2	1	1	>512	>512	>512	>512	>512
6-2	Dörtdivan	0.5	32	0.5	0.5	16	128	16	8	>512
11-2	Çömlekçiler	0.5	16	0.25	4	32	128	32	32	512
19-2	Bulanık Köyü	≤0.125	4	≤0.125	2	32	128	64	>512	>512
40-2	Yuvaköy	≤0.125	4	1	1	>512	>512	>512	>512	>512
MS1-1	Merzifon	1	8	1	2	>512	>512	>512	>512	>512
MS2-1	Merzifon	0.5	4	≤0.125	1	>512	>512	>512	>512	>512
MS2-3	Merzifon	≤0.125	8	0.5	4	>512	>512	>512	>512	>512
MS2-4	Merzifon	0.5	16	0.5	1	>512	>512	>512	>512	>512
MS2-5	Merzifon	1	4	2	1	>512	>512	>512	>512	>512
MS2-6	Merzifon	0.25	8	1	2	>512	>512	>512	>512	>512
MS3-1	Merzifon	≤0.125	8	≤0.125	0.5	>512	>512	>512	>512	>512

Çizelge 4.12. *S. thermophilus* izolatlarının makrodilüsyon tüp yöntemiyle elde edilen MİK sonuçları (devam).

Kültür No	Bölge Adı	Klortetrasiklin	Tetrasiklin	Ampisilin	Roksitrimosin	Penisilin G	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Streptomisin
MS3-2	Merzifon	0.5	2	0.25	1	>512	>512	>512	>512	>512
MS3-3	Merzifon	≤0.125	8	2	2	>512	>512	>512	>512	>512
MS3-4	Merzifon	≤0.125	16	1	2	>512	>512	>512	>512	>512
MS3-5	Merzifon	1	32	0.5	1	>512	>512	>512	>512	>512
MS4-1	Merzifon	0.25	4	1	2	>512	>512	>512	>512	>512
MS4-2	Merzifon	0.5	8	≤0.125	2	>512	>512	>512	>512	>512
MS4-3	Merzifon	1	8	≤0.125	0.25	>512	>512	>512	>512	>512
MS4-4	Merzifon	0.5	8	2	2	>512	>512	>512	>512	>512

Çizelge 4.13. *S. thermophilus* izolatlarının antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarının değerlendirilmesi.

Antibiyotik Adı	İzolatların belirlenen MİK değerine (µg/mL) göre dağılımı													EFSA Sınır Değerleri (µg/mL)
	≤0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	≥512	
Ampisilin	15	5	12	18	10	1								2
Gentamisin										10	18	2	31	32
Streptomisin										2		5	54	64
Tetrasiklin		6	4	5	4	8	10	13	11					4
Kloramfenikol						6	1	14	4	4	1		31	4

S. thermophilus izolatlarına ait Çizelge 4.12 ve 4.13’de verilen sonuçlar incelendiğinde, en yüksek dirençliliğin gentamisine (%100), Ermenek bölgesinden alınan yoğurt örneğinden izole edilen 1 nolu izolatın ise tüm antibiyotiklere karşı dirençli olan tek izolat olduğu görülmektedir. Yine Ermenek bölgesinden alınan örneklerden izole edilen 10 ve 11 nolu izolatların streptomisine, 0, 10, 33, 43 ve 51 nolu izolatlar ile Sertavul bölgesinden alınan örnekten izole edilen 88 nolu izolatın kloramfenikole duyarlılığı belirlenmiştir. Analizler sonucunda kloramfenikole karşı dirençlilik %90.2 olarak tespit edilmiştir. Tetrasikline karşı izolatların %73.8’inin dirençli, ampisiline karşı %98.4’ünün duyarlı olduğu saptanmıştır.



Çizelge 4.14. *Lb. bulgaricus* izolatlarının makrodilüsyon tüp yöntemiyle elde edilen MİK sonuçları.

Kültür No	Bölge Adı	Klortetrasiklin	Tetrasiklin	Ampisilin	Roksitrimosin	Penisilin G	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Streptomisin
11	Ermenek	2	16	2	2	32	128	32	256	256
13	Ermenek	1	4	2	1	32	32	16	256	32
15	Ermenek	4	4	1	1	16	64	16	64	32
16	Ermenek	1	8	0.5	1	16	128	32	256	128
17	Ermenek	0.25	16	2	1	8	128	16	64	64
20	Sertavul	0.5	32	0.25	1	8	32	16	64	32
21	Sertavul	1	4	0.5	0.5	16	64	16	256	64
23	Sertavul	≤0.125	4	0.5	1	4	128	32	256	256
24	Sertavul	0.125	4	1	0.25	8	64	8	128	64
25	Sertavul	0.25	8	1	0.25	64	4	8	>512	>512
27	Sertavul	0.5	8	1	1	64	128	64	512	256
29	Mut	0.125	8	0.25	1	4	64	8	64	128
30	Mut	≤0.125	8	0.25	2	8	32	16	256	32
37	Mut	0.5	2	≤0.125	0.5	16	64	32	256	64
39	Mut	≤0.125	2	1	0.25	32	64	32	512	64
41	Mut	1	2	1	0.25	8	128	8	256	256
42	Mut	1	16	0.5	0.5	8	64	16	64	64
44	Mut	1	16	0.25	1	16	128	32	512	64

Çizelge 4.14. *Lb. bulgaricus* suşlarının makrodilüsyon tüp yöntemiyle elde edilen MİK sonuçları (devam).

Kültür No	Bölge Adı	Klortetrasiklin	Tetrasiklin	Ampisilin	Roksitrimosin	Penisilin G	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Streptomisin
46	Mut	0.5	4	0.25	2	8	128	8	256	256
ML4-1	Merzifon	0.5	8	0.5	2	8	64	16	256	128
ML9-5	Merzifon	1	32	2	1	8	64	16	256	64

Çizelge 4.15. *Lb. bulgaricus* izolatlarının antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarının değerlendirilmesi.

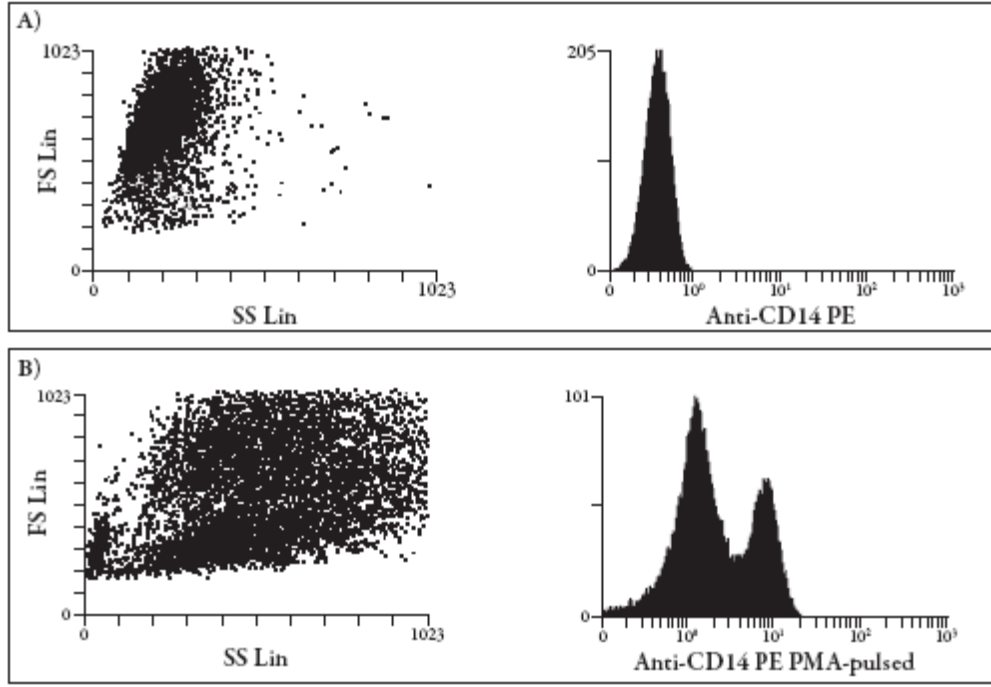
Antibiyotik Adı	İzolatların belirlenen MİK değerine (µg/mL) göre dağılımı													EFSA Sınır Değerleri (µg/mL)
	≤0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	≥512	
Ampisilin	1	5	5	6	4									1
Gentamisin						1			3	9	8			16
Streptomisin									4	8	3	5	1	16
Tetrasiklin					3	6	6	4	2					4
Kloramfenikol							5	9	6	1				4

Lb. bulgaricus izolatlarına ait Çizelge 4.14 ve 4.15’de verilen sonuçlar incelendiğinde, izolatların hepsinin streptomisin ve kloramfenikole karşı dirençli olduğu görülmektedir. Ayrıca Ermenek bölgesinden alınan örneklerden izole edilen 11 ve 17 nolu izolatlar ile Merzifon bölgesinden alınan örnekten izole edilen ML9-5 nolu izolatın değerlendirme yapılan 5 antibiyotiğe karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. Gentamisine karşı yalnızca Sertavul bölgesinden alınan örnekten izole edilen 25 nolu izolatın duyarlı olduğu ve izolatların %95.2’sinin dirençli olduğu görülmüştür. İzolatların en çok duyarlı olduğu antibiyotik %81 ile ampisiline karşı belirlenirken, tetrasikline ise %57.1’inin dirençli olduğu saptanmıştır.

Elde edilen sonuçların daha önce yapılan bazı çalışmalardaki sonuçlar ile karşılaştırılması yapıldığında; Zhou et al. [107], Çin’de üretilen yoğurtlardan izole ettikleri *S. thermophilus* izolatlarının, ampisiline karşı tespit edilen duyarlılık ile *Lb. bulgaricus* izolatlarının tetrasikline dirençlilik değerlerinin, Çelik et al. [109], Konya ili çevresinden temin edilen ticari ve ev tipi yoğurtlardan izole ettikleri *S. thermophilus* izolatlarının, ampisiline duyarlılığının, *Lb. bulgaricus* izolatlarının kloramfenikole karşı dirençliliğinin, Alp ve Öner [110], Isparta ili sınırlarında temin edilen beyaz ve kaşar peyniri örneklerinden izole ettikleri Laktobasil izolatlarının ampisilin ve tetrasikline duyarlılık sonuçlarının benzer olduğu görülmüştür.

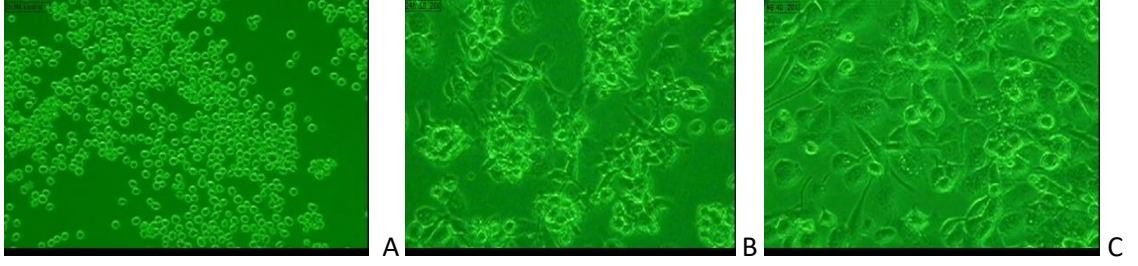
4.7. İmmün Sistem Yanıtları

Farklılaşmamış THP-1 hücrelerinde CD14 ekspresyonu düşük iken PMA ile 72 saat uyarıldıktan sonra anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.13). PMA ile uyarılma sonrası iğ şeklinde hücresel uzama, çekirdek/sitoplazma oranında artış, solgun bir sitoplazma ve daha belirgin bir granül oluşarak sitoplazmada vakuoller meydana gelmiştir (Şekil 4.14).

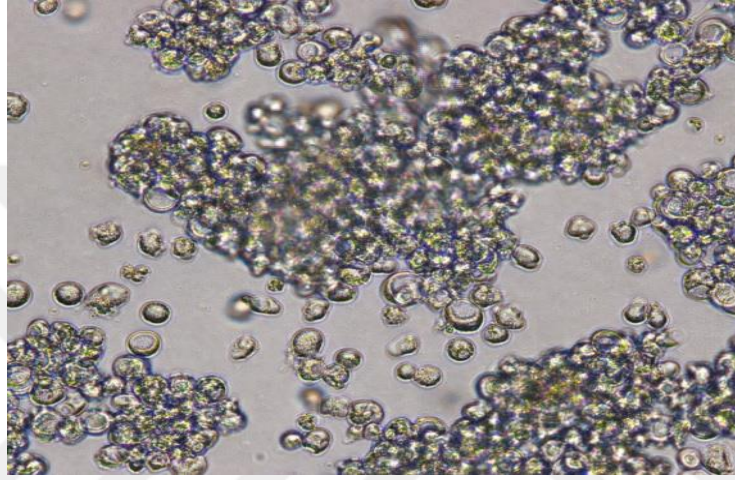


Şekil 4.13. Monositik hücrelerin PMA ile uyarılarak CD14 ekspresyonunda artışın flowsitometrik olarak gösterilmesi.

Normal monositer hücreler deki (A) CD14 yüzey reseptör ekspresyonu, 72 saat süresince 20 ng/mL PMA ile uyarıldıktan sonra (B) anlamlı düzeyde artmıştır.

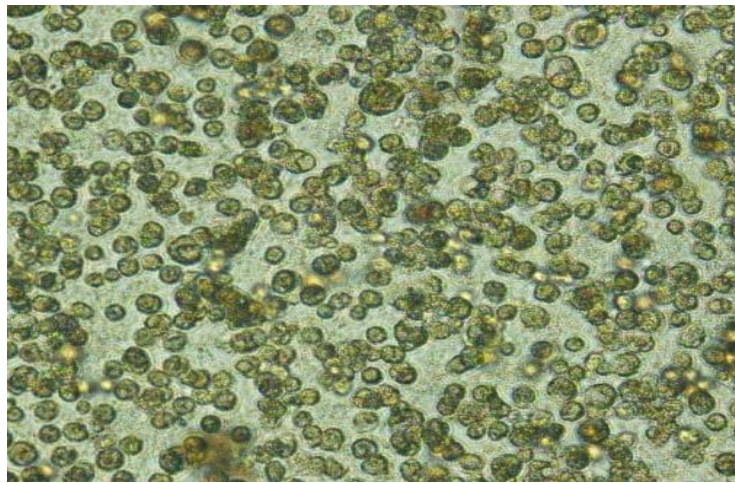


Şekil 4.14. Normal THP-1 (A), PMA uyarımı ile makrofaja dönüşen THP-1 hücrelerinin 48 ve 72. saat (B,C) faz kontrast görüntüleri.

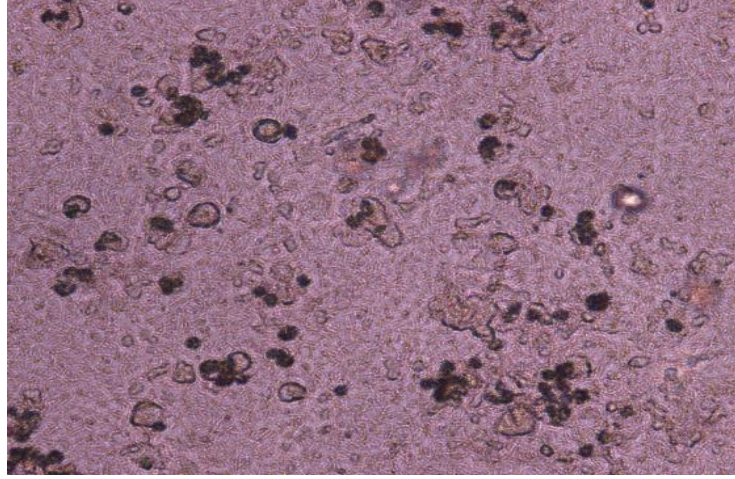


Şekil 4.15. Normal K-562 hücreleri.

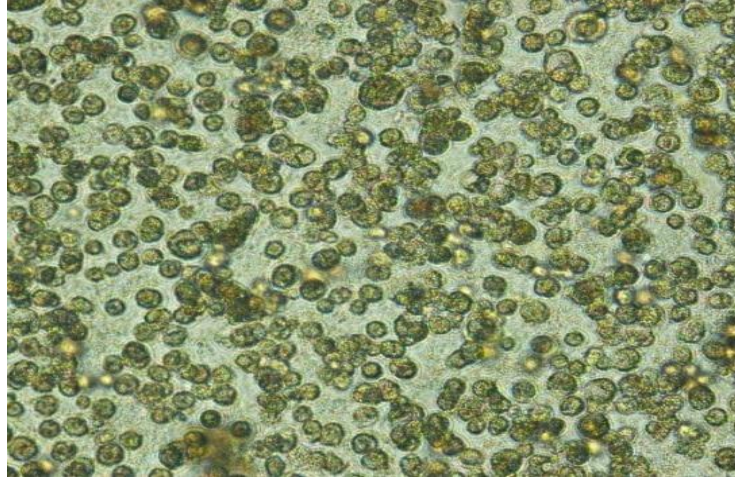
4.8. İzolatların NK Hücreleri ve THP-1 Makrofajları ile Etkileşimi Sonuçları



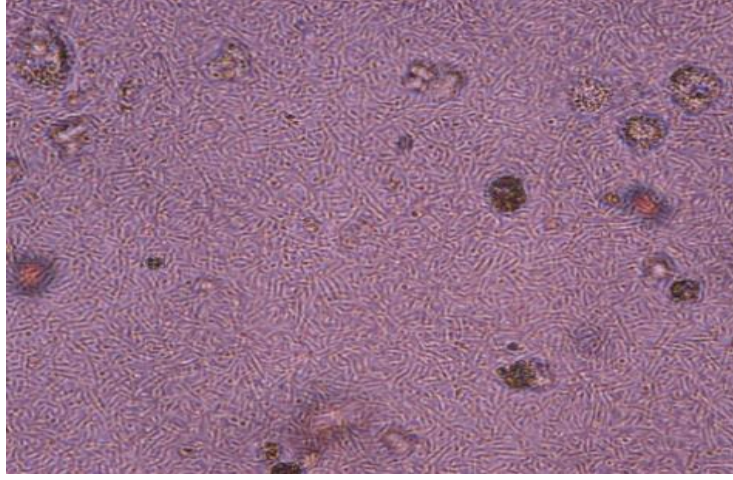
Şekil 4.16. Lb25 nolu izolatın K-562 hücre dizisi ile etkileşimi. Hücre sayısı belirgin artmış.



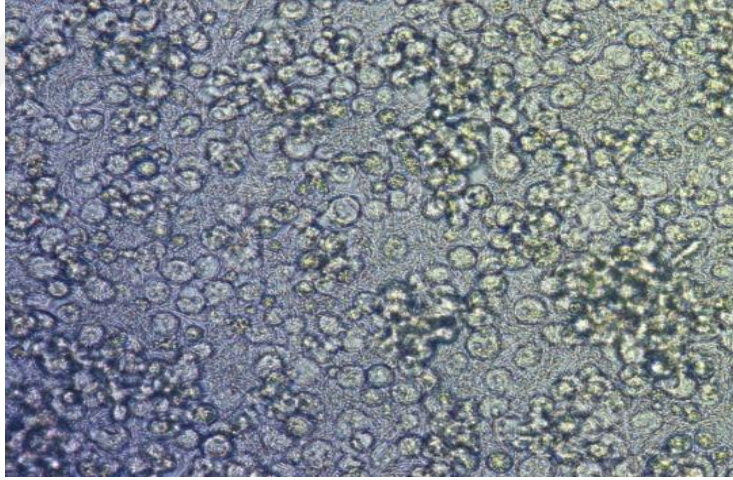
Şekil 4.17. Lb25 nolu izolatin THP-1 hücre dizisi ile etkileşimi. Hücre sayısı artmış.



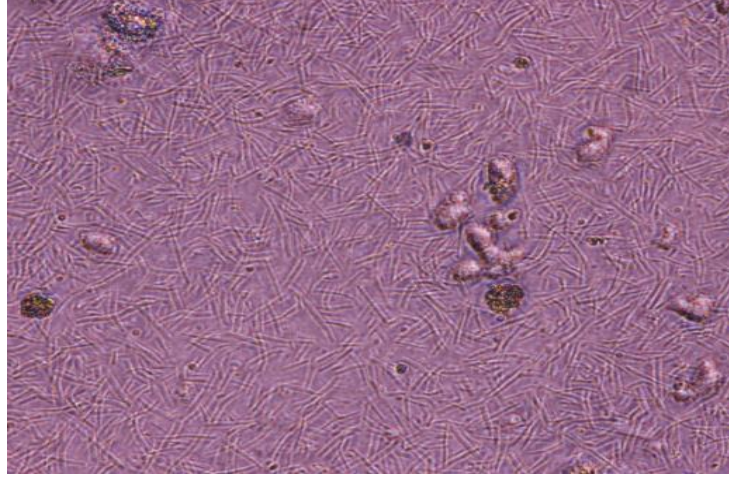
Şekil 4.18. Lb29 nolu izolatin K-562 hücre dizisi ile etkileşimi. Hücre sayısı belirgin artmış.



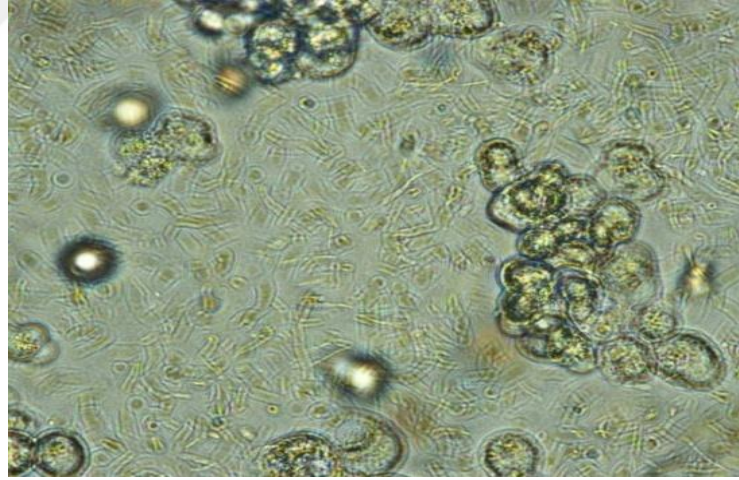
Şekil 4.19. Lb29 nolu izolatın THP-1 hücre dizisi ile etkileşimi. Hücre sayısı artmış.



