



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

GIDA MÜHENDİSLİĞİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**KİMYASAL VE FİZİKSEL MUTASYONLAR İLE LAKTİK ASİT
BAKTERİ SUŞLARINDA PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şeyma ÇAVUŞOĞLU

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TOKATLI

TOKAT- 2022



Bu tez çalışması;

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2020/58 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim süresince değerli bilgi ve tecrübeleriyle yolumu aydınlatan danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TOKATLI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde görevli tüm hocalarıma, laboratuvar çalışmalarım esnasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Arş. Gör. Özgül GÜZEL YAZAR'a, lisansüstü eğitim sürecimi destekleyen Tokat İl Tarım ve Orman Müdürlüğü Gıda ve Yem Şube Müdürü Sayın Bayram AYATA'ya, desteklerinden dolayı İkbâl SAVAŞ ile çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi her türlü destekleriyle daima yanımda olan başta kıymetli annem Nahide ÇAVUŞOĞLU olmak üzere sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ŞEYMA ÇAVUŞOĞLU

Ekim, 2022

ÖZET

KİMYASAL VE FİZİKSEL MUTASYONLAR İLE LAKTİK ASİT BAKTERİ SUŞLARINDA PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Çavuşoğlu, Şeyma

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TOKATLI

Ekim 2022, 94 sayfa

Laktik asit bakterileri (LAB) gıda endüstrisinde starter ve probiyotik kültür olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bu açıdan suşların teknolojik ve probiyotik özelliklerinin geliştirilmesi büyük bir öneme sahiptir. Mutasyon uygulamaları suşların geliştirilmesinde etkin bir rol oynamaktadır. Yapılan tez çalışması kapsamında, zayıf probiyotik (safra tuzu, pH 2.5 ve proteolitik enzim dayanımı) özelliklere sahip olan yerel LAB suşları (*Lb. brevis* MF105, *Lb. plantarum* MF239, *Lb. plantarum* MF376, *Lb. plantarum* MF556, *P. ethanolidurans* MF229, *P. ethanolidurans* MF50) UV radyasyon, etidyum bromür (EtBr) ve etil metan sülfonat (EMS) kullanılarak mutasyon yolu ile probiyotik özellikleri geliştirilmiştir. LAB suşlarının probiyotik özelliklerindeki değişimi belirlemek için pH 2.5 dayanımı, safra tuzu dayanımı, pepsin-pankreatin dayanımı, kolesterol asimilasyonu, antibiyotik direnci ve yüzey hidrofobisitesi gibi özellikler in Vitro olarak belirlenmiştir. Ayrıca probiyotik özelliklerin belirlenmesinden sonra mutant LAB suşlarının genomik DNA'ları RAPD-PCR tekniği ile incelenerek genetik polimorfizm ortaya konulmuştur.

LAB suşlarında EtBr, EMS ve EtBr/EMS (Mix) ile gerçekleştirilen mutasyonlarda EtBr mutasyonların hücre canlılığında meydana getirdiği azalmanın EMS ve Mix'e kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir. Mutasyonlar sonrası ön seçimde 16 adet *Lb. plantarum* MF239 mutant suşu, 2 adet *Lb. plantarum* MF376 mutant suşu, 3 adet *Lb. plantarum* MF556 mutant suşu, 16 adet *P. ethanolidurans* MF229 mutant suşu ve 7 adet *P. ethanolidurans* MF50 mutant suşu seçilmiştir. Seçilen mutant suşların probiyotik özelliklerinde ise gastrik pH dayanım testlerinde en düşük canlılık kaybı MF239 Mix1 mutant suşunda ölçülmüş ve sırasıyla %91,37 canlılık düzeyi ve Ana suşa göre +27,27 birim canlılık düzeyinde artış sağlanmıştır. Safra tuzu dayanımında en yüksek canlılık artışı *Lb. plantarum* MF376 suşunun MF376 Mix1 mutantında ölçülmüştür ve %51,55 olan Ana suş canlılık düzeyi

mutant suşta %76,62 bulunarak +25,07'lik bir canlılık düzeyi artışı sağlanmıştır. Pankreatin enzim dayanımı açısından *P. ethanolidurans* MF50 suşunun mutant MF50 Mix2 suşunda en yüksek pankreatin enzim dayanım artışı sağlanmış olup +14,07'luk bir değer elde edilmiştir. Kloramfenikol antibiyotik direncinde (C30) Ana suşa kıyasla MF239 KUV1 (0 mm zon) ve MF239 EMS2 (0 mm zon) mutant suşlarında tam bir direnç oluştuğu gözlemlenmiştir. İncelenen probiyotik özelliklerden kolesterol asimilasyon (MF239 UV5, MF229 Mix3) ve yüzey hidrofobisite (MF229 EMS3, MF239 Mix3) değerlerinde bazı mutant suşlardaki artışlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. *Lb. plantarum* MF239 Mix1 ve *Lb. plantarum* MF376 Mix1 mutant suşlarının RAPD primer bantlarında Ana suşa göre farklılıklar gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Probiyotik, Mutasyon, UV Radyasyon, Etidyum Bromür, Etil Metan Sülfonat

ABSTRACT

IMPROVEMENT OF PROBIOTIC PROPERTIES IN LACTIC ACID BACTERIA STRAINS BY CHEMICAL AND PHYSICAL MUTAGENESIS

Çavuşoğlu, Şeyma

Master's Thesis, Division of Curriculum and Instruction

Advisor: Asst. Prof. Dr. Mehmet TOKATLI

October 2022, 94 pages

Lactic acid bacteria (LAB) have a wide range of uses in the food industry as starter and probiotic cultures. In this respect, it is of great importance to develop the technological and probiotic properties of strains. Mutation practices play an active role in the development of strains. Within the scope of the thesis study, local LAB strains (*Lb. brevis* MF105, *Lb. plantarum* MF239, *Lb. plantarum* MF376, *Lb. plantarum* MF556, *P. ethanolidurans* MF229, *P. ethanolidurans* MF50) with weak probiotic properties (bile salt, pH 2.5 and proteolytic enzyme resistance) were enhanced by mutation using UV radiation, ethidium bromide (EtBr) and ethyl methane sulfonate (EMS). In order to determine the change in probiotic properties of LAB strains, properties such as pH 2.5 resistance, bile salt resistance, pepsin-pancreatin resistance, cholesterol assimilation, antibiotic resistance and surface hydrophobicity were determined as in Vitro. In addition, after the determination of probiotic properties, genomic DNAs of mutant LAB strains were examined by RAPD-PCR technique and genetic polymorphism was revealed.

It was determined that the decrease in cell viability caused by EtBr mutations in mutations performed with EtBr, EMS and EtBr/EMS (Mix) in LAB strains was lower compared to EMS and Mix. In the preselection after mutations, 16 *Lb. plantarum* MF239 mutant strain, 2 *Lb. plantarum* MF376 mutant strain, 3 *Lb. plantarum* MF556 mutant strains, 16 *P. ethanolidurans* MF229 mutant strains and 7 *P. ethanolidurans* MF50 mutant strains were selected. In the probiotic properties of the selected mutant strains, the lowest viability loss in gastric pH resistance tests was measured in the MF239 Mix1 mutant strain, and an increase of 91.37% viability and +27,27-unit viability compared to the parent strain were achieved, respectively. The highest vitality increase in bile salt resistance was *Lb. plantarum* MF376 strain was measured in the MF376 Mix1 mutant and the main strain

viability level was 51.55%, 76.62% in the mutant strain, resulting in a +25.07-viability increase. In terms of pancreatin enzyme resistance, the highest pancreatin enzyme resistance increase was obtained in the mutant MF50 Mix2 strain of *P. ethanolidurans* MF50 strain and a value of +14.07 was obtained. In chloramphenicol antibiotic resistance (C30), a complete resistance was observed in mutant strains MF239 KUV1 (0 mm zone) and MF239 EMS2 (0 mm zone) compared to the parent strain. The increases in cholesterol assimilation (MF239 UV5, MF229 Mix3) and surface hydrophobicity (MF229 EMS3, MF239 Mix3) values in some mutant strains were found to be statistically significant. *Lb. plantarum* MF239 Mix1 and *Lb. plantarum* MF376 Mix1 mutant strains differed in RAPD primary bands compared to the parent strain.

Keywords: Probiotic, Mutation, UV Radiation, Ethidium Bromide, Ethyl Methane Sulfonate

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TABLolar LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Starter Kùltürler	3
2.2. Laktik Asit Bakterileri	4
2.3. Probiyotik Mikroorganizmalar	7
2.4. Bakterilerde Asit Dayanım Mekanizması.....	9
2.5. Bakterilerde Safra Tuzu Dayanım Mekanizması	10
2.6. Bakterilerde Antibiyotik Dayanım Mekanizması	11
2.7. Bakterilerde Kolesterol Asimilasyonu	12
2.8. Suş Geliştirme Yöntemleri	12
2.8.1. UV radyasyon	15
2.8.2. Kimyasal mutajenler	16
2.9. Mutasyonları Belirleme Yöntemleri.....	18
2.10. Suş Geliştirme Yöntemlerinin Kıyaslanması	19
2.11. Mikroorganizmalarda Yapılan Mutasyon Çalışmaları.....	20
3. MATERİYAL ve YÖNTEM	29
3.1. Materyal.....	29
3.2. Yöntem	29
3.2.1. Laktik asit bakteri kùltürlerinin aktifleştirilmesi	29
3.2.2. Mutasyon uygulamaları	29
3.2.3. Mutant suşların seçilimi.....	31
3.2.4. Mutant suşların probiyotik özelliklerinin inVitro karakterizasyonu	32
3.2.5. Mutasyonların genetik yöntemlerle belirlenmesi (RAPD PCR)	34
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	37
4.1. UV Radyasyonun LAB Suşlarının Canlılık Düzeylerine Etkisi	37
4.2. Etidyum Bromür (EtBr) ve Etil Metan Sülfonat (EMS) Mutajenlerinin LAB Suşlarının Canlılık Düzeylerine Etkisi.....	47
4.3. Mutant Suşların Ön Seçimi.....	50

4.3.1 pH dayanım ön seçimi.....	50
4.3.2. Safra tuzu dayanım ön seçimi	54
4.3.3. Pepsin-pankreatin enzim dayanımı ön seçimi	57
4.4. Mutant Suşların in Vitro Probiyotik Özellikleri.....	61
4.4.1. Mutant suşların gastrik pH dayanımı	61
4.4.2. Mutant suşların safra tuzu dayanımı	64
4.4.3. Mutant suşların pepsin ve pankreatin enzim dayanımı	68
4.4.4. Mutant suşların antibiyotik dirençleri	70
4.4.5. Mutant suşların kolesterol asimilasyon özellikleri.....	73
4.4.6. Mutant suşların yüzey hidrofobisite özellikleri	76
4.5. Mutasyonların Genetik Yöntemlerle Belirlenmesi (RAPD PCR)	77
5. SONUÇ	82
6. KAYNAKLAR.....	84

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4.1. LAB suşlarına farklı sürelerde uygulanan UV radyasyonun besiyerinde koloni oluşumuna etkisi	38
Tablo 4.2. LAB suşlarına farklı sürelerde uygulanan UV radyasyonun logaritmik azalma düzeylerine etkisi	45
Tablo 4.3. <i>Lb. brevis</i> MF105 suşundan UV ve Kimyasal mutasyon uygulamaları ile elde edilen suşların düşük pH’da hücre gelişim artış oranları	51
Tablo 4.4. <i>Lb. plantarum</i> MF239 suşunda UV ve Kimyasal mutasyon uygulamaları ile elde edilen suşların düşük pH’da hücre gelişim artış oranları.	53
Tablo 4.5. <i>Lb. plantarum</i> MF376 suşunda UV ve Kimyasal mutasyon uygulamaları ile elde edilen suşların safra tuzunda hücre gelişim artış oranları.....	55
Tablo 4.6. <i>Lb. plantarum</i> MF556 suşunda UV ve Kimyasal mutasyon uygulamaları ile elde edilen suşların safra tuzunda hücre gelişim artış oranları.....	56
Tablo 4.7. <i>P. ethanolidurans</i> MF229 suşunda UV ve Kimyasal mutasyon uygulamaları ile elde edilen suşların pepsin ve pankreatin varlığında hücre gelişim artış oranları	57
Tablo 4.8. <i>P. ethanolidurans</i> MF50 suşunda UV ve Kimyasal mutasyon uygulamaları ile elde edilen suşların pepsin ve pankreatin varlığında hücre gelişim artış oranları.	59
Tablo 4.9. Mutasyon uygulamaları sonrası izole edilen ve mutant olarak seçilen LAB suşlarının adet sayıları	60
Tablo 4.10. Mutant LAB suşlarının pH 2.5 dayanımları (log kob/mL)	63
Tablo 4.11. Mutant LAB suşlarının safra tuzu dayanımları (log kob/mL).....	66
Tablo 4.12. Mutant LAB suşlarının pepsin ve pankreatin enzim dayanımları (log kob/mL)	69
Tablo 4.13. Mutant suşların antibiyotik dirençleri (zon çapı, mm).....	71

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Etil Metan Sülfonat (EMS) (Sigmaaldrich.com).....	17
Şekil 2.2. Etidyum Bromür (Sigmaaldrich.com).....	18
Şekil 3.3. Kolestrol standart grafiği.....	34
Şekil 4.1. <i>Lb. brevis</i> MF105 suşuna farklı sürelerde uygulanan UV radyasyonun hücre canlılık düzeylerine etkisi (log kob/mL)	39
Şekil 4.2. <i>Lb. plantarum</i> MF239 suşuna farklı sürelerde uygulanan UV radyasyonun hücre canlılık düzeylerine etkisi (log kob/mL)	40
Şekil 4.3. <i>Lb. plantarum</i> MF376 suşuna farklı sürelerde uygulanan UV radyasyonun hücre canlılık düzeylerine etkisi (log kob/mL)	41
Şekil 4.4. <i>Lb. plantarum</i> MF556 suşuna farklı sürelerde uygulanan UV radyasyonun hücre canlılık düzeylerine etkisi (log kob/mL)	42
Şekil 4.5. <i>P. ethanolidurans</i> MF229 suşuna farklı sürelerde uygulanan UV radyasyonun hücre canlılık düzeylerine etkisi (log kob/mL).....	44
Şekil 4.6. <i>P. ethanolidurans</i> MF50 suşuna farklı sürelerde uygulanan UV radyasyonun hücre canlılık düzeylerine etkisi (log kob/mL).....	44
Şekil 4.7. Kesikli UV radyasyon uygulamasının LAB suşlarının hücre canlılık düzeyleri üzerine etkisi (log kob/mL)	46
Şekil 4.8. Kimyasal mutajenler Etidyum Bromür (EtBr), Etil Metan Sülfonat (EMS) ve EtBr/EMS karışımlarının (Mix) LAB suşlarının hücre canlılık düzeyleri üzerine etkisi....	48
Şekil 4.9. Bazı mutant LAB suşlarına ait antibiyotik duyarlılık zonları	73
Şekil 4.10. Mutant suşların kolestrol asimilasyon değerleri (%).....	75
Şekil 4.11. Mutant suşların yüzey hidrofobisite değerleri (%).....	77
Şekil 4.12. <i>Lb. plantarum</i> MF239 Ana suş ve Mix1 mutant suşuna ait OPA2, OPA8, OPB08, OMP05 ve LAB49 RAPD primerleri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri.....	80
Şekil 4.13. <i>Lb. plantarum</i> MF376 Ana suş ve Mix1 mutant suşuna ait OPA2, OPA8, OPB08, OMP0,5 ve LAB49 RAPD primerleri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri.....	80
Şekil 4.14. <i>P. ethanolidurans</i> MF50 Ana suş ve Mix2 mutant suşuna ait OPA2, OPA8, OPB08, OMP0,5 ve LAB49 RAPD primerleri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri.....	81

1. GİRİŞ

Gıdaların çeşitli yöntemlerle muhafazası insanlık tarihinin ilk çağlarından günümüze kadar süregelmektedir. Bu amaçla; geleneksel olan kurutma, tutsüleme, tuzlama yöntemlerinin yanında mikroorganizmalar kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyon işlemleri geçmişte olduğu gibi günümüzde de aktif olarak kullanılmaktadır. Zaman içerisinde taksonomik, fizyolojik, biyokimyasal ve genetik olarak tanımlanmış saf kültürler ile mikroorganizmalar gıda üretiminde vazgeçilmez bir unsur haline gelmişlerdir. Gıda sanayiinde kullanılan starter kültürler; ham veya pastörize gıdada istenen etkiyi sağlayan ve fermantasyon işlemini hızlandırmak veya yönlendirmek amacıyla kullanılan bakteri, maya, küf gibi mikroorganizmaları içermektedir. Gıda üretiminde starter kültür seçimi; üretilecek ürünün özellikleri, yapısı, dokusu, istenen tat ve aroması üretim koşulları (fermantasyon süresi, sıcaklık, pH, gibi) ve verimlilik açısından büyük bir öneme sahiptir (Eisenbrand ve ark., 2010). Endüstriyel olarak kullanılacak mikroorganizmalar; genetik olarak stabil, metabolik ürünlerinin verimi yüksek, patojen olmayan, genetik olarak kolayca manipüle edilebilir, toksik olmayan, fermantasyon ortamından kolayca toplanabilen ve düşük maliyetli olmalıdır (Pathak ve ark., 2015).

Starter kültürler arasında laktik asit bakterileri önemli bir yer tutar. Laktik asit bakterilerinden; *Lactococcus lactis* ve *Lactococcus cremoris* çiğ süt ve peynirde baskın olan türlerdir ve peynir yapımında asidifikasyonu sağlarlar (Issa ve Tahergorabi, 2019). *L. delbruekii*, *L. bulgaricus*, *St. Salivarius* ve *St. thermophilus* türleri yoğurt üretiminde simbiyotik olarak birlikte görev alır. *Lactobacillus acidophilus* probiyotik olarak kullanılan bir kültürdür. *Leuconostoc* ise heterofermantatif olduğundan peynirlerde starter kültür olarak kullanılır. *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* ve *Tetragenococcus* cinsleri ise turşu yapımında etkin mikrofloradır (Rodríguez ve ark., 2009; Tokatlı ve ark., 2012). Kımızda ise *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* birlikte yer alırlar (Tegin ve ark., 2014).

Mikroorganizmaların insan sağlığı üzerindeki olumlu etkisi gözlemlendiğinden beri, insanların veya hayvanların sağlık durumunu iyileştirmek için bağırsak florasını canlı mikroorganizmaların yardımıyla modüle etmeye yönelik girişimlerde bulunulmuştur. Bu canlı ve faydalı mikroorganizmalar 'probiyotik' adı ile, kapsül olarak saf halde veya gıda formülasyonlarına dahil edilerek ticari olarak satışa sunulmaktadır (Pradhan ve ark., 2019).

Dünya Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yaptığı tanıma göre probiyotikler; yeterli miktarda tüketildiğinde bağırsakta mikrobiyal dengeyi geliştirerek konakçıya sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalardır (FAO/WHO, 2002). Probiyotik mikroorganizmalar; laktik asit bakterileri, *Bifidobacterium*, *Bacillus* türleri ve bazı mayalardır (Wood ve ark., 1995).

Mikroorganizmalar değerli ve geniş ürün yelpazesi sunmakta çok başarılı olsalar da genellikle endüstriyel ölçeklerde yetersiz kalmaktadır. Nüfus artışı, ürün yelpazesinin genişlemesi ve değişen tüketici talebi sebebi ile mikroorganizma içeren ürünlerde verim artışı ve çeşitli yeni özelliklerin eklenmesi ihtiyacını doğurmuştur (Adrio, 2005). Suş geliştirme; biyoteknolojik uygulamalar için metabolik kapasiteyi arttırmak amacı ile mikrobiyal suşların manipüle edilmesidir. Suş geliştirme teknikleri klasik ve genetik yöntemler olarak iki gruba ayrılır. Klasik yöntemlerde; genetik düzenlemeler olmadan mikroorganizmalardan doğal durumda en yüksek verimi elde etmek hedeflenir. Suş izolasyonu, suş adaptasyonu, fermentör dizaynı, fermentör tekniklerinin geliştirilmesi, immobilizasyon gibi yöntemler kullanılır. Genetik yöntemler ise; doğal rekombinasyon teknikleri, mutasyonlar ve rekombinant DNA teknolojisidir.

Bu çalışma kapsamında genetik yöntemlerden biri olan mutasyon teknolojisi kullanılmıştır. Elde edilen LAB suşlarının probiyotik özelliklerinde gelişme sağlayacak mutasyon tekniği belirlenmiş ve elde edilen mutant suşlar kültür koleksiyonlarına ve bilimsel araştırmalara biyomateryal sağlayabilecektir. Fermente ürünlerimize has özellikler taşıyan ve ürüne uygunluğu araştırılmış kültürler kullanılarak üretilen mutant suşların geliştirilmesi yerel starter kültür stoğuna da katkı sağlayacaktır. Ayrıca, mutant laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliklerinde gelişmelerin sağlanması ile, yerel suşların probiyotik starter kültür olarak kullanım potansiyellerinin belirlenmesine olanak sağlanmıştır. Bu nedenle, çalışma kapsamında elde edilen veriler, bu konudaki bilimsel bilgi birikimine önemli katkılar sağlayacak; ayrıca, probiyotik özellikleri geliştirilen suşlar, starter kültür geliştirme çalışmaları ve bilimsel çalışmalar için biyomateryal olabilecektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Starter Kültürler

Starter kültürler, bir fermantasyon sürecini başlatmak için kullanılan saf veya karışık bakteri, maya veya mantar suşlarıdır. Başlangıç kültürü, güvenli olarak bilinen ve kararlı metabolik aktivite gösteren gıda sınıfı mikroorganizmaların seçilmiş suşlarıdır ve tüketiciler tarafından istenen görünüm, tat, doku ve beğeniye sahip fermente gıdalar oluşturmak için kullanılır. Starter mikroorganizmalar, gıda endüstrisinin farklı alanlarında ve ayrıca biyolojik olarak zenginleştirilmiş gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır (Suleiman, 2019). Starter kültürler, süt endüstrisinde; peynir, yoğurt ve diğer fermente süt ürünleri üretimi, et endüstrisinde; özellikle sosis üretimi, alkol üretimi için bira ve şarap endüstrisi, sirke üretimi, pirinç ve soya bazlı doğu ürünleri, fermente tahıl, meyve ve sebzelerin üretimi gibi çok çeşitli gıda endüstrilerinde kullanılmaktadır (García-Díez ve Saraiva, 2021). Starter kültür olarak bir mikroorganizmayı seçmek için starter kültürün güvenli, büyük ölçekte üretilebilir ve saklama sırasında canlı ve stabil kalması gereklidir (Taskila, 2017).

Laktik asit bakterileri (LAB) grubu starter kültür endüstrisinde merkezi bir rol oynar, fermente gıda ve içeceklerin üretiminde uzun ve güvenli bir uygulama ve tüketim geçmişine sahiptir (Suleiman, 2022). Besinsel, çevresel ve yapışma adaptasyonları gibi özellikler, LAB'ne süt ürünleri, etler, sebzeler, ekşi mayalı ekmek gibi gıda matrislerinden farklı ortamlara kadar uyum sağlama yeteneği sağlamıştır. Ek olarak LAB, ağız boşluğu, vajina ve gastrointestinal sistem gibi insan mukozal yüzeylerinin mikroflorasında yaygın olarak bulunur (Binsist, 2018). Başta laktik asit olmak üzere diğer organik asitlerin üretimi yoluyla hammaddenin hızlı asitlenmesine neden olurlar. Ayrıca asetik asit, etanol, aroma bileşikleri, bakteriyosinler, ekzopolisakkaritler ve çeşitli enzim üretimleri gıda sanayinde önemli bir yere sahiptir. Mikroorganizmalar aktiviteleri sayesinde raf ömrünü ve mikrobiyal güvenliğini artırırlar, dokuyu iyileştirirler ve son ürünün istenen duyuşsal özelliklerine katkıda bulunurlar.

2.2. Laktik Asit Bakterileri

Laktik Asit Bakterileri (LAB) genel olarak, karbonhidrat fermantasyonunun metabolik son ürünü olarak laktik asit üreten gram pozitif, spor oluşturmeyen, kok veya çubuk şeklinde olabilen bakteri grubu olarak tanımlanır (Stiles ve Holzapfel, 1997; Peng ve ark., 2020).

LAB düşük GC oranına sahiptir. Genom boyutları *Oenococcus oenito* için 1.8 Mb ve *Lactobacillus plantarum* için 3.3 Mb aralığındadır. *Lactobacillales*'nin atası olan *Bacilli*'den ayrılması, biyosentetik enzimleri kodlayan birçok gen de dahil olmak üzere 600-1200 gen kaybı ile gerçekleşmiştir. LAB'nin mevcut genomlarının analizi, kaybedilen genlerin çoğunun, özellikle besin açısından zengin gıda ortamlarına adaptasyondan kaynaklandığını göstermektedir. LAB'lerin erken dönemlerde meydana gelen gen kayıplarının yanı sıra, çeşitli metabolik süreçlerde yer alan genlerdeki kayıplar bu türlerin şekillenmesine katkıda bulunmuştur. Gen kaybının en dikkate değer örneği, antibiyotik direnci ve tutunma gibi virülansla ilişkili genlerin kaybı ve bozulması yoluyla patojenik *Streptococcus* türlerinden ayrılan *Streptococcus thermophilus*' tur. Bu sayede *S. thermophilus*'un kullanımı GRAS (Genarally Regarded As Safe) statüsüne sahip olmuştur (Pfelier ve Klaenhemmer, 2007).

Laktik asit bakterileri, aralarında laktobasil, laktokok, enterokok, streptokok, lökonostok ve pediokok olan çok sayıda bakteri cinsi içerir. Bu cinsler morfoloji, pH ve tuz toleransı, optimum sıcaklık, habitatlar ve patojenik potansiyel açısından farklılık gösterir. Yararlı ve toksik türler arasında net bir sınır çizgisi oluşturmak çok zordur, bazı sorunlu özellikler türlerden çok suşla bağlantılıdır. Bazı laktik asit bakterilerinin gıdalarda ve fermantasyon endüstrilerinde yaygın görülen bakteriyel kontaminantlar olduğu bilinmektedir. Bunlara örnek olarak vakumlu-paketlenmiş et ürünlerinde hoş olmayan kokulara ve istenmeyen tatlara neden olan *Lactobacillus sake*, bira ve şarapta bulanıklığı arttıran *Lactobacillus brevis* ve fermantasyonla biyoyakıt üretiminde maya büyümesini engelleyen ve etanol üretimini kısıtlayan *Lactobacilli* verilebilir (Beckner ve ark., 2011; Björkroth ve Korkeala, 1996; Tribst ve ark., 2008; Peng ve ark., 2020). Bununla birlikte uzun yıllardır insan tüketiminde kullanılmaları yanı sıra gıdalarda yaygın olarak görülmeleri nedeniyle insan tüketimi için *Lactobacilli* ve *Lactococci*, GRAS olarak kabul edilir (Pessione, 2012).

LAB suşları, farklı metabolik aktiviteleri keşfedebilen ve hızlı büyüyen mikroorganizmalar olarak da bilinir. Beslenme, çevresel ve tutunma adaptasyonları gibi özellikler LAB'ne süt ürünleri, etler, sebzeler, ekşi mayalı ekmek ve şarap gibi gıda ortamlarından ağız boşluğu, vajina ve gastrointestinal sistem gibi insan mukozal yüzeylerine kadar farklı ortamlarda

uyum sağlama yeteneği sağlamıştır. LAB, yalnızca laktik asit oluşturmaya özelliği ile değil, aynı zamanda etanol, aroma bileşikleri, ekzopolisakkaritler ve bakteriyosinler ve enzim gibi farklı moleküller üretmeleri nedeniyle de gıda endüstrisinde önemli bir rol oynamaktadır (Peng ve ark., 2020). LAB'nin birincil metabolik aktivitesi, esas olarak enerji ve karbon molekülleri elde etmek için karbonhidratların ve ilgili bileşiklerin parçalanmasıdır. Laktik asit karbonhidratların metabolizmasından üretilen ana üründür ve ara piruvatın bir kısmı alternatif olarak diasetil, asetoin, asetaldehit veya asetik aside (bazıları tipik yoğurt aromaları için önemli olabilir) dönüştürülebilir (Bintist, 2018). Bununla birlikte, LAB'nin proteinaz ve peptidaz aktiviteleri, başta peynir olmak üzere farklı gıda ürünlerinin olgunlaşmasında özel aroma gelişimi ve enzim modifikasyonundaki önemi nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Lipoliz ve polifenoller gibi kompleks bileşiklerin degradasyonu gibi diğer metabolik faaliyetlerde gıda endüstrisi için önemli rollere sahiptir. Bununla birlikte, LAB'nin metabolik aktiviteleri, biyoteknolojik açıdan önemli bileşiklerin maksimum üretim oranları için doğal olarak optimize edilmemiştir. LAB'nin büyümesi ve metabolik aktiviteleri hem biyokimyasal hem de biyofiziksel ortamlardan etkilenebilir (Saeed ve Salam, 2013).

Lactobacillus plantarum, *Lactobacillus* cinsinin en yaygın türlerinden biridir ve gıda teknolojisinde endüstriyel fermantasyon ve çiğ gıdaların işlenmesi alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. *Lb. plantarum* suşları “Generally Recognized As Safe” (GRAS) ve “Qualified Presumption of Safety” (QPS) statüsüne sahiptir (Behera ve ark., 2018). 1.8 ila 3.3 Mbp arasında değişen nispeten küçük genomlara sahip, çubuk şeklinde, tekli hücre veya kısa zincirler halinde bulunur. *Lactobacillus plantarum* fakültatif heterofermentatif bir laktiktir. Karbonhidratları genellikle fosfoketolaz yolu ile fermente eder. Pentozların (ksiloz, riboz) fermantasyonu, piruvat ve asetil-P oluşumuna ve ardından sırasıyla laktat ve asetata dönüşümlerine yol açar. Heksozları (glukoz, fruktoz, mannoz) laktat, CO₂ ve etanole dönüştürülebilirler. Genomu, glikoliz ve fosfoketolaz yolu için gerekli olan tüm enzimleri kodlar. (de Silva Sabo ve ark., 2014). *Lb. plantarum* potansiyel bir probiyotiktir ve esas olarak turşu, sauerkraut (Alman lahanası turşusu), kimchi (Kore turşusu), salamura zeytin, ekşi hamur ve diğer fermente meyve ve sebzeler ve ayrıca bazı peynirler, fermente soslar ve stockfish (tuzsuz balık, özellikle morina balığı) dahil olmak üzere fermente gıda ürünlerinde bulunur. *Lb. plantarum*, gıdaları kontamine edebilen ve insanlarda hastalıklardan sorumlu olan hem Gram negatif hem de Gram pozitif türler dahil olmak üzere çeşitli patojenik bakterileri inhibe etmede önemli bir kapasiteye sahiptir. Organik asit, enzim,

biyoaktif peptitler, vitaminler ve EPS'nin biyosentezi antimikrobiyal, antioksidan ve probiyotik özelliklerinin ana mekanizmalardandır (Behara ve ark., 2018).