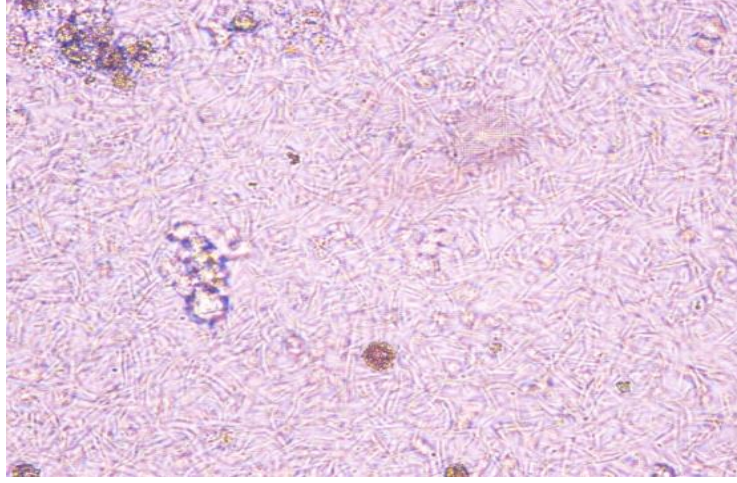
Şekil 4.20. ML9-6 nolu izolatın K-562 hücre dizisi ile etkileşimi. Hücre sayısı artmış.



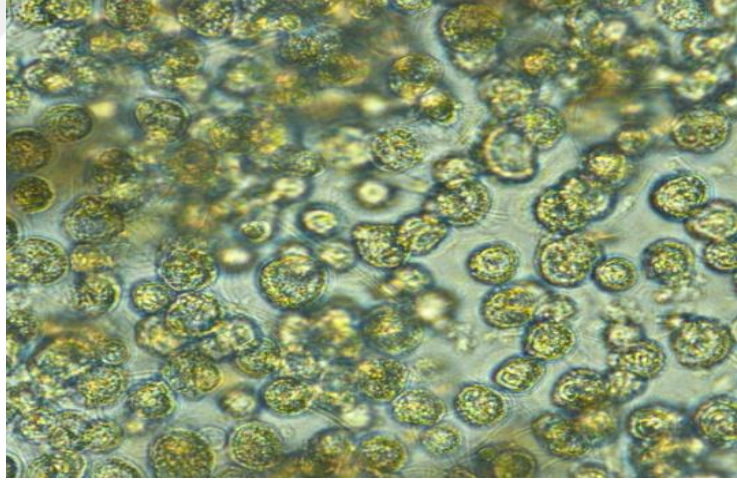
Şekil 4.21. ML9-6 nolu izolatin THP-1 hücre dizisi ile etkileşimi. Hücre sayısı artmış.



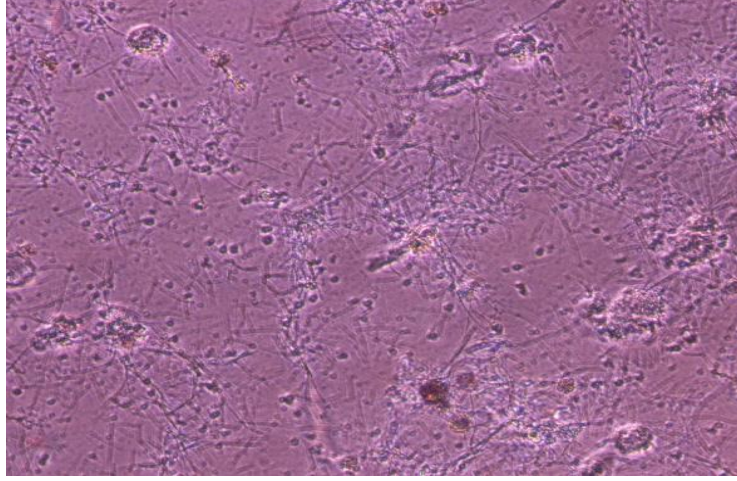
Şekil 4.22. ML7-6 nolu izolatin K-562 hücre dizisi ile etkileşimi. Hücre sayısı artmış.



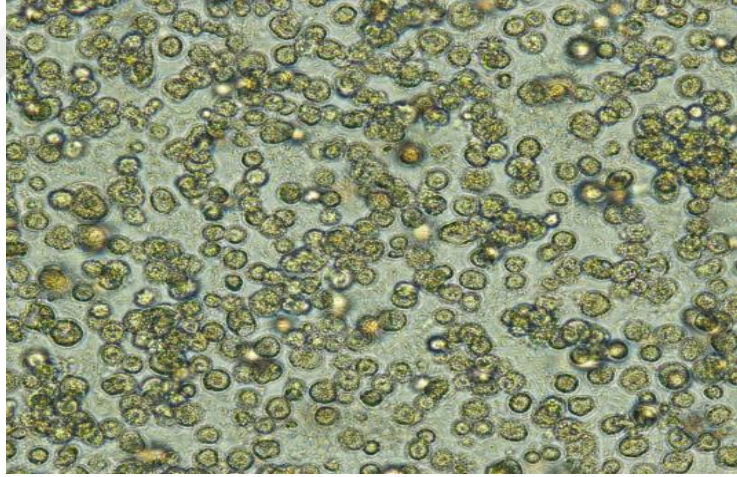
Şekil 4.23. ML7-6 nolu izolatın THP-1 hücre dizisi ile etkileşimi. Hücre sayısı artmış.



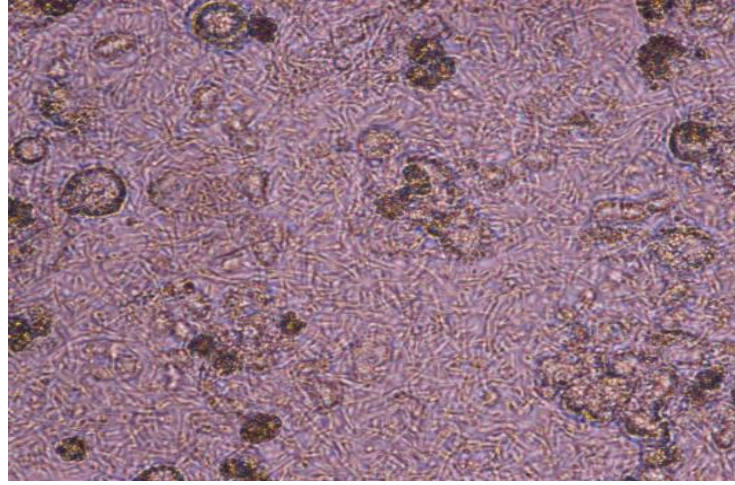
Şekil 4.24. Lb46 nolu izolatın K-562 hücre dizisi ile etkileşimi. Hücre sayısı artmış.



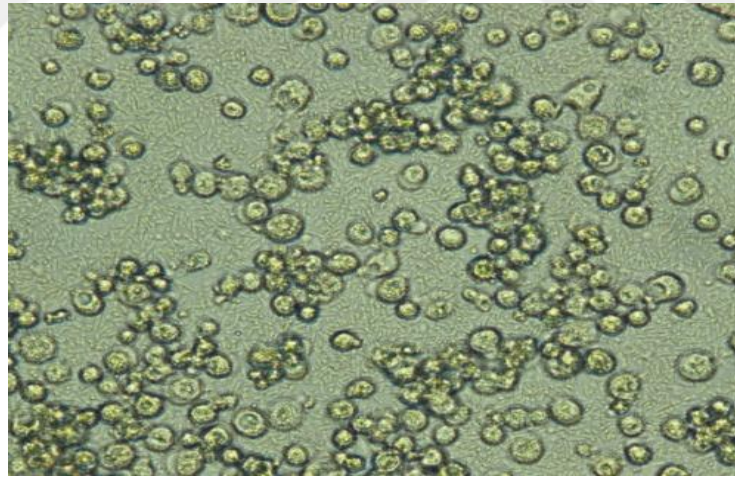
Şekil 4.25. Lb46 nolu izolatin THP-1 hücre dizisi ile etkileşimi. Hücre sayısı artmış.



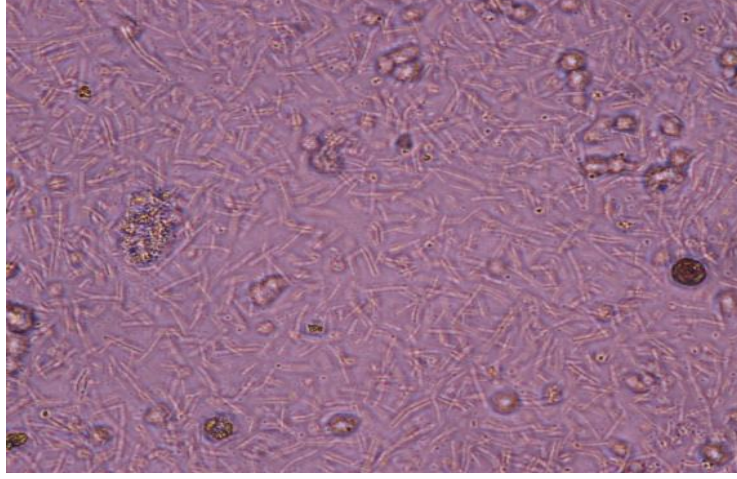
Şekil 4.26. ML4-1 nolu izolatin K-562 hücre dizisi ile etkileşimi. Hücre sayısı artmış.



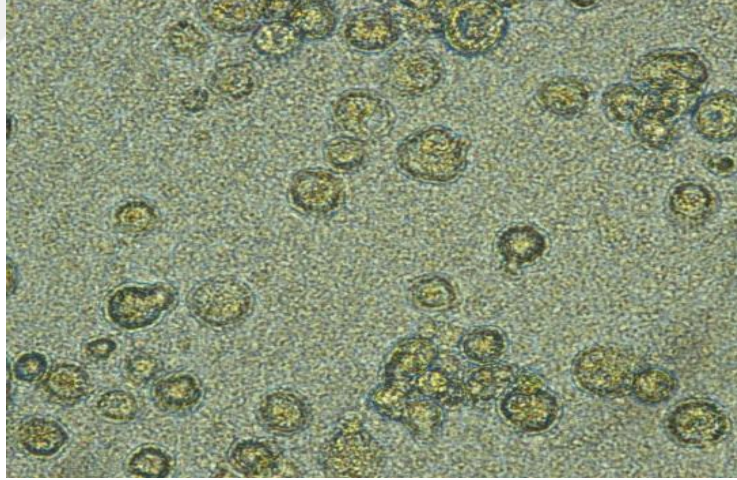
Şekil 4.27. ML4-1 nolu izolatin THP-1 hücre dizisi ile etkileşimi. Hücre sayısı artmış.



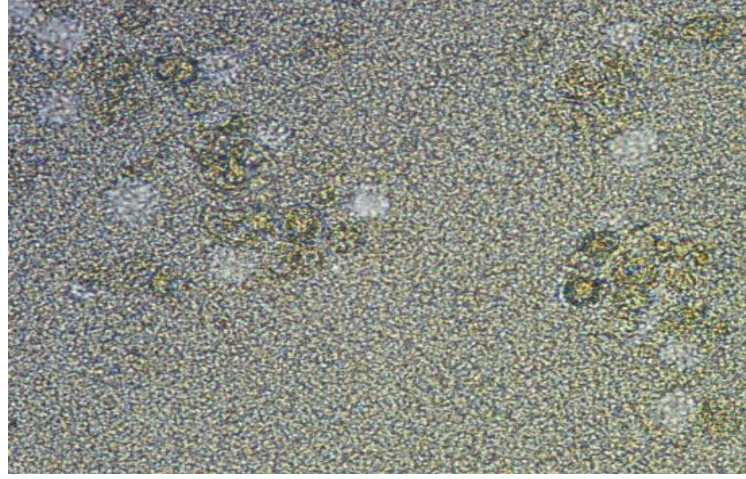
Şekil 4.28. ML9-5 nolu izolatin K-562 hücre dizisi ile etkileşimi. Hücre sayısı artmış.



Şekil 4.29. ML9-5 nolu izolatın THP-1 hücre dizisi ile etkileşimi. Hücre sayısı artmış.



Şekil 4.30. St27 nolu izolatın K-562 hücre dizisi ile etkileşimi. Hücre sayısı azalmış.

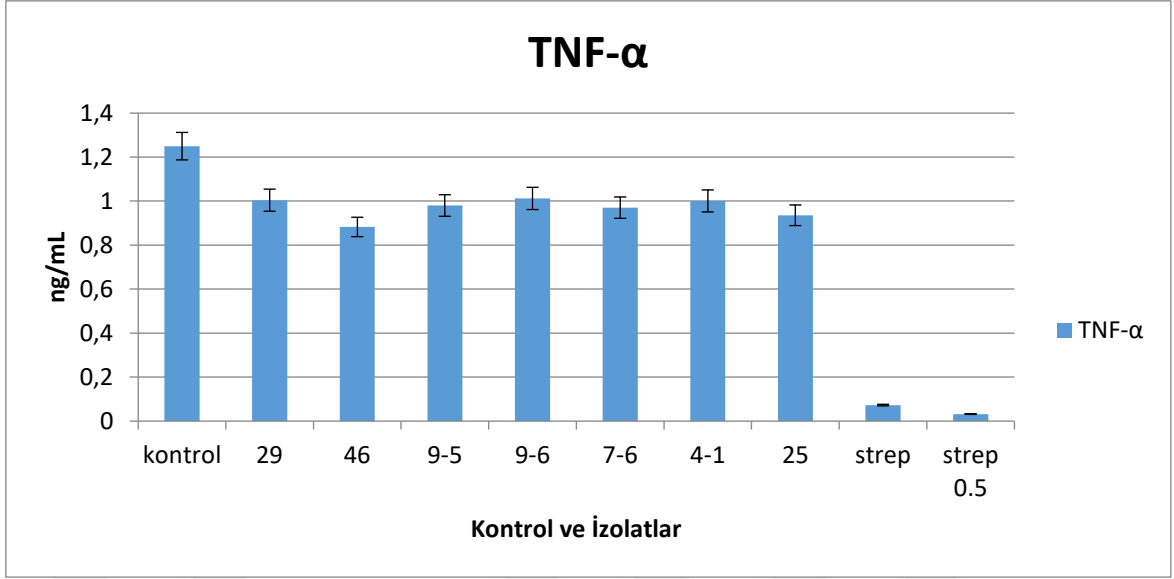


Şekil 4.31. St27 nolu izolatın THP-1 hücre dizisi ile etkileşimi. Hücre sayısı azalmış.

K-562 ve THP-1 hücre dizilerinin, LAB izolatları ile ayrı ayrı etkileşimleri incelendiğinde, immunolojik etkilerinde paralellik tespit edilmiştir. Her iki hücre dizisinin immunolojik etkinliğinin karşılaştırılması, proinflamatuvar ve anti inflamatuvar sitokin oluşturma düzeylerinin belirlenmesiyle yapılmıştır.

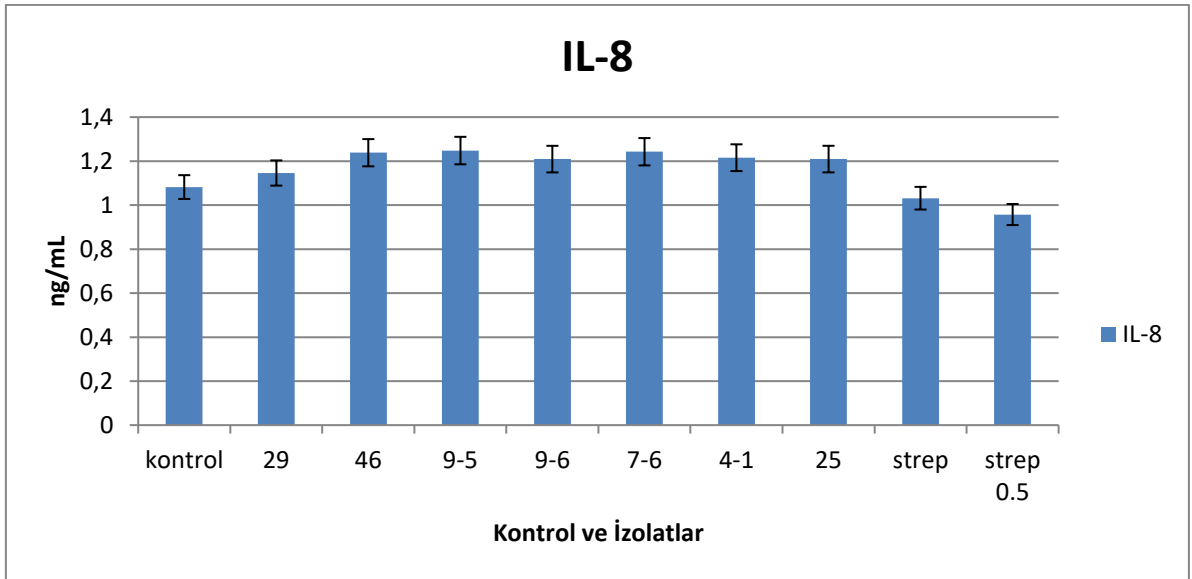
4.9. Sitokin Yanıtları

NK hücreleri ve THP-1 makrofaj hücre kültürleri birbirinden ayrı olarak, sekiz LAB izolatı ile uyarılarak oluşan sitokin yanıtları değerlendirilmek üzere alınan süpernatantlardan ELISA test kitleri ile TNF- α , IL-8 ve IL-10 ölçümleri yapılmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.



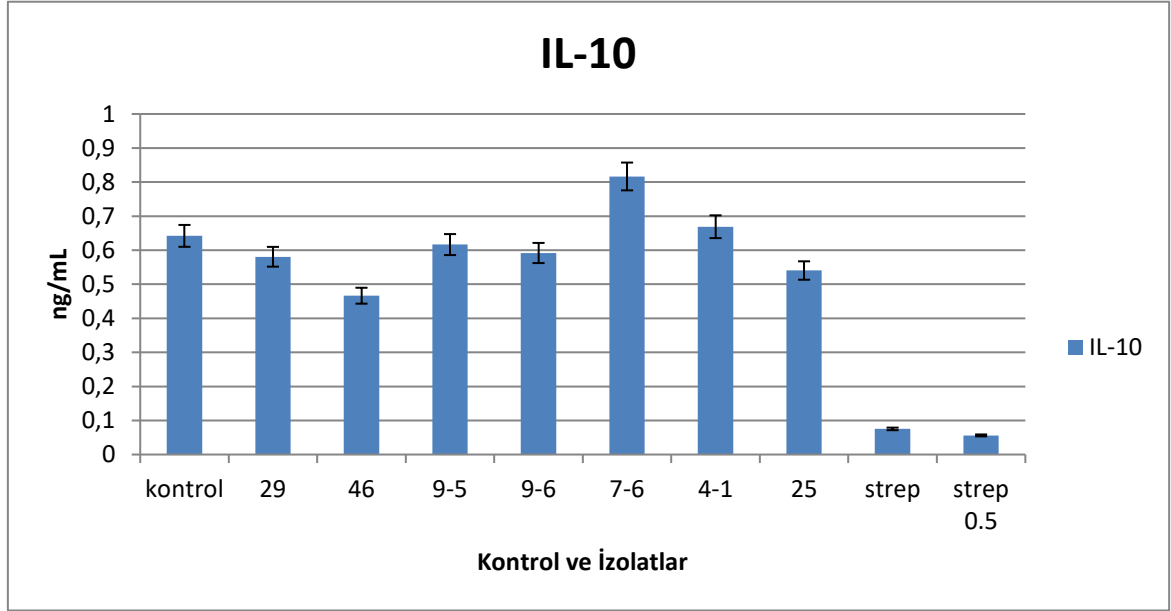
Şekil 4.32. LAB izolatlarının THP-1 hücre dizisinde TNF- α sekresyonuna etkisi.

THP-1 makrofaj hücrelerinin LAB ile uyarılması sonucu TNF- α oluşumu laktobasillerde, en yüksek Lb-29, Lb 9-6 ve Lb 4-1 izolatlarında tespit edilirken, en düşük oluşum Lb 46 izolatında elde edilmiştir. Streptokok izolatlarının TNF- α oluşumunun laktobasil izolatlarına göre anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.33. LAB izolatlarının THP-1 hücre dizisinde IL-8 sekresyonuna etkisi.

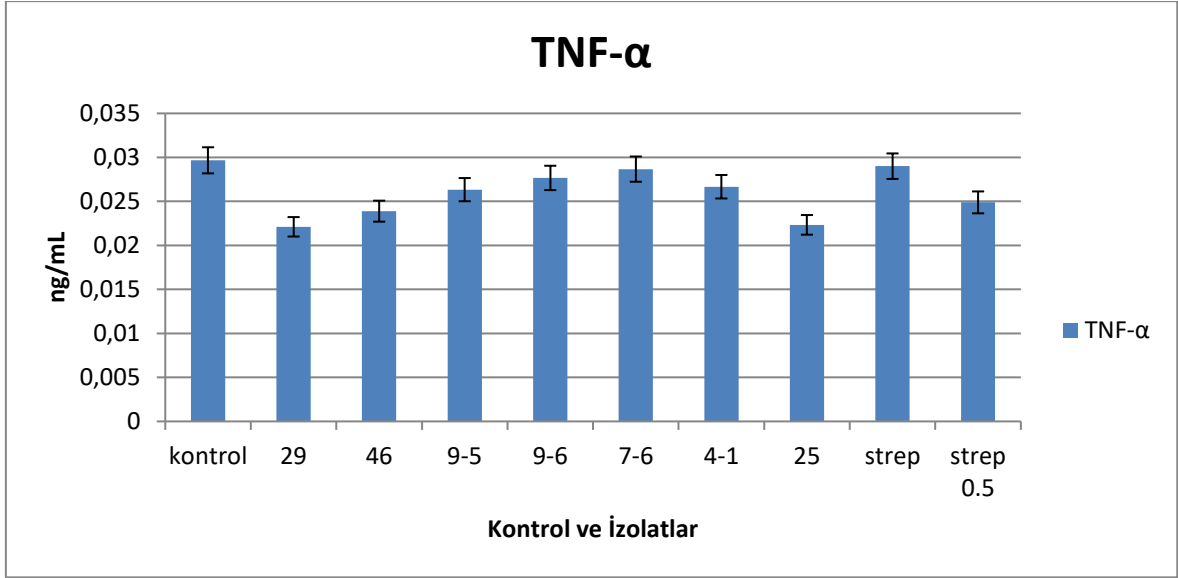
Laktobasil izolatlarının tümünde IL-8 oluşumu kontrol değerinin üzerinde elde edilirken, Streptokok izolatları kontrol değerinin altında tespit edilmiştir. Lb46 ve ML9-5 izolatları en yüksek IL-8 oluşumunu sağlarken, Strep 0.5 izolatı en düşük oluşumu sağlamıştır.



Şekil 4.34. LAB izolatlarının THP-1 hücre dizisinde IL-10 sekresyonuna etkisi.

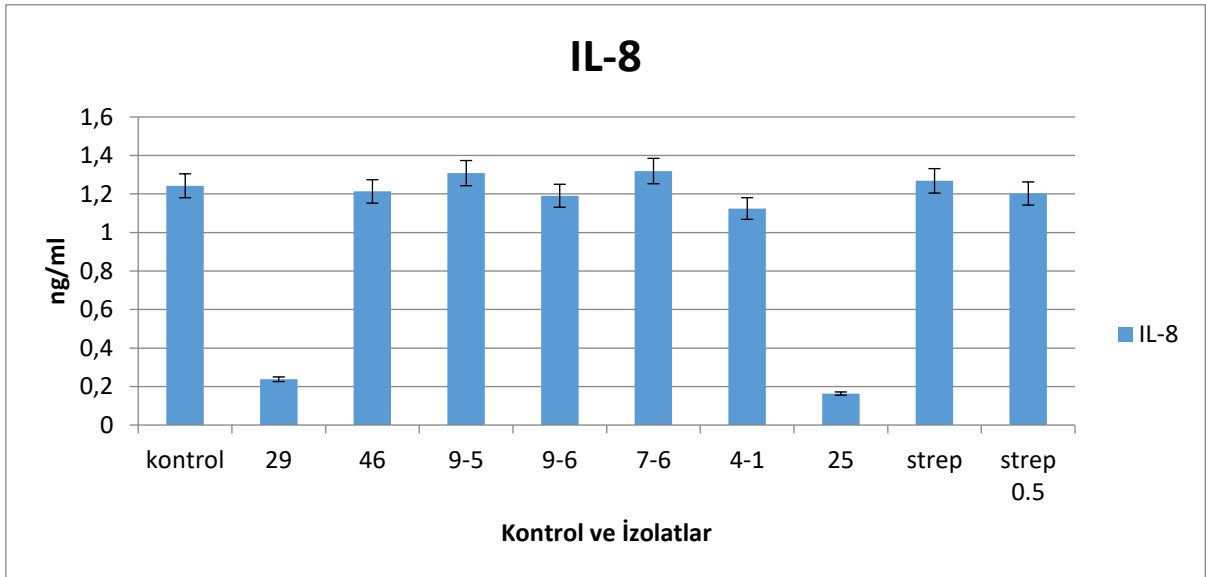
Lb 7-6 izolatı en yüksek düzeyde IL-10 sekresyonu oluştururken, laktobasiller arasında en düşük değer Lb46 izolatına aitti. Diğer sonuçlarla paralel olarak streptokok izolatları laktobasil izolatlarına göre daha düşük IL-10 meydana getirmiştir. ML7-6 ve ML4-1 izolatları kontrol değerinin üzerinde sekresyona neden olmuştur.

THP-1 hücre dizisinde, TNF- α ve IL-10 sekresyonunda laktobasiller ve streptokok izolatları arasında anlamlı bir fark meydana geldiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.35. LAB izolatlarının K-562 hücre dizisinde TNF- α sekresyonuna etkisi.

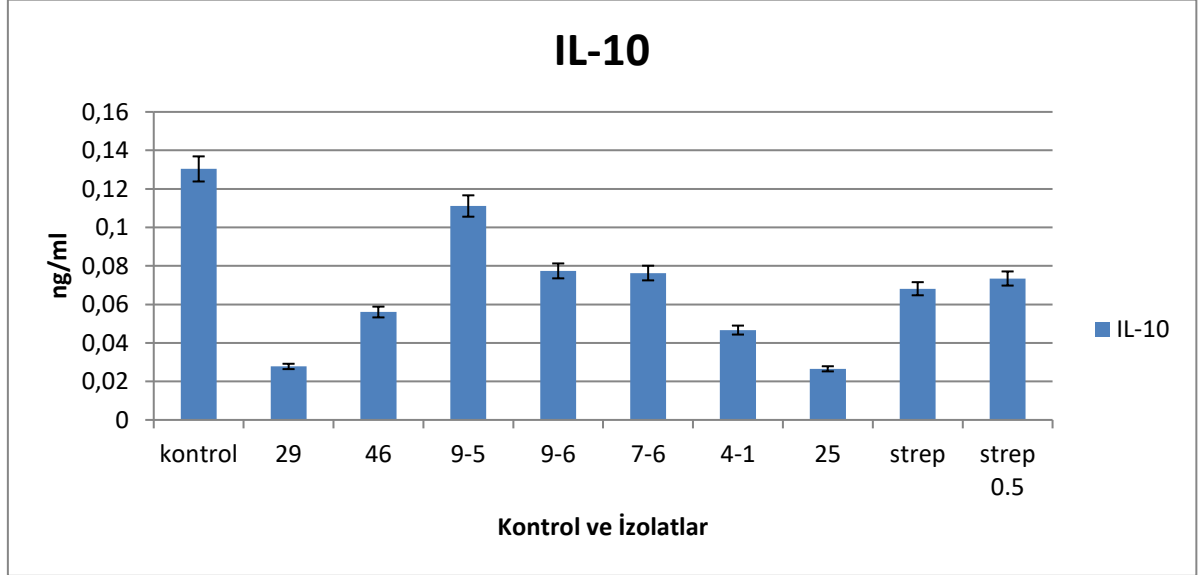
K-562 hücre dizisinin LAB ile uyarımı sonucunda, en yüksek TNF- α oluşumu strep izolatında elde edilirken, laktobasil izolatları arasında en yüksek değer ML7-6, en düşük değer Lb29'da tespit edilmiştir. İki ayrı grubun içlerinde yapılan değerlendirmede anlamlı bir fark bulunamamıştır. Tüm izolatlar kontrol değerinin altında sekresyona neden olmuştur.



Şekil 4.36. LAB izolatlarının K-562 hücre dizisinde IL-8 sekresyonuna etkisi.

Streptokok izolatlarının K-562 hücre dizisini uyarması sonucu elde edilen IL-8 oluşum değerleri birbirine yakın tespit edilirken, laktobasil izolatları arasında anlamlı

bir fark elde edilmiştir. En yüksek değer ML7-6'da, en düşük değer Lb25'te bulunmuştur.



Şekil 4.37. LAB izolatlarının K-562 hücre dizisinde IL-10 sekresyonuna etkisi.

IL-10 oluşum değerleri incelendiğinde, en yüksek değer ML9-5'te bulunmuş, en düşük değer Lb25'te elde edilmiştir. ML9-5, ML9-6 ve ML7-6 izolatlarında, streptokok izolatlarına göre daha yüksek IL-10 oluşurken, tüm izolatlar kontrol değerinin altında IL-10 sekresyonuna etki etmiştir.

Aynı izolatların ayrı ayrı K-562 ve THP-1 hücre dizilerini uyarması sonucu elde edilen değerler karşılaştırıldığında, ML9-6 ve ML7-6 izolatlarının IL-10, streptokok izolatlarının TNF- α ve IL-8, Lb25'in IL-8 ve IL-10 oluşumunda anlamlı farklar tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında laktobasillerle uyarımın PMA ile farklılaştırılmış THP-1 hücrelerinde streptokoklara göre anlamlı şekilde yüksek proinflatuvar sitokin cevabı oluşturulduğu görülmektedir

Laktobasil şuşlarından özellikle 25 ve 29 nolu izolatların IL-8 sekresyonunu baskıladığı ve otoimmün cevabın düzenlenmesinden önemli rol alabileceği düşünülmektedir.

Kullandığımız farklı hücre dizileri, farklı LAB'leri ile birlikte etkileşimi sırasında, hücre dizilerinin birbirinden farklı yanıt vermesi ve sitokin oluşturması diğer hücre dizilerinin de yapılacak çalışmalarda etkileşimin farklı olacağını göstermektedir.

Doğal immün sistemimizin elemanlarından olan NK hücreleri ve makrofajların LAB ile etkileşimiyle elde edilen sonuçların, proinflatuvar ve anti inflamatuvar tepkilerin anlaşılması hususunda önemli katkısı olacağı değerlendirilmektedir.



5. SONUÇLAR

112D052 kodlu “Geleneksel Yoğurt Örneklerinden İzole Edilen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* izolatlarının Endüstriyel Yoğurt Üretimine Uygunluğunun Saptanarak Starter Kombinasyonlarının Geliştirilmesi” adlı SAN-TEZ projesi ile desteklenen tez çalışmasında, Türk Halkı’nın damak zevkine uygun yoğurt üretiminin yapılabilmesi ve doğrudan yabancı starter kültür üreticilerine olan bağımlılığın azaltılması amacıyla yerel kaynaklardan izole edilmiş yoğurt starter kültürlerinin proteomik/genomik yöntemlerle tanımlanması, antibiyotik dirençliliğinin ve immün sisteme etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Bu çerçevede, ülkemizin çeşitli bölgelerinden alınan geleneksel yöntemlerle üretilen toplam 39 yoğurt örneğinden, şüpheli 153 *S. thermophilus* ve 28 *Lb. bulgaricus* izolatı elde edilmiştir.

Elde edilen izolatların sırasıyla, MALDI-TOF MS, gerçek-zamanlı PZR ve 16S rRNA sekans analizleri yapılmıştır.

MALDI-TOF MS ile yapılan analiz sonucunda, 53 *S. thermophilus* ve 23 *Lb. bulgaricus* izolatının, gerçek-zamanlı PZR ile yapılan analiz sonucunda, 49 *S. thermophilus* ve 22 *Lb. bulgaricus* izolatının tanımlaması yapılmıştır. Her iki yöntemle yapılan tanımlama sonuçlarının, *S. thermophilus* için %92.4, *Lb. bulgaricus* için %95.7 oranında uyduğu görülmüştür.

16S rRNA sekans analizinde 1 *S. thermophilus* ve 9 *Lb. bulgaricus* izolatının tanımlaması yapılmıştır. Diğer iki analiz sonucu ile arasında meydana gelen uyumsuzluk, daha önce tanımlaması yapılan izolatların ticari kökenli olması sebebiyle özelliklerini yitirmesinden kaynaklı olabileceği şeklinde değerlendirilmiştir.

Çalışmada MALDI-TOF MS ve/veya gerçek-zamanlı PZR ile yapılan 61 *S. thermophilus* ve 21 *Lb. bulgaricus* izolatının 9 farklı antibiyotiğe (gentamisin, tetrasiklin, kloramfenikol, penisilin G, klortetrasiklin, ampisilin, roksitrimosin, linkomisin ve streptomisin) karşı dirençlikleri makro dilüsyon tüp yöntemiyle, MİK (minimum inhibasyon konsantrasyonu) değeri belirlenerek tespit edilmiştir. Sonuçlar EFSA 2008 antibiyotik sınır değerlerine göre değerlendirilmiştir.

S. thermophilus izolatlarının gentamisine, *Lb. bulgaricus* izolatlarının ise streptomisin ve kloramfenikole %100 dirençli olduğu belirlenirken, *S. thermophilus*

izolatlarının kloramfenikole %90.2, tetrasikline %73.8, *Lb. bulgaricus* izolatlarının gentamisine %95.2, tetrasikline %57.1 dirençli olduğu, tüm izolatların en çok duyarlı olduğu antibiyotik ampisilin olarak tespit edilmiştir.

Antibiyotik direnç genlerinin yayılımında tüketilen gıdaların etkili olduğu düşünüldüğünde, özellikle hayvan sağlığı ile ilgili sorunlarda sıklıkla antibiyotiklere başvurulmasının antibiyotik dirençliliğinin artışında önemli kaynak olacağı açıktır. Çalışmamız ile ortaya konan, geleneksel yöntemlerle üretilen yoğurt örneklerinden izole edilen izolatların yüksek antibiyotik dirençliliği, hayvanlara uygulanan antibiyotiklerin dirençliliği ciddi düzeyde arttırdığı sonucunu desteklemektedir.

Bu sebeple, üretimde kullanılacak starter kültürlerin, periyodik olarak antibiyotik dirençlik testlerinin yapılması gerekmektedir.

Genellikle LAB'nin, immun sistemi etkileyerek anti inflamatuvar sitokinler olan IL-10 düzeylerini arttırırken TNF- α , ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokin üretimini düşürmektedir. Ayrıca INF- γ TGF- β sekreyonunu değiştirerek immunmodulatuar etki gösterebilirler [142].

Çalışma kapsamında LAB, immun sistemin önemli hücreleri olan monosier hücreler ve doğal katil hücreleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, immün sisteme etkileri araştırılan LAB'nin, herbirinin farklı hücre proliferasyonu etkisinin ve doğal bağışıklık sisteminde rol alan mediatörlere etkileri olabileceğini göstermiştir.

Hücre dizilerinin St27 nolu izolat ile etkileşimi sonucu meydana gelen hücre sayısında azalma ile tespit edilen sitokin düzeyleri, tüketime sunulacak yoğurdun içerisinde bulunması durumunda, doğal bağışıklık sisteminin ve alerjik yanıtın yüksek düzeyde olabileceği riskini ortaya koymaktadır.

Çalışma kapsamında izole edilen LAB'nin; immun hücreler olan THP-1 makrofaj ve NK hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı gözlenmiştir. Değerlendirilen sitokin cevapları da immun modulatuar etkilerini destekleyici yöndedir. Lb25, Lb29, ML4-1, ML7-6 nolu izolatların doğrudan veya bulunduğu yoğurtların tüketilmesinin sağlıklı bireyler için gıda takviyesi olma ve immun sistemi güçlendirebileceği yönünde potansiyel ürün olabileceği belirlenmiştir. Bu bakterilerin immun modulatuar etkilerini değerlendirmek üzere ileri *in vitro*, *in vivo* çalışmalar yapılması ile sağlık etkilerinin

daha doğru değerlendirilmesi ve etki mekanizmalarının açıklanması mümkün olacaktır.



KAYNAKLAR

- [1] Pamir, H.. *Fermantasyon Mikrobiyolojisi*, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, **1985**.
- [2] Blandino, A., Al-Aseeri, M.E., Pandiella, S.S., Cantero, D., Webb, C., Cereal-Based Fermented Foods And Beverages, *Food Research International*, 36, 527-543, **2003**.
- [3] İzmen, E.R., *Silivri Yoğurdunun Yapılışı ve Terkibi Hakkında Araştırmalar*, Yüksek Ziraat Enstitüsü Çalışmaları, 11, Ankara, **1935**.
- [4] Yöney, Z., *Fermente olmuş süt mamülleri teknolojisi*, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Ankara, **1959**.
- [5] Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi, Yoğurt, *Gıda Teknolojisi*, Ankara, **2008**.
- [6] Metchnikoff, I.I., Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. *The Prolongation of Life: Optimistic Studies*, The Knickerbocker Press, 161-183, **1908**.
- [7] T.S.E., *Mamul Gıdalar İhtisas Grubu-Yoğurt*, TS 1330, **2006**.
- [8] Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, *Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği*, Tebliğ No:2009/25, **2009**.
- [9] Halkman, A.K., Taşkın, Y., AOÇ Yoğurtta Ne Yaptık?, *8. Gıda Mühendisliği Kongresi*, 07-09 Kasım, Ankara, **2013**.
- [10] Chandan, R.C., Gandhi, A., Shah, N.P., Yogurt: Historical background, health benefits, and global trade. *Yogurt in Health and Disease Prevention*, (ed: Shah N.P.), Academic Press, 4-29, **2017**.
- [11] Gürbüz, M., Başkaya, C., Aksaray'da yoğurt tüketim alışkanlıkları anketi, *III. Süt ve Süt Hayvancılığı Öğrenci Kongresi*, 21 Mayıs, Aksaray, **2012**.
- [12] Yalçın, A., Yoğurt ve ayran üretiminde probiyotik bakterilerin kullanımı, *III. Süt ve Süt Hayvancılığı Öğrenci Kongresi*, 21 Mayıs, Aksaray, **2012**.

- [13] Morelli, L., Bacteria in yogurt and strain-dependent effects on gut health, *Yogurt in Health and Disease Prevention*, (ed:Shah N.P.), Academic Press, 395-410, **2017**.
- [14] Özden, A., İnsan beslenmesinde yoğurdun yararlı etkileri, *Güncel Gastroenteroloji*, 13/4, 227-231, Aralık **2009**.
- [15] Adolfsson, O., Medani, S.N., Russell, R.M., Yogurt and gut function, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 245-256, **2004**.
- [16] Plessas, S., Bosnea, L., Alexopoulos, A., Bezirtzoglou, E., Potential effects of probiotics in cheese and yogurt production, *Engineering in Life Sciences*, 12 (4), 433-440, **2012**.
- [17] Tamime, A.Y., Robinson, R.K., Nutritional value of yoghurt, *Tamime and Robinson's Yoghurt Science and Technology*, Third Edition, CRC Press, 646-684, **2007**.
- [18] Yurul, M., Saçık, R., Yoğurt üretimine yeni bir bakış, *III. Süt ve Süt Hayvancılığı Öğrenci Kongresi*, Aksaray, 358-365, **2012**.
- [19] McCance, R.A., Widdowson, E.M., Milk and milk products. *McCance and Widdowson's The Composition of Foods*, Sixth Edition, Royal Society of Chemistry, Cambridge and the Food Standards Agency, 83-124, **2002**.
- [20] Yıldız, M.S., Baran, Z., Kalite fonksiyon göçerimi ve homojenize yoğurt üretiminde uygulaması, *Ege Akademik Bakış*, cilt:11, sayı:1, 59-72, **2011**.
- [21] Güleş, H.K., Bülbül, H. Yenilikçilik-işletmeler için stratejik rekabet aracı, 1. Baskı, Nobel Yayınları, **2004**.
- [22] Sofyalıoğlu, Ç., Tunail, İ., Kano modelinin kalite fonksiyon göçerimi planlama matrisinde kullanımı, *Ege Akademik Bakış*, cilt:12, sayı:1, 125-135, **2012**.
- [23] Korkmaz, A.G., *Yoğurt ve peynir için starter kültür üretimi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, **2011**.
- [24] Leroy, F., De Vuyst, L., Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry, *Trends in Food Science and Technology*, 15, 67-78, **2004**.

- [25] Yıldız, F., Overview of yoghurt and other fermented dairy products. *Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products*, (ed:Yıldız, F.), CRC Press, **2010**.
- [26] Lortal, S., Chapot-Chartier, M.P., Role mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese, *International Dairy Journal*, 15, 857-871, **2005**.
- [27] Chandan, R.C., An overview of yogurt production and composition. *Yogurt in Health and Disease Prevention*, (ed: Shah, N.P.), Academic Press, 31-47, **2017**.
- [28] Gürakan, G.C., Altay, N., Yogurt microbiology and biochemistry, *Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products*, (ed:Yıldız, F.), CRC Press, 97-121, **2010**.
- [29] Fedele, P., Seraglia, R., Battistotti, B., Pinelli, C., Traldi, P., Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for monitoring bacterial protein digestion in yogurt production, *Journal of Mass Spectrometry*, 34, 1338-1345, **1999**.
- [30] Beshkova, D., Simova, E., Frengova, G., Simov, Z., Production of flavour compounds by yogurt starter cultures, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20, 180-186, **1998**.
- [31] Ray, B., Microbial growth characteristics. *Fundamental Food Microbiology*, 57-65, CRC Press LLC, **2004**.
- [32] Üstünol, Z., Dairy starter cultures. *Dairy Microbiology and Biochemistry Recent Developments*, (eds: Özer, B.H., Akdemir Evrendilek, G.), 39-67, Taylor & Francis Group, **2015**.
- [33] Carr, F.J., Chill, D., Maida, N., The lactic acid bacteria: A literature survey, *Critical Reviews Microbiology*, 28(4), 281-370, **2002**.
- [34] Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G., Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, 41, 103-125, **1998**.
- [35] Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A., Steele, J.L., Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria, *Antonie Van Leewenhoek*, 76, 217-246, **1999**.