Lactobacillus brevis süt, peynir, lahana turşusu, ekşi hamur, silaj, insanların ağız ve bağırsak yollarından izole edilebilen heterofermentatif bir organizmadır. *L. brevis*, geleneksel olarak fermente edilmiş çeşitli gıda ürünlerinde uzun süreli kullanımı nedeniyle, (GRAS) statüsüne sahiptir (Singh ve ark., 2020). *Lb. brevis* diğer birçok laktik asit bakterisinde olduğu gibi fermantasyon gerçekleştirir. Bu metabolik yolda şeker (heksozlar), 6-fosfoglukonat yolu ile laktik aside dönüştürülür ayrıca CO₂ ve etanol üretir. Enerji yol boyunca oksidatif olmayan substrat düzeyinde fosforilasyon ile üretilir. *L. brevis* özellikle endüstriyel üretimde çeşitli bira ve ekşi mayalı ekmek türleri için starter kültürü olarak kullanılır. Optimal büyüme koşulları 30°C ve pH 4- 6 arasındadır. *L. brevis*'in diğer Laktik asit bakteri türlerinden farkı, arjinin ve aromatik amino asitlerin biyosentezini gerçekleştiren genlerin kaybını içermesidir.

Pediococcus spp., Gram pozitif, kok şekilli, hareketsiz, spor oluşturmeyen laktik asit bakterisidir. Bu bakteriler, çiğ süt peynirlerinin florasında bulunur. Homofermantatif olmalarına rağmen, karbonhidrat asimilasyon modelleri ve fermantasyon türler ve suşlar arasında farklılık gösterebilir. Glikoz her zaman EmbdenMeyerhof-Parnas (EMP) yolu ile rasemik D ve L-laktata fermente edilir Pediokoklar tipik olarak laktozu fermente edemediğinden, süt fermentasyonlarındaki uygulamaları sınırlıdır. Bununla birlikte, başlatıcı olmayan ve yardımcı kültür olarak peynire arzu edilen özellikler kazandırmada rol alırlar (Papagianni ve Anastasiadou, 2009). *Pediococcus spp.* Dünyanın çeşitli coğrafi bölgelerinde geleneksel olarak üretilen cheddar peyniri, koyun sütü peynirleri ve diğer bazı çiğ süt peynirlerinden izole edilebilmektedir (Noohi ve ark., 2016; Ekinci ve ark., 2018). *Pediococcus spp.*; *P. etanolidurans*, *Pediococcus inopinatus*, *P. dextrinicus*, *P. claussenii*, *P. damposus*, *P. cellicola*, *P. parvulus*, *P. stilesii*, *P. acidilactici* ve *P. pentosaceus*'u kapsayan çeşitli türleri içerir. Türler ve suşlar oksijen, pH, sıcaklık ve NaCl'e karşı tolerans açısından farklılık gösterir. *Pediococcus* türü bakteriler tarafından sentezlenen bakteriyosin sınıfında yer alan pediosin gram pozitif bakterilere, özellikle *Listeria monocytogenes*'e karşı oldukça aktif antimikrobiyel etki göstermektedir. Pediosinler nanomolar seviyelerde bile antimikrobiyal potansiyellerini gösterebilirler (Zommiti ve ark., 2018).

2.3. Probiyotik Mikroorganizmalar

Probiyotik mikroorganizmalar; Laktik asit bakterileri, Bifidobacterium, Bacillus ve bazı mayalardır. Laktik asit bakterilerinden Lactobacillus suşları ilk keşfedilen probiyotik mikroorganizmadır. Bu cins; çubuk şekilli gram pozitif özelliklerine sahip bakterilerden oluşur. Gıda endüstrisinde koruyucu maddeler, asitleştiriciler, tatlandırıcıların üretiminde ayrıca ilaç ve kozmetik sanayiinde ve biyobozunur polilaktik asit polimerlerinin üretiminde görev alırlar. Sağlıklı yaşamın sürdürülmesi ve sağlık sorunlarının iyileştirilmesinde kanıtlanmış etkiye sahip, hayvan ve insan gastrointestinalinde baskın LAB grupları; Lactobacillus ‘un yanında *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. satsumensis* ve *L. Johnsonii*’dır. Kanıtlanmış probiyotik etki gösteren diğer LAB türleri arasında Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus, Pediococcus ve Leuconostoc bulunur (Wood ve ark., 1995). Laktik asit bakterileri glikoz, früktoz, laktoz ve galaktoz karbon kaynaklarından metabolik yollarla yüksek miktarda laktik asit üretir (Carr ve ark., 2002). Laktik asit bakterileri ayrıca bakteriyosin, ekzopolisakkarit ve enzim gibi fermente ürünlerin raf ömrünü ve kalitesini arttıran ikincil metabolit ürünler sentezler (Leroy ve ark., 2004; de Melo de Melo Pereira ve ark., 2018).

Bifidobacterium 19.yy’da keşfedilmiş ve toplam Guanin ve Sitozin oranı %42-67 arasında değiştiği için Actinomycetes grubuna dahil edilmiştir. Heterofermantatif, hareketsiz, katalaz negatif, aneorobik ve glikoz, galaktoz, früktoz, laktoz şekerlerini metabolize etme yeteneğine sahiptirler (Russell ve ark., 2011). *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B.breve*, ve *B. longum* türlerinin çeşitli probiyotik etkileri belirlenmiştir. Bu mikroorganizmalar yoğurt, süt, peynir gibi süt ürünlerinde yoğun olarak bulunur. (Picard ve ark., 2005; Russell ve ark., 2011; de Melo Pereira ve ark., 2018).

Bacillus türleri (*B. clausii* ve *B. subtilis*) probiyotik olarak gıdalarda ve ilaç endüstrisinde kullanım alanına sahiptir (Liu ve ark., 2018; Ripert ve ark., 2016). Gram pozitif ve aerobik Bacillus türlerinin temel özelliği uzun raf ömrü sağlayan endospor oluşturma yeteneğidir (Cutting, 2011). Fakat bazı türleri (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycoides* ve *B. weihenstephanesis*) enterotoksin ürettiği için güvenlik tehlikesi oluştururlar (Hong ve ark., 2008; Sorokulova ve ark., 2008; de Melo Pereira ve ark., 2018).

Mayalar, insanlarda, bitkilerde, havada, gıda ürünlerinde ve insan bağırsağı gibi doğal ortamlarda yaygın olarak bulunan ökaryotik mikroorganizma grubudur (Foligné ve ark., 2010). Yüksek miktarda protein içeriği, B vitamini, iz mineraller ve çeşitli immün uyarıcı

bileşikler (proteazlar, β -glukanlar ve mannan oligosakaritler) içermesi mayaların probiyotik olarak kullanımına olan ilgiyi arttırmıştır (Gil-Rodríguez ve ark., 2015). Mayaların antibiyotiklere ve endüstriyel işlem koşullarına karşı dayanıklılığı (yüksek sıcaklık vs.) probiyotik olarak kullanımında avantaj sağlar (Abdel-Rahman ve ark., 2013; Fleet, 2011; Morgunov ve ark., 2013; Joshi ve Thorat., 2011). Avrupa Gıda Güvenliği Örgütü (EFSA) tarafından *Saccharomyces boulardii*'nin tüketimi güvenli olarak ilan edilmiştir ve uzun yıllardır probiyotik olarak kullanılmaktadır (Hudson ve ark., 2016; de Melo Pereira ve ark., 2018).

Probiyotik mikroorganizmaların kaynağı insan kökenli; insan bağırsağı, anne sütü, hayvansal kökenli; çiğ süt veya fermente gıda olabilir. İnsanlarda kullanılacak probiyotik mikroorganizmanın insan kaynaklı olması bağırsak duvarına diğer suşlardan daha iyi tutunabilmesi ve güvenli olması açısından tercih edilir (Elmer ve ark., 2007; Dash, 2009). Probiyotik olarak seçilecek mikroorganizmalar öncelikle patojenik ve toksik olmamalıdır. FDA tarafından GRAS statüsünde ve EFSA tarafından QPS onaylı olmalıdır (Kosin ve ark., 2006). Özellikle toprak kökenli mikroorganizmalar probiyotik olarak seçilmeden önce toksikolojik çalışmaları yapılmalıdır (Shewale ve ark., 2014).

Probiyotik mikroorganizmalar ilk olarak mide ardından gastrik ortam asitlik seviyesi (pH 1.2-2.5) ve safra tuzu gibi stres etkenlerine karşı toleranslı olmalı hayatta kalarak bağırsağa ulaşabilmelidir (Dunne ve ark., 2001; Cho, 2010; Shewale ve ark., 2014). Probiyotiklerin bağırsağa ulaştıktan sonra intestinal mukus ve epitel hücrelere yapışması, probiyotik olarak seçilmesi için en önemli kriterlerinden biridir. Bağırsak mukozasına yapışma, probiyotik hücrelerin yıkanarak vücut dışına çıkmasını önleyebilir ve böylece geçici kolonizasyon, immün modülasyon ve patojenlerin rekabetçi dışlamaları sağlanabilir. Enzimler, laktik asitler, vitaminler ve doğal antibiyotikler üretmek için, probiyotik türün bağırsak duvarına yapışması, kolonileşmesi ve çoğalması gerekir (Nemcova, 1997; Shewale ve ark., 2014).

Probiyotik suşların antimikrobiyal madde üretme kapasitesine sahip olması probiyotik olarak seçilme kriterlerinin en önemlilerindendir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen birçok organik bileşik (organik asitler, yağ asitleri, hidrojen peroksit ve diasetil dahil) antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Bunlarla birlikte bakteriyosin gibi spesifik inhibitör etkiye sahip maddeler de öneme sahiptir. Günümüzde insan tüketimine izin verilen tek bakteriyosin, nisindir (*Lactobacillus lactis* tarafından üretilir). Probiyotik suşlar, doğal ve kazanılmış bağışıklık tepkisinin birkaç yönünü düzenleyebilmeli ve uyaramalıdır.

Probiyotiklerin enteropatojenlere karşı sitokin üretimini uyarak mikrofajların ve hücrelerin fagositik kapasitesini arttırmalıdır (Shewale ve ark., 2014).

Probiyotik olarak seçilecek mikroorganizmanın insan sağlığı üzerinde olumlu özellikleri olmalıdır. Sağlık yararlarını elde etmek için, probiyotik bakteriler canlı ve yüksek konsantrasyonda, tipik olarak 10^5 ila 10^7 CFU arasında bağırsak sisteminde bulunmalıdır. Gastroenterit, irite barsak sendromu ve İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı (IBD; Crohn hastalığı ve ülseratif kolit), ishal, kanser, depresif bağışıklık fonksiyonu, yetersiz laktaz sindirimi, bebek alerjileri, iyileşmeyen yetmezlik, hiperlipidemi, karaciğer hastalıkları, *Helicobacter pylori* enfeksiyonları ve AIDS gibi hastalıklara karşı fayda sağlamalıdır (Masci, 2013; Shewale ve ark., 2014). Probiyotik mikroorganizma ayrıca gıda takviyelerinde ve herhangi bir endüstriyel işlem aşamalarında hayatta kalabilme yeteneğine sahip olmalıdır. Üretim açısından probiyotik mikroorganizmaların stabilitesi çok önemlidir. Probiyotiklerin stabilitesi yüksek sıcaklık, oksijen ve su miktarından önemli derecede etkilenir. Stabilitate kriterleri; depolama ve işleme sırasında canlılığını kaybetmeme, basit ve ucuz fermantasyon ortamında maksimum konsantrasyonlarda büyüebilme, mikroaerofilik veya aerobik koşullarda büyüüp hayatta kalabilme, önemli derecede yaşam kaybı olmadan fiziksel kullanıma dayanabilme, gıda matrislerinde ve işlemler sırasında hayatta kalabilmedir (Salminen ve ark., 1998; Shewale ve ark., 2014).

2.4. Bakterilerde Asit Dayanım Mekanizması

Evrimsel süreçte mikroorganizmalar hücresel aktivitelerinin sürekliliği için büyüme koşullarını optimize etmişlerdir. Büyüme ortamı streslerinden pH değişikliği sonucunda metabolik bozukluk ve hücre ölümü gerçekleşebilir. Çoğu mikroorganizma çevre koşullarındaki pH'daki küçük değişikliklere uyum sağlayabilip hayatta kalabilir bununla birlikte ve çevresel pH kademeli olarak düştüğünde indüklenmiş asit toleransı oluşturabilir. Mikroorganizmaların pH dayanımının rolü iki yönlüdür. Bazı mikroorganizmalar patojeniktir asit streslerine karşı tolerans geliştirmeleri istenmeyen bir durumdur (Mani-López ve ark., 2012). Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalarda ise daha iyi fizyolojik fonksiyonlar için daha iyi asit tolerans mekanizmaları arzu edilir (Ranadheera ve ark., 2014).

pH dayanım mekanizmalarından pH homeostaz; hücre içindeki ve dışındaki pH'ın düzenlenmesidir. Besinlerin emilimi ve kullanımını, substratların indirgenmesini,

proteinlerin ve nükleik asitlerin sentezini, hücre büyümesi ve metabolizmasını etkileyen kritik öneme sahiptir. Asit dayanım mekanizmalarından Proton geçirgenliğinin kısıtlanmasında; proton hareket kuvveti (PMF) ile uygulanır. PMF, sitoplazma ve dış ortam arasındaki yük ayrımının yarattığı hücre zarının enerji durumunun bir ölçümüdür (BakerAustin ve Dopson, 2007). Protonların içeri ve dışarı akışı arasındaki denge ile sürdürülür. PMF'ye bağlı proton pompası, pH homeostazının korunmasında bakterilerdeki en önemli asit tolerans sistemlerinden biridir ve bu sayede fazla protonlar sitoplazmadan dışarı pompalanır. Transmembran proton taşınmasını kontrol etmeye ek olarak, bazı mikroorganizmalar asidik ortamlarda pH homeostazını sürdürmek için aşırı sitoplazmik proton tüketimine dayanan birkaç asit tolerans mekanizması geliştirmiştir. Alkali ürünler üreten hücrelerin enzim sistemleri bu mekanizmalarda kilit rol oynar. Çevresel stresin birincil hedefi, asidik koşullar altında hücresel aktivitelerin çeşitli şekillerde sürdürülmesine yardımcı olan hücre zarlarıdır. Kanal boyutunu ayarlayarak proton geçirgenliğini kısıtlamaya ek olarak, membran biyoenerjisini ve lipid fizyolojisi de mikroorganizmalardaki stres tepkisi ile yakından ilişkilidir. Mikroorganizmalar, asit ortamlarına adaptasyon sırasında asit toleranslarını geliştirmek için karmaşık metabolik düzenleyici mekanizmalar geliştirmiştir. Glikolitik yolu güçlendirerek asidik koşullar altında hayatta kalma, büyüme ve metabolizma için öncüllerini, kofaktörlerini ve redoks faktörlerini yükseltirler. Mikroorganizmalarda protein sentezine bağlı asit tepki mekanizması yaygın olarak gözlenmiştir (Liu ve ark., 2015). Spesifik proteinler genellikle DNA ve proteinler gibi makromolekülleri korumak veya onarmak için asit stresi tarafından indüklenir. Proteinlerin sentezi, taşınması, katlanması ve parçalanması sırasında önemli olan şaperonlar, önemli asit tolerans faktörleri olarak kabul edilmiştir (Guan ve Liu, 2019).

2.5. Bakterilerde Safra Tuzu Dayanım Mekanizması

Safra tuzu toleransı, probiyotik bakterilerin ince bağırsakta yaşama yeteneğini ve dolayısıyla probiyotik olarak fonksiyonel rolünü oynama kapasitesini belirlediğinden, probiyotik bakteriler için en önemli özelliklerden biridir.

Safra tuzu toleransı suşa bağlı olduğu düşünülse de laktobasiller safra tuzlarının varlığına aşamalı olarak adapte olabilir. Kademeli olarak artan safra tuzu konsantrasyonlarında alt kültürleme yoluyla ana suştan daha dirençli suşlar elde edilebilir.

Bazı durumlarda asit, pH gibi diğer stres koşullarına göre seçim yapılarak safra tuzuna dirençli suşlar da elde edilebilir. Safraya adapte olan suşlar genellikle diğer stres faktörlerine karşı çapraz direnç gösterir (Margolles ve ark., 2003). Genel olarak safra tuzu toleransı safranin detoksifikasyonuna ve bakteri yapıları üzerindeki zararlı etkilere karşı koymaya yönelik çeşitli süreçleri içeren çok faktörlü bir fenomendir. Laktobasillerde safra tuzlarının direnci; safra tuzu hidrolizi ve hücre duvarının yapısındaki/bileşimindeki değişiklikler olmak üzere en yaygın mekanizmalar olarak ortaya çıkmaktadır. Bunlara ek olarak safranin neden olduğu bazı hücresel zararlara karşı koymak için genel stres tepkisinin yanı sıra glikolitik sistemin yeniden düzenlenmesi gibi mekanizmalar rol alır (Ruiz ve ark., 2013).

2.6. Bakterilerde Antibiyotik Dayanım Mekanizması

Antibiyotik direnci; bir bakterinin antibakteriyel maddenin üremeyi önleme ve bakterisidal etkisini antogonize etme yeteneğidir. Bakteriler antibiyotiklere karşı dört ana direnç türü geliştirir. Doğal (içsel, yapısal) direnç; bakterilerin yapısal özelliklerinden kaynaklanır ve antibiyotik kullanımı ile ilişkili değildir. Doğal direnç, mikroorganizmaların hedef antibiyotiğin yapısını içermemesi veya antibiyotiklerin özelliğinden dolayı hedefine ulaşamaması sonucu gelişir. Sonradan kazanılan direnç; bakterilerin genetik özelliklerinin değişmesi sonucunda daha önce duyarlı olduğu antibiyotiklerden etkilenmemesidir. Bu tür direnç, esas olarak kromozom yapıları veya kromozom dışı yapılar nedeniyle oluşur. Kromozomda oluşan direnç, bakteri kromozomunda spontan gelişen mutasyonlardan kaynaklanır. Bu tür mutasyonlar bazı fiziksel (ultraviyole vb.) ve kimyasal etkenlere bağlı olarak meydana gelebilir. Bakteri hücrelerindeki yapısal değişiklikler ile sonuçlanabilir. Antibiyotik geçirgenliğinin azalması veya hücre içinde ilacın hedefindeki yapıların değişikliği ile gerçekleştirilir. Ekstra kromozomal direnç; plazmitler, transpozonlar ve integro gibi çeşitli yollarla aktarılabilen kromozom dışı genetik elementlere bağlıdır. Çapraz direnç; belirli bir antibiyotiğe dirençli olan mikroorganizmanın aynı veya benzer mekanizma ile hareket eden diğer ilaçlara da dirençli olması durumudur. Bu durum genellikle yapıları benzer olan antibiyotiklerde görülür. Çoklu antibiyotik direnci ve pan-direnç; bakterilerin kendilerini etkisiz hale getirmek için kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli hale gelmeleridir. Bu şekilde kullanılan belirli bir antibiyotiğin artık bakterileri öldüremeyeceği veya kontrol edemediği anlamına gelir. Bakterilerde çoklu ilaç direnci iki mekanizma ile meydana gelebilir. İlk olarak bakteriler her biri tek bir ilaca karşı direnci kodlayan birden

fazla gen biriktirebilir. Bu tip direnç tipik olarak direnç (R) plazmitlerinde meydana gelir. İkinci tip direnç, yani çoklu ilaç direnci, çoklu ilaç akış pompalarını kodlayan genlerin ekspresyonunun artması, enzimatik inaktivasyon, hücre içindeki antibiyotik hedefinin yapısındaki değişiklikler şeklinde gerçekleşir (Cesur ve Demiröz, 2013).

2.7. Bakterilerde Kolesterol Asimilasyonu

Kolesterol, hayvan hücre zarlarının yapısal bir bileşeni olarak işlev gören ve steroid hormonları, D vitamini ve safra asitlerinin yapısında bulunan önemli bir biyolojik moleküldür (Kenny ve ark., 2020). Son yıllarda yapılan in vitro araştırmalarda bağırsakta bulunan bakterilerin diyet, genetik ve çevresel faktörlerine ek olarak, kolesterol metabolizmasını etkilediği ve kolesterol koprostanole dönüşümünden ve BA metabolizmasına kadar her yolda kilit bir rol oynadığı öne sürülmüştür (Kriaa ve ark., 2019). Probiyotiklerin hipokolesterolemik etkisinin ince bağırsaklarda kolesterolü bağlama yeteneklerine bağlanmıştır. Usman, daha önce *Lactobacillus gasseri* suşlarının hücresel yüzeylere bağlanarak laboratuvar ortamından kolesterolü bağlayabildiğini bildirmiştir (Kumar ve ark., 2012). Çok sayıda çalışma; bakteriler tarafından kolesterol bağlanması mekanizmalarının araştırılmasına odaklanmıştır. Bu konu kapsamında, kültür ortamından kolesterol kullanımının başlıca bakteri hücre duvarlarına bağlanma veya büyüme sırasında asimilasyonu ve kolesterol çökmesi ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Buna ek olarak, ortamdaki kolesterolün çoğunun, metabolizma için kullanmak yerine bozulmadan bakteri hücre zarına dahil edilmiş olabileceğini gözlemlenmiştir. Şimdiye kadarki çalışmalarda, *Lactobacillus* cinsinin çeşitli suşlarında (*Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *L. bulgaricus*, *L. casei* ve *L. Gasseri*) kolesterol tutulması gözlenmiştir (Kriaa ve ark., 2019).

2.8. Suş Geliştirme Yöntemleri

Biyoteknoloji endüstrisi, temel olarak çeşitli ürünler elde etmek için mikroorganizmalardan, bitkilerden ve hayvan hücrelerinden yararlanmaya dayanır. Klasik yöntemlerle fermentasyon geliştirme teknikleri; uygun mikroorganizma suşunun, genetik olarak stabil, kolaylıkla çoğalabilen, kontaminasyona karşı şartlara uyum sağlayabilme, kolaylıkla kültüre alınabilme ve muhafaza edilebilme gibi özelliklere sahip suşların seçilimi, uygun substrat

seçimi, uygun fermantasyon koşullarının oluşturulması ile suşların doğal halinde en yüksek verimi almak mümkündür.

Mikroorganizmalar, metabolizmalarının bir parçası olarak, insanların günlük kullanımı için büyük fayda sağlayan çok çeşitli ürünler üretirler. Bu ürünlerden bazıları antibiyotikler, enzimler, organik bileşikler, biyoyakıtlar gibi ürünlerdir. Doğada mikrobiyal metabolizma, enerjinin boşa harcanmasını önlemek için kontrol edilir, bu nedenle mikroorganizmalar bu metabolitleri düşük konsantrasyonlarda üretir; bununla birlikte, herhangi bir endüstriyel ölçekli biyoteknolojik işlem için ön koşul istenen herhangi bir endüstriyel ürünü yüksek miktarlarda üreten bir mikrobiyal türdür. Bu genetik ve biyolojik sistem, nükleotid dizileri tarafından kontrol edilir, bu nedenle doğal olarak yüksek miktarda ürün üretmediklerinden mikroorganizmaların genomda genetik modifikasyonların yapılması gerekir. Bu nedenle, suş düzenleyici kontrol noktalarını değiştirmek veya atlamak için DNA'nın değiştirilmesi ve yeniden programlanması yoluyla ilgilenilen ürünü aşırı üretmek için sayısız fiziksel, kimyasal veya genetik tekniğe tabidir (Goraya ve ark., 2017).

Suş geliştirme; biyoteknolojik uygulamalar için mikrobiyal suşların metabolik kapasitelerini arttırmak amacıyla iyileştirilme ve manipüle edilmesidir. Endüstriyel olarak genetik suş geliştirme; doğal rekombinasyon, mutasyon ve rekombinant DNA teknolojisi ile uygulanmaktadır. Doğal rekombinasyon tiplerinden konjugasyonda; seks ayrımı gösteren iki ayrı bakterinin, geçici olarak birleşmesi sonucu, bir bakterinin diğerine genetik madde aktarımı söz konusu iken, transformasyonda; herhangi bir aracı bulunmaksızın, verici bakteri tarafından ortama bırakılmış olan DNA materyalinin, alıcı bakteri tarafından alınması yoluyla rekombinasyon gerçekleşir. Transdüksiyonda ise bir bakteriye ait DNA parçacıkları bakteriyofajlar aracılığıyla, diğer bakteriye aktarılır. Doğal rekombinasyonda farklı tipteki yollarla iki farklı genetik materyal bir araya gelerek yeni bir form oluşturur (Pathak ve ark., 2015).

Protoplast füzyon tipi rekombinasyon doğal veya yönlendirilmiş olarak meydana gelebilir. İki protoplastın birbirine yapışması ve ardından bazı noktalarda iki sitoplazmanın birbirine karışmasıdır (Pathak ve ark., 2015). Protoplast füzyon teknolojisi geleneksel gen teknolojileri arasında önemli bir yere sahiptir. Protoplast füzyonu, çeşitli prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde genetik rekombinasyonu indüklemek için kullanılan çok yönlü bir tekniktir. Genetik analiz ve suş iyileştirme için büyük bir potansiyele sahiptir. Tür içi veya türler arası melezler üretmek için kullanılabilir. Protoplast teknolojisinde, somatik

hücrelerden izole edilen genetik olarak farklı iki protoplast, paraseksüel hibrit protoplastlar elde etmek için birleşir. Hibrit protoplast, heteroplazmik sitoplazma içerir. Protoplastlar birbirine yaklaştırıldığında, indüksiyon fazı başlar ve zarın elektrostatik potansiyelinde indüklenen değişiklikler füzyon ile sonuçlanır. Füzyondan sonra, membranlar stabilize olur ve hücre yüzeyi eski durumuna döner (Verma ve ark., 2008).

Rekombinant DNA teknolojisi ve genetik mühendisliği yöntem ve kavramları, DNA molekülünün temel yapısı üzerine yapılan uzun çalışmalar sonucunda geliştirilmiştir. Rekombinant DNA ilk olarak 1973'te San Francisco'daki California Üniversitesi'nden Herbert Boyer ve yabancı DNA'yı plazmitlere yerleştirmek için *E. coli* kısıtlama enzimlerini kullanan Stanford Üniversitesi'nden Stanley Cohen'de elde edilmiştir (Shinde ve ark., 2018). Rekombinant DNA teknolojisi; organizmanın genomundaki manipülasyon, yeni genler ekleyerek veya mevcut genlerin aktivitesini sınırlayarak gerçekleştirilebilir (Tarhan, 2019). Rekombinant DNA teknolojisi, genetik olarak değiştirilmiş bir vektör eklendiğinde ve organizmanın genomuna entegre edildiğinde bir organizmanın (konakçının) fenotipini değiştirir. Rekombinant DNA (rDNA) molekülleri, birden fazla kaynaktan oluşan doğal olarak genomda bulunamayacak ancak laboratuvar yöntemi ile oluşturan DNA molekülleridir. Rekombinant DNA teknolojisinin uygulanmasında ilk adım teknolojinin uygulanacağı DNA parçasının seçimi ve izolasyonun gerçekleştirilmesidir. Seçilen DNA parçasına uygun vektör seçilir. Rec DNA molekülü oluşturmak için DNA parçası vektöre tanıtılır. Oluşturulan Rec DNA molekülü konakçı organizmaya yerleştirilir. Rekombinant hücreler, rec DNA molekülünü almış olan konakçı hücrelerdir. Bu adımda transforme hücreler, transforme olmayan hücrelerden marker genler kullanılarak ayrılır (Shinde ve ark., 2018). Konak içerisinde rekombinant molekül kendini eşler ve rekombinant molekülün birbirine özdeş düzinelerce kopyası ya da klonları oluşur. Böylece istenen özelliklere sahip DNA moleküllerine sahip organizmalar oluşur (Klug ve ark., 2011) Rekombinant DNA teknolojisinin kullanımı uzun yıllara dayanır. Fakat gıda endüstrisi; mevzuat kısıtlamaları ve tüketici kabulü gibi nedenlerle rekombinant DNA teknolojisi içermeyen yöntemler ile suş geliştirme yöntemlerine odaklanmıştır (Derkx ve ark., 2014). Bu nedenle gıda endüstrisinde suş geliştirmede öncelikli olarak kullanılan genetik yöntem klasik ve yönlendirilmiş mutasyonlardır (Johansen, 2017).

Mutasyonlar DNA'daki değişim türüne veya mutasyonu indükleyen etkene göre sınıflandırılabilir. Spontan mutasyon hücredeki normal işlemlerin bir sonucu olarak

meydana gelen mutasyondur. Bunlar DNA'nın bir eksojen etkenle ya da mutajenle etkileşmesi sonucu oluşurlar. Ayrıca, DNA replikasyonundaki hatalardan da kaynaklanabilirler. DNA polimerazlar bu replikasyon hatalarını 3'-5' yönünde çalışan ekzonükleaz aktivitesi ile düzeltmelerine karşın yanlış bir şekilde dahil olan nükleotidler replikasyondan sonra kalabilmektedir. Spontan mutasyonlar düşük oluşum sıklığına sahiptir ve genellikle tek bir gen için yaklaşık 10^{-10} - 10^{-6} arasında meydana gelir. Spontan mutasyon tiplerinden; totomerik baz kayması, keto grubunun enol formuna veya amino grubunun imino formuna dönüşmesidir. Depürinasyonda; baz ve deoksriboz şekerinin glikosidik bağın kesilmesi ve bunun devamında bir Adenin ve Guanin grubu kaybedilir. DNA, replikasyonda bu pürin kaybı olan bölgeler için tamamlayıcı baz belirleyemez. Bu şekilde meydana gelen apurinik alanları tamir sistemleri temizler. Bu koşullarda başka bir baz rastgele apurinik bölgeye yerleştirilebilir ve bu da mutasyona sebep olur. Deaminasyon ise Adenin ve Sitozin'deki bir amino grubunun keto grubuna dönüşmesidir. Bu da bir G-C çiftinin bir A-T çiftine (GC → AT geçişi) dönüşmesine neden olur. Spontan olarak gerçekleşmekle birlikte nitroz asit gibi kimyasal mutajenlerle de gerçekleşebilmektedir. Ayrıca Süper oksit radikali ($O_2\cdot$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH) gibi aktif oksijen molekülleri aerobik metabolizmanın doğal ürünleri oksidatif baz hasarı oluşturabilir. Örneğin; Guanin bazının oksidasyonu ile oluşan, 8-okso-7-hidrodeoksiguanozin (GO) formu Adenin ile yanlış eşleşme eğilimindedir (Najafi ve ark., 2013).

Mutasyon tiplerinden klasik mutasyon; bir organizmanın istenen özelliğini geliştirmek için genetik yapısını manipüle etmektir. Fiziksel mutajenler veya kimyasal mutajenler aracılığı ile uygulanabilir.

2.8.1. UV radyasyon

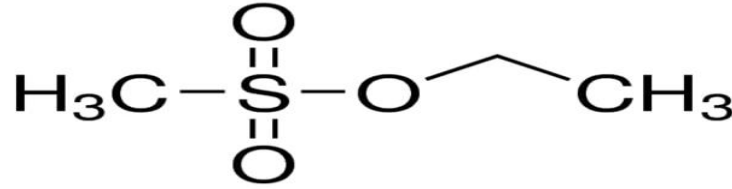
Klasik mutasyon yaratan fiziksel mutajen ultraviyole radyasyon; kısa dalga boylu ışıktır ve yüksek enerji taşıdığı için organik maddelere zarar verebilir. UV radyasyon; aynı polinükleotid zincirinde pirimidin bölgeleri arasında kovalent bağlara neden olur. Bunlara pirimidin dimer denir. Çoğunlukla T-T dimerleri meydana gelir. Bu bağlar DNA konformasyonunu bozar, DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu inhibe eder böylece mutasyon meydana getirirler. UV radyasyonun mutajen etkileri kısa ve uzun dalga boylarında farklı şekillerde gerçekleşmektedir. Kısa dalga boylu UV, en etkili mutajenik ajanlardan biridir. Mutasyon için etkili dalga boyları 200-300 nm arasındadır. Kısa dalga

boyulu UV radyasyonu temel olarak GC- AT geçişleri indükler. Uzun dalga boyulu UV 300-400 nm dalga boylarında olup kısa dalga boyulu UV'den daha az ölümcül ve daha az mutajenik etkilere sahiptir. Normalde fazla etkili olmayan uzun dalga boyulu uv özellikle psoralen türevi boylarla kombineli bir şekilde mutajenik etki gösterir. Sıklıkla mutajen olarak kullanılan psoralen türevli boya maddelerinden 8-Methoxypsoralen çift sarmallı DNA da baz çiftlerinin arasına girip uzun dalga UV etkisi ile aktive olarak pirimidin bazları arasında bağ oluşturarak mutasyon oluşumunu sağlar. Diğer kısa dalga boyulu ışınlar; X ışınları, gama ışınları ve beta ışınları etkileştiği ortamdaki moleküllerden elektron kopararak iyonizasyonunu sağlayan elektromanyetik enerjidir. Mutasyon için sadece UV radyasyonun hücre materyaline etki etmediği durumlarda kullanılır. İyonize radyasyon DNA' da büyük yapısal değişikliklere sebep olur. Bu nedenle endüstriyel olarak suş geliştirilmesinde UV radyasyon tercih edilir (Najafi ve ark., 2013).