- [36] Kleerebezem, M. and Hugenholtz, J., Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria, *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 232-237, **2003**.
- [37] Hammes, W.P., Vogel, R.F., The genus *Lactobacillus*, The genera of lactic acid bacteria. *The Lactic Acid Bacteria*, Volume:2, (eds: Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H.), Chapman & Hall, 19-55, **1995**.
- [38] Farrow, J.A.E., Collins, M.D., DNA base composition, DNA–DNA homology and longchain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*, *Journal of General Microbiology*, 130, 357-362, **1984**.
- [39] Schleifer, K.H., Ehrmann, M., Krusch, U., Neve, H., Revival of the species *Streptococcus thermophilus*, *Systematic and Applied Microbiology*, 14 (4), 386–388, **1991**.
- [40] Axelsson, L., Lactic acid bacteria: classification and physiology. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, (Eds: Salminen, S., Wright, A.V, Ouwehand, A.), CRC Press, 1-66, **2004**.
- [41] Capela, P., Hay, T.K.C. and Shah, N.P., Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt, *Food Research International*, 39, 203–211, **2006**.
- [42] Anonim, Scanning electron micrograph of *S.thermophilus* by Dennis Kunkel Microscopy, https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Streptococcus_thermophilus.jpg (Eylül, **2017**).
- [43] Marshall, V.M.E., Fermented milks and their future trends: microbiol aspects, *Journal of Dairy Research*, 54, 559-574, **1987**.
- [44] Tamime, A. Y., Deeth, B.C., Yoghurt: Techcnology and biochemistry, *Journal of Food Protection*, 43 (12), 939-977, **1980**.
- [45] Davidson, B.E., Kordias, N., Dobos, M., Hillier, A.J., Genomic organization of lactic acid bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 70, 161-183, **1996**.

- [46] Mercenier, A., Molecular genetics of *Streptococcus thermophilus*, *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiological Reviews*, 87, 61-78. **1990**.
- [47] Holt, J.G., *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Paperback)*, 9th edition, Williams & Wilkins, **1994**.
- [48] Anonim, Scanning electron micrograph of *L.bulgaricus* at Utah State University,
https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Lactobacillus_bulgaricus.jpg (Eylül, **2017**).
- [49] Ray, B., Microorganisms used in food fermentation, *Fundamental Food Microbiology*, 125-135, **2004**.
- [50] Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H., Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy, *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1-29, **1997**.
- [51] Robinson, R.K., Fermented milks, yogurt, Encyclopedia of Food Microbiology, (eds: Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P.D.), Academic Press, London, 784-791, **2000**.
- [52] Davidson, B.E., Kordias, N., Dobos, M., Hillier, A.J., Genomic organization of lactic acid bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 70, 161-183, **1996**.
- [53] Wang, T.T. and Lee, B.H., Plasmids in *Lactobacillus*, *Critical Reviews in Biotechnology*, 17(3), 227-272, **1997**.
- [54] Anonim, Bakteri İdentifikasyon Testleri, http://www.dergi.dirimbilim.net/index.php?option=com_content&view=article&id=84&Itemid=113, (Eylül, **2017**).
- [55] Eser, Ö., Moleküler tanı testlerinin direnç tayininde kullanımı: Gram negatif bakteriler için hızlı moleküler tanı yöntemleri, *ANKEM Dergisi*, 26(2), 86-91, **2012**.
- [56] Başaran, E., Aras, S., Cansaran-Duman, D., Genomik, proteomik, metabolomik kavramlarına genel bakış ve uygulama alanları, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 67 (2), 85-96, **2010**.

- [57] Wassie, M. and Wassie, T., Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw cow milk, *International Journal of Advanced Research in Biological Science*, 3(8), 44-49, **2016**.
- [58] Simmonds, P., Shulman, G., Stembridge, C., Organic analysis by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry a candidate experiment for the biological exploration of Mars, *Journal of Chromatographic Science*, 7, 36-41, **1969**.
- [59] Simmonds, P., Whole microorganisms studied by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry: significance for extraterrestrial life detection experiments, *Applied Microbiology*, 20, 567-572, **1970**.
- [60] Anhalt, J.P., Fenselau, C., Identification of bacteria using mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 47 (2), 219-225, **1975**.
- [61] Heller, D., Cotter, R., Fenselau, C., Profiling of bacteria by fast atom bombardment mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 59, 2806-2809, **1987**.
- [62] Holland, R., Wilkes, J., Rafii, F., Sutherland J., Persons C., Voorhees, K., Lay J., Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10, 1227-1232, **1996**.
- [63] Krishnamurthy, T., Ross, P., Rapid identification of bacteria by direct matrixassisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10, 1992-1996, **1996**.
- [64] Toh-Boyo, G., Wulff, S., Basile, F., Comparison of sample preparation methods and evaluation intersample reproducibility in bacteria MALDI-TOF profiling, *Analytical Chemistry*, 84, 9971-9980, **2012**.
- [65] Soner, Yılmaz S., Serhat, Duyan S., Artuk, C., Diktaş, H., Mikrobiyolojik tanımlamada MALDI-TOF MS uygulamaları, *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 13(5), **2014**.
- [66] Özcan, N., Ezin, Ö., Akpolat, N., Bozdağ, H., Mete, M., Gül, K., Klinik örneklerde saptanan Candida türlerinin MALDI-TOF MS ile tiplendirilmesi, *Dicle Tıp Dergisi*, 43 (3), 390-394, **2016**.

- [67] Fedele, P., Seraglia, R., Battistotti, B., Pinelli, C., Traldi, P., Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for monitoring bacterial protein digestion in yogurt production, *Journal of Mass Spectrometry*, 34, 1385-1388, **1999**.
- [68] Teramoto, K., Sato, H., Sun, L., Torimura, M. and Tao, H., A simple intact protein analysis by MALDI-MS for characterization of ribosomal proteins of two genome-sequenced lactic acid bacteria and verification of their amino acid sequences, *Journal of Proteome Research*, 6, 3899-3907, **2007**.
- [69] Angelakis, E., Million, M., Henry, M., Raoult, D., Rapid and accurate bacterial identification in probiotics and yoghurts by MALDI-TOF Mass Spectrometry, *Journal of Food Science*, 76 (8), 568-572, **2011**.
- [70] Doan, N.T.L., Van Hoorde, K., Cnockaert, M., De Brandt, E., Aerts, M., Le Thanh B., Vandamme, P., Validation of MALDI-TOF MS for rapid classification and identification of lactic acid bacteria, with a focus on isolates from traditional fermented foods in Northern Vietnam, *Letters in Applied Microbiology*, 4, 265-273, **2012**.
- [71] Dušková, M., Šedo, O., Kšicová, K., Zdráhal, Z., Karpíšková, R., Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS, *International Journal of Food Microbiology*, 159, 107-114, **2012**.
- [72] Dec, M., Urban-Chmiel, R., Gnat, S., Puchalski, A., Wernicki, A., Identification of Lactobacillus strains of goose origin using MALDI-TOF mass spectrometry and 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis, *Research in Microbiology*, 165, 190-201, **2014**.
- [73] Günel, T., Gen anlatımının kantitatif analizi "Real-Time PCR", *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 27 (5), 763-767, **2007**.
- [74] Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind K., The real-time polymerase chain reaction, *Molecular Aspects in Medicine*, 27 (2-3), 95-125, **2006**.
- [75] Anonim, Is the primer used for real time pcr different from that used in conventional pcr, [https://www.researchgate.net/post/Is the primer used for real time pcr different from that used in conventional pcr](https://www.researchgate.net/post/Is_the_primer_used_for_real_time_pcr_different_from_that_used_in_conventional_pcr) (Temmuz, **2018**).

- [76] Anonim, What is a C_t value, <https://bitesizebio.com/24581/what-is-a-ct-value/> (Temmuz, **2018**).
- [77] Dubernet, S., Desmasures, N., Guéguen, M., A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level, *FEMS Microbiology Letters*, 214, 271-275, **2002**.
- [78] Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Peláez, C., Requena, T., Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L.acidophilus*, *L.paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk, *International Dairy Journal*, 17, 1107-1114, **2007**.
- [79] Furet, J.P., Quénée, P., Tailliez, P., Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR (Jouy-en-Josas Cedex, France), *International Journal of Food Microbiology*, 97, 197-207, **2004**.
- [80] FAO, WHO, Codex Standart for milk and milk products, 2nd edition, *Codex Alimentarius*, Codex Stan 243-2003, **2011**.
- [81] Josephson, K.L., Yerba, C.Q., Pepper, I.L., Polymerase chain-reaction detection of nonviable bacterial pathogens, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3513-3515, **1993**.
- [82] Nocker, A., Sossa-Fernandez, P., Burr, M.D., Camper, A.K., Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology, *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5111-5117, **2007**.
- [83] García-Cayuela, T., Tabasco, R., Peláez, C., Requena T., Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR, *International Dairy Journal*, 19, 405-409, **2009**.
- [84] Herbel, S.R., Lauzat, B., von Nickisch-Rosenegk, M., Kuhn, M., Murugaiyan, J., Wieler, L.H., Guenther, S., Species-specific quantification of probiotic lactobacilli in yoghurt by quantitative real-time PCR, *Journal of Applied Microbiology*, 115, 1402-1410, **2013**.
- [85] Kao, Y.T., Liu, Y.S., Shyu, Y.T., Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis, *Food Research International*, 40, 71-79, **2007**.

- [86] Kántor, A., Kluz, M., Puchalski, C., Terentjeva, M., Kačániová, M., Identification of lactic acid bacteria isolated from wine using real-time PCR, *Journal of Environmental Science Health*, 51(1), 52-6, **2016**.
- [87] Lick, S., Keller, M., Bockelmann, W., Heller, K.J., Rapid Identification of *Streptococcus thermophilus* by primer-specific PCR amplification based on its lacZ gene, *Systematic and Applied Microbiology*, 19, 74-77, **1996**.
- [88] Giraffa, G., Paris, A., Valcavi, L., Gatti, M., Neviani, E., Genotypic and phenotypic heterogeneity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products, *Journal of Applied Microbiology*, 91, 937-943, **2001**.
- [89] Michaylova, M., Minkova, S., Kimura, K., Sasaki T., Isawa K., Isolation and characterization of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* from plants in Bulgaria, *FEMS Microbiol Lett*, 269, 160-169, **2007**.
- [90] Vélez, M.P., Hermans, K., Verhoeven, T.L.A., Lebeer, S.E., Vanderleyden, J. and De Keersmaecker, S.C.J., Identification and characterization of starter lactic acid bacteria and probiotics from Columbian dairy products, *Journal of Applied Microbiology*, 103, 666-674, **2007**.
- [91] Del Campo, R., Bravo, D., Cantón, R., Ruiz-Garbajosa, P., García-Albiach, R., Montesi-Libois, A., Yuste, F.J., Abaira, V., and Baquero F., Scarce Evidence of Yogurt Lactic Acid Bacteria in Human Feces after Daily Yogurt Consumption by Healthy Volunteers, *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (1), 547-549, **2005**.
- [92] RoushanZadeh, S., Eskandari, M.H., Shekarforoush, S.S., Hosseini, A., Phenotypic and genotypic diversity of dominant lactic acid bacteria isolated from traditional yoghurts produced by tribes of Iran, *Iranian Journal of Veterinary Research*, 2014, 15 (4), 49, 347-352, **2014**.
- [93] Zülal, A., , İnsan Genomu, kalıtım şifresinin peşinde 136 yıl, *Tübitak Yayınları*, Mart; 5-11, **2001**.
- [94] Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., *Concept of Genetics*, 8th edition, Pearson Prentice Hall, **2006**.
- [95] Bölükbaşı, E., Aras, E.S., Third generation DNA sequencing technologies, *International Journal of Scientific and Technological Research*, 1 (3), **2015**.

- [96] Klaenhammer, T.R., Ahn, C., Fremaux, C., Milton, K., Molecular properties of *Lactobacillus* bacteriocins, *Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics*, (Eds: James, R., Lazdunski, C., Pattus, F.), Springer-Verlag, 37-58, **1992**.
- [97] Kumar, B.R., DNA representation, *DNA Sequencing – Methods and Applications*, (ed: Munshi, A.), InTech, 3-14, **2012**.
- [98] Liu, W., Bao, Q., Jirimutu, Qing M, Siriguleng, Chen, X., Sun, T., Li, M., Zhang, J., Yu, J., Bilige, M., Sun, T., Zhang, H., Isolation and identification of lactic acid bacteria from Tarag in Eastern Inner Mongolia of China by 16S rRNA sequences and DGGE analysis, *Microbiological Research*, 167, 110-115, **2012**.
- [99] Moraes, P.M., Perin, L.M., Júnior, A.S., Nero, L.A., Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria, *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 1, 109-112, **2013**.
- [100] Akoğlu, A., Yaman, H., Coşkun, H., Sarı, K., Mengen peynirinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, moleküler tanımlanması ve bazı starter kültür özelliklerinin belirlenmesi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 21 (2), 453-459, **2017**.
- [101] Sunil, N., Vora, D.J., Analysis of 16S rRNA gene of lactic acid bacteria isolated from curd and raw milk, *International Journal of Science and Research*, 5 (5), **2016**.
- [102] Anonim, Antibiyotik Direnci, http://www.akilciilac.gov.tr/?page_id=826, (Eylül, **2017**).
- [103] Ammor, M.S., Flórez, A.B., van Hoek, A.H.A.M., de los Reyes-Gavilán, C.G., Aarts, H.J.M., Margolles, A., Mayo, B., Molecular Characterization of Intrinsic and Acquired Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria, *Journal of Molecular Microbiology Biotechnology*, 14, 6-15, **2008**.
- [104] Ouoba, L.I., Lei, V., Jensen, L. B., Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: determination and transferability of the resistance genes to other bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, 121, 217-224, **2008**.

- [105] Danielsen, M. and Wind, A., Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents, *International Journal of Food Microbiology*, 82, 1-11, **2003**.
- [106] Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J., Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products, *International Journal of Food Microbiology*, 81, 1-10, **2003**.
- [107] Zhou, N., Zhang, J.X., Fan, M.T., Wang, J., Guo, G., Wei, X.Y., Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Chinese yogurts, *Journal of Dairy Science*, 95, 4775-4783, **2012**.
- [108] D'Aimmo, M.R., Modesto, M., Biavati, B., Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products, *International Journal of Food Microbiology*, 115, 35-42, **2007**.
- [109] Çelik, H., Durak, Y., Uysal, A., Bazı ticari ve ev yapımı yoğurtlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik duyarlılıkları, *Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 42 (2), 149-160, **2016**.
- [110] Alp, D., Öner, Z., Bazı laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençliklerinin ve aroma maddeleri oluşturma özelliklerinin belirlenmesi, *Gıda*, 39 (6), 331-337, **2014**.
- [111] Dykuizen, D.E., Santa Rosalia revisited: Why are there so many species of bacteria?, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73, 25-33, **1998**.
- [112] Auwerx, J., The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation, *in Experientia*, 47 (1), 22-31, **1991**.
- [113] Bosshart, H., Heinzelmann, M., THP-1 cells as a model for human monocytes, *Annals of Translational Medicine*, 4(21), 438, **2016**.
- [114] Anonim, Cytokine Release Assays Tests for Leishmaniasis Transplant Recipients, <https://www.labmedica.com/immunology/articles/294761241/cytokine-release-assays-tests-for-leishmaniasis-in-transplant-recipients.html> (Kasım, **2017**).
- [115] Mandal, A., Viswanathan, C., Natural killer cells: In health and disease, *Hematology Oncology Stem Cell Therapy*, 8(2), 47-55, **2015**.

- [116] Deniz, G., T, B, NK Hücrelerin Değerlendirmesinde Pratik Yaklaşımlar, http://www.guncelpediatric.com/makale_869/T-B-Nk-Hucrelerin-Değerlendirilmesinde-Pratik-Yaklasimlar (Kasım, **2017**).
- [117] Anonim, Study Suggests Refined Donor Selection Could Improve Outcomes of Bone Marrow Transplantation in Leukemia, <https://www.mskcc.org/blog/study-suggests-refined-donor-selection-could-improve-outcomes-bone-marrow-transplantation-leukemia> (Kasım, **2017**).
- [118] Dembic, Z., Common features about cytokines. *The Cytokines of the Immune System The Role of Cytokines in Disease Related to Immune Response*, Academic Press, 1-14, **2015**.
- [119] Chowdhury, I., Bhat, G.K., Cell Biology Research Progress Series Tumor Necrosis Factor, *Tumor Necrosis Factor (TNF)–From Bench to Bed Side* (ed: Rossard, T.P.), Nova Science Publishers, 1-48, **2009**.
- [120] Haque, S.J., Sharma, P., Interleukins and STAT Signaling, *Interleukins Vitamins and Hormones*, (ed:Litwack, G.), Academic Press, California,165-206, **2006**.
- [121] Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Ouaked, N., Schaffartzik, A., Van De Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M., Akdis C.A., Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 701-721, **2011**.
- [122] LeBlanc, A.M., Del Carmen, S., Zurita-Turk, M., Rocha, C.S., Van de Guchte, M., Azevedo, V., Miyoshi, A. and LeBlanc, J.G., Importance of IL-10 Modulation by Probiotic Microorganisms in Gastrointestinal Inflammatory Diseases, *International Scholarly Research Network Gastroenterology*, 2011, 11 pages, **2010**.
- [123] Zdanov, A., Structure and Function of IL-10 and the IL-10 Receptor, *Medical Intelligence Unit Interleukin-10*, (ed: Marincola, F.M.), Landes Bioscience, 1-10, **2006**.

- [124] Miettinen, M., Matikainen, S., Vuopio-Varkila, J., Pirhonen, J., Varkila, K., Kurimoto, M., and Julkunen, I., Lactobacilli and Streptococci Induce Interleukin-12 (IL-12), IL-18, and Gamma Interferon Production in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells, *Infection and Immunity*, 66 (12), 6058-6062, **1998**.
- [125] Perdígón, G., Galdeano, C.M., Valdez, J.C., and Medici, M., Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system, *European Journal of Clinical Nutrition*, 56 (4), 21-26, **2002**.
- [126] Ménard, S., Candalh, C., Bambou, J.C., Terpend, K., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M., Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport, *Gut*, 53, 775-775, **2004**.
- [127] Yazıhan, N., Karakurt, Ö., Ataoğlu, H., Erythropoietin Reduces Lipopolysaccharide-Induced Cell Damage and Midkine Secretion in U937 Human Histiocytic Lymphoma Cells, *Advances in Therapy*, 25 (5), 502-514, **2008**.
- [128] Anonim, <http://www.dynebio.co.kr/yc/shop/dw.php?fn=1402000095%2F11796828001.pdf> (Şubat, **2018**).
- [129] Shipley, G.L., An introduction to real-time PCR. *Real-time PCR*, (ed: Dorak, M.T.), Taylor & Francis Group, 1-37, **2006**.
- [130] Anonim, <https://biochimie.umontreal.ca/wp-content/uploads/sites/37/2015/11/LC480ProbesMasterguide.pdf> (Şubat, **2018**).
- [131] Anonim, <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/04683633001bul.pdf> (Şubat, **2018**).
- [132] Neuohoff, N., Oumeraci, T., Wolf, T., Kollwe, K., Bewerunge, P., Neumann, B, et al., Monitoring CSF Proteome Alterations in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Obstacles and Perspectives in Translating a Novel Marker Panel to the Clinic, *Public Library of Science*, 7(9), e44401, **2012**.
- [133] Mercanoğlu, B., Griffiths, M.W., Combination of immunomagnetic separation with real-time PCR for rapid detection of *Salmonella* in milk, ground beef, and alfalfa sprouts, *Journal of Food Protection*, 68, 3, 557-561, **2005**.

- [134] Anonim, <https://www.protocolsonline.com/recipes/phosphate-buffered-saline-pbs/> (Şubat, **2018**).
- [135] Taban, B., *İmmünomanyetik Ayırma-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (İMA-PZR) Yönteminin Uygulaması ile Tavuk Etlerinde Salmonella spp. Belirlenmesi*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2007**.
- [136] Anonim, flow chart for real time PCR or quantitative PCR, http://www.bio-rad.com/webroot/web/images/lse/products/pcr_amplification_kits/product_overlay_content/global/lse_flowchart_pcr_realtime.jpg, (Temmuz, **2018**).
- [137] Anonim, 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis, <https://www.slideshare.net/abduldv/16s-ribosomal-dna-sequence-analysis>, (Temmuz, **2018**).
- [138] Anonim, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI document M7-A7, 29 (2), **2012**.
- [139] Anonim, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement*, Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI document M100-S21, 31 (1), **2011**.
- [140] Andrews, J.M., Determination of minimum inhibitory concentrations, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, Suppl. S1, 5-16, **2001**.
- [141] European Food Safety Authority, *Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance*, **2012**.
- [142] Niğdelioğlu, S., Laktikisit bakterilerinin antiproliferatif, antigenotoksik, antiinflamatuvar etkilerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2013**.