2.8.2. Kimyasal mutajenler

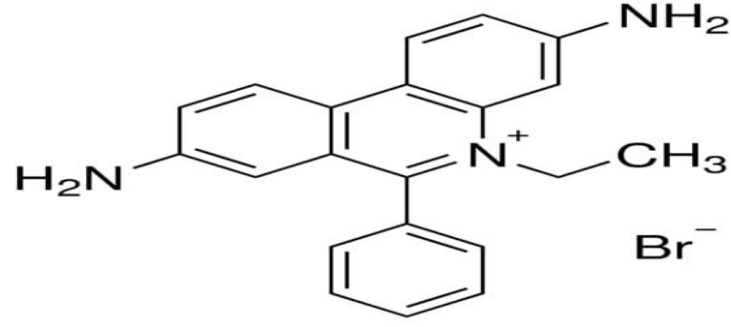
Klasik mutasyon için kullanılan diğer mutajen türü kimyasal maddelerdir. N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG), Etil metan sülfonat (EMS), Nitröz asit, etidyum bromid (EtBr) gibi kimyasallar yaygın olarak kullanılan kimyasal mutajenlerdir. Bu kimyasal mutajenler, mikroorganizmalar için faydalı olabilecek fenotipik ve genotipik değişikliklere yol açan nokta mutasyonlar, eklemeler ve/veya delesyonlar nedeniyle genomik zincirlerde genotipik etkiye olduğu kadar fenotipik etkiye de neden olabilir (Greene ve ark., 2003; Flibotte ve ark., 2010). Bu kimyasallardan EMS; kolay kullanım nedeniyle ve yüksek seviyelerde mutant verimi sağladığı için rutin bir mutajen olarak kullanılır. Kimyasal kaynaklı mutajenler fonksiyonlarına göre 3 gruba ayrılmıştır; birinci grup kimyasal mutajenler DNA üzerindeki bir baz tabanını kimyasal olarak değiştirerek etkiyen ve böylece farklı bir baz tabanı yaratan ajanlardır. Etil metan sülfonat (EMS) ve nitröz asit (NG) bu gruptadır. İkinci gruptaki kimyasal mutajenler; çerçeve kayması oluşumunu indükleyen mutajenlerdir. Proflavin, akridin orange, etidyum bromid boyları baz çiftleri gibi hareket eder ve DNA'daki bazlar arasında ara tabaka oluştururlar. Bu olay DNA sarmalında genişleme oluşturarak mutasyona sebep olur. Üçüncü grup kimyasal mutajenler ise sadece büyüyen hücrelere karşı etki eden kimyasal ajan türüdür. 5-bromoürasil gibi baz analoglarından oluşur. 5-bromoürasil ismine rağmen aslında Timin ve Adenin analogudur. 5-BU bir forma dahil edildiğinde mutasyonlara neden olur.

Kimyasal mutajenlerden Etil metansülfonat (EMS), virüslerden memelilere kadar çok çeşitli genetik test sistemlerinde mutajenik etkisini gösteren tek işlevli bir etilasyon maddesi olarak kabul edilir (Meuth ve ark., 1982). EMS, oda sıcaklığında renksiz bir sıvıdır ve moleküler ağırlığı 124.2'dir. EMS'nin kaynama noktası 213-213,5°C (761 mmHg) ve yoğunluğu 22°C'de 4°C'deki suya göre 1.1452'dir (IARC, 1974). EMS, güçlü bir alkilleyici mutajendir ve bazen fiziksel mutajenlerden daha etkilidir (Bhat ve ark., 2005). EMS, guanin bazlarını alkile eder ve bu yanlış eşleşme nedeniyle, C yerine T ile alkilenmiş G çiftleri, öncelikle G/C'den A/T'ye geçişlere neden olur, ancak bunun dışında mutasyonun konumuna bağlı olarak küçük delesyonlara ve yeniden düzenlemelere de neden olabilir (Rafi ve ark., 2016; Shah ve ark., 2016).



Şekil 2.1. Etil Metan Sülfonat (EMS) (Sigmaaldrich.com)

Etidyum bromür (EtBr) (3,8-Diamino-5-etil-6 fenilfenantridinyum, Homidium bromide) şeklinde bilinen bir kimyasal mutajendir. Moleküler Ağırlığı 394.4 mol/gr' dır. Elektroforezde ve diğer jel bazlı nükleik asit yöntemlerinde nükleik asit bantlarını tanımlamak ve görselleştirmek için DNA'yı boyayan radyoaktif olmayan marker olarak yaygın olarak kullanılır. EtBr suda orta derecede çözünür, koyu kırmızı, kristal, uçucu olmayan, kokusuz bir tozdur. Ultraviyole (UV) ışık altında ve çift sarmallı DNA'ya bağlandığında artan floresan ile kırmızı-turuncu bir renk verir. EtBr interlokasyon ajanı aynı zamanda tetrajen ajanı olarak bilinmektedir. Etidyum Bromid, baz çiftleriyle etkileşime girebilen trisiklik fenantridin halka sistemini içermektedir. Etidyum Bromid baz çiftleri ile van der Waals bağı oluşturarak DNA molekülünün hidrofobik iç kısmına bağlanabilir. DNA'nın yoğunluğunun düşmesine neden olmakta, aynı zamanda ardışık baz çiftlerinin aralıklarını arttırarak ve sarmalın eğimini azaltarak sarmal yapısını bozmaktadır (Özalpar, 2018).



Şekil 2.2. Etidyum Bromür (Sigmaaldrich.com)

Klasik mutasyon tiplerinde mutasyon tamamen rastgeledir ve belirli bir mutajenin etkileyeceği bölgeyi bilmenin bir yolu yoktur. Fonksiyondan sorumlu olan, iyileştirilmesi gereken genin bulunduğu durumlarda bölgeye yönelik mutajenez kullanabilir. Bu, istenen mutant tiplerinin maksimum frekansını elde etmek için yapılır. Hedef ürünün oluşumunu kontrol eden gen ve organizmanın genetik haritası hakkında geniş bilgi gerektirir. Yönlendirilmiş mutasyon için ön şart, mutasyon yapacak genlerin bilgisi ve mutajenik ürün oluşumunu kontrol eden spesifik genlere yönlendirilmesi için araçların bulunmasıdır. Yönlendirilmiş mutasyon teknikleri; klasik mutasyon teknikleri kullanılarak hedef bölgeye uygulanır (Najafi ve ark., 2013).

2.9. Mutasyonları Belirleme Yöntemleri

Son yıllarda, mutasyonların belirlenmesinde denatüre edici gradyan jel elektroforezi (DGGE), sabit denatüre edici jel elektroforezi (CDGE), geçici sıcaklık gradyan jel elektroforezi (TTGE), tek iplikli konformasyon polimorfizmi (SSCP) ve protein budaması gibi mutasyon tespit teknikleri testi (PTT) kullanılmaktadır. Bu tekniklerden herhangi birinin ardından mutasyonu doğrulamak için DNA dizilimi kullanılabilir. Bu tekniklerin tümü, teknik kullanılmadan önce PCR yoluyla DNA amplifikasyonu gerektirir.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), bir DNA dizisinin milyarlarca kez kopyalanmasını ve çoğaltılmasını sağlayan in vitro bir tekniktir (Mullis ve Faloona, 1987; Saiki ve ark., 1988). PCR prensibi, 95° C'ye yaklaşan yüksek denatüre edici sıcaklıklarda, hedef DNA molekülünün iki ipliğinin, A-T ve G-C bağlarının kopması ve ayrılmasının ardından, 50-65°C aralığındaki sıcaklıklarda, tamamlayıcı ileri ve geri primerler, ayrılmış tek iplikli hedef DNA molekülünün yan bölgelerinin 3' ucunda bağlanmasıdır. Taq polimeraz enzimleri daha

sonra dNTP'ler ekleyerek yeni DNA ipliğini uzatır ve çift iplikli molekül kendisini 72°C genişletme sıcaklığında yeniden yapılandırır. Bu işlem birkaç kez tekrarlanır ve hedef DNA molekülünün birden fazla kopyası üretilir. PCR, biyolojik ve tıp bilimlerinin çoğu alanında çok yönlülüğünü kanıtlamış, sadece niteliksel değil, niceliksel sonuçlar da verebilme kabiliyeti nedeniyle oldukça gelişmiş ancak kullanım kolaylığı nedeniyle basit bir tekniktir (Singh ve ark., 2014). RAPD PCR genetik varyasyonu tanımlamak için kullanılan PCR tabanlı bir tekniktir. Bir PCR reaksiyonu rastgele tek primerin kullanılması ardından birçok farklı DNA'nın amplifikasyonu ile sonuçlanır. RAPD teknolojisi, çok sayıda lokusta DNA sekans bazlı polimorfizm için hızlı ve verimli bir görüntüleme sağlar. RAPD'in en büyük avantajı, DNA'nın ön dizilimini gerektirmemesidir. RAPD analizi, DNA parçalarının tanımlanması ve sınıflandırılması (Fukuoka ve ark., 1992), ırkların tanımlanması (Qian ve ark., 1996) ve genetik çeşitlilik analizi (Mackill, 1995) gibi çeşitli amaçlar için yaygın olarak kullanılmıştır (Nandani ve Thakur, 2014). Standart RAPD teknolojisi, PCR ile düşük tavlama sıcaklıkları altında toplam genomik DNA'nın nanogram miktarlarını arttırmak için primerler olarak rastgele dizilerin kısa sentetik oligonükleotitlerini (10 baz uzunluğunda) kullanır. Amplifikasyon ürünleri genellikle agaroz jeller üzerinde ayrılır ve etidyum bromür ile boyanır. Termal döngü sırasında uygun sıcaklıkta, rastgele dizilimin oligonükleotit primerleri, şablon genomik DNA'daki tamamlayıcı diziler üzerindeki birkaç primer bölgesini bağlar ve bu bölgeler birbirinden yeterli bir mesafedeyse ayrı DNA ürünleri üretir. RAPD teknolojisinin avantajları arasında dizilimi bilinmeyen genomlar üzerinde çalışmaya uygun olması, sınırlı miktarda DNA'nın bulunduğu durumlarda uygulanabilirliği, verimlilik ve düşük maliyet sayılabilir (Nandani ve Thakur, 2014). RAPD tekniği yürütülmesi kolaydır, önceden dizi bilgisi gerektirmez ve yalnızca az miktarda şablon genomik DNA'ya ihtiyaç duyar (Behera ve ark., 2018).

2.10. Suş Geliştirme Yöntemlerinin Kıyaslanması

Suş geliştirme yöntemlerinin avantaj-dezavantaj kıyaslaması yapıldığında klasik yöntemler mutasyon veya gen düzenlemesi gibi teknikler içermemesi sebebi ile mikroorganizma doğal halindedir. Fakat hücre fizyolojisi hakkında derinlemesine bilgi gerektirir ve elde edilecek verim sınırlıdır. Klasik mutasyonda ise suş geliştirilirken az bir bilgi yeterli iken; kimyasal kullanımı, istenmeyen mutasyonların oluşma riski ve çok sayıda mutant suş tarama gereksinimi gibi dezavantajları mevcuttur. Yönlendirilmiş mutasyon klasik mutasyona

oranla daha doğru hedeflenmiş ve spesifiktir ancak klasik mutasyonda olduğu gibi kimyasal kullanımı ve istenmeyen mutasyon oluşumu riskini taşır. Rekombinant DNA teknolojisi ise son derece doğru hedeflenmiş bir yöntem olmasına karşın genetik düzenlemeler sebebi ile genetiği değiştirilmiş organizmalar sınıfındadır bu sebeple tüketiciler tarafından kabul görmemekte aynı zamanda gıda endüstrisinde kullanımı mevzuatça kısıtlıdır (Derkx ve ark., 2014). Özellikle Laktik asit bakterilerinin geliştirilmesinde rekombinant DNA teknolojinin kullanımı uzun bir geçmişe sahiptir fakat mevzuat kısıtlamaları ve kamuoyunda kabul görmemesi sebebi ile bu suşlar gıda endüstride kullanılamamıştır. Bu sebeple gıda endüstrisi genetik düzenlemeler içermeyen suş yöntemleri üzerine yoğunlaşmıştır. Bu amaçla en sık kullanılan metot ise spontan veya indüklenmiş mutasyondur (Johansen, 2017).

Suş geliştirme teknikleri son yıllarda laktik asit bakterilerinde; bakteriyofaj direncinin iyileştirilmesi, bakteriyofaj reseptörleri, pirimidin oksotrofisi, fermente sütü tekstüre etme yeteneğini geliştirmek için bakteri hücre yüzeylerinin değiştirilmesi ve EPS'nin metabolik yolunu optimize etme, bakteriyofaj dirençli mutantlar, antibiyotik direnci ve sitrat metabolizması gibi istenmeyen özelliklerin ortadan kaldırılması, stres toleransını geliştirmek, karbonhidrat metabolizmasını adapte ederek asitleştirme özelliklerini değiştirme, fermantasyon sırasında büyüme verimini arttırmak gibi konularda yoğunlaşmıştır (Derx ve ark., 2014).

2.11. Mikroorganizmalarda Yapılan Mutasyon Çalışmaları

Li ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada, büyüme eğrisinin üstsel fazında seçilen *Oenococcus oeni* suşunu 20 cm mesafeden 65-100 saniye aralığında 15W gücünde UV radyasyona maruz bırakmışlardır. UV mutasyonundan sonra bakteri süspansiyonu on kat seyreltme yöntemiyle 10^{-6} 'ya seyreltilip yayma plak yöntemi ile ATB besiyerine ekim gerçekleştirilmiştir. Anaerobik ortamda 28 °C'de 6-7 gün süreyle inkübe edilen petrilerden inkübasyon sonunda şekil, renk ve hacimleri farklılık gösteren kolonilerden ilk seçim yapılmıştır. Ön seçimden elde edilen bakteriyel süspansiyon, steril ATB ortamında 10^{-6} 'ya seyreltildikten sonra agar sandviç yöntemi ile tarama ortamına yayılmıştır. Ana suşlar, J2 ve C10 suşları ise kontrol olarak kullanılmıştır. Anaerobik ortamda 28 °C'de 7 gün süreyle inkübe edilen petrilerde laktik asidin neden olduğu hidrolize dairenin boyutu karşılaştırılarak pozitif yönde farklılık gösteren suşları seçmişlerdir. ATB besiyerine uygun miktarda malik asit eklenerek yapay MLF sistemleri oluşturulmuş ve şarabın biyokimyasal durumunu taklit etmek için pH 3.4'e

ayarlanmıştır. Daha sonra, ön taramadan elde edilen J2 ve C10 mutantları ve ana suşlar MLF fermentasyonunu izlemek amacıyla hazırlanan ortama aşılانmıştır. MLF sırasında fermentasyon sisteminin pH'sı ölçülerek değerlendirme yapılmıştır. Ayrıca titrasyon asitliği şarabın duyuşal özellikleri ve fermentasyon özelliklerini karşılaştırmalı olarak analiz etmişlerdir. Sonuçların güvenilirliğini arttırmak amacı ile analizlerde hem klasik hem de enstrümental yöntemleri birlikte kullanmışlardır. Analiz sonuçlarına göre; doğal suşlar mutant suşlarla karşılaştırıldığında mutant C10-1 suşunun malolaktik dönüşüm oranının %38,81 olarak dikkate değer bir şekilde yükseldiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca mutant C10-1 suşunun ana suşa göre; malolaktik dönüşüm oranını arttırmadaki yeteneğinin yanında şarap yapımında ağarma fenomenini azaltmada ve yumuşaklık indeksini arttırmadaki etkisi de çalışmanın endüstriyel uygulamalardaki değerini ortaya koymuştur.

Arihara ve ark. (1999), fermente et ürünlerinde bulunan ve insan bağırsak florasında baskın probiyotik bakterilerden *Lactobacillus gasserı*'nin, gıda koruyucu maddelerinden sodyum nitrit ve sodyum klorit tuzlarına olan dayanıklılığını arttırmak amacı ile; 10^8 - 10^9 sayı aralığında bakteri kültürünü %3,3 sodyum klorit ve 200 ppm sodyum nitrat içeren MRS agar besiyerine yayarak ve 60 cm mesafeden 15 saniye 15W gücünde UV radyasyona maruz bırakmışlardır. 37 °C'de 48 saat anaerobik şartlarda inkübe etmişlerdir. Ana suş %3,3 sodyum klorit ve 200 ppm sodyum nitrit içeren MRS besiyerinde gelişme göstermezken; mutant 1131-M8 suşu anlamlı bir şekilde gelişme göstermiştir. Mutant 1131-M8 suşu hücre duvar proteinleri SDS- PAGE yöntemi ile yüzey proteinleri analiz edilmiştir. Yüzey proteinleri ana suş ile karşılaştırıldığında büyük bir değişim gösterirken diğer biyokimyasal karakterlerinde (karbonhidrat fermente etme yeteneği, asit ve safra tuzu toleransı) bir farklılık göstermediğini gözlemlemişlerdir. Çalışma sonucunda geliştirilen mutant suşun probiyotik fermente et ürünleri üretiminde starter kültür olarak kullanılmasıyla endüstriye önemli katkılarda bulunacağı öngörülmüştür.

Khatab ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada *Aspergillus* ve *Penicillium* tarafından üretilen okratoksin A'nın (OTA) biyosorpsiyonunu arttırmak amacı ile *Lactobacillus delbrueckii* suşlarını; santrifüjleyerek (8000 rpm×5 dk) 0.1 M bir fosfat tamponu (pH 7) içine süspanse etmişler. Hazırlanan süspansiyonu kimyasal mutajen etil metan sülfonat (EMS) ile 60 dk boyunca muamele ederek mutasyona uğratmışlardır. Süspansiyon dilüsyon yapılarak OTA (200 ng/mL) içeren MRS agar besiyerine ekim yaparak 37°C'de 2 gün inkübe etmişlerdir. Kolonilerin gelişme hızına göre seçim yapılmıştır. Ana suş ve mutantlar MRS ortamında

48 saat 30°C'de geliştirmiş ve 120 rpm'de santrifüj etmişlerdir. Ardından aynı koşullar altında 1, 3 ve 5 saat OTA (100 ng/mL) ile inkübe etmişlerdir. OTA biyosorpsiyonu her bir mutant ve ayrıca ana suş için belirlemişlerdir. EMS ile 60 dakikalık muamele sonucunda yüksek OTA konsantrasyonuna (200 ng/mL) dirençli 19 mutant ile sonuçlanmıştır, ancak 7 mutantın, ana suştan daha yüksek OTA biyosorpsiyon sergilediğini gözlemlemişlerdir. Mutant EMS-9 en yüksek OTA alımı (82.6 ng/mL) ile OTA biyosorpsiyonunda %165,2 iyileşme elde edilirken, OTA biyosorpsiyonunda %144,7 iyileşme ile 72.3 ng/mL alımı olan mutant EMS-10 suşu da anlamlı artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, 8 mutantın, orijinal suşlarından daha düşük OTA biyosorpsiyonu olduğunu ortaya koymuşlardır. Dört mutant suşun ana suşlarına kıyasla OTA biyosorpsiyon yeteneklerini kaybettiğini görmüşlerdir. Kimyasal mutasyon yolu ile elde edilen EMS-9 suşunun OTA biyosorpsiyonu için en iyi suş olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) tekniğı kullanılarak yapılan analizlerde, ana suş ve mutant suşlar arasında genetik değişikliklerin olduğunu, RAPD profillerindeki bu farklılıkların, EMS indüklenmesi sonrasında *Lactobacillus delbrueckii*'nin NRRL B-1024 genomundaki DNA dizisi değişikliklerinden kaynaklandığını ortaya koymuşlardır.

Abosereh ve ark. (2006), probiyotik *Saccharomyces boulardii* suşlarını ışınlamadan önce 4 gün boyunca katı büyüme ortamında büyümenin durağan fazına kadar büyütmüşler, büyümenin durağan fazına ulaşıldıktan sonra hücreleri iki kez tamponlu tuzlu su (%0,8 NaCl, pH 6) ile yıkadıktan sonra 5×10^7 hücre/mL'lik bir başlangıç hücre konsantrasyonu hazırlamışlardır. Fiziksel mutajen olarak gama- γ (1, 2, 3, 4, 5 KG) ışması kullanmışlardır. Daha sonra hücreler tekrar yukarıdaki gibi iki kez yıkamışlardır. Maya mutantlarını seçmek için, her muameleden bir seri seyreltme yapılmış ve 0,1 mL'lik süspansiyon CM içeren petrilere yayılmış ve 48 saat 30°C'de inkübe etmişlerdir. İnkübasyondan sonra gelişen koloniler hem MM hem de CM ortamına nakletmişlerdir. CM'de büyüme gösteren ancak MM'de büyüme göstermeyen kolonileri mutant olarak kabul etmişlerdir. Elde edilen mutant suşların safra tuzu toleransını (%3) ve zararlı indikatör mikroorganizmalar karşısındaki antimikrobiyal özelliklerini incelemişlerdir. *S. Boulardii* ana suşunu ve elde edilen mutantları %0,2 sodyum tiyoglikolat ve %3 safra tuzları (Oxoid) ilave edilmiş YEP sıvı besiyerinde inkübe ederek canlılık ve büyüme açısından değerlendirmişlerdir. Kültür, yayma plak yöntemi kullanılarak YEP agara yayılmış ve 48 saat 30°C'de inkübe etmişlerdir. Ana suş ve mutant suşların indikatör mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesi ise agar difüzyon kuyusu testi kullanılarak belirlemişlerdir. Sonuçlar, hayatta kalma ve mutasyon

yüzdelерinin gama-γ dozlarından etkilendiğini göstermiştir. Hayatta kalma yüzdeleri, gama radyasyon dozlarının arttırılmasıyla azalırken, maruz kalma dozunda hayatta kalma yüzdesi düşük dozun 5KG γ olduğunu ayrıca, en yüksek mutant yüzdelерini (%14,29) veren maruz kalma dozunun 4KG γ olduğunu ortaya koymuştur. Elde ettikleri sonuçlara göre %3 safra tuzu varlığında büyüme yeteneğı (tolerans) *S. boulardii* ana suşu ve mutant suşları arasında değışiklik göstermiştir. M4 mutant suşunun ana suşa kıyasla önemli oranda yüksek safra tuzu toleransı gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca mutant suş M4 patojenik mikroorganizmalardan *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus*'a karşı antimikrobiyal etki gösterdiğini tespit edilmiştir.

Pandey ve ark. (2015), endüstride karşılaşılan probiyotik mikroorganizmalarda faj kontaminasyonu probleminin çözümü amacıyla; 18 cm mesafeden 260 nm dalga boyunda UV(4W) radyasyon ile 30-480 saniye süre aralığında ve 5-50 µL/mL konsantrasyonlarında metil-metan-sülfonat (MMS) ile 2 saat boyunca *Bacillus coagulans* suşunu muamele ederek mutant suşlar elde etmişlerdir. Mutant suşların bakteriyofaj direnci plak yöntemi ile gözlemlenmiştir. Ayrıca mutant suşların genetik stabilitesi reversiyon testi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen mutant suşlardan bakteriyofaj dirençliliğı tespit edilen ve genetik olarak stabil olan; MIII ve PIII suşları seçilmiş ve ileri testler uygulanmıştır. Asit toleransı, safra tuzu toleransı, sporülasyon verimliliğı, kolonizasyonlarını deneysel yöntemlerle incelemişlerdir. Bakteri hücresinin protein profillerini tespit etmek amacıyla MALDI-TOF/MS cihazı kullanılmıştır. Ayrıca mutant suşların ve ana suşun genetik karakteri PCR tekniğı ile belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre; mutant suşların (MIII ve PIII), ana suş *Bacillus coagulans* da olduğu gibi bağırsak koşullarına ve safra tuzuna dayanıklılığını koruduğunu ayrıca laktik asit üretim miktarının değışmediğini bunun yanı sıra pozitif bir değışim göstererek faja karşı dirençli hale geldiklerini tespit etmişlerdir. Probiyotik bir kültür olarak kalmak için gerekli özelliklere sahip ve ana suşun aksine faj saldırılarına karşı dirençli mutant suşlarla probiyotik endüstrisine önemli ölçüde maliyet kazancı sağlanacağı öngörülmüştür.

Goodarzi (2016), OD 0.4'e (600 nm) kadar 37°C'de 20 mL LAPTg içinde *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactococcus lactis* ve NB besiyerinde geliştirdiğı *Escherichia coli* suşlarını antibiyotik dirençliliğini geliştirmek amacı ile 254 nm dalga boyunda UV radyasyona 5-40 saniye aralığında maruz bırakmıştır. Hayatta kalan hücreleri antibiyotikler; rifampicin (Rif) ve streptomycin (Str) içeren ve içermeyen besiyerlerinde

inkübe etmiştir. Seçilimi yapılan mutant suşların ana suşlara göre yüksek düzeyde antibiyotik dirençliliği gösterdiği gözlemlenmiştir. Rifampisin ve streptomisine direnci ise UV maruziyet süresine bağlı olarak değişkenlik göstermiştir. *Lactobacilli* ve *Lactococcus* mutant suşlarında en yüksek hücre verimi (2,3 log) 20 sn UV radyasyon maruziyetinde elde edilmiştir. Laktik asit bakterileri suşlarının *E. coli* suşu ile karşılaştırıldığında antibiyotiklere karşı (1-2 log) daha fazla dirençli olduğunu gözlemlenmiştir. UV ışığının etki mekanizması olarak pirimidinler arasında kovalent bağ oluşturarak DNA hasarına yol açtığı bildirilmiştir. *E. coli*'ye göre daha fazla direnç göstermesinin nedeni olarak laktik asit bakterilerindeki düşük G/C oranı yüksek A/T anlamına geldiği için UV ışığının LAB'nde etkisinin daha fazla olduğu öngörülmüştür. Çalışma sonucunda UV radyasyon yoluyla geliştirilen suşların probiyotik özelliklere sahip antibiyotik dirençli starter kültür olarak süt ürünlerinde kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

Hussein (2017), farklı kaynaklardan izole ettiği laktik asit bakterilerinden yüksek miktarda bakteriyosin üretimi gözlemlediği iki suşu seçmiştir. Bu iki suşun morfolojik, biyokimyasal, fizyolojik karakterlerini ve ayrıca *S. typhimurium*, *E.coli*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* ve *Proteus vulgaris* patojenik suşları karşısındaki antimikrobiyal etkisini disk difüzyon metodu ile incelemiştir. En iyi antimikrobiyal etkiyi gösteren *Lactobacillus plantarum* suşunu geliştirmek amacı ile fiziksel mutajen UV radyasyon ve akridin orange, etidyum bromid kimyasal mutajenlerine ve pH, sıcaklık gibi stres faktörlerine maruz bırakmıştır. Çalışma sonucunda; en geniş zon çapı 30 dk UV radyasyon maruziyeti ile oluşan mutant suşta 32 mm olarak gözlemlenmiştir. 37°C'deki sıcaklık ve pH 7.0 stresi için; 28 mm, akridin orange ve etidyum bromid ile 15 dk maruziyet sonrasında sırası ile 17 mm ve 15 mm olarak gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre; *Lactobacillus plantarum*'un bakteriyosin üretimini arttırmak için UV radyasyonun diğer yöntemlere göre daha yüksek verim potansiyeli taşıdığını ortaya koymuştur. UV radyasyon yoluyla elde edilen suşların mikrobiyolojik olarak güvenli gıda ürünlerinde önemli rol alan bakteriyosin üretiminde gıda endüstrisine faydalı olacağını öngörülmüştür.

Syed ve ark. (2008), melas içeren besiyerinde *Clostridium acetobutylicum* tarafından üretilen n-butanol üretimini arttırmak amacı ile; kültürleri 5-60 dk zaman aralığında UV radyasyona, 1,0 mg/mL konsantrasyonlarında N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) ve etil metan sülfonat (EMS) ile 55-60 dk zaman aralığında muamele etmişlerdir. UV radyasyon için; hayatta kalma eğrisi hazırlanmış ve maruz kalma süresinin (1.0×10^3

CFU/mL) 3 log öldürme oranı verdiği suşlar mutant olarak kabul edilmiştir. Kimyasal uygulaması sonucunda oluşan mutantların seçilimi için; tüm canlı hücreler alınarak 120 g/L melas içeren fermantasyon ortamında karakterize etmişlerdir. Maksimum bütanol üretimi izlenerek en yüksek üretim oranına sahip suşlar mutant olarak seçilmiştir. Çalışma sonucunda; UV radyasyon *Clostridium* türünün geliştirilmesinde etkisinin olmadığı belirlenmiştir. MNNG kimyasalı ile elde edilen mutantların ise fermantasyon veriminde önemsiz bir artış gözlemlenmiştir. EMS mutajeni ile elde edilen mutant MEMS-7 suşunun ise, 30°C’de 91 saat inkübasyondan sonra ana suşa kıyasla %20 daha fazla butanol ürettiğini belirlemişlerdir. Ana suşun hücre gelişimi 1,6 mol/L butanol tarafından inhibe edilirken, mutant suş MEMS-7’nin butanol toleransı 3,84 mol/L olarak bulunmuştur. Fermentasyon profili ve kinetik özellikleri açısından mutant suşun melastan n-butanol üretimindeki üstünlükleri ortaya konmuştur.

Agrawal ve ark. (2012), mikroorganizmalar tarafından düşük düzeylerde üretilen ekstrasellüler β -glukosidaz üretimini arttırmak amacı ile büyüme evresinin log fazında *Bacillus subtilis* suşunu 10-40 dk aralığında 0.01-0.04 mL etil metan sülfonat (EMS) ile ve 20 cm mesafeden 30 dk süre ile UV radyasyona maruz bırakmışlardır. İki yöntemi tek ve kombinasyonlu bir şekilde uygulamışlardır. Potansiyel mutantların taranması ve seçimi, β -glukozidaz üretimlerine dayalı olarak yapılmıştır. Koloniler renk yoğunluklarına ve boyutlarına göre MM agar petrilerinden seçilimi yapılmıştır. Seçilen kolonilere enzim üretimi ve genetik stabilite testleri için ileri analizler uygulamışlardır. Çalışma sonucunda hem EMS mutajenezi hem de UV mutajenezi için %50 öldürücü doz (LD50) UV radyasyon için; 20 cm mesafeden 20 dk olarak EMS için ise 25 dk, 0,03 mL olarak belirlemişlerdir. Sadece UV maruziyeti ile elde edilen PS-UM1 suşunun β -glukosidaz üretiminde ana suşa oranla (675 U/L) daha fazla (718 U/L) aktivite gözlemlenmiştir. Sadece EMS ile muamele edilen PS-CM5 suşunda ise diğer 2 suşa kıyasla aktivitede belirgin bir artış (762 U/L) elde etmişlerdir. UV radyasyon ve EMS’nin kombine edilmesiyle üretilen PS-CM5-UM3 suşunda ise ana suş ve tekli mutasyon yöntemlerine kıyasla çok daha yüksek bir üretim gözlemlenmiştir (806 U/L). Seçilen mutantların (PS-UM1, PS-CM5 ve PS-CM5-UM3) genetik stabilitesi, on ardışık nesil için β -glukosidaz üretimi ölçülerek belirlemişlerdir. PS-CM5 mutant suşu, seçilen diğer mutantlara (PS-UM1 ve PS-CM5-UM3) kıyasla kararsızken, PS-UM1 sekizinci nesle kadar stabil, PS-CM5-UM3 ise onuncu jenerasyona kadar %78 oranında başlangıç β -glukozidaz üretimi ile stabil olduğunu görmüşlerdir.

Revin ve ark. (2017), *Saccharomyces cerevisiae* suşu 10 mL YPD ortamına (%2 glikoz, %1 pepton ve %2 maya özütü) aşılana ve hücre yoğunluğu 2×10^8 hücre/mL'ye ulaşana kadar 30°C'de 1 gece boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler, 10-100 hücre/mL'lik yoğunluğa seyreltilerek elde edilen süspansiyondan 100 µL alınarak Saburo agar petrisine inoküle etmişlerdir. *Saccharomyces cerevisiae* suşlarını etanol üretimini arttırmak amacı ile 254 nm dalga boyundaki UV radyasyona 5-15 dk zaman aralığında maruz bırakmışlardır. Fotoreaksiyonları durdurmak için petriler 24 saat karanlıkta tutulmuştur. Koloniler 30 °C'de 3 gün inkübe etmişlerdir. Ana suş ve UV radyasyon ile elde edilen mutant suşların aktivitesini fermentörde analiz etmişlerdir. Deneysel veriler sonucunda mayalarda UV radyasyon maruziyeti ile, ana suşa kıyasla etanol veriminin ortalama %25 artırılmasına olanak sağladığı gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda ışınlanmış suşların alkol direncinin artmasının UV ışınlaması sırasında maya mutasyonu nedeniyle arttığı öngörmüşlerdir. UV radyasyonunun hem mutajenik hem de rekombinojenik DNA lezyonları ile sonuçlandığı bilinmektedir. Yüksek UV dozlarında aynı pozisyonda kırılan iki kromatidin onarımını ile oluşurken daha düşük UV dozlarında, olay tek bir kırık kromatidin onarımını içerir ve farklı bölgelerde mutajeneze neden olabilir. Bu sebeple elde edilen UV radyasyonun olumlu etkisi, mayadaki şekerlerin stres direncinden ve fermentasyonundan sorumlu olan gen alanlarının etkilenmesiyle ilişkili olduğunu öngörmüşlerdir.

Saravanan ve ark. (2017), *Saccharomyces cerevisiae*'nın ortamdaki glikoz varlığı ile baskılanan invertaz enzim üretimini arttırmak amacı ile YEPD (50 mL) ortamında inoküle edilmiş, inkübasyondan sonra hücreler santrifüjlenerek (5000 rpm× 10 dk) 0.1M fosfat tamponu (pH 7.0) ile iki kez yıkanmıştır. 0.1M fosfat tamponu (pH 7.0) içinde süspanse edilmiş ardından 1 mL süspanse edilmiş hücreler, sterilize edilmiş cam petri plakalarına alınmıştır. 48 cm mesafeden; farklı sürelerde (5-30dk) UV radyasyona maruz bırakmışlardır.

Ardından YEP glikoz petrilere yayılarak 30°C'de 30 saat inkübe etmişlerdir. Mutantları taramak amacıyla filtre yöntemi ile intervaz aktivitelerini belirlemişlerdir. Araştırma sonucunda en iyi sonucu veren tip2 mutant suşunda; glikoz ortamında invertaz aktivitesi 3.1 üniteden 32 üniteye kadar artarken; sakkaroz ortamında 24.1 ünite olarak neredeyse ana suşun sakkaroz ortamındaki aktivitesi ile aynı değerlerde olduğunu gözlemlemişlerdir. Yapılan çalışmada UV radyasyon yolu ile elde edilen mutant suşların glikoz baskısını aşabileceğini göstermişlerdir.

Sobrun ve ark. (2012), taze şeker kamışı suyundan izole edilen Laktik asit bakterilerinden daha yüksek verim elde etmek amacıyla kimyasal mutajen Etidyum bromür ve fiziksel mutajen iyonlaştırıcı olmayan UV-B kategorisinde ultraviyole radyasyonu (290- 320 nm) kullanarak mutasyona uğratmışlardır. UV radyasyon uygulaması için; logaritmik büyüme fazında bakteri kültürünün 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} lık dilüsyonları sakkaroz (%2 w/v) ve bromokresol moru (0,12 g/l) ilave edilmiş MRS agar üzerine yaymışlardır. Petriler UV radyasyon ile (25 W, 302 nm, 30 cm mesafe) 5 ve 120 saniye süre aralığında ışınlamışlardır. Ardından aynı işlem 15 sn ve 90 sn süre aralığında daha düşük bir UV yoğunluğunda (15 W, 302 nm, 30 cm mesafe) uygulanmıştır. UV uygulamasının ardından tüm bakteriler alüminyum folyoya sarılarak tamamen karanlıkta 37°C'de 48 saat inkübe etmişlerdir. Kimyasal mutajenez için logaritmik büyüme fazındaki bakteri kültürü iki kez soğuk steril %0,9 NaCl solüsyonu ile yıkanarak her hücre süspansiyonunun 2 mL'sine 0,05 ve 0,75 mg/mL aralığında etidyum bromür eklemişlerdir. Karışım 37°C'de 30 dakika 200 rpm'de santrifüjlenmiştir. Muamele edilen süspansiyonlar bir kez %0,9 NaCl solüsyonu ile ve iki defa MRS broth ile yıkamışlardır. %0,9 NaCl ile seri seyreltmeden sonra, MRS agar petrilere yayılarak 37°C'de 60 saat inkübe etmişlerdir. Her iki uygulama için %1 hayatta kalma oranına sahip kolonileri sonraki analizler için kullanmışlardır. Mutant kolonilerin morfolojik karakterizasyonuna dayalı olarak, kimyasal mutajenezin fiziksel mutajenezden daha iyi bir yöntem olduğunu tespit etmişlerdir. Şeker kamışı suyunda 28 saatlik inkübasyondan sonra, UV ile oluşturulan mutant U2 tarafından maksimum 29 g/l laktik asit konsantrasyonu üretilirken, ana suşun 19 g/l ürettiğini ortaya koymuşlardır. U2 mutant suşunda verim; 1,04 (g/l/saat/ verim) iken ana suş da verim 0,68 (g/l/saat verim) olarak hesaplanmıştır. ¹H-NMR spektroskopisi kullanılarak laktik asidin fermente edilmiş sakkarozla yüzde oranını belirlemişlerdir. 46 saatlik fermentasyondan sonra ana suşun %51,4 sakkaroz kullandığı ve %20,1 laktik asit ürettiği, buna karşın en yüksek verimli UV ile oluşturulan mutantın (U2) %55 sakkaroz kullandığı ve %21,7 laktik asit ürettiğini tespit etmişlerdir.

Radha ve ark. (2012), *Aspergillus niger* suşlarını 10^{-8} , 10^{-9} ve 10^{-10} seri dilüsyonlarından 2 mL sterilize edilmiş petrilere alarak 15 cm mesafeden 5 -120 dk süre aralığında UV radyasyona maruz bırakmışlardır. UV radyasyonundan sonra, timin-timin (T-T) dimerlerinin stabilizasyonu için karanlıkta tutmuşlardır. 0,1 mL'lik ana suş ve UV ile muamele edilmiş suşlar agar petrilere yayılmıştır. 2 mL hücre süspansiyonu steril test tüplerine alınarak 2 mg ile 10 mg arasında değişen kimyasal mutajen EMS konsantrasyonları ile 30-60 dk süre

aralığında 32 °C' de inkübe etmişlerdir. Ardından hücreler 3000 rpm'de 10 dakika 4°C'de santrifüjleyerek iki kez sterilize edilmiş fosfat tamponu (pH 7.0) ile yıkamışlardır. EMS ile muamele edilen hücrelerden 0,1 mL alınarak agar petrilere yaymışlardır. %1'den daha az ölüm oranı görülen petrilere mutant seçilimi yapılarak kazein içeren agar petrilere yayılmıştır. UV ve EMS ile muamele edilmiş petrilere en az hayatta kalma oranı görülen suşlar kazein içeren agar petrilere üzerinde tarama için yaymışlardır. Ana suş 50 mm kazein zon oluştururken, UV4 ve UV7 (75 mm ve 68 mm kazein zon) ile maksimum kazeinoliz hızı elde edilirken, UV6 suşunda 46 mm ile minimum kazeinoliz gözlenmiştir. EMS ile muamele edilen tüm mutant suşların, ana suştan daha fazla hücre dışı proteaz salgılayabildiği EMS6 ve EMS4 mutant suşlarının 85 mm kazein zone ile maksimum proteolitik aktivite gösterdiğini gözlemlemişlerdir. SmF ortamında yapılan Proteaz enzim üretimi miktarı testinde; UV radyasyon ile elde edilen mutant suşları arasında UV3, UV4 ve UV9 suşlarında kontrol suşa oranla daha yüksek oranda enzim üretkenliği gözlemlenmiştir. UV9 mutant suşunda ile 9,5 U/mL-1 maksimum enzim üretkenliği elde edilmiştir. EMS2, EMS4, EMS5 ve EMS6 kimyasal mutant suşlarının enzim üretkenliğinin ana suşa oranla daha yüksek miktarlarda olduğunu gözlemlemişlerdir. EMS4 ile 7,12 U/mL-1 maksimum enzim üretkenliği elde edilmiştir. Çalışma sonucunda hem fiziksel mutajen UV radyasyon hem kimyasal mutajen EMS uygulamasında *Aspergillus niger* mutant suşlarının morfolojik ve genetik olarak değişim gözlemlemişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez çalışması kapsamında mutasyon teknikleri ile probiyotik özellikleri geliştirilen planlanan yerel laktik asit bakteri (LAB) suşları daha önceki bir çalışmada Ankara-Çubuk yöresinde üretilen turşulardan izole edilmiş olup, moleküler yöntemlerle tanımlanmış (Bağder Elmacı ve ark., 2015) ve teknolojik-probiyotik özellikleri belirlenmiştir (Tokatlı ve ark., 2015; Tokatlı ve ark., 2017). Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Kültür Koleksiyonunda muhafaza edilen 16s rRNA gen dizi analiz sonuçlarına ait GenBank erişim numaraları (Accession number: KJ994358-KJ994509) daha önceki çalışmalarda belirtilen (Bağder Elmacı ve ark., 2015) Laktik Asit Bakteri suşlarından *Lb. brevis* MF105, *Lb. plantarum* MF239, *Lb. plantarum* MF376, *Lb. plantarum* MF556, *P. ethanolidurans* MF229, *P. ethanolidurans* MF50 suşları bu çalışmada kullanılmıştır. Mutajen kimyasallar olarak etidyum bromür ve etil metan sülfonat (EMS), fiziksel mutajen olarak UV lamba kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Laktik asit bakteri kültürlerinin aktifleştirilmesi

Daha önce yapılan çalışmada (Tokatlı ve ark., 2015) probiyotik özellikleri belirlenmiş laktik kültürler mutasyon teknikleri ile probiyotik özellikleri geliştirilmek üzere seçilimi yapılmıştır. Seçim yapılırken düşük pH dayanımı, safra tuzu dayanımı ve proteolitik enzim dayanımları baz alınmıştır. Seçilen saf laktik kültürlerin aktifleştirilmesi için, kültürler MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) sıvı besiyerinde 30°C’de pH 6.0’da 48 saat OD₆₀₀.1,5 yoğunluğuna ulaşınca kadar inkübe edilmiştir. Aktifleştirme işlemi mutasyon teknikleri uygulanmadan önce birkaç kez tekrarlanmıştır.

3.2.2. Mutasyon uygulamaları

Ultraviyole radyasyon (UV) ile mutasyon: seçilen LAB suşları (*L. plantarum* MF239, *L. brevis* MF105, *L. plantarum* MF376, *L. plantarum* MF556, *P. ethanolidurans* MF229, *P. ethanolidurans* MF50) MRS sıvı besiyerinde (30°C) 48 saat geliştirilmiştir. Belirli hücre

yoğunluğuna ulaşan kültürler santrifüjlenmiştir (6000 rpm×15 dk, 25°C). Sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra bakteriyel çökelti iki kez %0,85'lik steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ile yıkanmış ve tekrar santrifüjlenmiştir. Elde edilen yıkanmış bakteriyel çökelti tekrar FTS ile belirli bir optik yoğunluğa (OD₆₀₀:1,0) kadar seyreltilmiştir. Bu aşamada elde edilen bakteri süspansiyonunun yayma plak yöntemi ile MRS agar besiyerinde 30 °C'de 48 saat inkübe edilerek toplam canlı laktik asit bakteri sayımları yapılmıştır. Hazırlanan bakteriyel süspansiyondan mikropipet yardımı ile steril şartlarda 50 µL alınarak steril petri kabına damlatılmıştır. Petri kaplarına damlatılan bakteri süspansiyon sıvısı kapaksız bir şekilde steril ekim kabini içerisinde oda sıcaklığında (25°C) Germicidal UV lamba (254nm dalga boyu, 25W güç) ile 60-130 saniye aralığındaki farklı sürelerde ve belirli mesafelerden (20 cm) UV radyasyona maruz bırakılmıştır. Ayrıca UV radyasyonun mutasyon etkinliğinin artırılması amacı ile 40 saniye aralıklarla 4 defa LAB suşları kesikli (KUV) olarak radyasyona da maruz bırakılmıştır. Kontrol grubu olarak bakteri süspansiyonundan 50µL steril petrilere alınarak UV radyasyon uygulanmadan karanlık bir ortamda oda sıcaklığında bekletilmiştir. UV radyasyon uygulaması yapılmış petri içerisindeki bakteri süspansiyonu ve kontrol grubu steril FTS (100µL) yardımı ile yıkama yapılarak MRS agar besiyerine alınıp yayma plak yöntemi ile ekim yapılmış 30°C'da 48 saat inkübasyondan sonra canlı bakteri sayımları yapılmıştır. Bu yolla toplanan ve mutasyona uğradığı düşünülen bakteriyel koloniler mutant seçimini yapmak üzere diğer prosedürler uygulanana kadar soğuk şartlarda (+4° C) saklanmıştır.

Kimyasal mutasyon (Etidyum Bromür, Etil Metansülfonat); mutasyon uygulamaları için seçilen LAB suşları (*L. plantarum* MF239, *L. brevis* MF105, *L. plantarum* MF376, *L. plantarum* MF556, *P. ethanolidurans* MF229, *P. ethanolidurans* MF50) MRS sıvı besiyerinde (30°C) 48 saat geliştirilmiştir. Belirli hücre yoğunluğuna ulaşan kültürler santrifüjlenerek (6000 rpm, 10 dk) sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra bakteriyel çökelti iki kez %0,85'lik (FTS) ile yıkanmış ve tekrar santrifüjlenmiştir. Elde edilen yıkanmış bakteriyel çökelti tekrar FTS ile belirli bir optik yoğunluğa (OD₆₀₀:1,5) kadar seyreltilmiştir. Bu aşamada elde edilen bakteri süspansiyonunun yayma plak yöntemi ile MRS agar besiyerinde toplam canlı sayımları yapılmıştır. Belirli optik yoğunlukta (OD₆₀₀:1,5) hazırlanan 5 mL bakteriyel süspansiyon içerisine 5 mL etidyum bromür (1,00 EtBr mg/mL, Merck) veya 5 mL etil metan sülfonat (1,00 EMS mg/mL, Merck) veya 5 mL EtBr-EMS (Mix) karışımı (1:1) ilave edilerek ön denemelerle belirlenen 6 saat süre ile statik şartlarda 30°C'de inkübe edilmiştir. İşlem sonrasında kimyasal mutajen içeren süspansiyonlar

santrifüjlenerek (6000 rpm× 15 dk) 2 kez %0,85 FTS ile yıkanmıştır. Elde edilen süspansiyondan seri dilüsyonlar hazırlanarak yayma plak yöntemi ile MRS agar besiyerine ekim yapılarak, 30°C’da 48 saat inkübe edilmiştir. Kimyasal mutasyon uygulaması sonrası sayım için MRS agar besiyerinde kültüre alınan ve özellikle farklı tipe veya görünüşe sahip olan kolonilerden mutant seçilimi yapmak üzere 4°C ‘de depolanmıştır (Sobrun ve ark., 2012; Sudi ve ark., 2008; Khattab ve ark., 2016).

3.2.3. Mutant suşların seçilimi

Bazı probiyotik özelliklerin iyileştirilmesi doğrultusunda kimyasal (EtBr, EMS, Mix) ve fiziksel mutajenlere (UV, KUV) maruz bırakılan ve hayatta kalan laktik suşların geliştirilmesi hedeflenen probiyotik özellik açısından mutasyonlara uğradıklarının belirlenmesi için hızlı yöntemler ile ön seçim yapılmıştır. Bu amaçla laktik suşların gastrik asit (pH 2.5) dayanımında meydana gelen değişikliği belirlemek üzere, *Lb. brevis* MF105 ve *Lb. plantarum* MF239 suşlarının kimyasal ve UV mutasyon işlemine maruz bırakılan kültürlerinden özellikle farklı tipe veya görünüşe sahip olan bakteriler öze ile alınıp, MRS sıvı besiyerinde (pH 2.5) 30°C’de 24 saat inkübasyona bırakılarak optik yoğunluktaki (OD₆₀₀) değişimler takip edilmiş ve mutasyon işlemine maruz bırakılmamış kontrol örneği ile kıyaslanmıştır. Mutasyon işlemine maruz bırakılmamış kontrol örneğine göre asitlik dayanım özelliğinde artış görülen suşlar seçilmiştir.

Safra tuzu dayanımının geliştirilmesi hedeflenen mutant suşların seçilimi amacıyla mutasyon işlemleri sonucunda kültüre alınan ve +4°C de muhafaza edilen *Lb. plantarum* MF376 ve *Lb. plantarum* MF556 suşlarından özellikle farklı tipe veya görünüşe sahip olan bakteriler öze ile alınarak %0,3 safra tuzu (Oxgall) içeren MRS sıvı besiyerinde 30°C’de 24 saat inkübe edilmiş ve gelişimleri optik yoğunluk ile (OD₆₀₀) asitlik dayanımında olduğu gibi takip edilmiştir. Mutasyon işlemine maruz bırakılmamış kontrol örneğine göre oranla daha yüksek dayanım ve gelişme gösteren mutant suşlar seçilmiştir.

Enzim dayanımlarındaki gelişme ise 4°C’de muhafaza edilen *P. ethanolidurans* MF229 ve *P. ethanolidurans* MF50 suşlarının petrilerinden öze yardımı ile alınarak pepsin enzimi (Sigma) için; MRS sıvı besiyerinde (pepsin 3 mg/mL, pH 3.5), pankreatin enzimi (Sigma) için; MRS sıvı besiyeri (pankreatin 1 mg/mL, pH 8)’ne inoküle edilerek 30°C’de 16 ve 19 saat inkübe edilmiş ve gelişimleri optik yoğunluk ile (OD₆₀₀) takip edilmiştir. Mutasyon

işlemine maruz bırakılmamış kontrol örneğine göre pozitif yönde farklılık gösteren mutant suşlar seçilmiştir.

3.2.4. Mutant suşların probiyotik özelliklerinin inVitro karakterizasyonu

pH 2.5 dayanımının belirlenmesi; mutant LAB'nin mide ortamı asitlik şartlarına karşı dayanımlarının belirlenmesi amacı ile %1 oranında MRS sıvı besiyerine aşıl原因an mutant hücreler 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası aktif hücreler santrifüj edilerek (6000 rpm, 15 dk) çökeltileri pH değeri 2.5 olan PBS (phosphate-buffered saline; 9 g/L NaCl, 9 g/L Na₂HPO₄. 2 H₂O, 1.5 g/L KH₂PO₄) içerisinde ilk hacmine tamamlanarak süspanse edilmiştir. Hazırlanan hücre süspanسیونlarından başlangıçta (0. Saat) ve 37°C'de 4 saat inkübe edildikten sonra (4. saat) örnek alınarak seri dilüsyonları hazırlandıktan sonra MRS agar besiyerine yayma plak yöntemi ile ekimleri yapılarak canlı hücre sayıları (log kob/mL) belirlenmiştir. Canlı sayım sonuçları ile suşların % canlılık ve canlılık artış değerleri de hesaplanmıştır. Kontrol grubu olarak mutasyona uğramamış doğal suş için de aynı yöntem uygulanmıştır (Conway ve ark., 1987; Tokatlı, 2013).

Safra tuzuna dayanımının belirlenmesi; mutant LAB suşlarının safra tuzuna karşı dayanımlarının belirlenmesi amacı ile, %1 oranında MRS sıvı besiyerine aşıl原因an mutant hücreler 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Aktif kültürlerden %1 oranında %0,3 safra tuzu (Oxgall) içeren MRS sıvı besiyerine aşıl原因arak, 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. LAB'nin safra ortamında canlılık düzeylerini belirlemek amacı ile 0. saat ve 4. saatte alınan örneklerden MRS agar besiyerine yayma plak yöntemi ile ekimleri yapılarak canlı hücre sayımları yapılmıştır. Canlı sayım sonuçları ile suşların % canlılık ve canlılık artış değerleri de hesaplanmıştır. Kontrol grubu olarak kullanılacak doğal suş için de aynı yöntem uygulanmıştır (Yavuzdurmaz, 2007; Tokatlı, 2013).

Pepsin ve Pankreatin enzim dayanımının belirlenmesi; mutant LAB suşlarının Pepsin ve Pankreatin enzim varlığına karşı dayanımlarının belirlenmesi amacı ile, %1 oranında MRS sıvı besiyerine aşıl原因an mutant hücreler 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Aktifleştirilen kültürler pepsin varlığında canlılık düzeylerinin belirlenmesi için, membran filtrasyonu ile sterilize edilmiş taklit mide ortamına (50Mm KH₂PO₄, 3 mg/mL pepsin, pH 3.5) %1 oranında aşıl原因arak, 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. Pankreatin varlığında canlılık düzeylerini belirlemek için, taze kültürlerden %1 oranında taklit bağırsak ortamına (50Mm KH₂PO₄, %0,3 safra tuzu, 1 mg/mL pankreatin, pH 8) aşıl原因arak 37°C'de 6 saat inkübe

edilmiştir. İnkübasyon öncesi ve sonrası yayma plak yöntemi ile sayım yapılarak kültürlerin canlılık düzeyleri belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak kullanılacak doğal suş için de aynı yöntem uygulanarak canlılık düzeyi hesaplanmıştır (Kimura ve ark., 2006; Musikasang ve ark., 2009; Tokatlı, 2013).

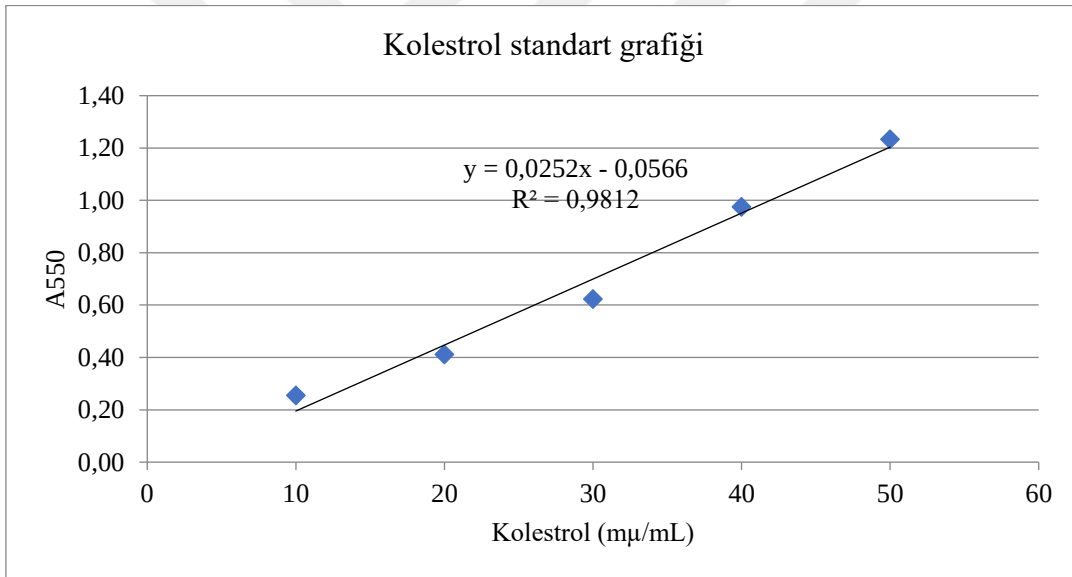
Antibiyotik direncinin belirlenmesi; mutant suşların 30 µg kloramfenikol (C30), 10 µg amfisilin (AM10), 15 µg eritromisin (E15), 30 µg tetramisin (TE30), 30 µg kanamisin (K30) antibiyotiklerine dirençlerinin belirlenmesi amacı ile %1 oranında MRS sıvı besiyerine aşılana ve 30°C’de 48 saat inkübe edilen mutant suşların MRS Agar besiyerine yayma plak yöntemi ile ekimleri yapılmıştır. Her bir antibiyotik diski besiyerine yerleştirilmiştir ve 72 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. Antibiyotik direnci inkübasyon sonrası disklerin etrafındaki berrak zonlar ölçülerek belirlenmiştir (Thirabunyuan ve ark., 2009; Tambekar ve ark., 2010; Tokatlı, 2013).

Hücre yüzey hidrofobisite özelliğinin belirlenmesi; mutant suşların hücre yüzey hidrofobisite belirlenmesi amacı ile %1 oranında MRS sıvı besiyerine aşılana ve 30°C’de 48 saat inkübe edilen mutant suşların mutant suşlar (6000 rpm×10 dk) santrifüjlenmiştir. Elde edilen hücre çökeltisi 2 kez 50 mm K₂HPO₄ tamponu ile yıkanmıştır. Elde edilen yıkanmış çökelti 50 mm K₂HPO₄ tamponu ile absorbansı (560 nm) yaklaşık 1 (A₀) olacak şekilde tekrar çözündürülerek, 5 mL bakteri süspansiyondan 1 mL n-hexadecane içeren tüp içerisine aktararak karıştırılmış ve 37°C’de 1 saat inkübe edilmiştir. Faz ayrımı gerçekleştikten sonra alt faz (n-hexadecane fazı) alınarak 560 nm’de absorbansı (A) ölçülmüştür. Aşağıdaki formül kullanılarak mikroorganizmaların % hidrofobisitesi (% H) hesap edilmiştir (Perez ve ark., 1998; Tokatlı, 2013).

$$\% H = [(A_0 - A) / A_0] * 100$$

Kolesterol asimilasyon özelliklerinin belirlenmesi; mutant suşların kolesterol asimilasyon özelliklerinin belirlenmesi amacı ile %1 oranında MRS sıvı besiyerine aşılana ve 30°C’de 48 saat inkübe edilen mutant suşlar 50 µg/mL kolesterol (PEG600, Sigma) içeren MRS sıvı besiyerine aşılarak, 37°C’de 24 saat inkübe edilmiş ve bakterileri uzaklaştırmak için santrifüjlenerek (6000 rpm×10dk) sıvı faz ayrılmıştır. Aynı işlemler inoküle edilmemiş besiyerine de uygulanarak, kontrol örnek olarak analize alınmıştır (Gilliland ve ark., 1985; Pereira ve Gibson 2002; Al-Awwad, 2009). Elde edilen sıvı fazda, OPA (o-phtalaldehit) metodu kullanılarak kolesterol miktarı belirlenmiştir. OPA metodu ile kolesterol miktarının belirlenmesi amacı ile 0,5 mL sıvı fazdan alınarak üzerine 3 mL %95’lik etil alkol ve 2 mL

%5'lik KOH ilave edilerek 60°C'de 10 dk bekletilmiştir. Daha sonra soğutulan çözelti üzerine 5 mL hekzan, 3 mL saf su ilave edilerek 15 dk oda sıcaklığında bekletilerek faz ayrımı sağlanmıştır. Hekzan tabakasından 1 mL alınarak 60°C'de etüvde bekletilerek hekzan uzaklaştırılmıştır. Sonrasında 1,6 mL o-phtalaldehit (0,5 mg/mL) ilave edilmiştir. 10 dk bekletilen örneklerin üzerine 0,8 mL sülfirik asit eklenerek 550 nm'de spektrofotometrede absorbansları ölçülmüştür. Hesaplamalarda ve standart kurvenin çizilmesinde aynı şartlarda hazırlanmış olan 10-50 µg kolesterol/mL çözeltileri kullanılmıştır. Ölçülen absorbans değerleri üzerinden standart curve yardımı ile sıvı fazdaki, yani bakteriler tarafından asimile edilmeyen kolesterol miktarı hesap edilmiştir. Benzer şekilde % kolesterol asimilasyon değeri ise, sıvı fazdaki kolesterol oranı ile kontrol örneğinde hesap edilen değer üzerinden hesaplanmıştır (Rudel ve Morris 1973).



Şekil 3.3. Kolesterol standart grafiği

3.2.5. Mutasyonların genetik yöntemlerle belirlenmesi (RAPD PCR)

RAPD-PCR Analizi (Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction); Mutant LAB suşlarının ve mutasyona uğramamış doğal suşların genomik DNA'ları RAPD-PCR tekniği ile incelenerek genetik polimorfizm ortaya konulmuştur. Mutant ve doğal ana suşların DNA izolasyonu, genomic DNA ekstraksiyon ve izolasyon kitleri (GeneAll) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Sambrook ve ark., 1989).

DNA ekstraksiyonu ve izolasyonu için; 1,5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpü içerisindeki geliştirilmiş hücreler 1 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve sıvı kısım uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücre peleti 180 µL enzim karışımının içerisinde yeniden süspanse edilmiştir. Ardından 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. 20 µL Proteinaz K solüsyonu (20 mg/mL) ve 200 µL tampon BL eklendikten sonra karıştırılmıştır. Önce 56 °C'de 30 dakika ardından 70°C'da 30 dakika inkübe edilmiştir. Elden edilen süspansiyona 200 µL etanol eklenip karıştırılmış ve karışım G tipi kolona aktarılmıştır. 1 dakika boyunca 6.000 g'de santrifüjlenen örnekler 600 µL tampon TW eklenmiş, 6.000×g'de 1 dakika santrifüjlenmiş ve toplama tüpü yenisiyle değiştirilmiştir. Mini kolonda kalıntı kalmayana kadar işlem tekrarlanmıştır. 700 µL tampon TW uygulanmış ardından 1.000×g' de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Geçen kısmı atıldıktan sonra mini kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Kalan yıkama tamponunu çıkarmak için 1 dakika boyunca tam hızda (>13.000 g)'de santrifüjlenmiştir. Mini kolon yeni bir 1.5 mL santrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. Saflaştırılan DNA parçaları PCR karışım kitleri kullanılarak ve üretici firma tarafından belirtilen prosedür eşliğinde RAPD primerler kullanılarak hedef DNA bölgelerinin çoğaltma işlemi gerçekleştirilmiştir.