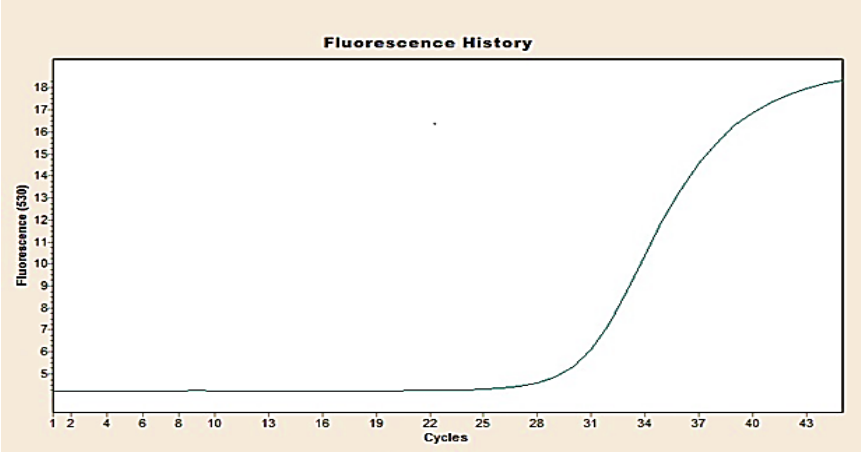
EKLER

EK-I Tanımlanan *S. thermophilus* Suşlarının Gerçek-Zamanlı PZR Görüntüleri

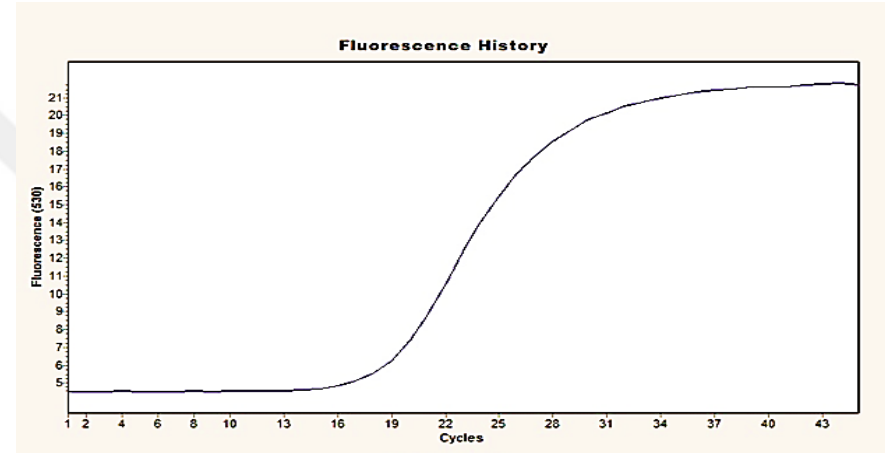
EK-II Tanımlanan *Lb. bulgaricus* Suşlarının Gerçek-Zamanlı PZR Görüntüleri



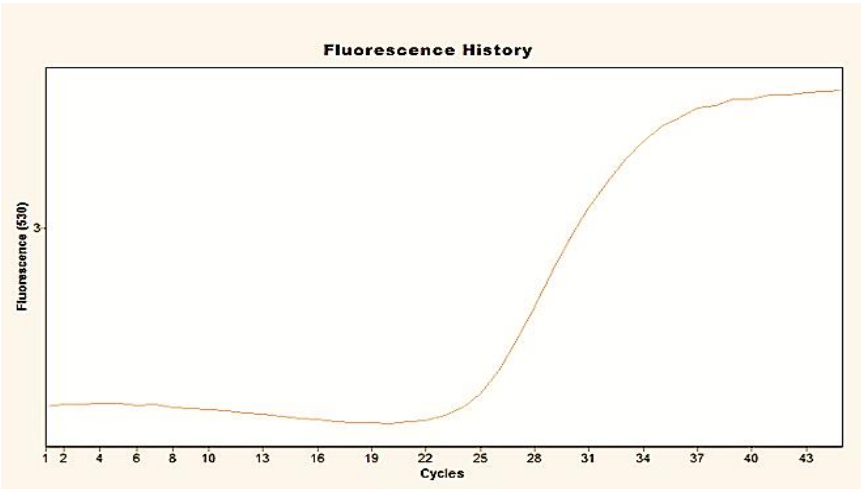
EK-I: Tanımlanan *S. thermophilus* Suşlarının Gerçek-Zamanlı PZR Görüntüleri



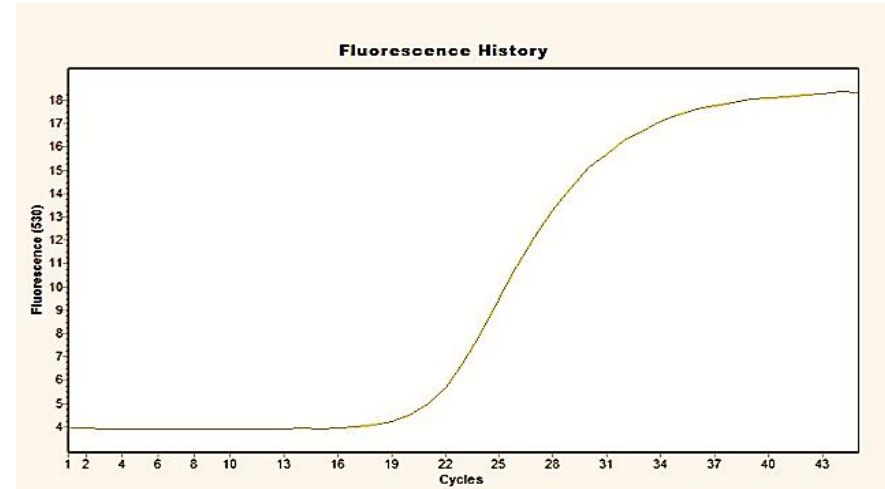
St0-C_p:29.32



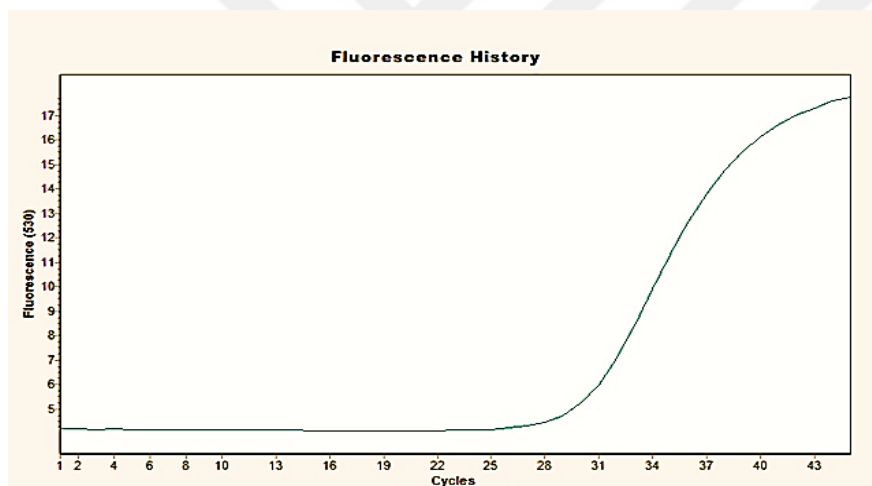
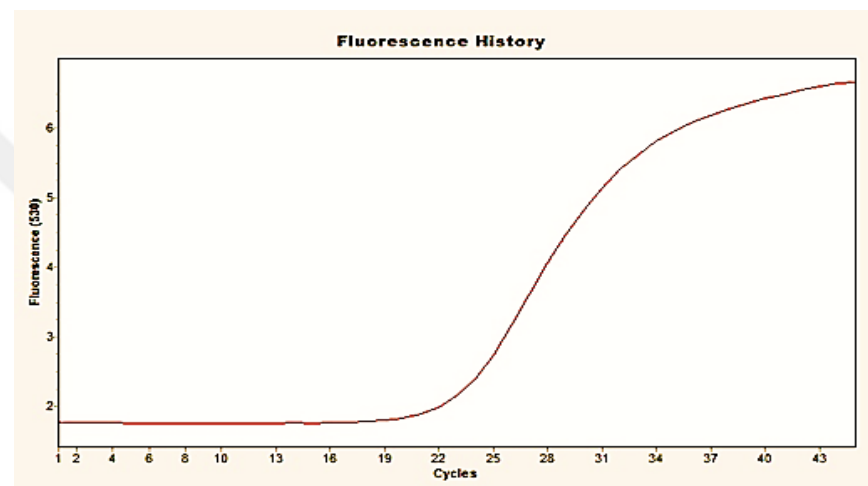
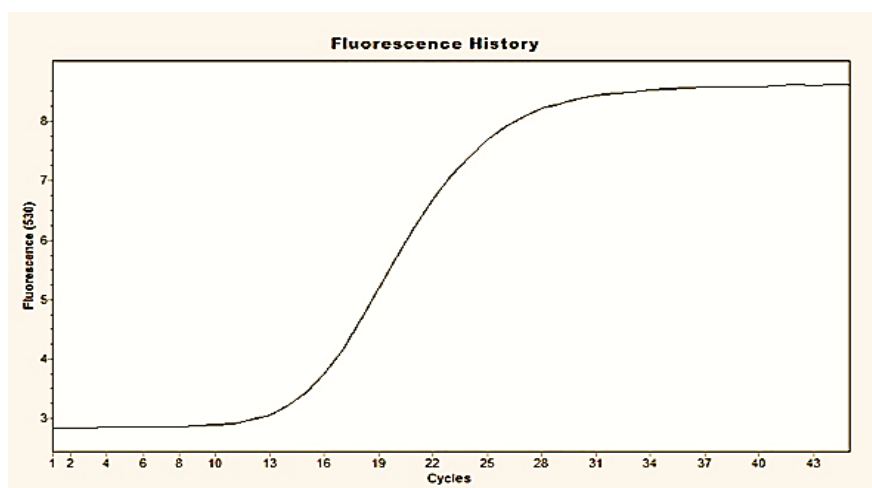
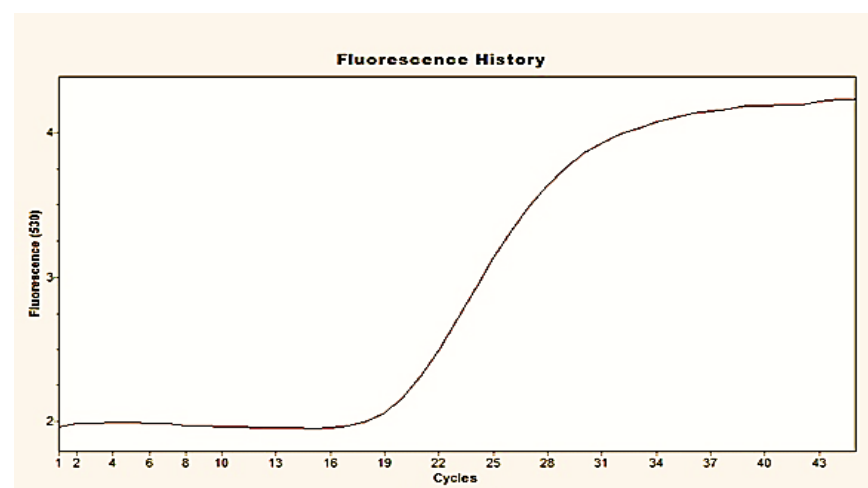
St1-C_p:17.76

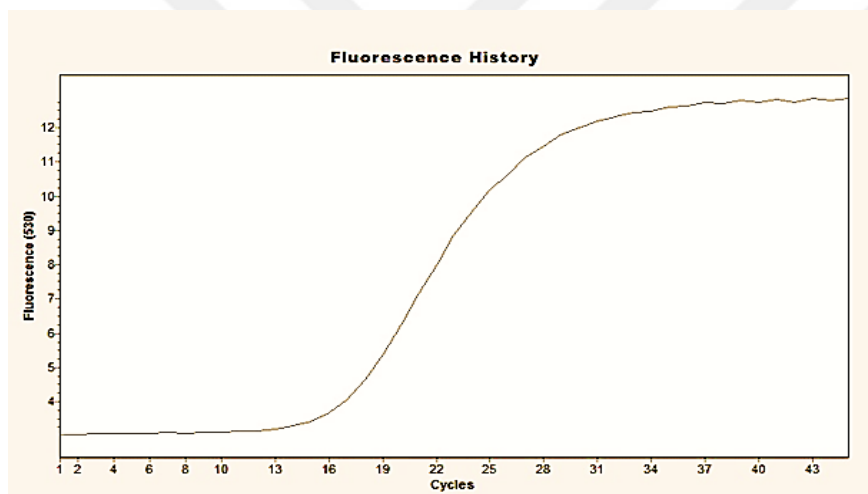
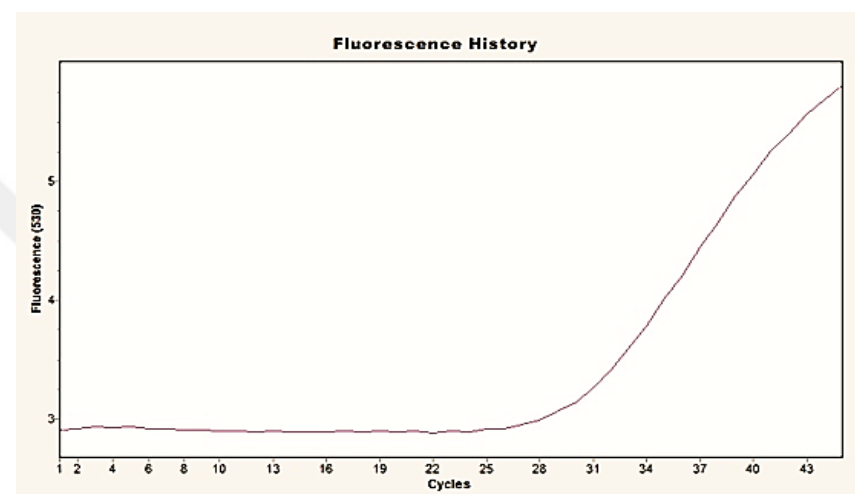
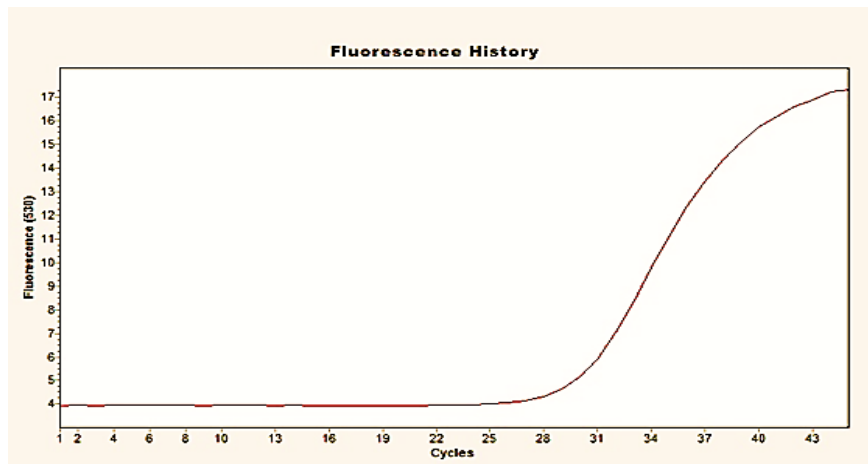
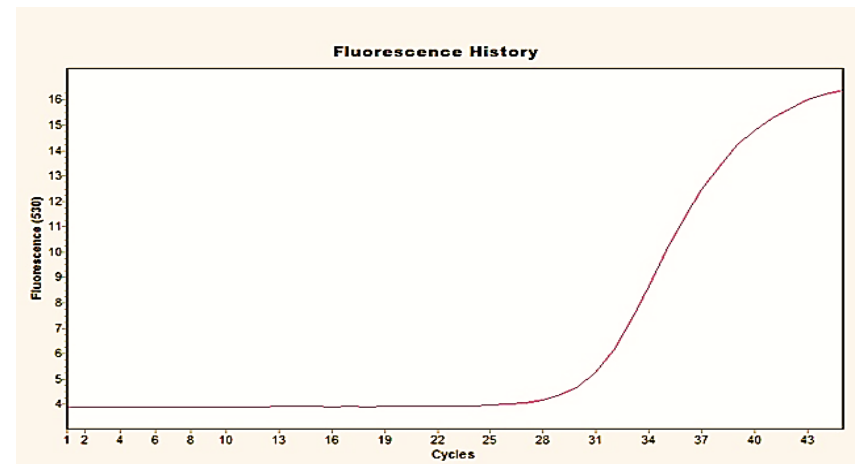


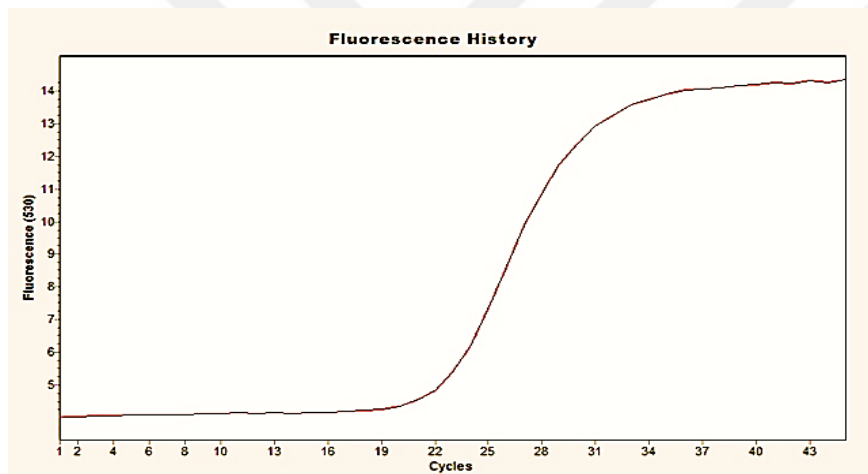
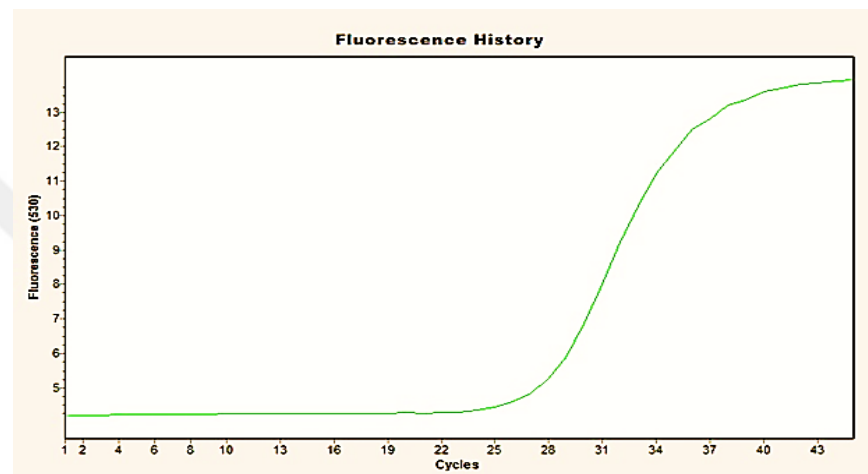
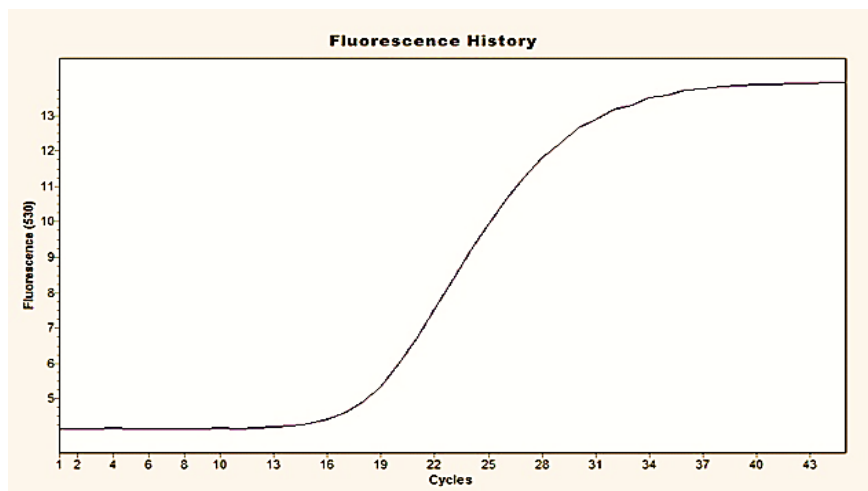
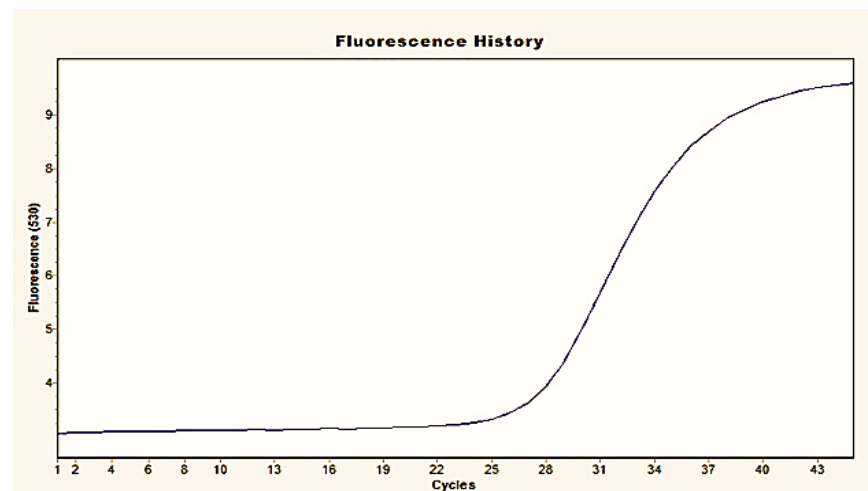
St6-C_p:23.71

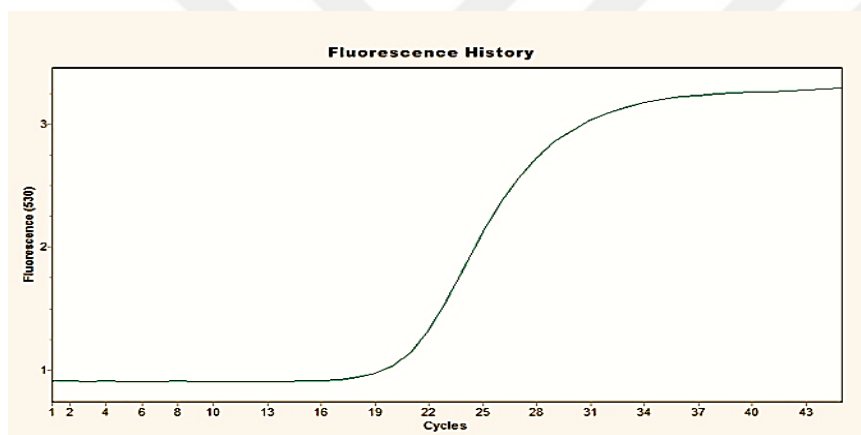


St10-C_p:20.30

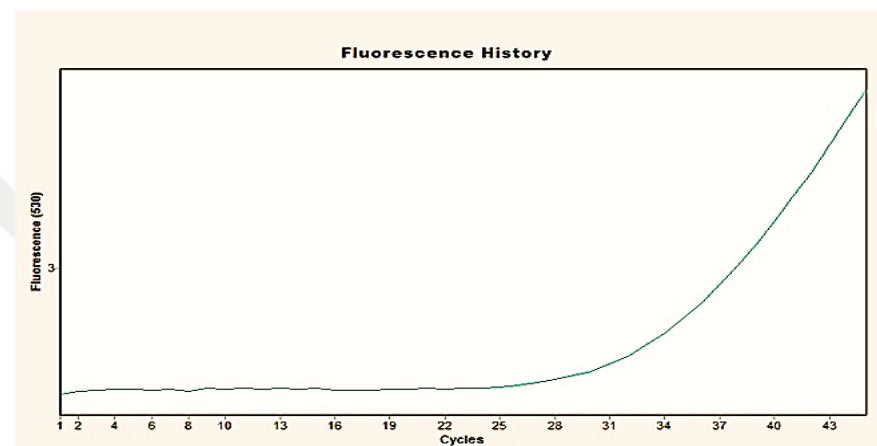
St11-C_p:29.23St12-C_p:22.12St23-C_p:13.99St26-C_p:18.56