RAPD PCR (Biogener) aşaması için, OPA2 primer (5'-TGCCGAGCTG-3'), LAB49 primer (5'-AGCAGCGTGG-3'), OPA8 primer (5'-GTGACGTAGG-3'), CRA25 primer (5'-AACGCGCAAC-3'), OPB08 primer (5'-GTCCACACGG-3'), OMP05 primer (5'-GGGAACGTCT-3') kullanılmıştır. PCR prosedüründe uygulanacak sıcaklık ve süreler kullanılan primer çeşitleri (G/C oranı) dikkate alınarak farklılık göstermiştir. Daha sonra çoğaltılan PCR ürünleri %1-%1,5'lik yatay agaroz jel elektroforezinde yürütülerek UV ışık altında görüntülenmiştir. Elektroforez işlemi ile elde edilen genomik bantların (fragment) boyutları (bp) ve sayıları belirlenerek mutant suşlar ve doğal suş arasındaki genomik DNA fragment farklılıkları ortaya çıkartılmıştır (Akkaya, 2009; Khatlab ve ark., 2016).

RAPD PCR çalışmasında izole bakteriyel genomik DNA örnekleri amplifikasyon öncesi karışımları hazırlanmıştır. Bunun için 10 µL ABT 2x MasterMix, 2µL primer (10µM), 5 µL DNA örneği karışımı hazırlanarak saf su ile 20 µL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan karışım PCR işlemi için ilk denatürasyon basamağından (94°C, 5 dk) sonra döngü halinde 94°C'de 30sn denatürasyon, 38°C de 1 dk primer bağlanması ve 72°C'de 1 dk 45 sn uzama adımlarından oluşan toplam 32 döngü gerçekleştirilmiştir. Bitiş aşamasında ise 72°C'de 8 dk. uzama gerçekleştirilmiştir. PCR işlemi gerçekleşen örnekler %1,0'lık Agoroz jelde

yürütölünceye kadar -60 °C’de depolanmıştır. Agaroz jel görüntüleri değerdendirilerek mutant suşlarda meydana gelen DNA fragmentleri düzeyindeki değışim analiz edilmiştir.

3.2.6. İstatistiksel değerdendirme

Elde edilen verilerin istatistiksel değerdendirilmesi ve karşılaştırılması Minitab programında (Minitab, Minitab inc., 1998) T-test, one-way (ANOVA) ve balanced (ANOVA) analizleri kullanılarak yapılmıştır.



4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. UV Radyasyonun LAB Suşlarının Canlılık Düzeylerine Etkisi

En yaygın olarak kullanılan fiziksel mutajenlerden UV radyasyon; enerjisi zayıf olmasına ve hücre içerisinde iyonlaşmaya neden olmamasına rağmen DNA'nın yapısını değiştirebilir. Örneğin hücre içerisinde DNA zincirinin kırılmasına neden olabilir, DNA'da molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlanma, proteinin çapraz bağlanması, nükleik asit ve proteinin çapraz bağlanması, sitozin ve urasil hidrasyonu, primidin dimerlerinin oluşumuna neden olabilir (Pullman ve Pullman, 1963; Rohwerder ve ark., 2003). UV mutasyonunun ana etkisi, DNA'nın biyolojik aktivitesini değiştirebilen ve bakteriyel mutasyona neden olabilen timin dimerlerini biçimlendirmektir (Yang ve ark., 2010). Aşırı miktarda UV radyasyonu, DNA hücrelerinin büyük bir bölümünün kaybına neden olabilir veya DNA'nın replikasyonunu ve transkripsiyonunu önleyebilir. Bu nedenle aşırı miktarda UV hücre ölümüne neden olabilir. Mutajen miktarı bakteri öldürücülüğünü doğrudan etkileyebilir (Beggs, 2002).

Probiyotik özellikleri açısından düşük pH dayanımı gösteren *Lb. brevis* MF105, *Lb. plantarum* MF239 suşları, düşük safra tuzu dayanımı gösteren olan *Lb. plantarum* MF376, *Lb. plantarum* MF556 suşları ve düşük pepsin/pankreatin enzim dayanımı gösteren *P. ethanolidurans* MF229, *P. ethanolidurans* MF50 suşları çalışma kapsamında ilk olarak uygun UV radyasyon süre aralığının belirlenmesi için ön denemeler ile MRS agar besiyeri üzerine damlatılan hücre süspansiyonları 0-400 saniye süre aralığında UV radyasyona maruz bırakılarak LAB suşlarının petri kaplarındaki koloni oluşumları görsel olarak gözlemlenmiş ve gelişimleri negatif (-) ve pozitif (+) olarak değerlendirilmiştir.

UV radyasyon sürelerinin belirlenmesi için yapılan ön deneme çalışmalarına ait sonuçlar Tablo 4.1'de verilmiştir. LAB suşlarının UV radyasyon karşısında gösterdikleri hücresel gelişim sonuçları incelendiğinde MF105, MF239, MF376, MF229 ve MF50 suşlarının 100 saniye UV radyasyon uygulamasında canlı kalabildikleri ve artan süre ile canlılıklarını tamamen kaybettikleri belirlenmiştir. Sadece *Lb. plantarum* MF556 suşu daha uzun süreli (200 saniye) UV radyasyon dayanımı göstermiş ve 400 saniye sürede canlılığını tamamen kaybetmiştir. MF556 suşunun diğer suşlara göre daha yüksek UV dayanım süresi göstermesinin türe bağımlı olmadığını ancak diğer değişkenlerden kaynaklı olabileceğini düşündürmüştür. Ön deneme sonuçları ile MF556 suşu hariç diğer tüm LAB suşları için UV

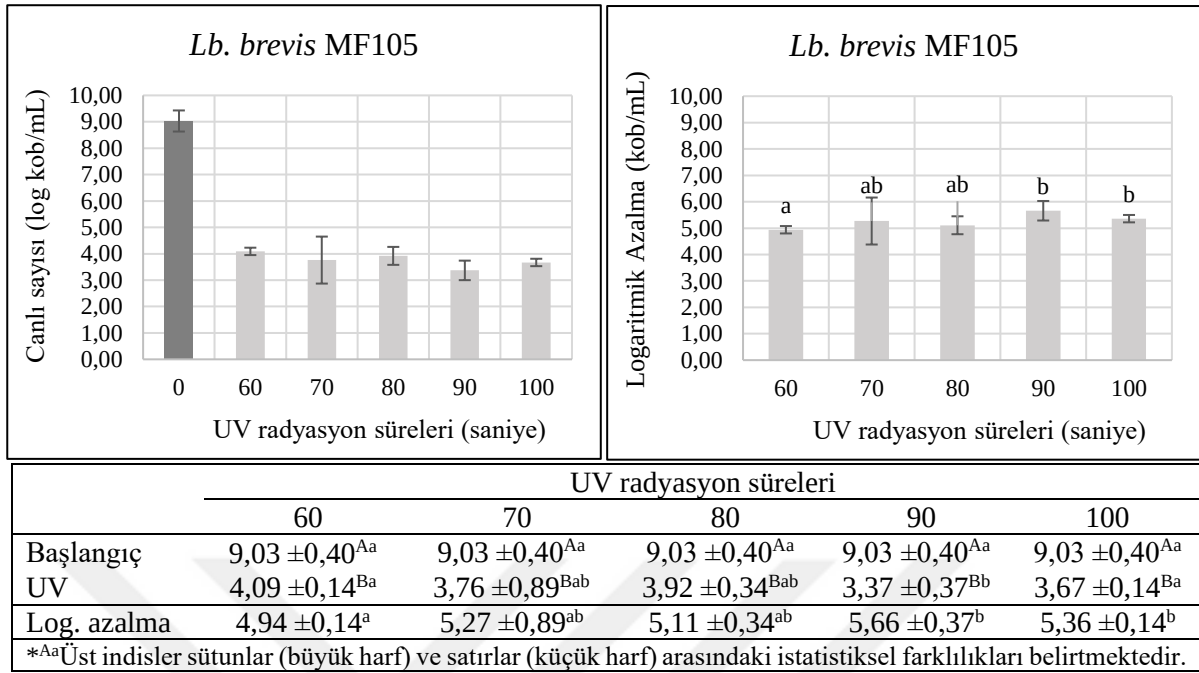
radyasyon uygulamasının 60-100 saniye aralığında, MF556 suşu için ise 80-130 saniye aralığında uygulanmasına karar verilmiştir.

Uygun UV sürelerinin her bir LAB suşu için belirlenmesinden sonra kültürler petri kaplarına damlatılarak (50µL) steril ekim kabini içerisinde oda sıcaklığında (25°C) Germicidal UV lamba (254 nm, 25W) ile 20 cm mesafeden belirlenen süre aralıklarında UV radyasyona maruz bırakılmış ve mutasyon uygulaması gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.1. LAB suşlarına farklı sürelerde uygulanan UV radyasyonun besiyerinde koloni oluşumuna etkisi

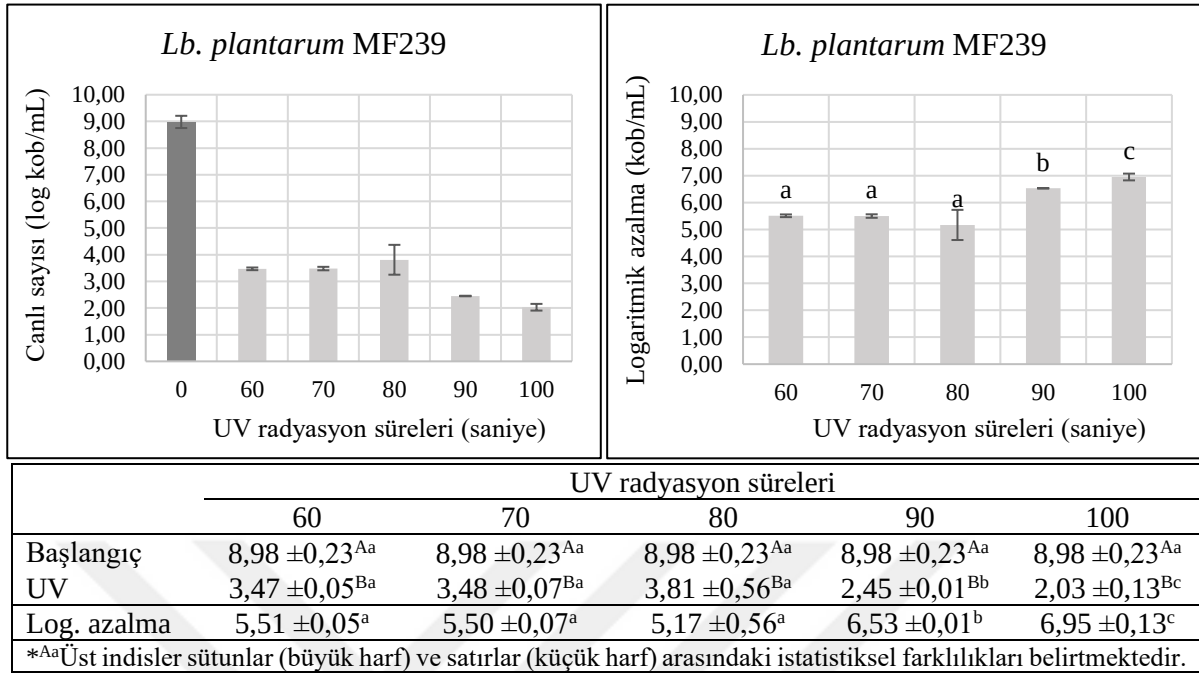
LAB suşları	UV radyasyon süreleri (saniye)				
	0	50	100	200	400
<i>Lb. brevis</i> MF105	+	+	+	-	-
<i>Lb. plantarum</i> MF239	+	+	+	-	-
<i>Lb. plantarum</i> MF376	+	+	+	-	-
<i>Lb. plantarum</i> MF556	+	+	+	+	-
<i>P. ethanolidurans</i> MF229	+	+	+	-	-
<i>P. ethanolidurans</i> MF50	+	+	+	-	-

*MRS agar besiyerinde farklı sürelerde UV radyasyona maruz bırakılan LAB suşlarının inkübasyon sonrası koloni oluşumları görsel olarak takip edilmiştir



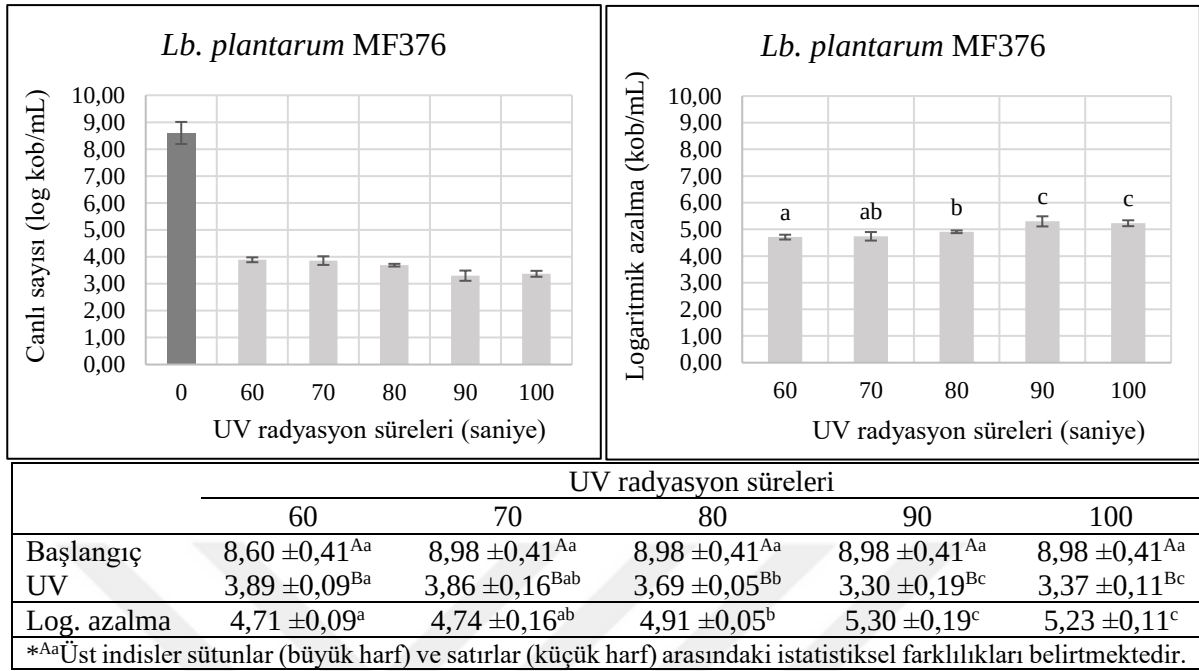
Şekil 4.1. *Lb. brevis* MF105 suşuna farklı sürelerde uygulanan UV radyasyonun hücre canlılık düzeylerine etkisi (log kob/mL)

Lb. brevis MF105 suşunun 60-100 saniye aralığında UV radyasyon uygulamalarından elde edilen canlı hücre sayıları ve logaritmik azalma değerleri Şekil 4.1’de verilmiştir. Şekil 4.1 incelendiğinde başlangıç hücre sayısının ($9,03 \pm 0,40$ log kob/mL) uygulanan UV radyasyon sonrasında tüm sürelerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir ($p < 0,05$). *Lb. brevis* MF105 suşuna 70, 80, 90 ve 100 saniye süre ile uygulanan UV radyasyonun hücre sayısındaki logaritmik azalma değerleri benzer bulunmuş ($p > 0,05$) ve en yüksek logaritmik azalma değerleri sırası ile 90 saniye UV uygulamasında $5,66 \pm 0,37$ log kob/mL, 100 saniye UV uygulamasında $5,36 \pm 0,14$ log kob/mL olarak ölçülmüştür. *Lb. brevis* MF105 suşunda UV uygulama sürelerinin artışı ile logaritmik azalma değerleri bir miktar artarken sürelerin tümü arasında anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır.



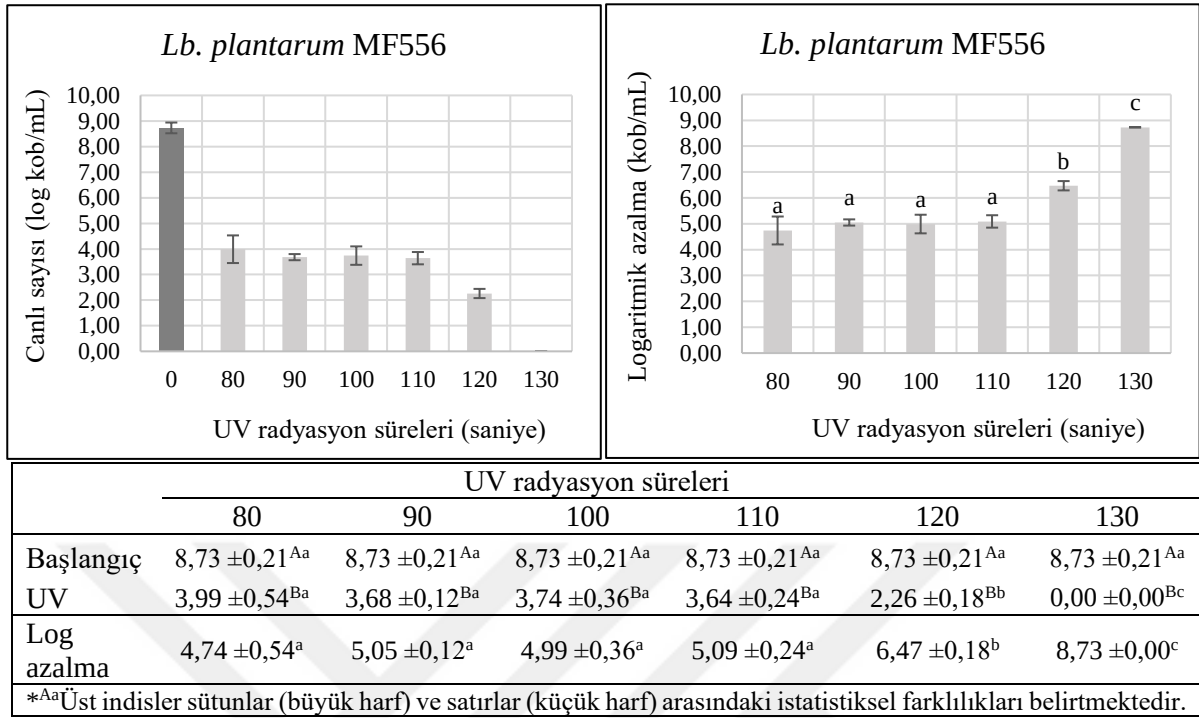
Şekil 4.2. *Lb. plantarum* MF239 suşuna farklı sürelerde uygulanan UV radyasyonun hücre canlılık düzeylerine etkisi (log kob/mL)

Lb. plantarum MF239 suşunun 60-100 saniye aralığında UV radyasyon uygulamalarından elde edilen canlı hücre sayıları ve logaritmik azalma değerleri Şekil 4.2’de verilmiştir. Şekil 4.2 incelendiğinde başlangıç hücre sayısının ($8,98 \pm 0,23$ log kob/mL) uygulanan UV radyasyon sonrasında tüm sürelerde azaldığı belirlenmiştir ($p < 0,05$). *Lb. plantarum* MF239 suşunda 60, 70, 80 saniye süre ile uygulanan UV radyasyonun hücre sayısındaki logaritmik azalma değerleri 5,51-5,17 log kob/mL aralığında benzer olarak bulunmuştur ($p > 0,05$). Diğer taraftan artan UV uygulama süresi ile canlı hücre sayısındaki logaritmik azalma artmış ve en yüksek azalma 100 saniye UV uygulamasında $6,95 \pm 0,13$ log kob/mL olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). *Lb. plantarum* MF236 suşunda özellikle 90 ve 100 saniye UV uygulama sürelerinde logaritmik azalma değerleri anlamlı bir şekilde yükselmiştir.



Şekil 4.3. *Lb. plantarum* MF376 suşuna farklı sürelerde uygulanan UV radyasyonun hücre canlılık düzeylerine etkisi (log kob/mL)

Şekil 4.3 incelendiğinde *Lb. plantarum* MF376 suşunun UV radyasyon uygulama öncesi $8,98 \pm 0,41$ log kob/mL olan başlangıç canlı hücre sayısının 60 saniye uygulamasında 3,89, 70 saniyede 3,86, 80 saniyede 3,69, 90 saniyede 3,30 ve 100 saniyede ise 3,37 değerine düştüğü belirlenmiştir. Tüm uygulanan UV radyasyon sürelerinde canlı hücre sayılarında meydana gelen düşüş anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). UV radyasyon sürelerindeki artış ile logaritmik azalma miktarında artış meydana gelerek en yüksek değere 90 ve 100 saniye uygulamalarında benzer olarak sırası ile $5,30 \pm 0,19$ log kob/mL ve $5,23 \pm 0,11$ log kob/mL olarak gerçekleşmiştir ($p > 0,05$). Diğer sürelerde (60, 70, 80 saniye) elde edilen logaritmik azalma değerleri ise daha düşük düzeylerde ($4,71$ - $4,91$ log kob/mL) bulunmuştur ($p < 0,05$).

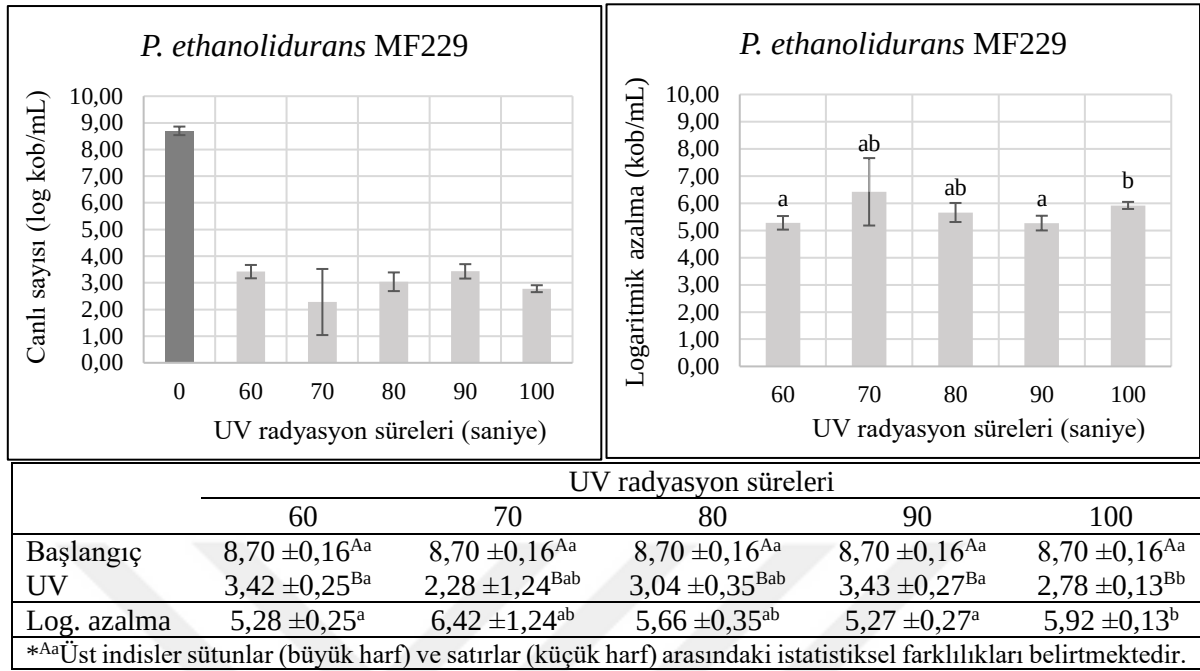


Şekil 4.4. *Lb. plantarum* MF556 suşuna farklı sürelerde uygulanan UV radyasyonun hücre canlılık düzeylerine etkisi (log kob/mL)

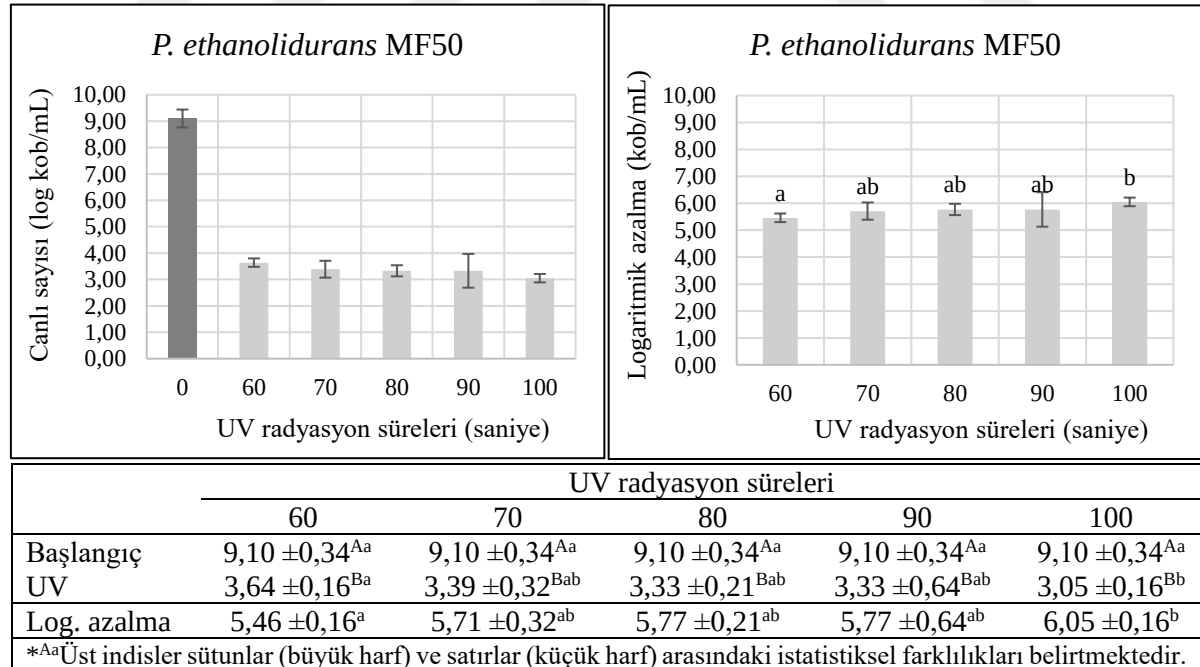
UV radyasyon uygulama süre aralıklarının belirlenmesi için yapılan ön denemeler sonucu daha yüksek sürelerde canlılığını kaybeden *Lb. plantarum* MF556 suşu için mutasyonlarda uygulanacak süreler 80-130 saniye olarak seçilmiş ve MF556 suşunun bu süre aralıklarında radyasyon uygulamalarından elde edilen canlı hücre sayıları ve logaritmik azalma değerleri Şekil 4.4’de verilmiştir. Şekil 4.4 incelendiğinde başlangıç hücre sayısının ($8,73 \pm 0,21$ log kob/mL) uygulanan UV radyasyon sonrasında tüm sürelerde azaldığı belirlenmiştir ($p < 0,05$). En düşük canlı hücre sayıları 120 ve 130 saniye sürelerde sırası ile 2,26 ve 0,00 olarak belirlenmiştir. 130 saniye UV radyasyon maruziyeti ile sayılabilir koloni elde edilememiş ve mutant suş seçimleri için kullanılmamıştır. Diğer süre aralıklarında ise *Lb. plantarum* MF556 suşu için belirlenen canlı hücre değerleri 3,99-3,64 log kob/mL aralığında benzer olarak ölçülmüştür ($p > 0,05$). En yüksek logaritmik azalma değeri 120 ve 130 saniye sürelerde 6,47 log kob/mL ve 8,73 log kob/mL olarak hesaplanmıştır.

Şekil 4.5’de farklı sürelerde uygulanan UV radyasyonun *P. ethanolidurans* MF229 suşunun hücre canlılıklarına ve logaritmik azalmalarına etkileri verilmiştir. Şekil 4.5 incelendiğinde tüm süreler arasında anlamlı bir korelasyon bulunmamakla birlikte 70 saniye uygulamasında elde edilen hücre canlılık sayısı ($2,28 \pm 1,24$ log kob/mL) en düşük değer olarak belirlenmiş ve bu değer tüm diğer sürelerde belirlenen canlı sayıları ile istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ($p > 0,05$). En yüksek UV uygulama süresi olan 100 saniyede ise elde edilen logaritmik azalma değeri $5,92 \pm 0,13$ log kob/mL olarak hesaplanmış ve bu değer 80, 70 saniyede hesaplanan değerler ile benzer bulunmuştur ($p > 0,05$). *P. ethanolidurans* MF229 suşunun UV mutasyon uygulamasında süre artışı ile canlı hücre sayısındaki azalma arasında doğrusal bir ilişki bulunamamış ve bu durum daha çok uygulama stabilitesinin düşüklüğüne bağlanmıştır.

P. ethanolidurans MF50 suşunun 60-100 saniye aralığında UV radyasyon uygulamalarından elde edilen canlı hücre sayıları ve logaritmik azalma değerleri Şekil 4.6’da verilmiştir. Şekil 4.6 incelendiğinde başlangıç hücre sayısının ($9,10 \pm 0,34$ log kob/mL) uygulanan UV radyasyon sonrasında tüm sürelerde azaldığı belirlenmiştir ($p < 0,05$). En düşük canlı hücre sayısı ve en yüksek logaritmik azalma değerleri 100 saniye UV radyasyon uygulamasında sırası ile $3,05 \pm 0,16$ log kob/mL ve $6,05 \pm 0,16$ log kob/mL olarak belirlenmiş ve bu değerler istatistiksel olarak 70, 80, ve 90 saniye sürelerinde elde edilen değerler ile benzer bulunmuştur ($p > 0,05$).