St27-C_p:15.82St33-C_p:29.47St43-C_p:29.08St49-C_p:29.75

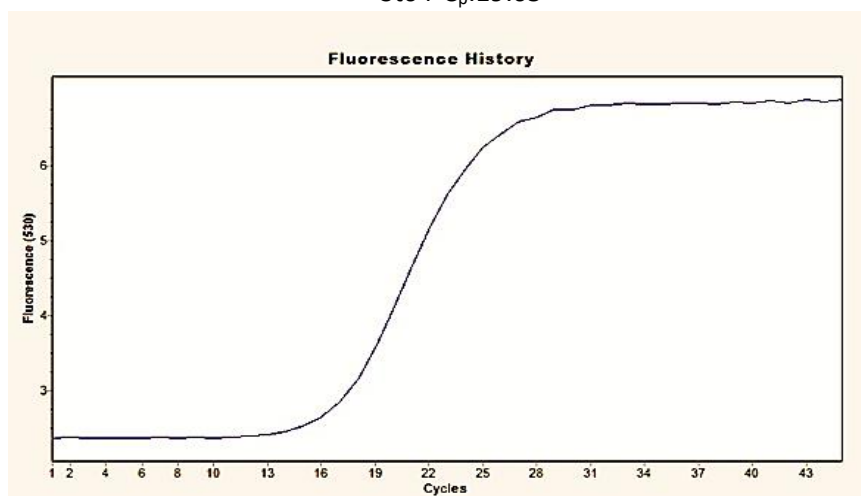
St51-C_p:21.54St53-C_p:26.85St55-C_p:17.34St58-C_p:26.62



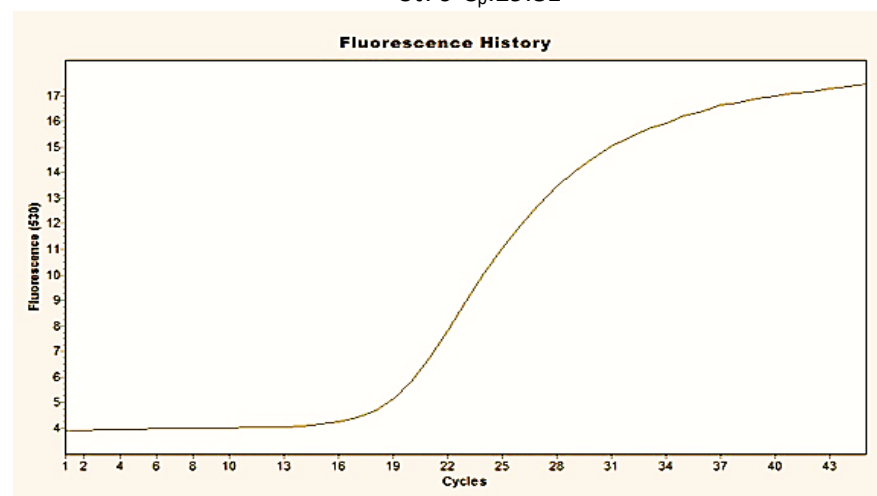
St64-C_p:19.65



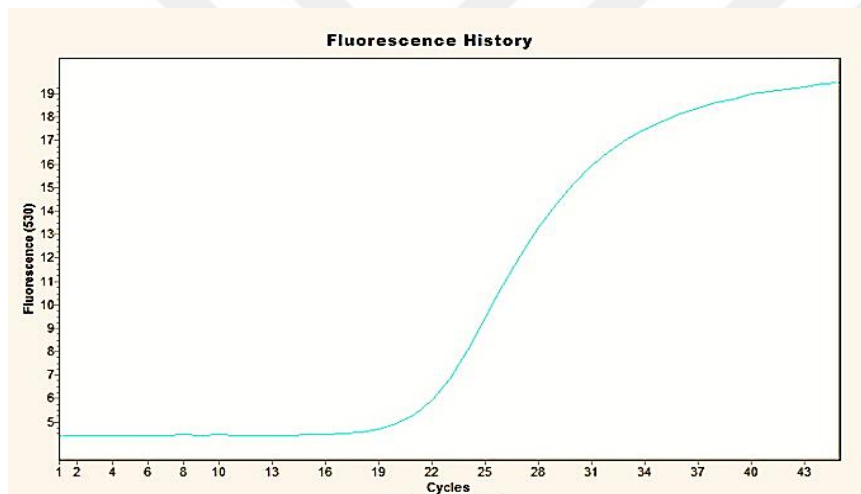
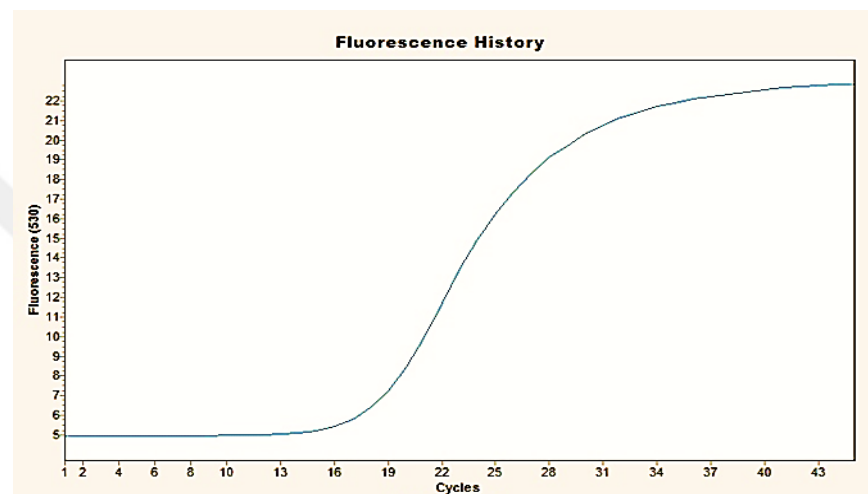
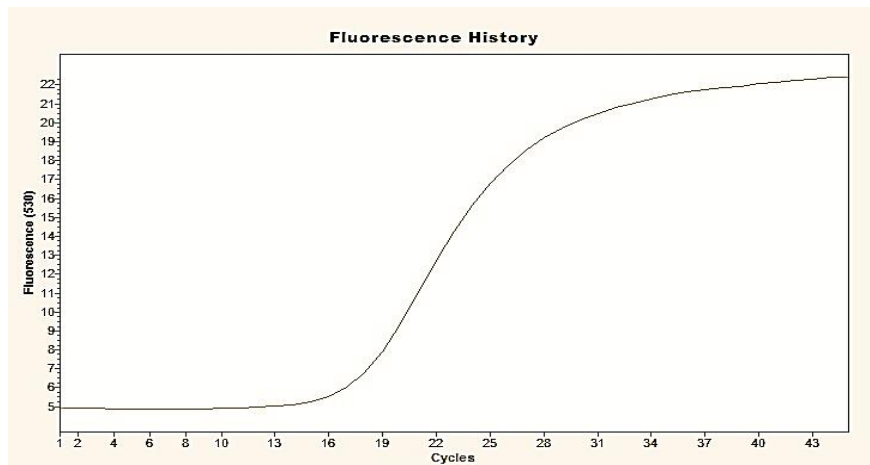
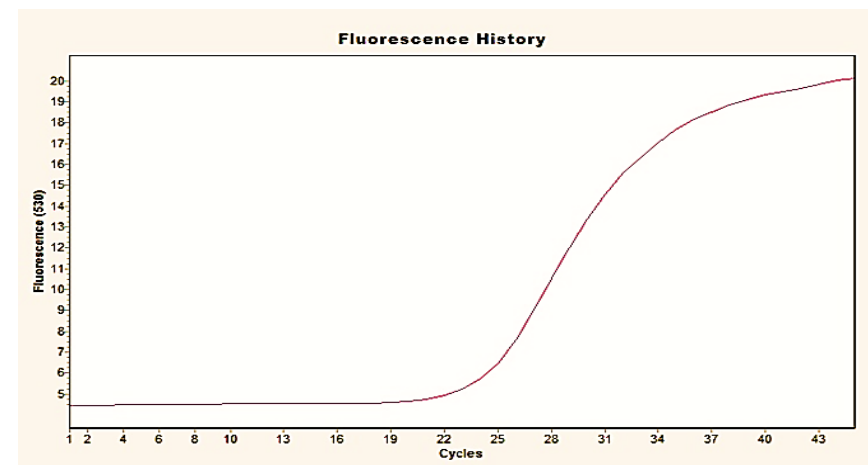
St70-C_p:29.81

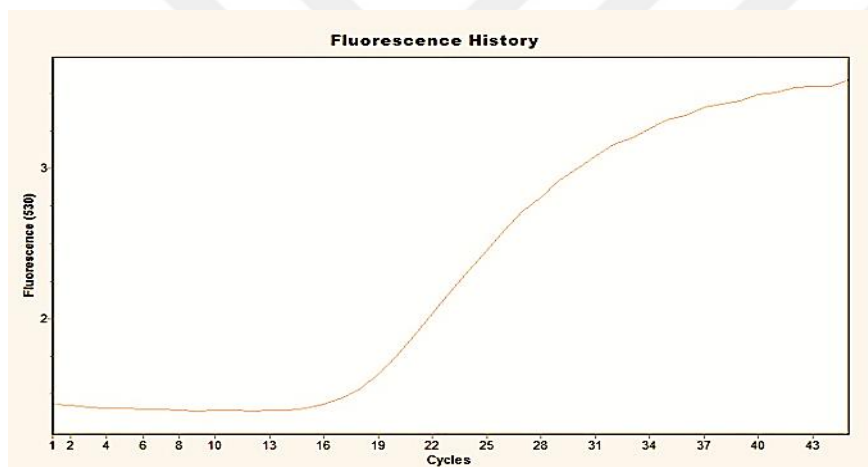


St71-C_p:15.96

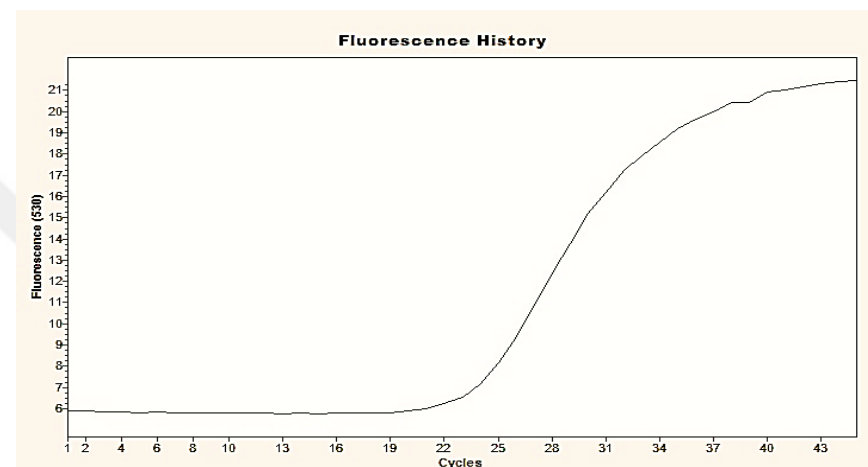


St72-C_p:17.86

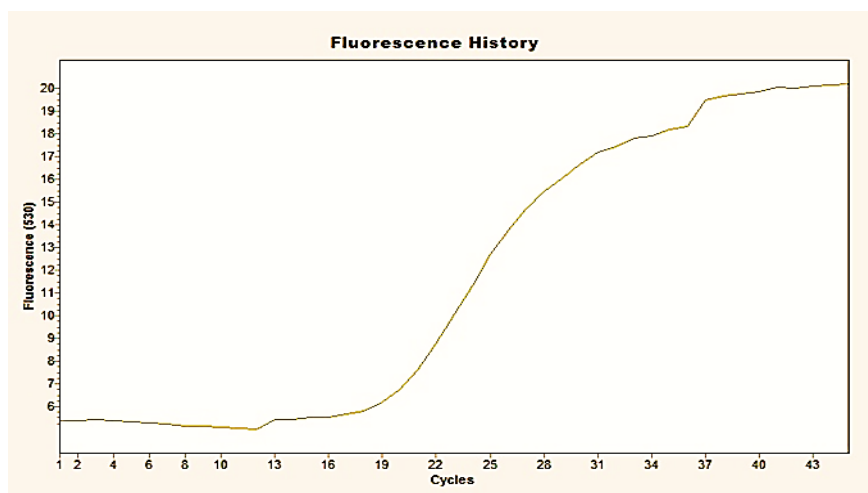
St73-C_p:20.66St74-C_p:17.24St75-C_p:16.57St77-C_p:23.25



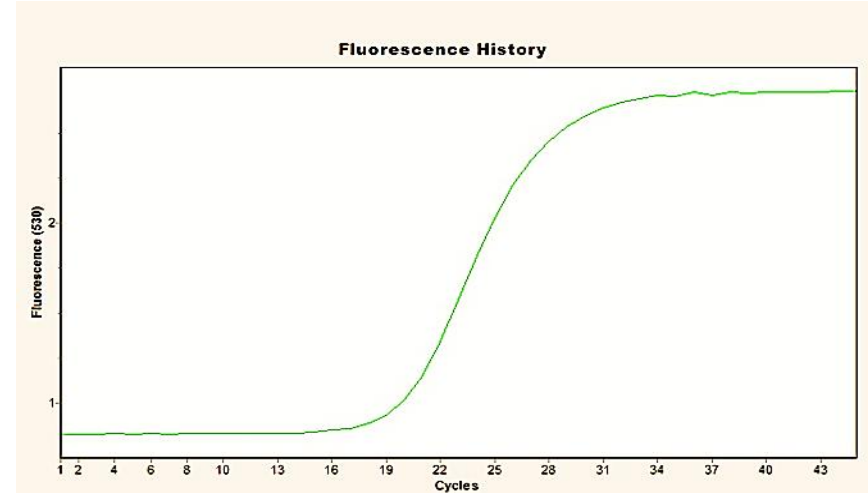
St79-C_p:16.84



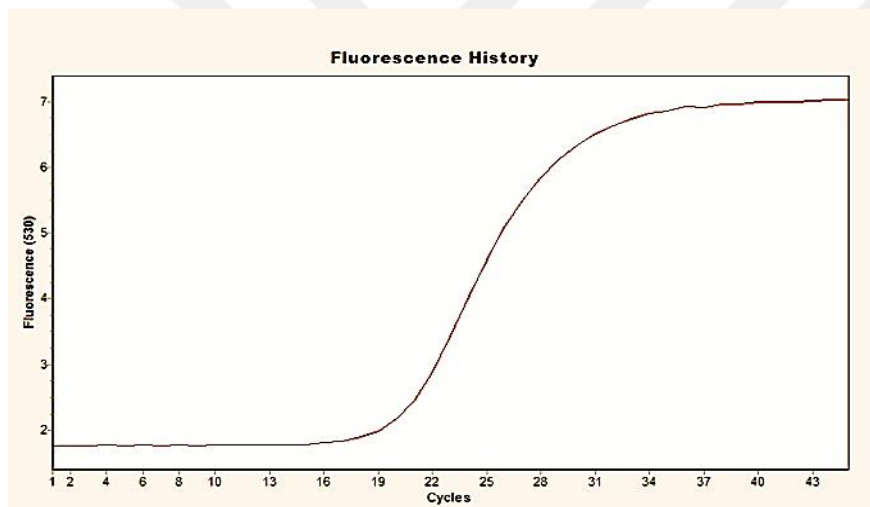
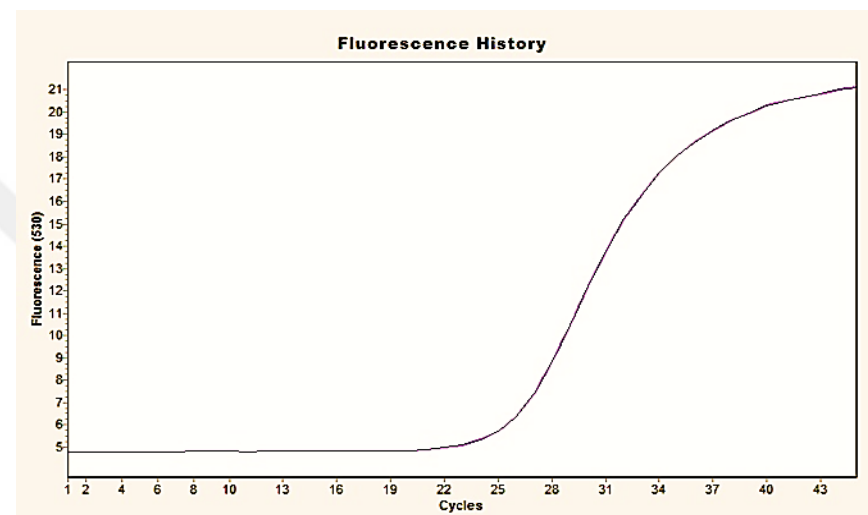
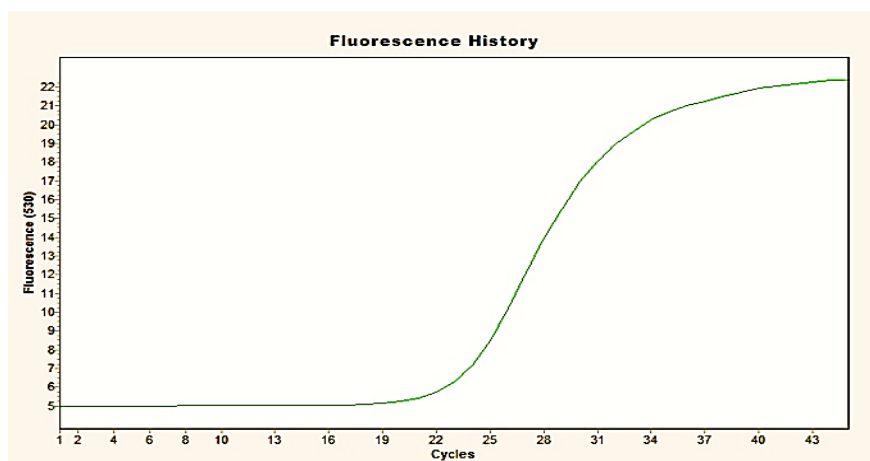
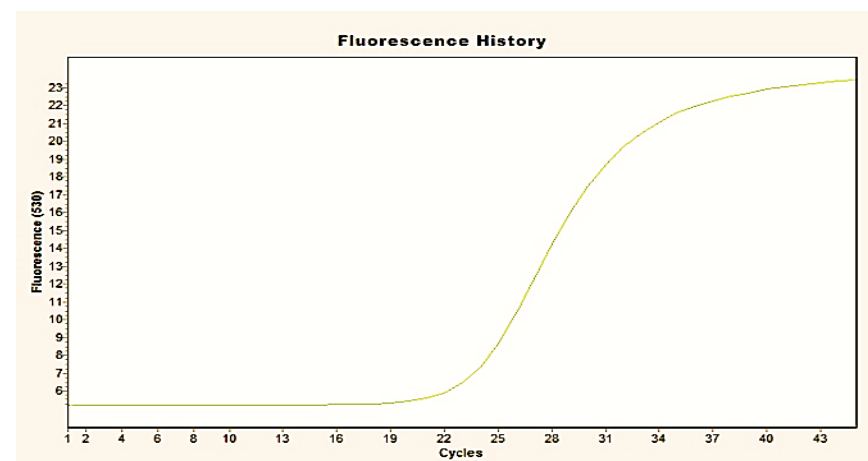
St80-C_p:22.78