Şekil 4.5. *P. ethanolidurans* MF229 suşuna farklı sürelerde uygulanan UV radyasyonun hücre canlılık düzeylerine etkisi (log kob/mL)



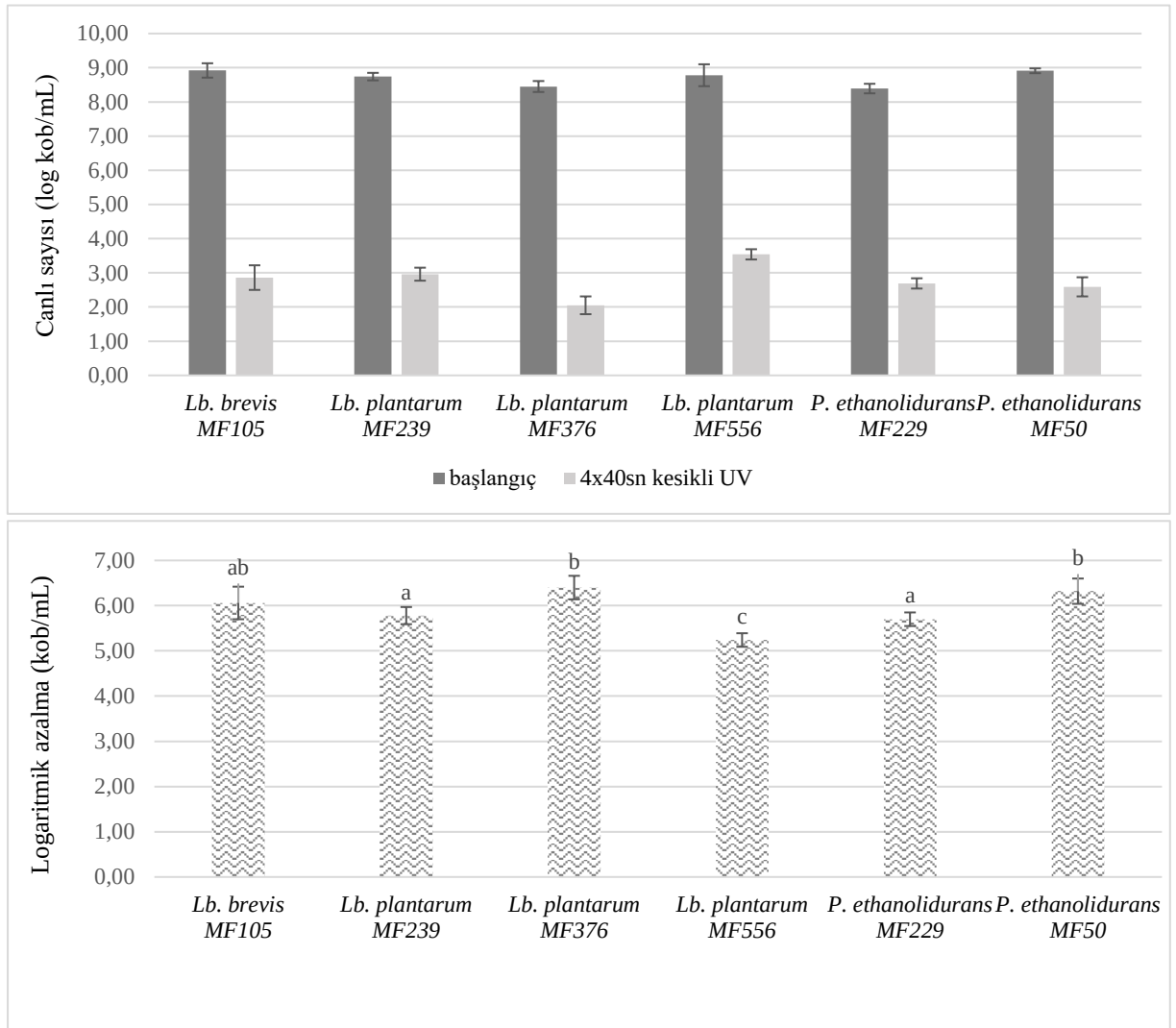
Şekil 4.6. *P. ethanolidurans* MF50 suşuna farklı sürelerde uygulanan UV radyasyonun hücre canlılık düzeylerine etkisi (log kob/mL)

Tablo 4.2. LAB suşlarına farklı sürelerde uygulanan UV radyasyonun logaritmik azalma düzeylerine etkisi

LAB Suşları	UV radyasyon Süreleri		
	80	90	100
<i>Lb. brevis</i> MF105	5,11 ±0,34 ^{AB}	5,66 ±0,37 ^A	5,36 ±0,14 ^A
<i>Lb. plantarum</i> MF239	5,17 ±0,56 ^{ABC}	6,53 ±0,01 ^B	6,95 ±0,13 ^B
<i>Lb. plantarum</i> MF376	4,91 ±0,05 ^A	5,30 ±0,19 ^{AC}	5,23 ±0,11 ^A
<i>Lb. plantarum</i> MF556	4,74 ±0,54 ^A	5,05 ±0,12 ^C	4,99 ±0,36 ^A
<i>P. ethanolidurans</i> MF229	5,66 ±0,35 ^{BC}	5,27 ±0,27 ^{AC}	5,92 ±0,13 ^C
<i>P. ethanolidurans</i> MF50	5,77 ±0,21 ^C	5,77 ±0,64 ^{AC}	6,05 ±0,16 ^C

*Aa Üst indisler sütunlar (büyük harf) arasındaki istatistiksel farklılıkları belirtmektedir.

UV mutasyon için çalışmaya alınan *Lb. brevis* MF105, *Lb. plantarum* MF239, *Lb. plantarum* MF376, *Lb. plantarum* MF556, *P. ethanolidurans* MF229 ve *P. ethanolidurans* MF50 suşları için ortak UV uygulama sürelerinden elde edilen logaritmik azalma değerleri suşlar arasındaki kıyaslama için Tablo 4.2’de verilmiştir. Tablo 4.2 incelendiğinde LAB suşları arasındaki 80, 90 ve 100 saniye sürelerde logaritmik azalma değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). UV radyasyonun 80 saniye süre ile gerçekleştirilen uygulamasında en fazla logaritmik azalma *P. ethanolidurans* MF50 suşunda $5,77 \pm 0,21$ log kob/mL olarak hesap edilmiş ve bu değer *P. ethanolidurans* MF229 ($5,66 \pm 0,35$) ve *Lb. plantarum* MF239 ($5,17 \pm 0,56$) suşlarında hesaplanan değer ile benzer bulunmuştur ($p > 0,05$). *Lb. plantarum* MF556 suşunda ise logaritmik azalma en az düzeyde $4,74 \pm 0,54$ log kob/mL olarak hesaplanmıştır. Tüm suşlar için ortak kullanılan en yüksek UV radyasyon süresi olan 100 saniyede ise en yüksek logaritmik azalma değeri *Lb. plantarum* MF239 suşunda ($6,95 \pm 0,13$) hesaplanmıştır ($p < 0,05$). Diğer taraftan *P. ethanolidurans* MF229 ve *P. ethanolidurans* MF50 suşlarında birbiri ile benzer logaritmik azalma değerleri ($5,92 \pm 0,13$ ve $6,05 \pm 0,16$) hesaplanmıştır ($p > 0,05$). UV radyasyon karşısında ön denemelerde canlılığını en iyi koruduğu bilinen *Lb. plantarum* MF556 suşu en düşük logaritmik azalmayı ($4,99 \pm 0,36$) göstermiş ve azalma değeri MF376, MF105 suşları ile benzer bulunmuştur ($p > 0,05$).



Şekil 4.7. Kesikli UV radyasyon uygulamasının LAB suşlarının hücre canlılık düzeyleri üzerine etkisi (log kob/mL)

UV radyasyonun mutasyon etkinliğinin artırılması amacı ile 40 saniye aralıklarla 4 defa LAB suşları kesikli olarak radyasyona maruz bırakılması ile elde edilen hücre canlı sayıları ve logaritmik azalma değerleri Şekil 4.7’de verilmiştir. Kesikli olarak toplamda 160 saniye süresince uygulanan UV radyasyon sonucunda LAB suşlarının başlangıç hücre sayılarında anlamlı bir azalma meydana gelerek tüm suşlar için canlı sayıları 2,05-3,54 log kob/mL aralığında değişmiştir. Suşlara ait logaritmik azalma değerleri incelenecek olursa *Lb. plantarum* MF376 suşunda en yüksek ($6,40 \pm 0,26$ log kob/mL) azalma meydana gelirken, *P. ethanolidurans* MF50 ($6,32 \pm 0,28$ log kob/mL) ve *Lb. brevis* MF105 ($6,06 \pm 0,36$ log kob/mL) suşlarından hesaplanan değerler ile benzer bulunmuştur ($p > 0,05$). Kesikli UV uygulamasında sürekli UV uygulamasında olduğu gibi en düşük logaritmik azalma değeri

Lb. plantarum MF556 suşunda $5,24 \pm 0,15$ log kob/mL olarak hesaplanmış ve bu değeri MF229 ve MF239 suşlarından hesaplanan değerler takip etmiştir ($p < 0,05$). Kesikli UV uygulaması sürenin daha uzun olması sebebi ile özellikle MF376, MF50 ve MF105 suşlarında sürekli UV uygulamasına kıyasla canlı hücre sayılarında daha fazla bir azalma meydana getirirken, toplam sürenin fazlalığı dikkate alındığında canlılıklarını daha iyi korudukları gözlemlenmiştir.

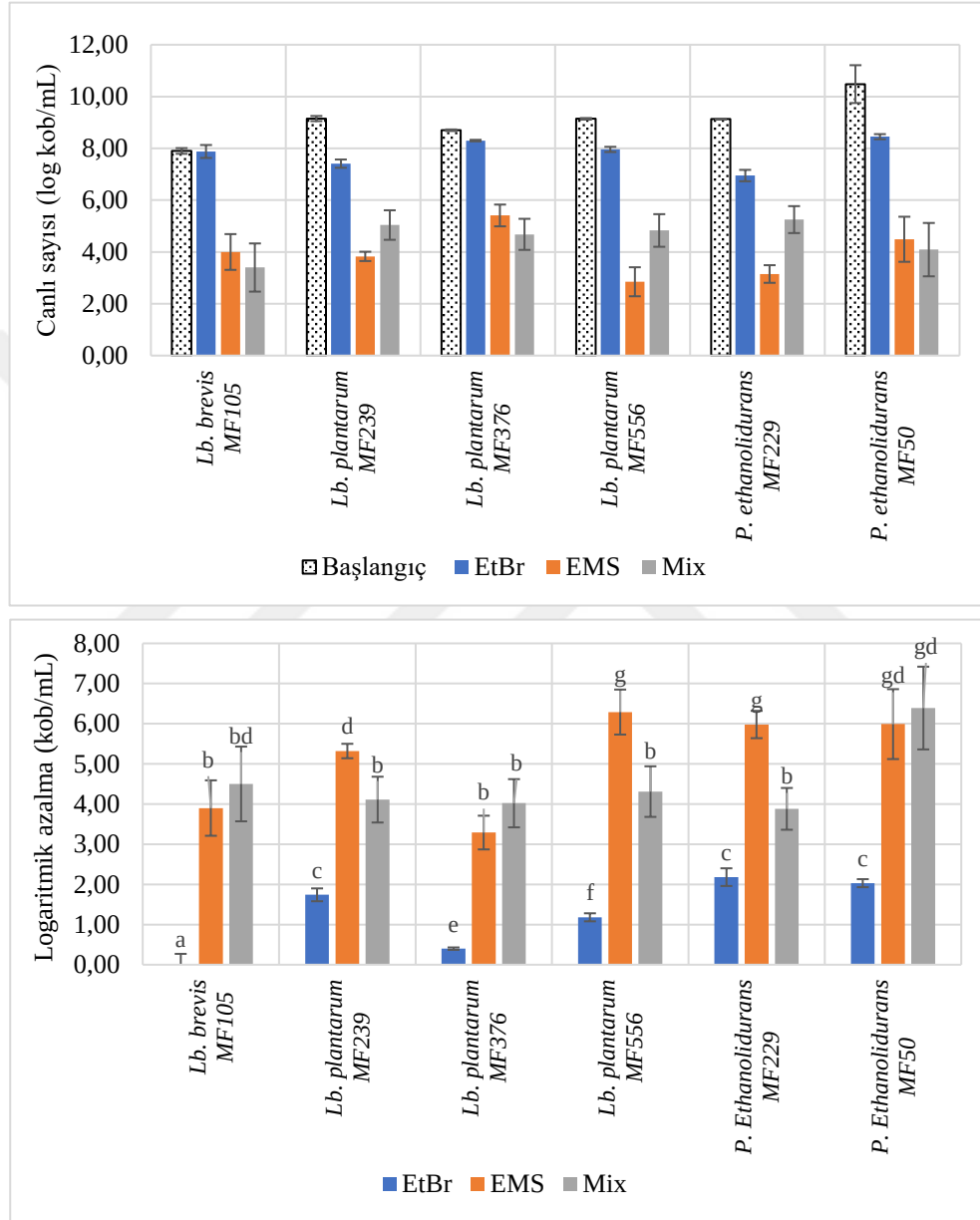
Adebayo-Tayo ve İshola (2018), *Lactobacillus delbrueckii* suşunun başlangıç miktarı 1882 kob/mL iken 120 saniye UV radyasyona maruz kalması sonucunda hücre sayısının 19 kob/mL'ye düştüğü, yaklaşık %1'lik canlılık oranı olduğunu bulmuşlardır. Sobrun ve ark. (2012) Laktik Asit Bakterilerinde maruz kalma süresi arttıkça organizmaların hayatta kalma oranında azalma olduğunu gözlemlemişlerdir. Goodarzi (2016), LAB türleri *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. lactis* ve *E. coli* suşlarını UV radyasyona (5 sn, 10 sn, 20 sn ve 40 sn) maruz bırakmıştır. Hayatta kalma eğrilerinin artan UV maruziyeti ile sabit bir azalma gösterdiğini ortaya koymuştur. Laktik asit bakterilerinin UV radyasyona *E. coli*'den 1-2 log daha dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Li ve ark. (2015), *Oenococcus oeni* suşunda UV radyasyon süresi 90 saniye iken öldürücülük oranının %80 ile %90 arasında olduğunu bulmuşlardır. Abosereh ve ark., (2006), probiyotik *Saccharomyces boulardii* suşunda hayatta kalma yüzdelerinin, UV radyasyon dozlarının artırılmasıyla azalırken, 5 KGy maruz kalma dozunda hayatta kalma yüzdesini düşük (%2,67) elde etmişlerdir. Pang ve ark., (2016), *E. coli* suşuna 5 ila 20 mJ.cm⁻² arasında UV doz uygulamışlar ve yaklaşık 2,0 log'luk bir inaktivasyon oranı elde etmişlerdir. En yüksek inaktivasyon oranı 40 mJ. cm⁻²'lik dozda 5.5 log olarak bulmuşlardır.

4.2. Etidyum Bromür (EtBr) ve Etil Metan Sülfonat (EMS) Mutajenlerinin LAB Suşlarının Canlılık Düzeylerine Etkisi

Kimyasal mutajenler, mutasyon sıklığını artırdıkları ve uygulama kolaylığı sebebi ile yüksek talep görmektedir (Sikora ve ark., 2011; Serrat ve ark., 2014). Etidyum bromür (EtBr) (2,7-diamino-9-fenilfenantridyum-1-etil bromür) çeşitli biyolojik amaçlar için kullanılır. Nükleik asit biyosentezinin bir inhibitörüdür (Tomchick ve Mandel, 1964) ve bakteri hücrelerinde mutajen olarak işlev görür (Maillet, 1969). EtBr in vitro olarak nükleik asitlere bağlanır ve nükleotid insersiyonlarına ve çerçeve kaymalarına yol açan yaygın olarak kullanılan bir interkalasyon ajanıdır (Waring, 1966). Ek olarak, EtBr hücre zarlarına bağlanarak floresan

artışı sağlar (Gitler ve ark., 1969). Düşük konsantrasyonlarda EtBr mtDNA sentezini önemli ölçüde inhibe eden bir mutajen olarak bilinmektedir (Yu ve ark., 2007; Sobrun ve ark., 2012).



Şekil 4.8. Kimyasal mutajenler Etidyum Bromür (EtBr), Etil Metan Sülfonat (EMS) ve EtBr/EMS karışımlarının (Mix) LAB suşlarının hücre canlılık düzeyleri üzerine etkisi

Probiyotik özelliklerin geliştirilmesi amacı ile *Lb. brevis* MF105, *Lb. plantarum* MF239, *Lb. plantarum* MF376, *Lb. plantarum* MF556, *P. ethanolidurans* MF229 ve *P. ethanolidurans* MF50 LAB suşları çalışma kapsamında EtBr, EMS ve EtBr/EMS karışımları (Mix) ile 6 saat süre ile inkübe edilerek kimyasal mutasyon uygulaması gerçekleştirilmiştir. Kimyasal mutajenlerin uygulama süresinin ve dozunun belirlenmesinde, ön denemelerde elde edilen gözlemler ışığında hücre canlılığının belirli oranda korunduğu en uygun süre (6 saat) ve kimyasal doz (1 mg/mL) seçilmiştir. Şekil 4.8’de kimyasal mutajen olarak kullanılan EtBr, EMS ve EtBr/EMS karışımlarının LAB suşlarının hücre canlılık düzeyleri ve logaritmik azalma değerleri gösterilmiştir. Şekil 4.8 incelendiğinde *Lb. Brevis* MF105 suşunun EtBr ile gerçekleştirilen kimyasal mutasyon denemelerinde hücre canlılığının başlangıç hücre sayısına ($7,90 \pm 0,11$) oranla aynı kaldığı ($7,88 \pm 0,25$) ve anlamlı bir logaritmik azalmanın sağlanmadığı belirlenmiştir ($p > 0,05$). *Lb. Brevis* MF105 suşunda EMS ve Mix ile yapılan denemelerde en yüksek logaritmik azalma değerleri elde edilmiş olup sırası ile $3,90 \pm 0,69$ log ve $4,50 \pm 0,93$ log olarak benzer gerçekleşmiştir ($p > 0,05$). *Lb. Plantarum* MF239 suşunun kimyasal mutajenlere karşı hücre canlılık düzeyleri incelenecek olursa en fazla logaritmik azalma ($5,32 \pm 0,18$ log kob/mL) EMS ile elde edilirken bunu Mix ve EtBr denemeleri sırası ile $4,11 \pm 0,57$ ve $1,74 \pm 0,16$ olarak takip etmiştir ($p < 0,05$). *Lb. Plantarum* MF376 suşunun başlangıç canlı hücre sayısı ($8,70$ log kob/mL) EtBr uygulaması sonra ufak bir düşüş ile $8,30$ log kob/mL olarak ölçülmüş ve logaritmik azalma değeri ise $0,40$ log kob/mL olarak hesap edilmiştir. Bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı olmakla birlikte uygulamada öneme sahip değildir ($p < 0,05$). MF376 suşunun EMS ve Mix ile gerçekleştirilen mutasyon denemelerinde ise anlamlı bir düşüş sağlanmış ve sırası ile $3,29$ ve $4,02$ log kob/mL logaritmik azalma gerçekleşmiştir. EMS ve Mix denemelerinde elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak benzer bulunmuştur. *Lb. Plantarum* MF556 suşunda kimyasal mutasyonlar ile EtBr, EMS ve Mix denemelerinden elde edilen logaritmik azalma değerleri sırası ile $1,18$, $6,29$ ve $4,31$ log kob/mL olarak bulunmuş ve en yüksek azalma EMS ile sağlanmıştır ($p < 0,05$). *P. Ethanolidurans* MF229 ve *P. Ethanolidurans* MF50 suşlarında EtBr ve EMS uygulamalarında elde edilen logaritmik azalmalar benzer ($p > 0,05$) bulunmuş olup sırası ile EtBr için $2,18$ ve $2,03$ log kob/mL, EMS için $5,98$ ve $5,99$ log kob/mL olarak hesap edilmiştir. Her iki *Pediococcus* suşu için Mix denemelerinde sağlanan azalma değerleri ise $3,88$ ve $6,39$ log kob/mL olarak farklı bulunmuştur. MF50 suşunun Mix ve EMS mutasyonlarında bulunan değerler istatistiksel olarak benzerdir.

LAB suşlarında EtBr, EMS ve Mix ile gerçekleştirilen mutasyonlarda hücrelerin canlılık düzeylerine etkileri ve sağladıkları logaritmik azalma değerleri kıyaslandığında tüm suşlarda EtBr uygulamasının hücre canlılığında meydana getirdiği azalmanın diğer kimyasallara kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). *P. Ethanolidurans* MF229, MF50 suşlarında EtBr'in öldürücü etkisi diğer suşlara kıyasla en yüksek düzeyde bulunmuş ve bu durum *Pediococcus* cinsinin daha az dayanıklı olması ile ilişkilendirilmiştir. Özellikle *Lb. Brevis* MF105 suşunda ise EtBr'in canlılık üzerine etkisiz olduğu görülmektedir. Tüm suşlarda EMS'nin logaritmik bir azalma sağladığı ve azalma değerlerinin 6,29-3,29 log kob/mL arasında değiştiği belirlenmiştir. EMS ile sağlanan en yüksek logaritmik azalma MF556, MF229 ve MF50 suşlarında benzer olarak hesaplanmıştır. Mix ile gerçekleştirilen denemelerde EMS'de olduğu gibi yüksek logaritmik azalma değerleri elde edilmiş ve özellikle *P. Ethanolidurans* MF50 suşunda en yüksek azalma değeri (6,39 log kob/mL) bulunmuştur. Diğer suşlarda Mix ile ulaşılan azalma değerleri ise birbirleri ile benzer olarak 3,88-4,50 log kob/mL aralığında hesaplanmıştır.

Sobrun ve ark. (2012), Laktik Asit Bakterilerinde 0,75 mg/mL Et-Br ile 30 dk maruz kalma süresinde canlılık oranını %5 olarak bulmuşlardır. Agraval ve ark. (2012), *B. Subtilis* suşunda EMS mutagenesi için %50 oranında öldürücü doz (LD_{50}) olarak 0,03 mL EMS ile 25 dk maruziyetin olduğunu bulmuşlardır. Ziadi (2017), *Saccharomyces boulardii*'nin suşunu farklı konsantrasyonlarda Etidyum bromüre maruz bırakmış, (LD_{90}) 15 µg/mL olduğunu ve artan konsantrasyonla birlikte hayatta kalma oranlarının önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. %100 öldürme etkisine 20µg/mL dozunda ulaşmıştır.

4.3. Mutant Suşların Ön Seçimi

4.3.1 pH dayanım ön seçimi

Probiyotik özelliklerin geliştirilmesi için kimyasal (EtBr, EMS, Mix) ve fiziksel mutajenlere (UV ışık) maruz bırakılarak ve canlı kalan laktik suşların hedeflenen probiyotik özellikler açısından mutasyonlara uğradıklarının belirlenmesi için hızlı yöntemler ile ön seçilim işlemleri yapılmıştır. Bu amaçla ilk olarak asit dayanım yetenekleri zayıf olan ve mutasyon yolu ile iyileştirilmesi planlanan *Lb. Brevis* MF105 ve *Lb. Plantarum* MF239 suşlarının pH dayanımında meydana gelen değişikliği belirlemek üzere, kimyasal ve UV mutasyon işlemine maruz bırakılan suşların farklı tip veya görünüşe sahip olan kolonilerinden öze ile

alınır, MRS sıvı besiyerinde (pH 2.5) 30°C’de 24 saat inkübasyona bırakılarak optik yoğunluktaki (OD₆₀₀) değişimler takip edilmiş ve mutasyon işlemine maruz bırakılmamış kontrol örneği ile aktivite değişimleri kıyaslanmıştır. Mutasyon işlemine maruz bırakılmamış kontrol örneğine göre düşük pH dayanım özelliğinde artış gösteren suşlar probiyotik özellikleri belirlenmek üzere seçilmiştir.

Tablo 4.3’de *Lb. Brevis* MF105 suşunun UV, EtBr, EMS ve EtBr/EMS karışım (Mix) mutasyon uygulamalarından elde edilen suşlarının düşük pH’da (pH 2.5) 24 saatlik inkübasyonu ile gelişimleri optik olarak (OD₆₀₀) belirlenmiştir. Ana suş ile aralarındaki gelişmenin artış oranı hesaplanmıştır.

Tablo 4.3. *Lb. Brevis* MF105 suşundan UV ve Kimyasal mutasyon uygulamaları ile elde edilen suşların düşük pH’da hücre gelişim artış oranları

UV Mutasyon				Kimyasal Mutasyon			
Mutant Kodu	Artış Oranı*	Mutant Kodu	Artış Oranı*	Mutant Kodu	Artış Oranı*	Mutant Kodu	Artış Oranı*
UV1	1,15	UV21	0,98	EMS1	1,07	Mix1	1,18
UV2	1,05	UV22	0,98	EMS2	1,02	Mix2	1,10
UV3	1,04	UV23	0,98	EtBr1	1,04	Mix3	1,19
UV4	1,03	UV24	0,98	EtBr2	1,01	Mix4	1,16
UV5	1,03	UV25	0,98	EtBr3	0,98	Mix5	1,10
UV6	1,02	UV26	0,98	EtBr4	0,97	Mix6	1,08
UV7	1,01	UV27	0,98	EtBr5	0,95	Mix7	1,03
UV8	1,01	UV28	0,98	EtBr6	0,94	Mix8	1,03
UV9	1,00	UV29	0,98	EtBr7	0,92	Mix9	0,99
UV10	1,00	UV30	0,98	EtBr8	0,92	Mix10	0,98
UV11	1,00	UV31	0,97	EtBr9	0,92	Mix11	0,97
UV12	1,00	UV32	0,97	EtBr10	0,92	Mix12	0,90
UV13	0,99	UV33	0,97	EtBr11	0,91	Mix13	0,88
UV14	0,99	UV34	0,97	EtBr12	0,90	Mix14	0,87
UV15	0,99	UV35	0,97	EtBr13	0,89	Mix15	0,86
UV16	0,99	UV36	0,96	EtBr14	0,89	Mix16	0,86
UV17	0,99	UV37	0,96	EtBr15	0,88	Mix17	0,85
UV18	0,99	UV38	0,96	EtBr16	0,88	Mix18	0,83
UV19	0,99	UV39	0,95	EtBr17	0,86	Mix19	0,83
UV20	0,99	UV40	0,87	EtBr18	0,82	Mix20	0,82
						Mix21	0,74

*Mutant suşların OD₆₀₀ nm’de ölçülen değerleri ana suştan elde edilen okuma değerlerine oranlanarak OD₆₀₀ değerlerindeki artış miktarları verilmiştir.

Tablo 4.3 incelendiğinde *Lb. Brevis* MF105 suşundan UV mutasyonundan 40 suş, EMS mutasyonundan 2 suş, EtBr mutasyonundan 18 suş ve Mix mutasyonundan toplamda 21 suş izole edilmiş olup 81 suşun tamamında düşük pH'da hücre gelişiminde anlamlı bir artış sağlanmadığı bulunmuştur. Bu sebeple MF105 suşunda düşük pH gelişiminde artış gösteren mutant suş seçilimi yapılamamıştır. Özellikle Mix ile gerçekleştirilen mutasyonlardan elde edilen suşların bazılarında (MF105 Mix21) Ana suşa kıyasla düşük pH hücre gelişimlerinin daha da zayıfladığı gözlemlenmiştir. EMS mutasyonlarında ise çok düşük bir düzeyde gelişim artışı kaydedilirken bu artışlar anlamlı olmamıştır.

Lb. Plantarum MF239 suşunun UV, EtBr, EMS ve EtBr/EMS karışım (Mix) mutasyon uygulamalarından elde edilen suşlarının düşük pH'da (pH2.5) 24 saatlik inkübasyonu ile gelişimleri optik olarak (OD600) belirlenmiştir. Ana suş ile aralarındaki hücre gelişiminin artış oranı hesaplanmış ve Tablo 4.4'de verilmiştir. Tablo 4.4 incelendiğinde *Lb. Plantarum* MF239 kültürü ile UV mutasyonda 169 suş, kesikli UV (KUV) mutasyonda 15 suş, EMS mutasyonda 28 suş, EtBr mutasyonda 10 suş ve Mix mutasyonda ise 23 suş izole edilmiş olup toplamda 245 suş izole edilerek düşük pH gelişim oranları değerlendirilmiştir. Mutant suşların ön seçiminde hücresel gelişim (OD600) artış oranı 2 ve üzerinde olan suşlar belirlenerek bir sonraki aşama için depolanmışlardır. *Lb. Plantarum* MF239 mutant suş olarak UV uygulamasından 7 suş seçilmiş olup hücresel gelişim artış oranları 2,57-2,09 aralığında bulunmuştur. Kesikli UV uygulanan grupta ise MF239 KUV1, MF239 KUV2, MF239 KUV3 suşları seçilmiş ve sırası ile 2,42, 2,35, 2,28 artış oranları elde edilmiştir. Kimyasal mutasyon uygulamalarından EMS ve Mix ile hücresel gelişmede artış elde edilmiş olup EtBr ile herhangi bir artış sağlanamamıştır. Bu sebeple EMS uygulanan suşlardan MF239 EMS1 ve MF239 EMS2 (2 suş) suşları seçilmiştir. Mix uygulanan suşlarda ise diğer uygulamalara kıyasla daha yüksek bir gelişme artışı sağlanmış olup artış oranları 4,11-2,64 aralığında bulunmuştur. Mix uygulanan gruptan 4 suş seçilmiştir.

Tablo 4.4. *Lb. Plantarum* MF239 suşunda UV ve Kimyasal mutasyon uygulamaları ile elde edilen suşların düşük pH’da hücre gelişim artış oranları

UV Mutasyon								Kimyasal Mutasyon			
Mutant Kodu	Artış Oranı	Mutant Kodu	Artış Oranı	Mutant Kodu	Artış Oranı	Mutant Kodu	Artış Oranı*	Mutant Kodu	Artış Oranı	Mutant Kodu	Artış Oranı*
UV1	2,57**	UV51	1,25	UV101	1,04	UV150	0,81	EMS1	2,63**	Mix1	4,11**
UV2	2,57**	UV52	1,24	UV102	1,04	UV151	0,81	EMS2	2,29**	Mix2	4,03**
UV3	2,53**	UV53	1,23	UV103	1,04	UV152	0,80	EMS3	1,28	Mix3	3,63**
UV4	2,50**	UV54	1,22	UV104	1,03	UV153	0,80	EMS4	1,26	Mix4	2,64**
UV5	2,37**	UV55	1,21	UV105	1,02	UV154	0,79	EMS5	1,20	Mix5	1,88
UV6	2,10**	UV56	1,20	UV106	1,02	UV155	0,78	EMS6	1,19	Mix6	1,82
UV7	2,09**	UV57	1,18	UV107	1,00	UV156	0,69	EMS7	1,19	Mix7	1,81
UV8	1,99	UV58	1,18	UV108	1,00	UV157	0,69	EMS8	1,16	Mix8	1,39
UV9	1,97	UV59	1,18	UV109	1,00	UV158	0,64	EMS9	1,15	Mix9	1,18
UV10	1,87	UV60	1,17	UV110	1,00	UV159	0,60	EMS10	1,15	Mix10	1,09
UV11	1,84	UV61	1,17	UV111	0,98	UV160	0,56	EMS11	1,12	Mix11	1,09
UV12	1,73	UV62	1,17	UV112	0,98	UV161	0,54	EMS12	1,11	Mix12	1,06
UV13	1,69	UV63	1,17	UV113	0,98	UV162	0,51	EMS13	1,08	Mix13	1,03
UV14	1,67	UV64	1,16	UV114	0,98	UV163	0,43	EMS14	1,08	Mix14	0,99
UV15	1,67	UV65	1,16	UV115	0,97	UV164	0,40	EMS15	1,08	Mix15	0,97
UV16	1,63	UV66	1,16	UV116	0,97	UV165	0,38	EMS16	1,00	Mix16	0,95
UV17	1,60	UV67	1,16	UV117	0,97	UV166	0,38	EMS17	0,98	Mix17	0,91
UV18	1,60	UV68	1,16	UV118	0,97	UV167	0,31	EMS18	0,98	Mix18	0,86
UV19	1,60	UV69	1,16	UV119	0,97	UV168	0,27	EMS19	0,95	Mix19	0,86
UV20	1,57	UV70	1,15	UV120	0,96	UV169	0,20	EMS20	0,95	Mix20	0,82
UV21	1,57	UV71	1,15	UV121	0,96			EMS21	0,94	Mix21	0,82
UV22	1,57	UV72	1,15	UV122	0,95	KUV1	2,42**	EMS22	0,93	Mix22	0,73
UV23	1,54	UV73	1,15	UV123	0,95	KUV2	2,35**	EMS23	0,92	Mix23	0,64
UV24	1,53	UV74	1,14	UV124	0,95	KUV3	2,28**	EMS24	0,92		
UV25	1,52	UV75	1,14	UV125	0,95	KUV4	1,24	EMS25	0,92		
UV26	1,51	UV76	1,14	UV126	0,93	KUV5	1,22	EMS26	0,88		
UV27	1,48	UV77	1,13	UV127	0,92	KUV6	1,22	EMS27	0,85		
UV28	1,47	UV78	1,13	UV128	0,91	KUV7	1,21	EMS28	0,83		
UV29	1,46	UV79	1,12	UV129	0,91	KUV8	1,19				
UV30	1,43	UV80	1,12	UV130	0,90	KUV9	1,13	EtBr1	1,32		
UV31	1,43	UV81	1,11	UV131	0,90	KUV10	1,05	EtBr2	1,12		
UV32	1,43	UV82	1,11	UV132	0,90	KUV11	1,01	EtBr3	1,11		
UV33	1,43	UV83	1,11	UV133	0,89	KUV12	0,99	EtBr4	1,03		
UV34	1,42	UV84	1,11	UV134	0,89	KUV13	0,99	EtBr5	0,96		
UV35	1,41	UV85	1,10	UV135	0,89	KUV14	0,94	EtBr6	0,93		
UV36	1,40	UV86	1,10	UV136	0,88	KUV15	0,89	EtBr7	0,91		
UV37	1,37	UV87	1,10	UV137	0,87			EtBr8	0,91		
UV38	1,37	UV88	1,10	UV138	0,87			EtBr9	0,87		
UV39	1,37	UV89	1,10	UV139	0,86			EtBr10	0,85		
UV40	1,35	UV90	1,09	UV140	0,85						
UV41	1,34	UV91	1,08	UV141	0,85						
UV42	1,33	UV92	1,08	UV142	0,85						
UV43	1,33	UV93	1,08	UV143	0,85						
UV44	1,31	UV94	1,07	UV144	0,85						
UV45	1,30	UV95	1,07	UV145	0,84						
UV46	1,28	UV96	1,07	UV146	0,83						
UV47	1,27	UV97	1,06	UV147	0,83						
UV48	1,27	UV98	1,05	UV148	0,81						
UV49	1,26	UV99	1,05	UV149	0,81						
UV50	1,25	UV100	1,05								

*Mutant suşların OD₆₀₀ nm’de ölçülen değerleri ana suştan elde edilen okuma değerlerine oranlanarak OD₆₀₀ değerlerindeki artış miktarları verilmiştir.