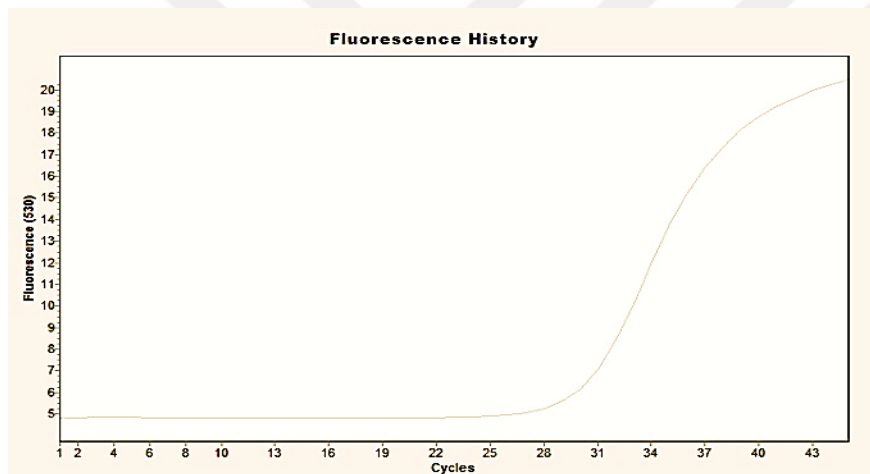
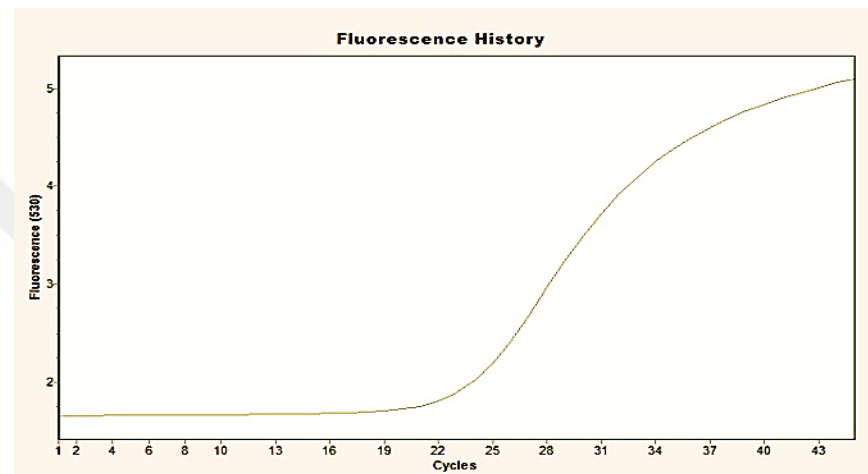
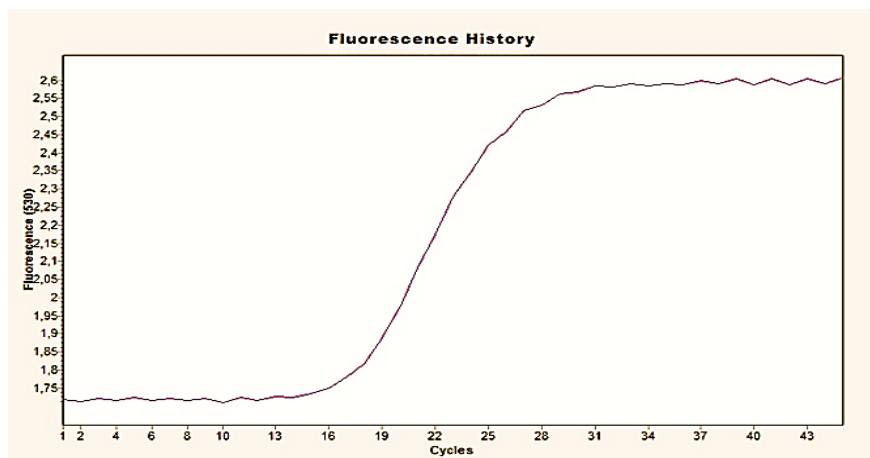
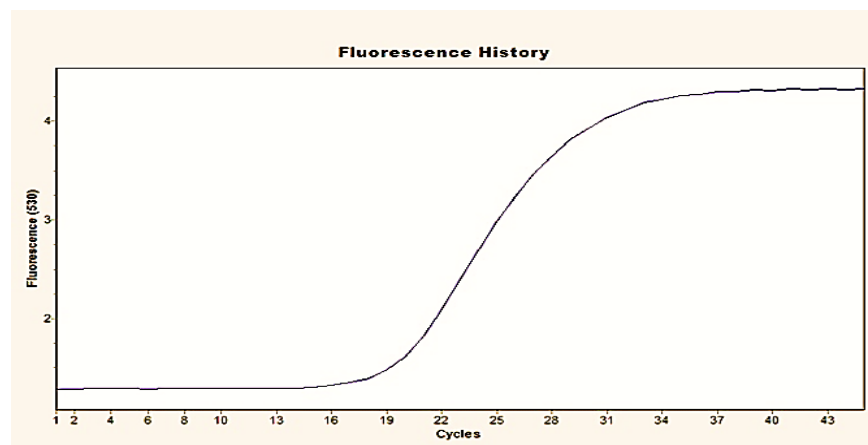


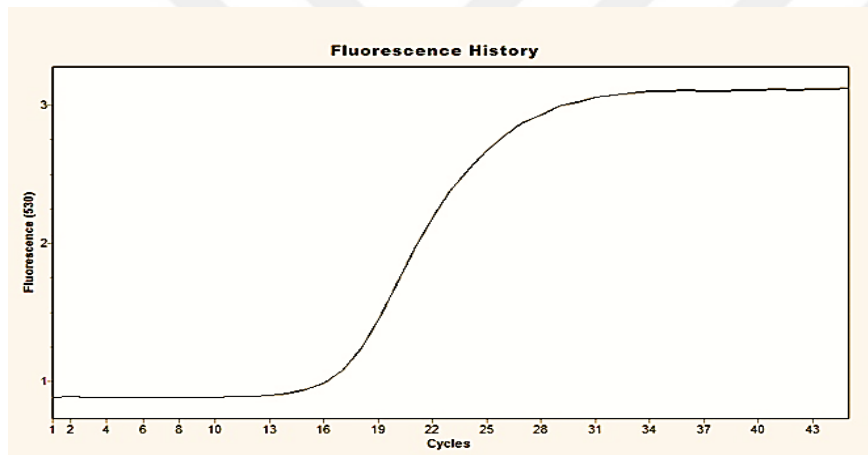
St81-C_p:18.70



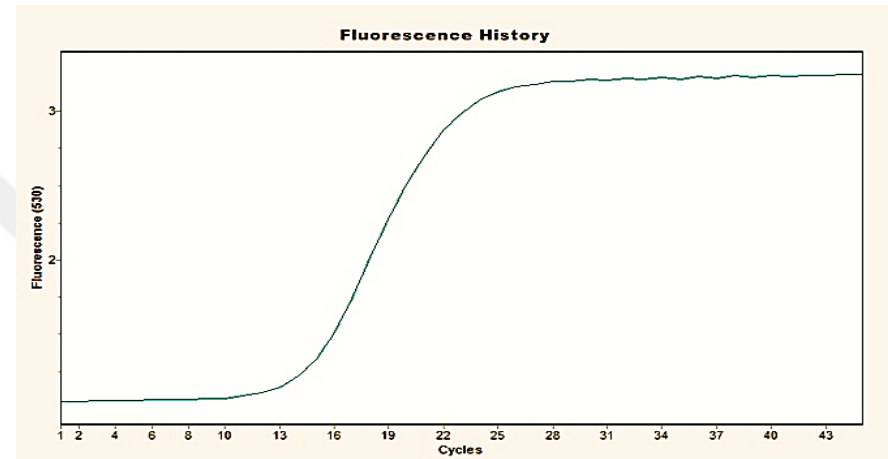
St88-C_p:18.88

St89-C_p:19.25St90-C_p:24.84St93-C_p:22.32St94-C_p:22.55

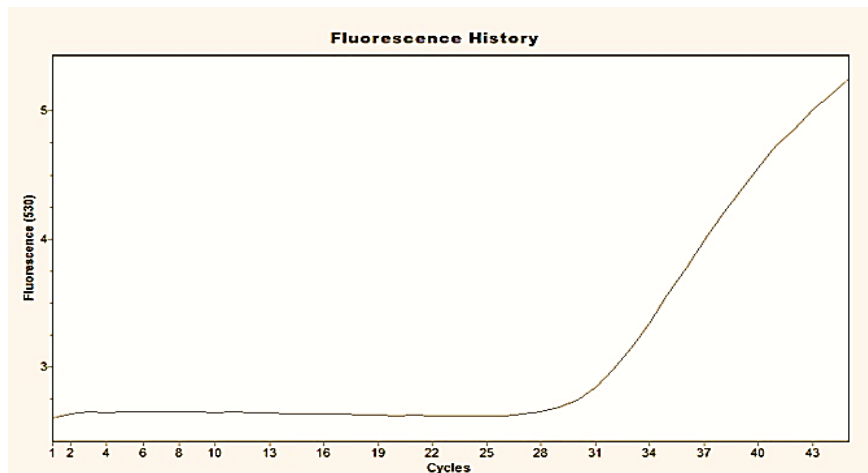
St95-C_p:29.12St100-C_p:22.80St139-C_p:16.62St6-2-C_p:18.63



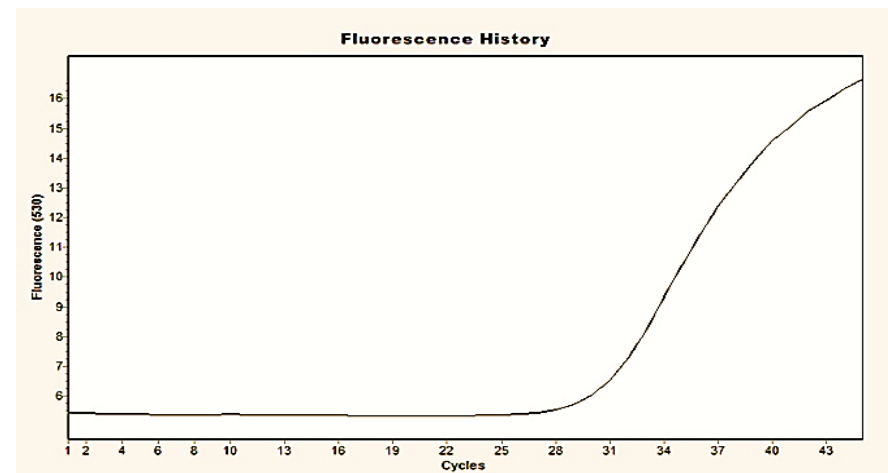
St19-2-Cp:15.79



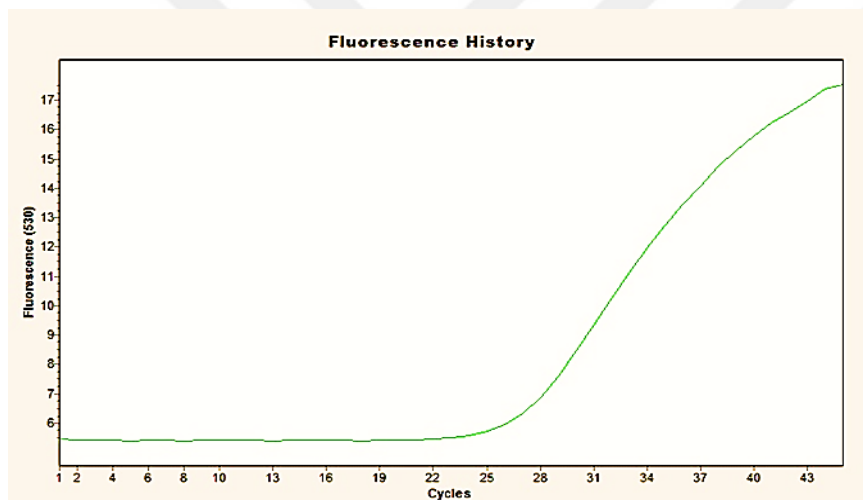
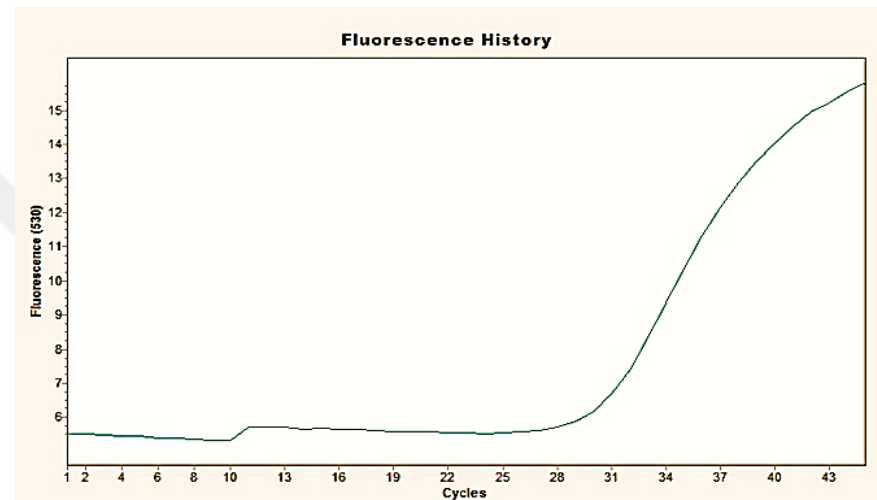
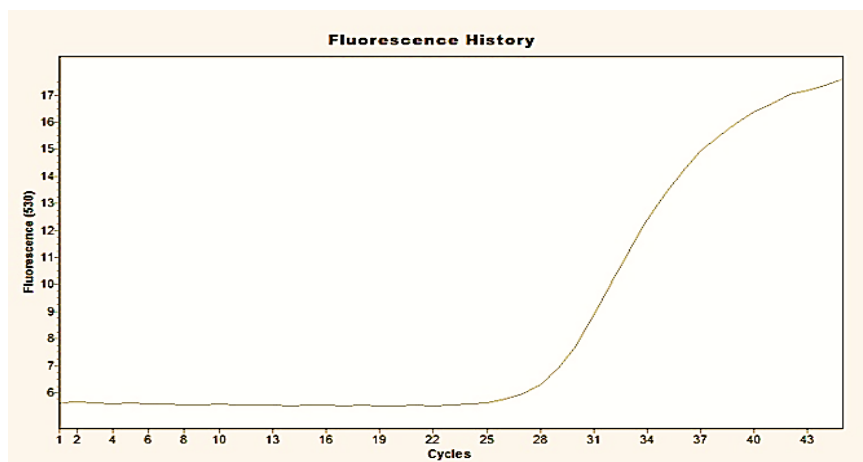
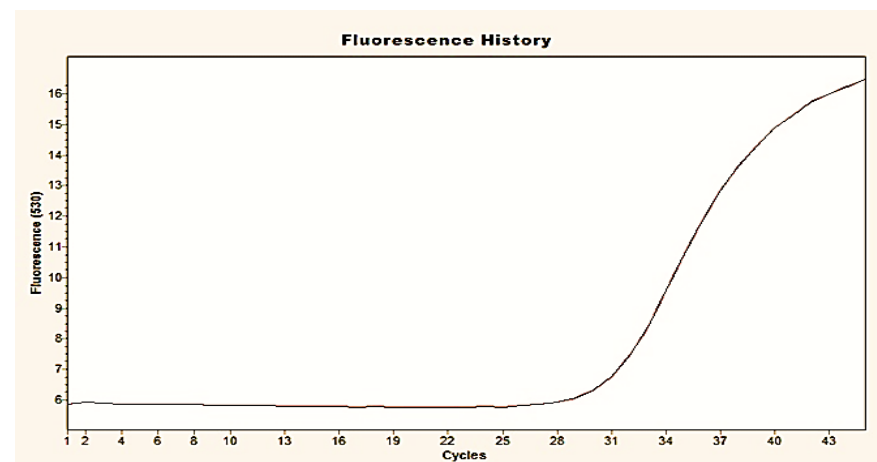
St40-2-Cp:13.57

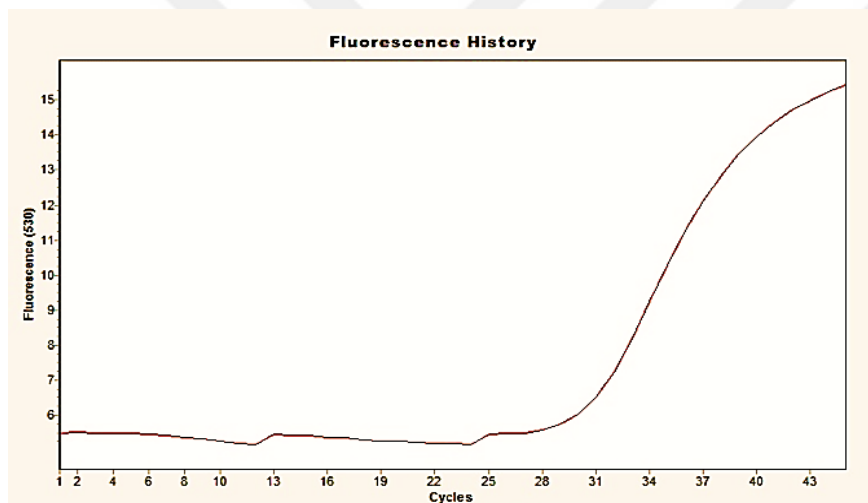
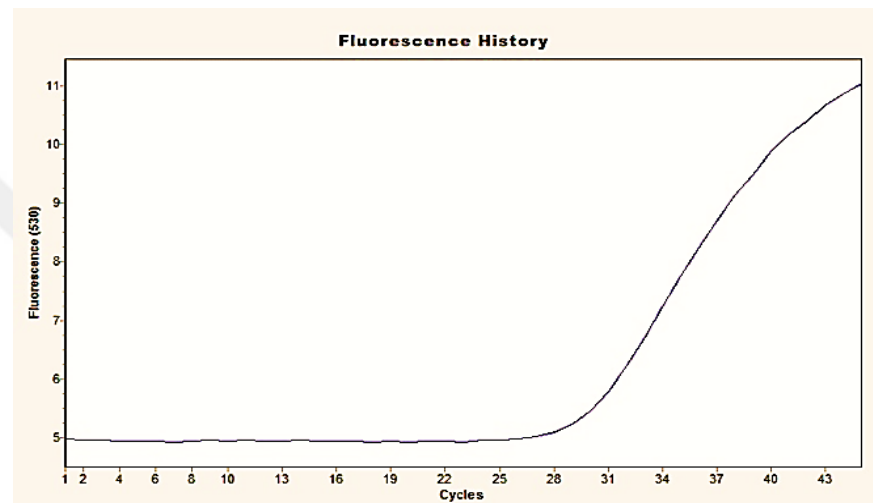
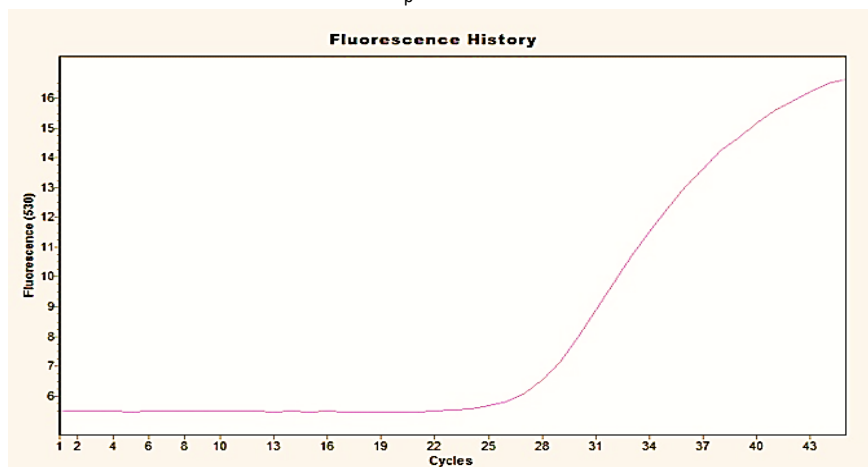
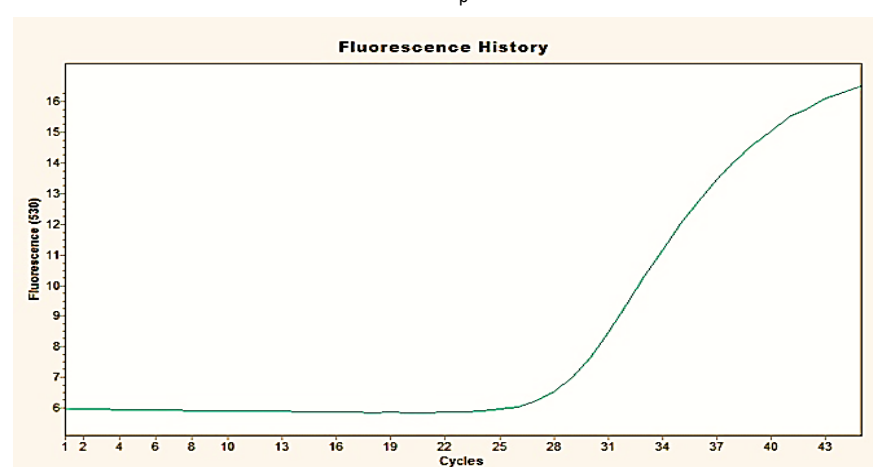


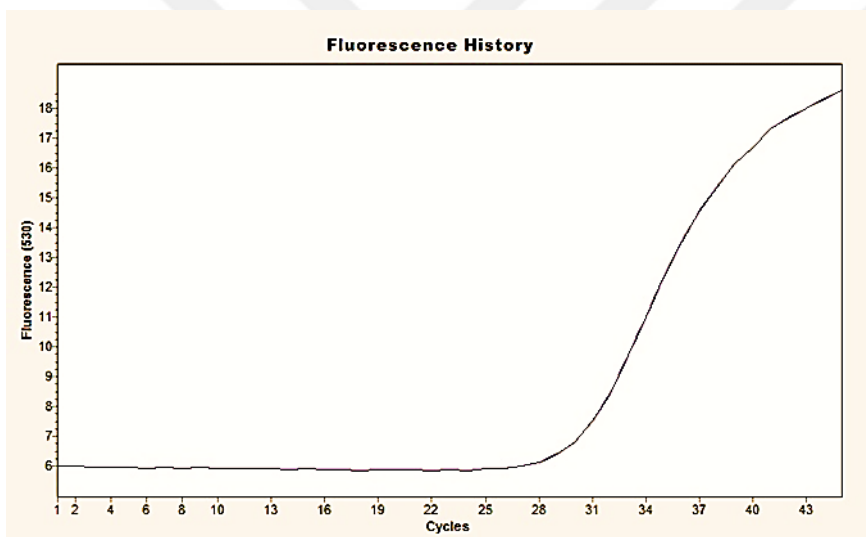
MS1-1-Cp:29.84



MS2-3-Cp:29.57

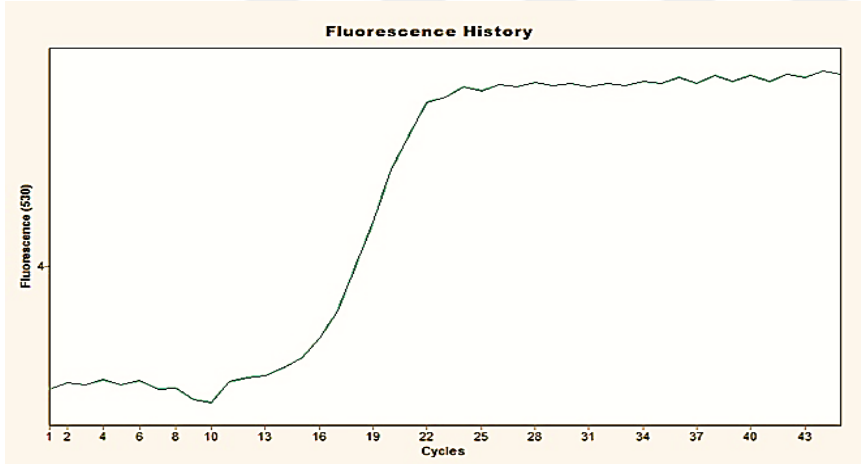
MS2-4-C_p:25.99MS2-5-C_p:29.37MS3-1-C_p:27.38MS3-3-C_p:29.88

MS3-4-C_p:29.66MS3-5-C_p:28.86MS4-1-C_p:26.59MS4-2-C_p:27.91

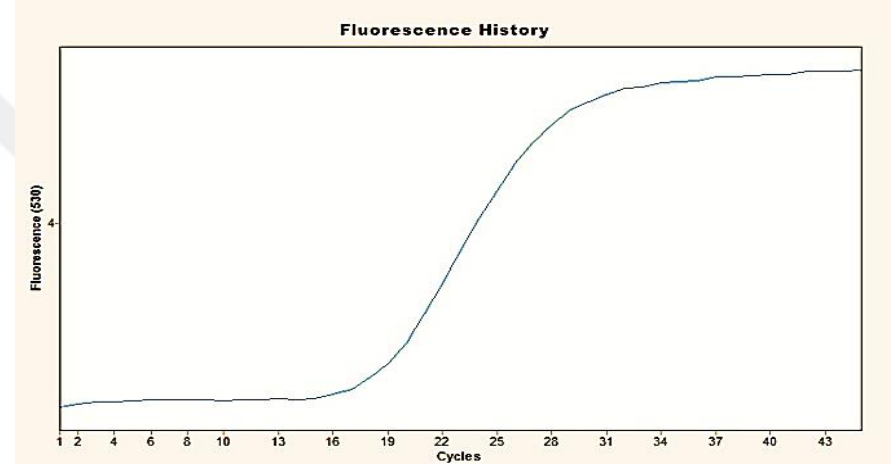


MS4-4-C_p:29.21

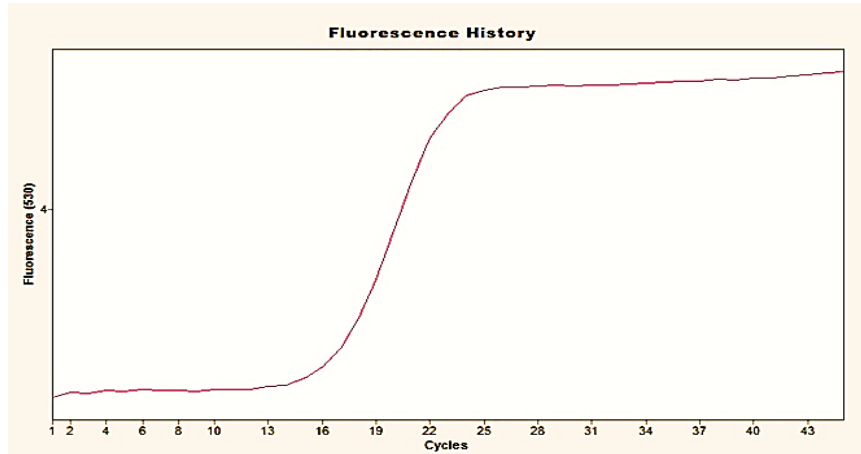
EK-II: Tanımlanan *Lb. bulgaricus* Suşlarının Gerçek-Zamanlı PZR Görüntüleri.



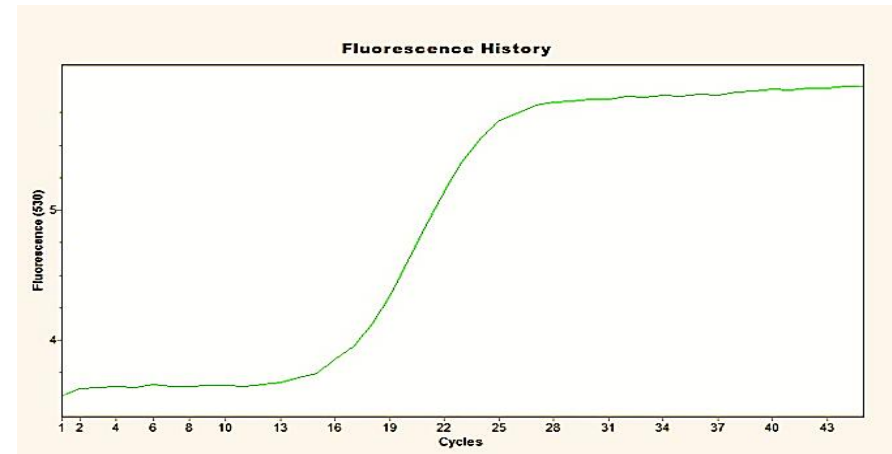
Lb11-C_p:14.73



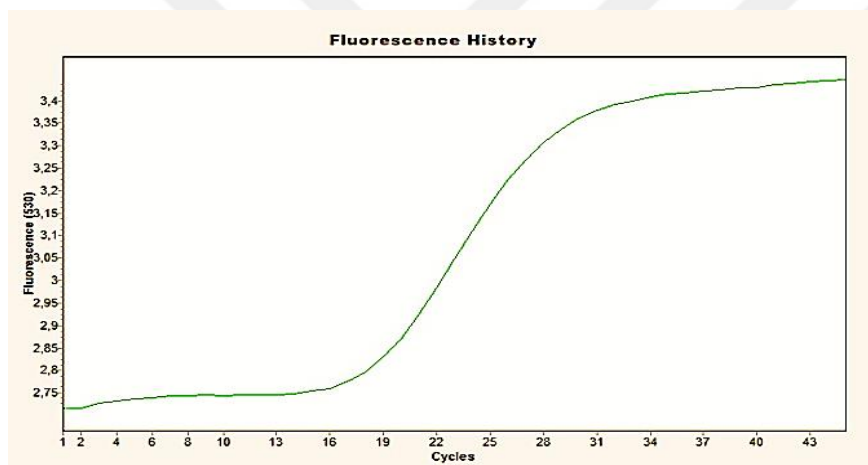
Lb12-C_p:17.67



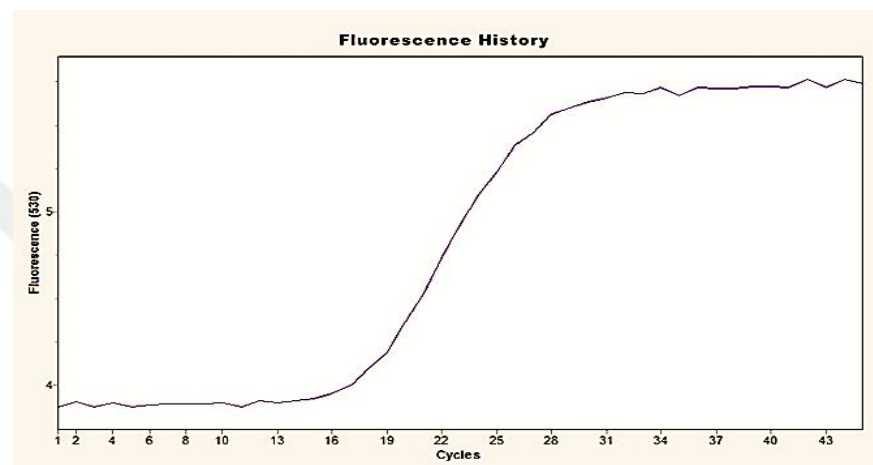
Lb13-C_p:15.59



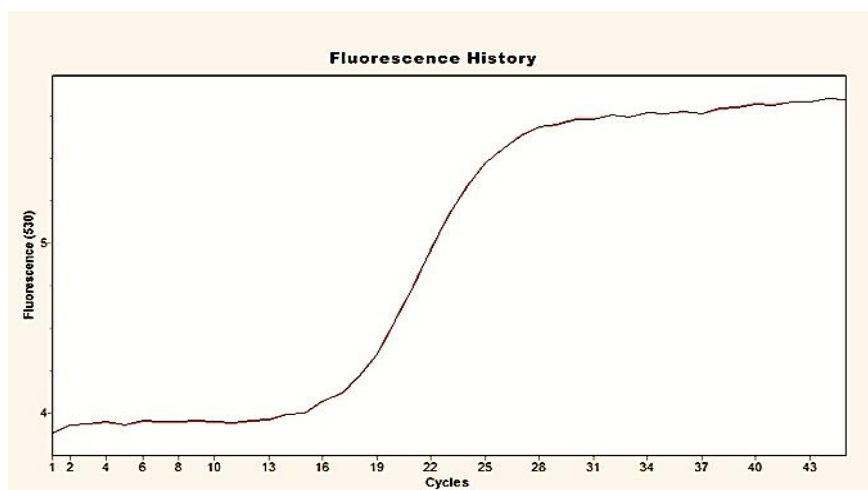
Lb15-C_p:15.75



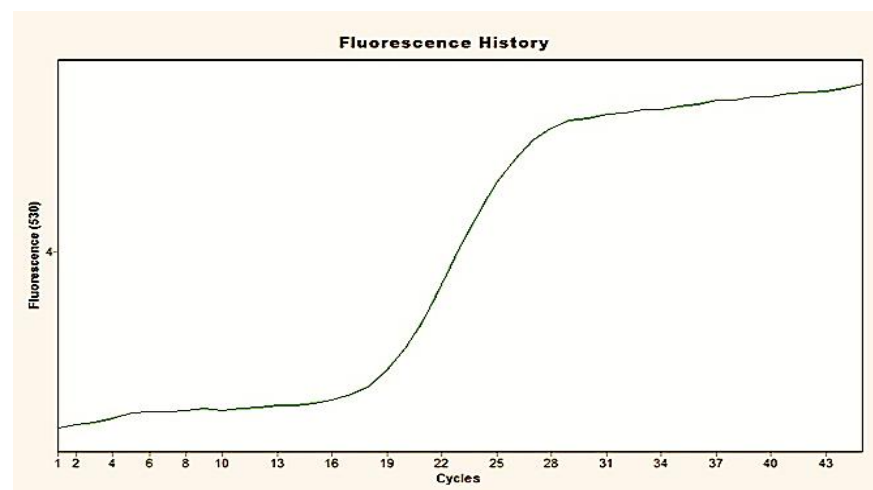
Lb17-C_p:17.59



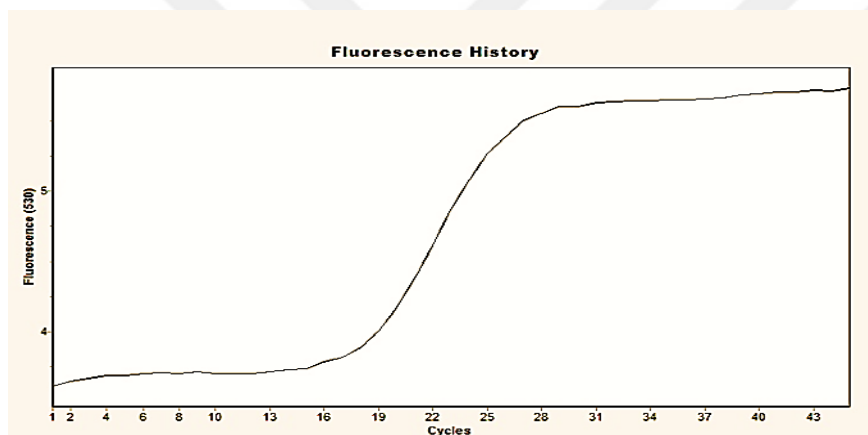
Lb21-C_p:16.85



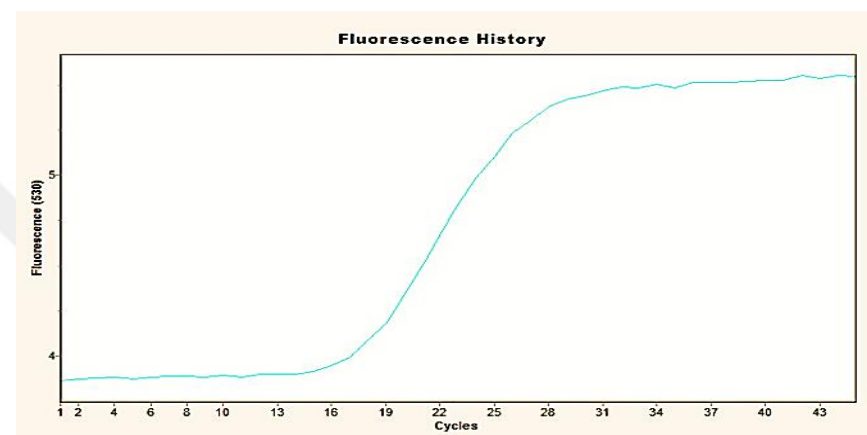
Lb23-C_p:16.68



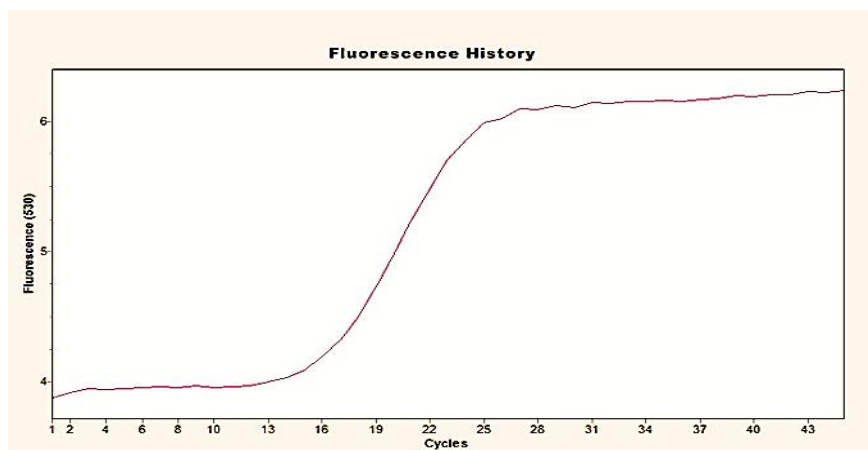
Lb24-C_p:17.83



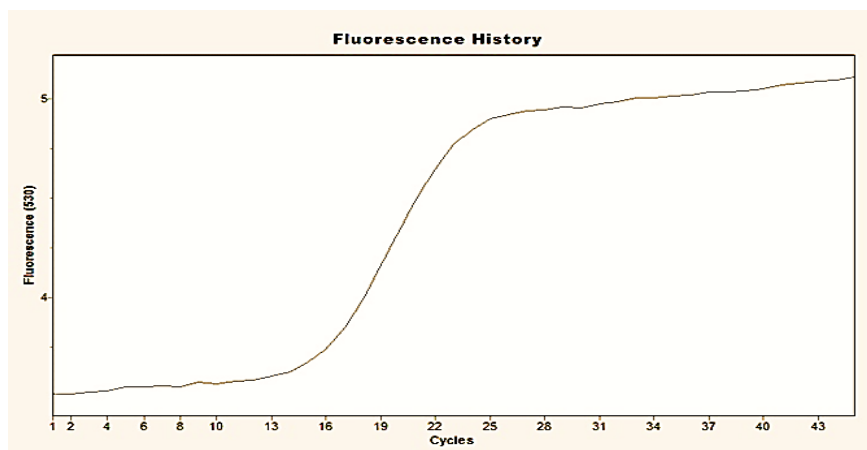
Lb27-C_p:17.54



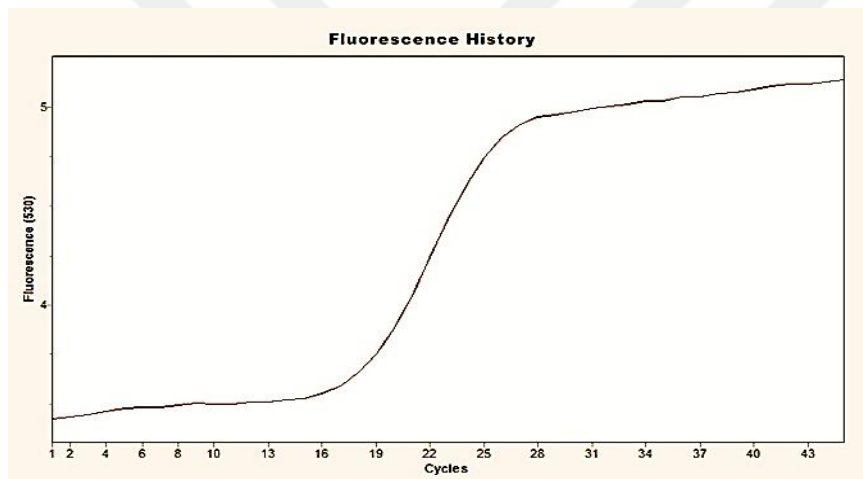
Lb30-C_p:16.33



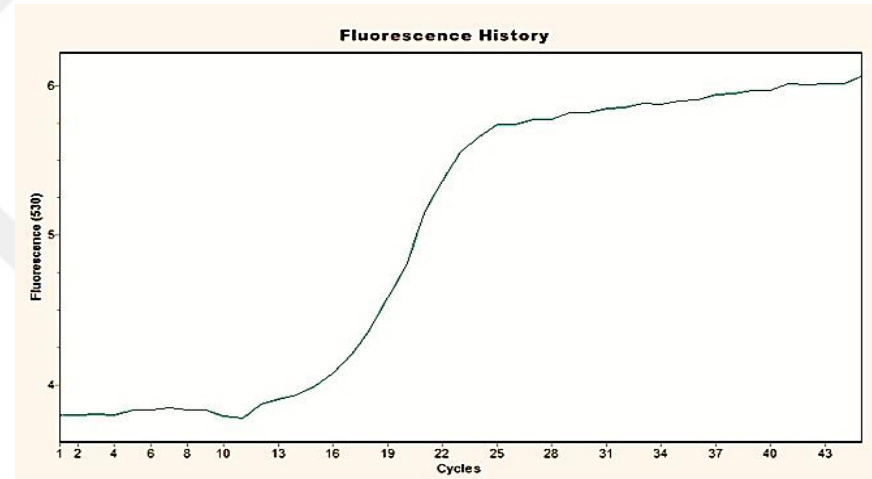
Lb37-C_p:15.30



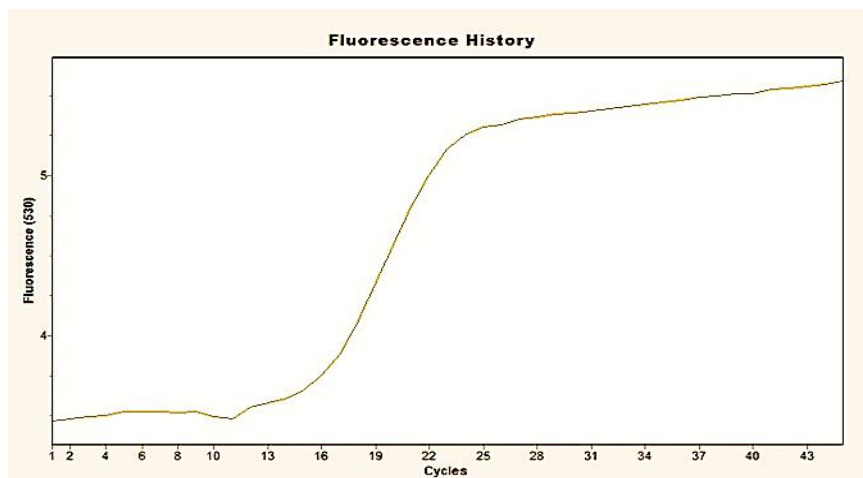
Lb39-C_p:14.84



Lb41-C_p:17.45



Lb42-C_p:15.80



Lb44-C_p:15.00

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Riza TABAK
Doğum Yeri : Malkara-TEKİRDAĞ
Medeni Hali : Bekar
E-posta : rizatabak@hotmail.com
Adresi : Aziziye mah. Refik Belendir sok. 40/3
Yukarı Ayrancı-Çankaya-ANKARA

Eğitim

Lise : 1987-1990 Malkara Lisesi-Tekirdağ
Lisans : 1990-1995 Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri
Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü-
Ankara
Yüksek Lisans :1999-2002 Trakya Üniversitesi Gıda
Mühendisliği
Bölümü-Tekirdağ
Doktora :2012-2018 Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri
Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü-
Ankara

Yabancı Dil ve Düzeyi : İngilizce-73 (KPDS)

İş Deneyimi:-

Deneyim Alanları:-

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi:-

Tezden Üretilmiş Yayınlar:-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar:-



**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU**

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA**

Tarih: 31/08/2018

Tez Başlığı / Konusu: Geleneksel Yoğurtlardan Starter Bakterilerin İzolasyonu, Moleküler Tanımlaması ve Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 152 sayfalık kısmına ilişkin, 31/08/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %7'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

31/08/2018

Adı Soyadı: Riza TABAK
Öğrenci No: N12149933
Anabilim Dalı: Gıda Mühendisliği
Programı: Gıda Mühendisliği
Statüsü: ☐ Y.Lisans ☒ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. S.Aykut AYTAÇ