**Mutant olarak ön seçilimi yapılan suşlar

4.3.2. Safra tuzu dayanım ön seçimi

Kimyasal (EtBr, EMS, Mix) ve fiziksel mutajenler (UV) ile muamele edilen ve canlı kalan *Lb. plantarum* MF376 ve *Lb. plantarum* MF556 suşlarının hedeflenen probiyotik özellikler açısından mutasyonlara uğradıklarının belirlenmesi için hızlı yöntemler ile ön seçim işlemleri yapılmıştır. Safra tuzu dayanımı geliştirilmesi hedeflenen mutant suşların seçilimi amacıyla mutasyon işlemleri sonucunda kültüre alınan *Lb. plantarum* MF376 ve *Lb. plantarum* MF556 suşları %0,3 safra tuzu (Oxgall) içeren MRS sıvı besiyerinde 30°C’de 24 saat inkübe edilmiş ve gelişimleri optik yoğunluk ile (OD₆₀₀) pH dayanımında olduğu gibi takip edilmiştir. Mutasyon işlemine maruz bırakılmamış kontrol örneğine göre pozitif yönde gelişme gösteren mutant suşlar seçilmiştir.

Tablo 4.5’de *Lb. plantarum* MF376 suşunun UV ve kimyasal mutasyon uygulamalarından izole edilen suşların safra tuzu içeren besiyerinde 24 saatlik inkübasyonu ile gelişimleri optik olarak (OD₆₀₀) belirlenmiş ve hücre artış oranları verilmiştir. Mutasyon uygulanmayan Ana suş ile UV ve kimyasal mutasyon işlemi uygulanan suşlar arasındaki artış oranları hesaplanmıştır. Tablo 4.5 incelendiğinde *Lb. plantarum* MF376 suşunda UV mutasyonundan 77 suş, EMS mutasyonundan 6 suş, EtBr mutasyonundan 19 suş ve Mix mutasyonundan toplamda 25 suş izole edilmiş olup toplamda 127 suş safra tuzu dayanım ön seçim için testlere alınmıştır. UV mutasyon uygulamalarından izole edilen 77 suşun hepsi Ana suşa oranla çok daha düşük bir gelişme göstermiş ve suşların tamamının hücre gelişim oranları 1,0’ın altında oldukça düşük bulunmuştur. Bu durum UV radyasyonun *Lb. plantarum* MF376 suşunda safra tuzu varlığında hücre gelişimini önemli ölçüde düşürücü etkiye sahip olduğunu düşündürmüştür. Diğer taraftan EMS ve EtBr mutasyonlarından izole edilen suşlarda da hücre artış oranı 2,0 ve üzerinde olan suş bulunmamaktadır. Sadece MF376 EtBr1, MF376 EtBr2 ve MF376 EtBr3 (1,89-1,18) suşlarında hücre artış oranı 1,0’ değerinin üzerinde hesaplanmıştır. Ancak bu suşlarda da oran 2,0’ın üzerinde olmamasından dolayı seçimi yapılmamıştır. Mix mutasyon uygulamasından izole edilen MF376 Mix1 ve MF376 Mix2 suşlarında gelişim artış oranları sırasıyla 2,39 ve 2,33 olarak bulunmuş ve bu suşların mutant olarak ön seçimi yapılmıştır.

Tablo 4.5. *Lb. plantarum* MF376 suşunda UV ve Kimyasal mutasyon uygulamaları ile elde edilen suşların safra tuzunda hücre gelişim artış oranları

UV Mutasyon						Kimyasal Mutasyon			
Mutant Kodu	Artış Oranı*	Mutant Kodu	Artış Oranı*	Mutant Kodu	Artış Oranı*	Mutant Kodu	Artış Oranı*	Mutant Kodu	Artış Oranı*
UV1	0,18	UV27	0,07	UV53	0,04	EMS1	0,94	MİX1	2,39**
UV2	0,14	UV28	0,07	UV54	0,04	EMS2	0,51	MİX2	2,33**
UV3	0,13	UV29	0,07	UV55	0,04	EMS3	0,50	MİX3	1,96
UV4	0,12	UV30	0,07	UV56	0,04	EMS4	0,44	MİX4	1,68
UV5	0,12	UV31	0,07	UV57	0,04	EMS5	0,34	MİX5	1,30
UV6	0,12	UV32	0,07	UV58	0,04	EMS6	0,29	MİX6	1,18
UV7	0,11	UV33	0,07	UV59	0,03			MİX7	1,17
UV8	0,11	UV34	0,07	UV60	0,03	EtBr1	1,89	MİX8	0,99
UV9	0,11	UV35	0,07	UV61	0,03	EtBr2	1,33	MİX9	0,92
UV10	0,11	UV36	0,07	UV62	0,03	EtBr3	1,18	MİX10	0,89
UV11	0,10	UV37	0,06	UV63	0,03	EtBr4	1,04	MİX11	0,89
UV12	0,10	UV38	0,06	UV64	0,03	EtBr5	0,99	MİX12	0,84
UV13	0,10	UV39	0,06	UV65	0,03	EtBr6	0,94	MİX13	0,81
UV14	0,10	UV40	0,06	UV66	0,02	EtBr7	0,94	MİX14	0,81
UV15	0,10	UV41	0,06	UV67	0,02	EtBr8	0,94	MİX15	0,79
UV16	0,09	UV42	0,06	UV68	0,02	EtBr9	0,87	MİX16	0,78
UV17	0,09	UV43	0,06	UV69	0,02	EtBr10	0,77	MİX17	0,78
UV18	0,09	UV44	0,06	UV70	0,02	EtBr11	0,67	MİX18	0,76
UV19	0,09	UV45	0,05	UV71	0,02	EtBr12	0,66	MİX19	0,75
UV20	0,09	UV46	0,05	UV72	0,02	EtBr13	0,60	MİX20	0,74
UV21	0,08	UV47	0,05	UV73	0,02	EtBr14	0,58	MİX21	0,73
UV22	0,08	UV48	0,05	UV74	0,01	EtBr15	0,49	MİX22	0,71
UV23	0,08	UV49	0,05	UV75	0,01	EtBr16	0,48	MİX23	0,58
UV24	0,08	UV50	0,04	UV76	0,00	EtBr17	0,46	MİX24	0,52
UV25	0,08	UV51	0,04	UV77	0,00	EtBr18	0,46	MİX25	0,26
UV26	0,08	UV52	0,04			EtBr19	0,27		

*Mutant suşların OD₆₀₀ nm’de ölçülen değerleri ana suştan elde edilen okuma değerlerine oranlanarak OD₆₀₀ değerlerindeki artış miktarları verilmiştir.

**Mutant olarak ön seçilimi yapılan suşlar

Tablo 4.6. *Lb. plantarum* MF556 suşunda UV ve kimyasal mutasyon uygulamaları ile elde edilen suşların safra tuzunda hücre gelişim artış oranları

UV Mutasyon				Kimyasal Mutasyon			
Mutant Kodu	Artış Oranı*	Mutant Kodu	Artış Oranı*	Mutant Kodu	Artış Oranı*	Mutant Kodu	Artış Oranı*
UV1	2,30**	UV17	0,94	EMS1	2,04**	Mix1	2,27**
UV2	1,71	UV18	0,92	EMS2	1,30	Mix2	1,62
UV3	1,46	UV19	0,86	EMS3	1,15	Mix3	1,62
UV4	1,45	UV20	0,86	EMS4	1,07	Mix4	1,52
UV5	1,30	UV21	0,85	EMS5	1,06	Mix5	1,49
UV6	1,29	UV22	0,84	EMS6	0,96	Mix6	1,49
UV7	1,21	UV23	0,80	EMS7	0,84	Mix7	1,40
UV8	1,14	UV24	0,79	EMS8	0,71	Mix8	1,40
UV9	1,10	UV25	0,79			Mix9	1,39
UV10	1,04	UV26	0,78	EtBr1	1,76	Mix10	1,36
UV11	1,01	UV27	0,78	EtBr2	1,65	Mix11	1,30
UV12	1,00	UV28	0,77	EtBr3	1,62	Mix12	1,30
UV13	0,98	UV29	0,77	EtBr4	1,54	Mix13	1,29
UV14	0,97	UV30	0,74	EtBr5	1,41	Mix14	1,28
UV15	0,96	UV31	0,72	EtBr6	1,20	Mix15	1,26
UV16	0,96	UV32	0,50	EtBr7	0,92	Mix16	1,23
				EtBr8	0,90	Mix17	1,22
				EtBr9	0,87	Mix18	1,15
						Mix19	1,11
						Mix20	0,91

*Mutant suşların OD₆₀₀ nm’de ölçülen değerleri ana suştan elde edilen okuma değerlerine oranlanarak OD₆₀₀ değerlerindeki artış miktarları verilmiştir.
**Mutant olarak ön seçilimi yapılan suşlar

Tablo 4.6’da *Lb. plantarum* MF556’nın UV, EtBr, EMS ve Mix mutasyon uygulamaları sonrası izole edilen suşların %0,3 safra tuzu varlığında hücre gelişim artış oranları verilmiştir. Mutasyon uygulamaları sonrasında UV işleminden 32 suş, EMS işleminden 8 suş, EtBr işleminden 9 suş ve Mix işleminden 20 suş olmak üzere toplamda 69 suş izole edilerek safra tuzu gelişim oranları hesap edilmiştir. *Lb. plantarum* MF556 suşu ile yapılan çalışmada izole edilen suşlardan UV mutasyondan MF556 UV1 suşu, EMS mutasyonundan MF556 EMS1 suşu, Mix mutasyonundan MF556 Mix1 suşu mutant olarak ön seçimi gerçekleştirilmiştir. EtBr uygulamasından izole edilen suşlardan herhangi bir suş mutant olarak seçilmemiştir.

4.3.3. Pepsin-pankreatin enzim dayanımı ön seçimi

Kimyasal (EtBr, EMS, Mix) ve UV uygulamaları sonrası izole edilen *P. ethanolidurans* MF229 ve *P. ethanolidurans* MF50 suşlarının pepsin ve pankreatin enzim dayanımları açısından mutasyona uğradıkları belirlenmeye çalışılmıştır. Pepsin (pepsin 3 mg/mL, pH 3,5) ve pankreatin (pankreatin 1 mg/mL, pH 8) enzim dayanımı için MRS sıvı besiyerinde 30°C’de 16 ve 19 saat inkübe edilen kültürlerin gelişimleri optik yoğunluk ile (OD₆₀₀) takip edilmiştir. Mutasyon işlemine maruz bırakılmamış kontrol örneğine göre pozitif yönde farklılık gösteren mutant suşlar seçilmiştir.

Tablo 4.7. *P. ethanolidurans* MF229 suşunda UV ve kimyasal mutasyon uygulamaları ile elde edilen suşların pepsin ve pankreatin varlığında hücre gelişim artış oranları

UV Mutasyon			Kimyasal Mutasyon					
Mutant Kodu	Pepsin Artış*	Pankreatin Artış*	Mutant Kodu	Pepsin Artış*	Pankreatin Artış*	Mutant Kodu	Pepsin Artış*	Pankreatin Artış*
UV1**	0,96	9,99	EMS1**	1,54	8,23	Mix1**	2,18	9,79
UV2**	1,72	9,91	EMS2**	2,50	8,02	Mix2**	0,95	6,57
UV3**	0,85	8,42	EMS3**	1,96	5,25	Mix3**	4,82	4,48
UV4**	1,57	7,83	EMS4**	0,67	3,44	Mix4	0,59	4,30
UV5**	2,85	7,24	EMS5	0,52	1,98	Mix5	1,85	1,91
UV6**	2,91	4,37	EMS6	1,50	1,90	Mix6	1,23	1,88
UV7	1,32	1,76	EMS7	1,11	1,88	Mix7	0,76	1,83
UV8	1,87	1,51	EMS8	0,72	1,73	Mix8	1,72	1,82
UV9	0,88	1,46	EMS9	1,06	1,70	Mix9	1,30	1,78
UV10	1,46	1,35	EMS10	0,69	1,62	Mix10	1,05	1,70
UV11	1,96	1,21	EMS11	1,98	1,42	Mix11	1,02	1,58
KUV1**	1,85	8,91	EMS12	1,03	1,13	Mix12	1,51	1,19
			EMS13	0,86	1,08	Mix13	0,69	1,12
			EMS14	0,94	0,92	Mix14	1,40	1,03
			EMS15	0,55	0,07	Mix15	0,92	1,02
			EtBr1**	1,98	7,54			
			EtBr2**	2,66	7,50			
			EtBr3	1,31	1,65			
			EtBr4	1,52	1,44			
			EtBr5	1,48	1,34			
			EtBr6	1,20	1,05			

*Mutant suşların OD₆₀₀ nm’de ölçülen değerleri ana suştan elde edilen okuma değerlerine oranlanarak OD₆₀₀ değerlerindeki artış miktarları verilmiştir.

**Mutant olarak ön seçilimi yapılan suşlar

Tablo 4.7’de *P. ethanolidurans* MF229 suşunun UV ve kimyasal mutasyon uygulamalarından izole edilen suşlarının pepsin ve pankreatin içeren besiyerinde 24 saatlik inkübasyonu ile gelişimleri optik olarak (OD₆₀₀) belirlenmiş ve hücre artış oranları verilmiştir. Mutasyon uygulanmayan Ana suş ile UV ve kimyasal mutasyon işlemi uygulanan suşlar arasındaki artış oranları hesaplanmıştır. Tablo 4.7 incelendiğinde *P. ethanolidurans* MF229 suşunda UV uygulamasından 11 suş, kesikli UV uygulamasından 1 suş, EMS uygulamasından 15 suş, EtBr uygulamasından 6 suş ve Mix uygulamasından 15 suş izole edilerek toplamda 48 suş pepsin ve pankreatin enzim varlığında gelişim için teste tabii tutulmuştur. Hızlı gelişim belirleme testlerinde *P. ethanolidurans* MF229 suşunda UV mutasyon uygulamalarından elde edilen izolatların 6 adedi 2,0 ve üzerinde gelişim artış oranı gösterdikleri için seçilmiştir. Ayrıca kesikli UV uygulamasından izole edilen 1 suş da seçilmiştir. UV uygulamasından izole edilen ve seçilen MF229 UV1, MF UV2, MF UV3, MF UV4 mutant suşları sadece pankreatin enziminde gelişim artışı gösterirken, MF226 UV5 ve MF226 UV6 suşları hem pepsin hem de pankreatin enziminde gelişim artışı göstermişlerdir. EMS, EtBr ve Mix uygulamalarından izole edilen suşlardan ise sırası ile 4, 2 ve 3 suş seçilmiştir. Tüm uygulamalarda seçilen mutant suşlarda özellikle pankreatin enzim ortamında gelişimin Ana suşa kıyasla oldukça yüksek bir artış sağladığı belirlenmiştir. Tüm gruplarda pankreatin enziminde artış oranı 9,90-3,44 aralığında oldukça yüksek değerlerde hesap edilmiştir. Bu durum pankreatin enzim dayanımında mutant suşların oldukça iyi bir artış sağlayabileceğini düşündürmüştür.

Tablo 4.8. *P. ethanolidurans* MF50 suşunda UV ve kimyasal mutasyon uygulamaları ile elde edilen suşların pepsin ve pankreatin varlığında hücre gelişim artış oranları

UV Mutasyon			Kimyasal Mutasyon					
Mutant Kodu	Pepsin Artış*	Pankreatin Artış*	Mutant Kodu	Pepsin Artış*	Pankreatin Artış*	Mutant Kodu	Pepsin Artış*	Pankreatin Artış*
UV1**	2,27	0,48	EMS1	2,17	1,47	Mix1**	1,24	6,41
UV2	1,99	0,77	EMS2	0,68	1,10	Mix2**	2,66	6,38
UV3	1,96	0,56	EMS3	0,60	1,03	Mix3**	1,46	6,31
UV4	1,96	0,62	EMS4	1,10	1,01	Mix4**	1,80	6,07
UV5	1,96	0,45	EMS5	1,11	0,96	Mix5	1,58	1,18
UV6	1,95	0,03	EMS6	0,96	0,96	Mix6	1,15	0,53
UV7	1,94	0,52				Mix7	1,52	0,48
UV8	1,94	0,47	EtBr1**	2,34	1,53	Mix8	1,19	0,35
UV9	1,94	0,46	EtBr2	0,63	1,47	Mix9	0,97	0,31
UV10	1,90	0,72	EtBr3	1,26	1,21	Mix10	0,70	0,24
UV11	1,90	0,64	EtBr4	0,95	1,19	Mix11	1,50	0,24
UV12	1,86	0,82	EtBr5	1,18	1,18	Mix12	0,86	0,22
UV13	1,82	0,53	EtBr6	0,85	1,15	Mix13	1,06	0,22
UV14	1,33	0,67	EtBr7	0,68	1,14	Mix14	1,08	0,19
UV15	1,30	0,69	EtBr8	1,14	0,25	Mix15	1,17	0,16
UV16	1,26	0,57	EtBr9	1,15	0,17	Mix16	1,05	0,11
UV17	1,23	0,64	EtBr10	1,05	0,17			
UV18	1,21	0,67	EtBr11	1,07	0,10			
UV19	1,21	0,57	EtBr12	0,99	0,01			
UV20	1,19	0,66	EtBr13	0,98	0,01			
UV21	1,19	0,48	EtBr14	1,06	0,00			
UV22	1,16	0,71						
UV23	1,14	0,70						
UV24	1,14	0,64						
UV25	1,12	0,58						
UV26	1,12	0,50						
UV27	1,11	0,68						
UV28	1,09	0,57						
UV29	1,07	0,74						
UV30	1,06	0,57						
UV31	1,06	0,48						
UV32	1,05	0,55						
UV33	1,05	0,52						
UV34	1,03	0,68						
UV35	1,01	0,83						
UV36	1,01	0,53						
UV37	1,01	0,54						
UV38	1,01	0,45						
UV39	1,00	0,56						

*Mutant suşların OD600 nm’de ölçülen değerleri ana suştan elde edilen okuma değerlerine oranlanarak OD600 değerlerindeki artış miktarları verilmiştir.

**Mutant olarak ön seçilimi yapılan suşlar

Tablo 4.8’de *P. ethanolidurans* MF50 suşunda UV ve Kimyasal mutasyon uygulamaları ile elde edilen suşların pepsin ve pankreatin varlığında hücre gelişim artış oranları verilmiştir.

Tablo 4.8 incelendiğinde UV uygulamasından izole edilen 39 suştan 1 tanesi, EMS uygulamasından izole edilen 6 suştan 1 tanesi, EtBr uygulamasından izole edilen 14 suştan 1 tanesi ve Mix uygulamasından izole edilen 16 suştan 4 tanesinin mutant suş olarak seçildiği görülmektedir. Özellikle Mix mutasyon uygulamasından seçilen mutant suşların pankreatin enzim varlığında daha yüksek gelişim artışı (6,41-6,07) gösterdikleri belirlenmiştir.

Probiyotik özelliklerden başlıca düşük pH dayanımı, safra tuzu dayanımı ve gastrik enzim (pepsin, pankreatin) dayanımı gibi temel probiyotik kriterler baz alınarak mutasyon uygulamaları yolu ile geliştirilmeye çalışılan suşların bu özelliklerinde değişimleri belirlenerek ön seçim işlemleri yapılmıştır. Bu aşamada kullanılan LAB kültürlerinden UV, kesikli UV, EMS, EtBr ve Mix mutasyonlar yolu ile izole edilen ve kriterleri karşılayarak ön seçimleri gerçekleştirilen mutant suşların özet listesi ve sayıları Tablo 4.9’da verilmiştir.

Tablo 4.9. Mutasyon uygulamaları sonrası izole edilen ve mutant olarak seçilen LAB suşlarının adet sayıları

LAB Suşları		Mutasyon Uygulaması					
		UV	KUV	EMS	EtBr	Mix	Toplam
<i>Lb. brevis</i> MF105	İzole	40	0	2	18	21	81
	Seçilen	0	0	0	0	0	0
	% Mutant	0	0	0	0	0	0
<i>Lb. plantarum</i> MF239	İzole	169	15	28	10	23	245
	Seçilen	7	3	2	0	4	16
	% Mutant	4	20	7	0	17	7
<i>Lb. plantarum</i> MF376	İzole	77	0	6	19	25	127
	Seçilen	0	0	0	0	2	2
	% Mutant	0	0	0	0	8	2
<i>Lb. plantarum</i> MF556	İzole	32	0	8	9	20	69
	Seçilen	1	0	1	0	1	3
	% Mutant	3	0	13	0	5	4
<i>P. ethanolidurans</i> MF229	İzole	11	1	15	6	15	48
	Seçilen	6	1	4	2	3	16
	% Mutant	55	100	27	33	20	33
<i>P. ethanolidurans</i> MF50	İzole	39	0	6	14	16	75
	Seçilen	1	0	1	1	4	7
	% Mutant	3	0	17	7	25	9

4.4. Mutant Suşların in Vitro Probiyotik Özellikleri

Sağlığı geliştirici özelliklere sahip fonksiyonel gıdalara artan bir ilgi vardır. Bu bağlamda probiyotik gıdalar son yıllarda oldukça ilgi görmektedir (Hill ve ark., 2014) tarafından güncellenen şekliyle probiyotikler, “yeterli miktarlarda uygulandığında konakçıya sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlanır. Probiyotikler için iddia edilen faydalı sağlık etkileri, gastrointestinal sistemdeki mikrobiyal dengenin düzenlenmesi, serum kolesterol seviyelerinin düşürülmesi, laktoz intoleransı semptomlarının hafifletilmesi, kolon kanseri riskinin azaltılması, besinlerin biyoyararlanımının artırılması, prevalansın önlenmesi veya azaltılmasıdır. Gıda ve Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütü (FAO/WHO) tarafından belirlendiği üzere, probiyotik suşların incelenmesi için şu anda kullanılan başlıca in vitro testler mide asiditesine direnç, safra asidi direnci, mukus ve/veya insan epiteline yapışma, patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite ve safra tuzu hidrolaz aktivitesi gibi özelliklerdir. Mutasyon ön seçimi yapılmış olan LAB suşlarının, probiyotik potansiyellerindeki değişimi belirlemek için in vitro analizlere tabi tutulmuştur. Bu çalışmalarda test edilen özellikler arasında pH 2.5’te hayatta kalma yeteneği, safra tuzlarına direnç (%0,3), pepsin-pankreatin varlığında yaşayabilirlik, kolesterol asimilasyonu, antimikrobiyal aktivite ve yüzey hidrofobiklik özellikleri yer almaktadır.

4.4.1. Mutant suşların gastrik pH dayanımı

Mide pH’sına, safra tuzlarına ve pankreas sıvısına direnç gastrointestinal koşullarda potansiyel probiyotik suşların hayatta kalmasını ve gelişimini tahmin etmede büyük önem taşımaktadır. Mide asiditesine tolerans (pH 2.0-2.5), probiyotiklerin gastrointestinal kanaldan geçiş sırasında hayatta kalmalarını sağlayan anahtar fonksiyonel gereksinim olarak kabul edilir (Musikasang ve ark., 2009). Sağlıklı bir insanın bağırsaklarında bulunan laktik asit bakteri sayısı 10^8 - 10^9 (kob/cm²) aralığında bulunabilmektedir (Lichtenstein ve Goldin, 2004). İnsan vücuduna yiyecekler aracılığı ile alınan mikroorganizmalar gastrointestinal sisteminden geçerler ve faydalı görevlerini önemli ölçüde bağırsaklarda gösterirler. Sindirim kanalında mikroorganizmaların canlı kalabilmesinin önündeki en büyük engel mide bölümüdür (Mishra ve Prasad, 2005). Tez çalışması kapsamında UV ve kimyasal (EMS, EtBr, Mix) mutasyon uygulamaları ile izole edilmiş ve ön seçimlerde yüksek aktivite gösteren muhtemel mutant suşların pH 2.5’de canlılık düzeyleri ve mutasyona uğratılmamış

Ana suşlar ile aralarındaki farklılıkları Tablo 4.10'da verilmiştir. Bir önceki bölümde açıklandığı gibi *Lb. brevis* MF105 suşu hariç diğer *Lb. plantarum* MF239, *Lb. plantarum* MF376, *Lb. plantarum* MF556, *P. ethanolidurans* MF229 ve *P. ethanolidurans* MF50 suşlarından muhtemel mutantlar seçilerek pH 2.5 canlılık testleri bu suşlar ile gerçekleştirilmiştir. LAB suşlarının ön seçiminde pH2.5 dayanımı açısından zayıf görülen ve mutasyonlar ile bu probiyotik özelliği geliştirilmesi planlanan *Lb. plantarum* MF239 suşuna ait pH 2.5 canlılık verileri incelenecek olursa, MF239 Ana suşunda pH 2.5 gastrik ortamda başlangıç mikroorganizma sayısında 4 saatlik inkübasyon sonrası 3,10 log kob/mL'lik canlılık kaybı ölçülmüş olup canlılık oranı %64,10 olarak hesap edilmiştir. Mutant suşlarda ise en düşük canlılık kaybı MF239 Mix1 mutant suşunda ölçülmüş ve sırasıyla %91,37 canlılık düzeyi ve Ana suşa göre +27,27 birim canlılık düzeyinde artış sağlanmıştır ($p<0,05$). İkinci olarak en iyi gelişme ise MF239 Mix2 ve MF239 KUV1 suşlarında benzer belirlenmiş ve +12,74 ve +12,15 birim canlılık düzeyinde artış gerçekleşmiştir ($p>0,05$). Diğer taraftan MF239 UV6 mutant suşunda ise Ana suşa kıyasla canlılık düzeyinde çok küçük bir artış (+3,35) yakalanabilmiştir. MF239 suşunun diğer mutantlarında ise -34,25 ve -2,57 aralığında değişen negatif yönlü bir canlılık kaybı elde edilmiştir.

Safra tuzu dayanımının geliştirilmesi amacı ile seçilmiş olan *Lb. plantarum* MF376 suşunun pH 2.5 canlılık düzeylerine ait veriler incelenecek olursa, Ana suşun başlangıç canlı sayısında test sonrası 3,03 log kob/mL'lik bir azalmanın meydana geldiği ve %66,09'luk bir canlılık elde edildiği görülmektedir. Mutant olarak seçilen MF376 Mix1 ve MF376 Mix2 suşlarında ise % canlılık değerlerinde sırası ile +5,63 ve +3,88 artış gerçekleşmiştir. MF376 suşunda meydana gelen bu artışlar Ana suşa kıyasla anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Benzer şekilde *Lb. plantarum* MF556 suşundan elde edilen mutant suşlarda da herhangi bir artış sağlanamamış olup MF556 EMS1 ve MF556 Mix1 suşlarında Ana suş ile benzer canlılık düzeyleri (%85,89) elde edilmiştir ($p>0,05$). MF556 UV1 mutant suşunda ise önemli düzeyde canlılık kaybı (-30,74) yaşanmıştır ($p<0,05$). Pepsin ve pankreatin enzim dayanımları açısından geliştirilmesi planlanan *P. ethanolidurans* MF229 suşunda ön seçilimi yapılan 16 mutant suşun herhangi birinde pH 2.5 canlılık düzeylerinde anlamlı bir artış sağlanamamıştır. Ana suşun canlılık düzeyi %72,10 bulunurken, özellikle MF229 Mix3, MF229 Mix1 ve MF229 KUV1 suşlarında en yüksek artış sağlanmış olup değerler 8,37-5,85 arasında değişmiştir. *P. ethanolidurans* MF50 suşunda ise Ana suşun pH 2.5 canlılık düzeyi %53,93 olarak bulunmuş ve MF50 EMS1 mutant suşunda canlılık düzeyinde (9,70) en

yüksek artış sağlanmıştır. *P. ethanolidurans* MF229 ve MF50 mutant suşlarında meydana gelen canlılık düzeyindeki artışlar düşük düzeylerde kalmıştır. Laktik asit bakterilerinin pH 2.5'te hayatta kalma kabiliyeti diğer araştırmacılar tarafından da bildirilmektedir (Balcazar ve ark., 2008). Bununla birlikte, test edilen suşlar arasında pH 2.5 canlılık düzeyi yanıtında farklılık olduğu bulunmuştur ($p<0,05$), bu da düşük pH'a direncin suşa ve mutantlara özgü bir özellik olduğunu göstermiştir.

Tablo 4.10. Mutant LAB suşlarının pH 2.5 dayanımları (log kob/mL)

	LAB Suşları	0. saat	4. saat	Fark	% Canlılık	%Artış*
<i>Lb. plantarum</i> MF239	MF239 Ana suş	8,63±0,21	5,53±0,11	3,10	64,10±0,70 ^A	0,00
	MF239 UV1	8,45±0,14	4,16±0,13	4,29	49,26±0,60 ^{BH}	-14,84
	MF239 UV2	7,66±0,15	3,76±0,23	3,90	49,10±2,42 ^{BH}	-15,00
	MF239 UV3	7,28±0,02	3,20±0,12	4,07	44,03±1,65 ^C	-20,0
	MF239 UV4	8,52±0,25	4,06±0,08	4,45	47,72±1,09 ^{BH}	-16,38
	MF239 UV5	7,71±0,19	2,30±0,01	5,41	29,85±1,50 ^D	-34,25
	MF239 UV6	7,70±0,07	5,20±0,15	2,51	67,45±1,59 ^E	3,35
	MF239 UV7	8,70±0,31	6,33±0,24	2,37	72,73±0,01 ^F	8,63
	MF239 KUV1	8,68±0,07	6,62±0,16	2,06	76,25±1,54 ^G	12,15
	MF239 KUV2	8,81±0,11	6,52±0,18	2,29	73,99±1,37 ^{FG}	9,89
	MF239 KUV3	8,51±0,13	4,33±0,08	4,18	50,91±0,18 ^H	-13,19
	MF239 EMS1	7,66±0,21	3,51±0,02	4,15	45,76±1,9 ^{BC}	-18,34
	MF239 EMS2	7,48±0,11	4,60±0,11	2,88	61,53±0,44 ^{AI}	-2,57
	MF239 Mix1	8,71±0,03	7,96±0,21	0,75	91,37±2,90 ^K	27,27
	MF239 Mix2	7,32±0,032	5,63±0,17	1,70	76,84±2,58 ^G	12,74
	MF239 Mix3	8,79±0,27	4,48±0,12	4,31	50,94±0,68 ^H	-13,16
	MF239 Mix4	8,96±0,15	5,26±0,22	3,70	58,67±1,76 ^I	-5,43
<i>Lb. plantarum</i> MF376	MF376 Ana suş	8,94±0,14	5,91±0,34	3,03	66,09±3,65 ^A	0,00
	MF376 Mix1	9,05±0,32	6,49±0,22	2,56	71,72±2,41 ^A	5,63
	MF376 Mix2	8,88±0,12	6,21±0,25	2,67	69,97±0,37 ^A	3,88
<i>Lb. plantarum</i> MF556	MF556 Ana suş	8,74±0,22	7,51±0,16	1,23	85,89±0,58 ^A	0,00
	MF556 UV1	8,74±0,13	4,82±0,34	3,92	55,15±3,98 ^B	-30,74
	MF556 EMS1	8,80±0,19	7,55±0,23	1,25	85,79±0,96 ^A	-0,10
	MF 556 Mix1	8,77±0,09	7,49±0,17	1,28	85,40±1,38 ^A	-0,49

*% artış, Ana suşa göre canlılık düzeylerinde meydana gelen artış veya azalmayı göstermektedir.

**A Üst indisler satırlar arasındaki her bir bakteri türü için istatistiksel farklılıkları belirtmektedir.

Tablo 4.10. Mutant LAB suşlarının pH 2.5 dayanımları (log kob/mL)-devam

LAB Suşları	0. saat	4. saat	Fark	% Canlılık	% Artış*	
<i>P. ethanolidurans</i> MF229	MF229 Ana suş	8,68±0,15	6,26±0,25	2,42	72,10±2,08 ^{ABCD}	0,00
	MF229 UV1	8,27±0,09	6,18±0,15	2,09	74,71±1,20 ^{ABEF}	2,61
	MF229 UV2	7,96±0,02	6,15±0,24	1,82	77,19±3,74 ^{ABEF}	5,09
	MF229 UV3	8,29±0,18	5,60±0,16	2,69	67,58±0,38 ^C	-4,52
	MF229 UV4	8,61±0,25	6,10±0,09	2,52	70,79±1,67 ^{BCD}	-1,31
	MF229 UV5	8,40±0,26	6,20±0,02	2,21	73,74±3,16 ^{ABCDE}	1,64
	MF229 UV6	8,15±0,13	6,18±0,16	1,97	75,80±0,86 ^{ABEF}	3,70
	MF229 KUV1	8,15±0,11	6,35±0,24	1,80	77,95±2,49 ^{AEF}	5,85
	MF229 EtBr1	8,39±0,09	6,21±0,45	2,18	74,00±6,24 ^{ABDE}	1,90
	MF229 EtBr2	8,47±0,19	6,22±0,23	2,26	73,38±1,29 ^{ABCDE}	1,28
	MF229 EMS1	8,50±0,21	6,43±0,35	2,07	75,60±2,98 ^{ABEF}	3,50
	MF229 EMS2	8,48±0,28	5,75±0,41	2,73	67,79±3,41 ^{CD}	-4,31
	MF229 EMS3	8,35±0,12	6,09±0,22	2,26	72,96±2,01 ^{ABCDE}	0,86
	MF229 EMS4	8,59±0,17	6,21±0,21	2,38	72,33±1,21 ^{ABCD}	0,23
	MF229 Mix1	8,73±0,12	6,89±0,14	1,84	78,92±0,56 ^{EF}	6,82
	MF229 Mix2	8,69±0,18	6,34±0,19	2,35	72,94±0,73 ^{ABCDE}	0,84
	MF229 Mix3	8,75±0,10	7,04±0,29	1,71	80,47±3,23 ^F	8,37
<i>P. ethanolidurans</i> MF50	MF50 Ana suş	9,02±0,25	4,15±0,27	4,86	53,93±1,76 ^A	0,00
	MF50 UV1	8,87±0,31	3,85±0,16	5,02	56,60±0,59 ^{AB}	2,67
	MF50 EtBr1	8,95±0,21	3,59±0,22	5,35	59,83±1,17 ^{AB}	5,90
	MF50 EMS1	8,06±0,15	2,93±0,49	5,13	63,63±6,61 ^B	9,70
	MF50 Mix1	8,86±0,21	3,61±0,16	5,26	59,31±0,24 ^{AB}	5,38
	MF50 Mix2	8,78±0,15	3,45±0,32	5,33	60,74±3,37 ^{AB}	6,81
	MF50 Mix3	8,82±0,11	3,62±0,52	5,20	58,96±6,97 ^{AB}	5,03
	MF50 Mix4	8,63±0,24	3,62±0,11	5,01	58,06±0,82 ^{AB}	4,13
*0% artış, Ana suşa göre canlılık düzeylerinde meydana gelen artış veya azalmayı göstermektedir.						
**AÜst indisler satırlar arasındaki herbir bakteri türü için istatistiksel farklılıkları belirtmektedir.						

4.4.2. Mutant suşların safra tuzu dayanımı

İnce bağırsak ve kolon, canlı hücreler için toksik olan nispeten yüksek konsantrasyonlarda safra tuzları içerdiğinden, safra tuzlarına direnç probiyotikler için en önemli seçim kriterlerinden biridir. Farklı LAB türlerinin safra tuzu toleranslarına göre önemli farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir (Ahmadova ve ark., 2013). Safra bileşikleri karaciğerde

sentezlenerek, safra kesesine gönderilmekte ve buradan da konjuge forma dönüştürülerek salgılanmaktadır. Safra asitleri özellikle *E. coli*, *Klebsiella* spp, *Enterococcus* spp mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etki göstermektedir (Dunne ve ark., 1999).

UV ve kimyasal (EMS, EtBr, Mix) mutasyon uygulamaları ile izole edilmiş mutant suşların safra tuzu içeren besiyerindeki canlılık düzeyleri ve Ana suşlar ile aralarındaki pozitif ve negatif farklılıklar Tablo 4.11’de verilmiştir. Mutant suşların ve Ana suşların safra dayanımlarının belirlenmesinde *Lb. plantarum* MF239, *Lb. plantarum* MF376, *Lb. plantarum* MF556, *P. ethanolidurans* MF229 ve *P. ethanolidurans* MF50 kültürleri test edilmiştir.

Lb. plantarum MF239 Ana suşunun başlangıç hücre sayısı %0,3 safra tuzu içeren ortamda 4 saatlik inkübasyon sonrasında 8,16 log kob/mL’den 6,35 log kob/mL’ye düşmüş ve canlılık düzeyi %77,82 olarak hesap edilmiştir. MF239 suşuna ait mutantlar incelendiğinde en yüksek canlılık düzeyi MF239 UV3 suşunda %80,94 olarak Ana suşa kıyasla +3,12’lik bir artış sergilemiştir. Ancak bu artış oldukça Ana suşa benzer olarak düşük düzeyde kalmıştır ($p>0,05$). Diğer mutant suşlarda da çok büyük bir gelişme gerçekleşmemiş ve artış düzeyleri -8,17 ve +3,12 aralığında kalmıştır. *Lb. plantarum* MF239 mutant suşlarında safra dayanımında anlamlı bir artış sağlanamamıştır.

Safra tuzu dayanımının geliştirilmesinde tüm suşlar içerisinde en yüksek canlılık artışı *Lb. plantarum* MF376 suşunun MF376 Mix1 mutantında ölçülmüştür. Buna göre %51,55 olan Ana suş canlılık düzeyi MF376 Mix suşunda %76,62 bulunarak +25,07’lik bir canlılık düzeyi artışı sağlanmıştır ($p<0,05$). Diğer MF376 Mix2 suşunda ise Ana suşa kıyasla anlamlı bir artış sağlanamamıştır ($p>0,05$).

Lb. plantarum MF556 suşuna ait safra dayanım verileri Tablo 4.11’de incelenecek olursa Ana suşa %48,54 canlılık düzeyi elde edilirken diğer mutant suşlarında ise anlamlı bir canlılık düzeyi artışı sağlanamamıştır ($p>0,05$). Benzer şekilde *P. ethanolidurans* MF229 ve *P. ethanolidurans* MF50 mutant suşlarında da önemli bir pozitif farklılık gerçekleşmemiş ve MF229 EMS2 suşunda +5,24 ($p<0,05$), MF50 EMS1 suşunda +4,83 değerlerinde az bir artış elde edilebilmiştir. Ayrıca *P. ethanolidurans* MF50 Ana suşunun safra tuzu dayanımının çok düşük (%36,48 canlılık) olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.11. Mutant LAB suşlarının safra tuzu dayanımları (log kob/mL)

	LAB Suşları	0. saat	4. saat	Fark	% Canlılık	%Artış*
<i>Lb. plantarum</i> MF239	MF239 Ana suş	8,16±0,32	6,35±0,21	1,81	77,82±0,87 ^{ACDF}	0,00
	MF239 UV1	8,12±0,21	6,00±0,24	2,12	73,83±1,25 ^{ABD}	-3,99
	MF239 UV2	8,23±0,12	6,08±0,12	2,15	73,87±0,31 ^{ABD}	-3,95
	MF239 UV3	8,07±0,15	6,54±0,15	1,54	80,94±0,33 ^C	3,12
	MF239 UV4	8,05±0,23	5,98±0,11	2,07	74,24±1,29 ^{ABD}	-3,58
	MF239 UV5	8,04±0,21	5,84±0,16	2,20	72,59±0,11 ^{BE}	-5,23
	MF239 UV6	8,07±0,32	5,94±0,00	2,13	73,65±4,37 ^{AB}	-4,17
	MF239 UV7	7,95±0,13	6,21±0,12	1,75	78,05±0,13 ^{CDF}	0,23
	MF239 KUV1	8,28±0,16	6,02±0,11	2,26	72,71±0,34 ^{BE}	-5,11
	MF239 KUV2	8,01±0,23	6,12±0,15	1,89	76,44±0,66 ^{ABDF}	-1,38
	MF239 KUV3	8,06±0,15	6,06±0,21	2,00	75,22±1,49 ^{ABDF}	-2,60
	MF239 EMS1	8,10±0,19	6,07±0,25	2,03	74,94±1,66 ^{ABDF}	-2,88
	MF239 EMS2	8,08±0,00	6,02±0,23	2,06	74,45±3,80 ^{ABD}	-3,37
	MF239 Mix1	8,00±0,11	5,57±0,12	2,43	69,65±0,50 ^E	-8,17
	MF239 Mix2	8,13±0,21	6,41±0,04	1,72	78,86±2,37 ^{CF}	1,04
	MF239 Mix3	8,39±0,09	6,37±0,08	2,02	75,94±0,01 ^{ABDF}	-1,88
	MF239 Mix4	8,38±0,08	6,25±0,17	2,13	74,56±1,65 ^{ABD}	-3,26
<i>Lb. plantarum</i> MF376	MF376 Ana suş	8,55±0,12	4,41±0,11	4,14	51,55±0,40 ^A	0,00
	MF376 Mix1	8,46±0,17	6,48±0,19	1,98	76,62±0,80 ^B	25,07
	MF376 Mix2	8,42±0,28	4,31±0,21	4,11	51,16±0,71 ^A	-0,39
<i>Lb. plantarum</i> MF556	MF556 Ana suş	8,36±0,11	4,06±0,28	4,30	48,54±3,40 ^A	0,00
	MF556 UV1	8,38±0,15	4,21±0,35	4,17	50,25±4,22 ^A	1,71
	MF556 EMS1	8,27±0,09	4,10±0,25	4,18	49,51±3,08 ^A	0,97
	MF 556 Mix1	8,28±0,08	4,21±0,19	4,07	50,88±2,13 ^A	2,34

*0% artış, Ana suşa göre canlılık düzeylerinde meydana gelen artış veya azalmayı göstermektedir.
**A Üst indisler satırlar arasındaki her bir bakteri türü için istatistiksel farklılıkları belirtmektedir.

Tablo 4.11. Mutant LAB suşlarının safra tuzu dayanımları (log kob/mL)-devam

LAB Suşları	0. saat	4. saat	Fark	% Canlılık	% Artış*	
<i>P. ethanolidurans</i> MF229	MF229 Ana suş	7,94±0,33	6,99±0,24	0,95	88,04±1,01 ^{AB}	0,00
	MF229 UV1	7,68±0,23	7,08±0,21	0,60	92,20±0,11 ^{BF}	4,16
	MF229 UV2	7,80±0,25	6,50±0,34	1,30	83,30±2,24 ^{ACEG}	-4,74
	MF229 UV3	7,54±0,21	6,17±0,27	1,37	81,81±1,67 ^{CDEG}	-6,23
	MF229 UV4	7,73±0,12	6,05±0,00	1,67	78,35±1,92 ^{CD}	-9,69
	MF229 UV5	7,48±0,17	6,02±0,17	1,46	80,52±0,44 ^{CDE}	-7,52
	MF229 UV6	8,32±0,15	6,66±0,11	1,66	80,03±0,34 ^{CDE}	-8,01
	MF229 KUV1	8,35±0,18	7,10±0,14	1,25	85,00±0,35 ^{AEG}	-3,04
	MF229 EtBr1	8,15±0,11	6,90±0,13	1,26	84,59±0,51 ^{AEG}	-3,45
	MF229 EtBr2	7,50±0,16	6,58±0,05	0,92	87,77±1,82 ^{AB}	-0,27
	MF229 EMS1	7,68±0,19	6,72±0,34	0,96	87,46±3,08 ^{AB}	-0,58
	MF229 EMS2	6,85±0,24	6,39±0,00	0,46	93,28±4,69 ^F	5,24
	MF229 EMS3	7,10±0,11	6,13±0,32	0,97	86,30±4,35 ^{AG}	-1,74
	MF229 EMS4	7,45±0,12	6,24±0,15	1,21	83,77±0,79 ^{AEG}	-4,27
	MF229 Mix1	7,53±0,12	5,79±0,11	1,74	76,94±0,12 ^D	-11,10
	MF229 Mix2	7,86±0,18	6,84±0,41	1,02	86,99±4,44 ^{ABG}	-1,05
	MF229 Mix3	7,07±0,29	6,22±0,21	0,86	87,91±1,02 ^{AB}	-0,13
<i>P. ethanolidurans</i> MF50	MF50 Ana suş	8,11±0,15	2,96±0,27	5,15	36,48±3,20 ^{ADE}	0,00
	MF50 UV1	7,91±0,21	2,38±0,18	5,53	30,08±1,46 ^{BC}	-6,40
	MF50 EtBr1	7,85±0,21	2,60±0,11	5,25	33,13±0,13 ^{AC}	-3,35
	MF50 EMS1	8,45±0,00	3,49±0,19	4,96	41,31±2,69 ^D	4,83
	MF50 Mix1	7,81±0,21	2,91±0,26	4,90	37,24±2,72 ^{ADE}	0,76
	MF50 Mix2	8,13±0,17	3,16±0,24	4,97	38,88±2,49 ^{DE}	2,40
	MF50 Mix3	8,17±0,11	2,94±0,12	5,23	36,01±0,84 ^{AE}	-0,47
	MF50 Mix4	8,15±0,08	2,29±0,09	5,86	28,06±0,55 ^B	-8,42

*% artış, Ana suşa göre canlılık düzeylerinde meydana gelen artış veya azalmayı göstermektedir.
**AÜst indisler satırlar arasındaki herbir bakteri türü için istatistiksel farklılıkları belirtmektedir.

4.4.3. Mutant suşların pepsin ve pankreatin enzim dayanımı

Pepsin-pH 2.5 çözeltisi ve pankreatin-safra tuzu çözeltisinin (pH 8.0) birleşik etkisi, sırasıyla mide suyunu ve bağırsağı simüle etmeyi amaçlar. Bu bakımdan mutasyon işlemleri uygulanan LAB suşlarının pepsin ve pankreatin enzim dayanımları ortaya konmuş ve Tablo 4.12’de % canlılık değerleri mutant suşlarda meydana gelen canlılık artışları verilmiştir. *Lb. plantarum* MF239 Ana suşunun pepsin ve pankreatin enzimine karşı canlılık düzeyleri sırası ile %51,45 ve %62,06 olarak gerçekleşmiştir. MF239 mutant suşlarında ise pepsin dayanımında en yüksek artış MF239 UV7 suşunda (+7,92), pankreatin dayanımında en yüksek artış MF239 Mix1 (+7,71) suşunda gözlemlenmiştir. Bu miktarlar çok önemli bir artış sağlamamıştır. *Lb. plantarum* MF376 Ana suşunda ise pepsin ve pankreatin canlılık düzeyleri %83,13 ve %50,18 olarak bulunmuştur. Sadece MF376 Mix2 mutant suşunda +8,75’lik pankreatin enzim dayanım artışı elde edilmiştir. *Lb. plantarum* MF556 mutant suşlarında herhangi bir canlılık artışı ölçülmemiştir. *P. ethanolidurans* MF229 UV6 mutant suşunda pankreatin dayanımında +7,16, MF229 EtBr1 mutant suşunda ise pepsin dayanımında +8,20 birimlik bir artış sağlanmıştır. *P. ethanolidurans* MF50 suşunun mutant MF50 Mix2 suşunda en yüksek pankreatin enzim dayanım artışı sağlanmış olup +14,07’lik bir değer elde edilmiştir.

Tablo 4.12. Mutant LAB suşlarının pepsin ve pankreatin enzim dayanımları (log kob/mL)

	LAB Suşları	0. saat	4. saat Pepsin	6. saat Pank.	% Canlılık		%Artış*	
					Pep	Pank.	Pep	Pank.
<i>Lb. plantarum</i> MF239	MF239 Ana suş	8,27±0,13	4,25±0,08	5,13±0,32	51,45 ^{AD}	62,06 ^{AD}	0,00	0,00
	MF239 UV1	7,92±0,14	3,80±0,12	5,43±0,21	47,92 ^{ABF}	68,53 ^{BE}	-3,53	6,47
	MF239 UV2	7,35±0,12	4,34±0,17	4,31±0,11	59,02 ^C	58,58 ^{AC}	7,57	-3,48
	MF239 UV3	7,19±0,16	3,42±0,04	4,23±0,12	47,57 ^{ABF}	58,84 ^{AC}	-3,88	-3,22
	MF239 UV4	8,10±0,32	3,91±0,09	5,38±0,07	48,24 ^{ABF}	66,32 ^{BDE}	-3,21	4,26
	MF239 UV5	7,86±0,23	4,50±0,24	5,35±0,15	57,18 ^C	68,06 ^{BE}	5,73	6,00
	MF239 UV6	8,08±0,21	4,65±0,21	5,38±0,14	57,60 ^C	66,53 ^{BE}	6,15	4,47
	MF239 UV7	8,12±0,23	4,82±0,15	5,49±0,06	59,37 ^C	67,63 ^{BE}	7,92	5,57
	MF239 KUV1	8,01±0,18	3,56±0,27	5,25±0,23	44,42 ^B	65,45 ^{BDE}	-7,03	3,39
	MF239 KUV2	7,83±0,21	3,95±0,21	4,42±0,12	50,41 ^{AD}	56,39 ^C	-1,04	-5,67
	MF239 KUV3	7,92±0,32	4,17±0,13	5,33±0,17	52,64 ^D	67,32 ^{BE}	1,19	5,26
	MF239 EMS1	6,95±0,19	3,18±0,12	4,45±0,11	45,67 ^{BF}	63,98 ^{BD}	-5,78	1,92
	MF239 EMS2	8,04±0,06	4,78±0,18	5,45±0,26	59,41 ^C	67,84 ^{BE}	7,96	5,78
	MF239 Mix1	7,82±0,12	3,71±0,19	5,46±0,31	47,48 ^{BF}	69,77 ^E	-3,97	7,71
	MF239 Mix2	7,85±0,12	3,62±0,21	4,50±0,02	46,12 ^{BF}	57,38 ^C	-5,33	-4,68
	MF239 Mix3	7,80±0,19	2,73±0,28	4,47±0,14	34,95 ^E	57,35 ^C	-16,50	-4,71
	MF239 Mix4	7,94±0,21	3,94±0,29	5,48±0,14	49,61 ^{ADF}	69,04 ^E	-1,84	6,98
<i>Lb. plantarum</i> MF376	MF376 Ana suş	7,92±0,21	6,58±0,12	3,97±0,08	83,13 ^A	50,18 ^A	0,00	0,00
	MF376 Mix1	8,00±0,25	6,48±0,16	3,74±0,25	80,97 ^A	46,76 ^A	-2,16	-3,42
	MF376 Mix2	8,21±0,12	4,39±0,14	4,84±0,22	53,45 ^B	58,93 ^B	-29,68	8,75
<i>Lb. plantarum</i> MF556	MF556 Ana suş	8,15±0,08	6,23±0,17	3,18±0,15	76,44 ^A	38,95 ^A	0,00	0,00
	MF556 UV1	7,58±0,03	5,76±0,18	2,78±0,32	75,94 ^A	36,68 ^A	-0,50	-2,27
	MF556 EMS1	7,80±0,12	5,41±0,12	2,02±0,27	69,33 ^B	25,90 ^B	-7,11	-13,05
	MF 556 Mix1	7,63±0,24	5,23±0,16	3,11±0,13	68,48 ^B	40,74 ^A	-7,96	1,79
*% artış, Ana suşa göre canlılık düzeylerinde meydana gelen artış veya azalmayı göstermektedir.								
**A Üst indisler satırlar arasındaki herbir bakteri türü için istatistiksel farklılıkları belirtmektedir.								

Tablo 4.12. Mutant LAB suşlarının pepsin ve pankreatin enzim dayanımları (log kob/mL)-devam

	LAB Suşları	0. saat	4. saat	6. saat	% Canlılık		% Artış*	
			Pepsin	Pank.	Pep	Pank	Pep	Pank
P. ethanolidurans MF229	MF229 Ana suş	8,01±0,23	4,26±0,12	5,38±0,07	53,21 ^{AC}	67,10 ^{ABGF}	0,00	0,00
	MF229 UV1	7,73±0,32	3,89±0,24	5,51±0,04	50,29 ^A	71,29 ^{BCE}	-2,92	4,19
	MF229 UV2	7,76±0,42	4,61±0,23	5,75±0,09	59,38 ^B	74,11 ^C	6,17	7,01
	MF229 UV3	7,13±0,23	4,05±0,28	4,54±0,11	56,81 ^{BCD}	63,65 ^{ADG}	3,60	-3,45
	MF229 UV4	7,58±0,12	4,60±0,21	4,87±0,22	60,75 ^B	64,29 ^{ADGF}	7,54	-2,81
	MF229 UV5	7,60±0,34	4,40±0,11	5,17±0,14	57,86 ^{BD}	68,02 ^{ABEFG}	4,65	0,92
	MF229 UV6	7,41±0,21	4,20±0,17	5,51±0,32	56,70 ^{BCD}	74,26 ^C	3,49	7,16
	MF229 KUV1	7,77±0,24	3,85±0,17	5,65±0,37	49,51 ^A	72,77 ^{CE}	-3,70	5,67
	MF229 EtBr1	6,37±0,17	3,91±0,12	4,03±0,21	61,41 ^B	63,25 ^{AD}	8,20	-3,85
	MF229 EtBr2	7,40±0,19	2,52±0,21	5,46±0,14	34,07 ^E	73,75 ^C	-19,14	6,65
	MF229 EMS1	7,28±0,11	4,26±0,27	5,17±0,23	58,44 ^{BD}	71,01 ^{BCE}	5,23	3,91
	MF229 EMS2	6,81±0,15	3,98±0,35	4,73±0,18	58,51 ^{BD}	69,47 ^{BCEF}	5,30	2,37
	MF229 EMS3	7,12±0,19	4,26±0,21	4,72±0,11	59,87 ^B	66,20 ^{ABDGF}	6,66	-0,90
	MF229 EMS4	7,62±0,05	3,64±0,37	5,26±0,11	47,73 ^A	69,07 ^{BCEFG}	-5,48	1,97
	MF229 Mix1	8,04±0,14	4,92±0,14	4,93±0,03	61,24 ^B	61,30 ^D	8,03	-5,80
	MF229 Mix2	7,41±0,24	3,82±0,19	4,72±0,02	51,52 ^{AC}	63,67 ^{ADG}	-1,69	-3,43
	MF229 Mix3	7,48±0,27	4,40±0,05	4,96±0,14	58,77 ^{BD}	66,25 ^{ABDGF}	5,56	-0,85
P. ethanolidurans MF50	MF50 Ana suş	7,80±0,21	1,20±0,11	1,10±0,27	15,39 ^A	14,11 ^A	0,00	0,00
	MF50 UV1	7,79±0,15	1,00±0,13	1,27±0,14	12,83 ^A	16,33 ^A	-2,56	2,22
	MF50 EtBr1	7,99±0,28	1,17±0,24	1,45±0,11	14,65 ^A	18,12 ^A	-0,74	4,01
	MF50 EMS1	7,77±0,21	1,28±0,21	1,20±0,27	16,47 ^A	15,50 ^A	1,08	1,39
	MF50 Mix1	7,77±0,11	1,16±0,27	1,14±0,38	14,93 ^A	14,62 ^A	-0,46	0,51
	MF50 Mix2	6,74±0,18	1,15±0,12	1,90±0,35	17,07 ^A	28,18 ^B	1,68	14,07
	MF50 Mix3	7,91±0,12	1,12±0,17	1,26±0,21	14,16 ^A	15,98 ^A	-1,23	1,87
	MF50 Mix4	7,61±0,17	1,23±0,16	1,35±0,14	16,16 ^A	17,70 ^A	0,77	3,59
*% artış, Ana suşa göre canlılık düzeylerinde meydana gelen artış veya azalmayı göstermektedir.								
** ^A Üst indisler satırlar arasındaki herbir bakteri türü için istatistiksel farklılıkları belirtmektedir.								

4.4.4. Mutant suşların antibiyotik dirençleri

Lb. plantarum MF239, *Lb. plantarum* MF376, *Lb. plantarum* MF556, *P. ethanolidurans* MF229 ve *P. ethanolidurans* MF50 mutant suşlarının antibiyotiklere (TE30, E15, K30, C30, AM10) karşı oluşturdıkları zon çapları Tablo 4.13'de ve bazı görüntüleri Şekil 4.9'da verilmiştir. *Lb. plantarum* MF239 ana suşunda K30 antibiyotiğine karşı tam bir dayanım mevcut iken MF239 UV1 ve MF239 Mix3 mutant suşlarında ufak bir zon gözlemlenmiş (9-7 mm zon) olup mutasyonlar bu bakteri suşlarında bir miktar antibiyotik dayanımını azaltmıştır. Diğer taraftan C30 antibiyotik direnci bakımından Ana suşa kıyasla MF239

KUV1 (0 mm zon) ve MF239 EMS2 (0 mm zon) mutant suşlarında tam bir direnç olduğu gözlemlenmiştir. *Lb. plantarum* MF376 ve *Lb. plantarum* MF556 mutant suşlarında ise Ana suş ile yakın zon oluşumları gözlemlenmiş olup sadece MF556 Mix1 suşunda çok az var olan AM10 zon oluşumu kaybolmuş ve direnç artmıştır. *P. ethanolidurans* MF229 UV3 ve EMS3 mutant suşlarında ise düşük zon (7-8 mm zon) artışları meydana gelmiştir.

Tablo 4.13. Mutant suşların antibiyotik dirençleri (zon çapı, mm)

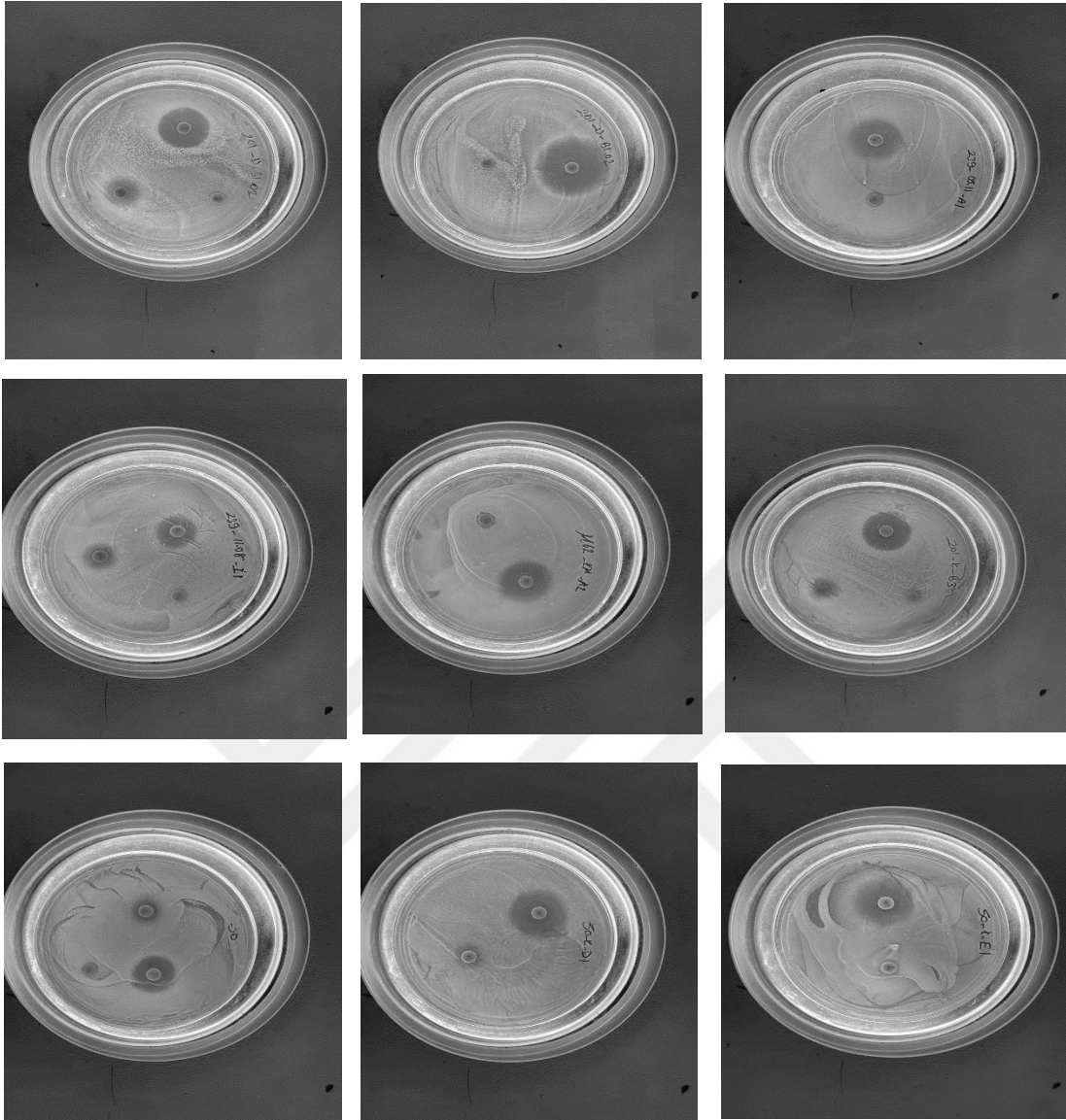
	LAB suşları	TE30	E15	K30	C30	AM10
<i>Lb. plantarum</i> MF239	MF239 Ana suş	22	23	0	27	32
	MF239 UV1	21	15	9	29	37
	MF239 UV2	25	12	0	29	38
	MF239 UV3	20	12	0	22	30
	MF239 UV4	20	15	0	20	30
	MF239 UV5	17	13	0	26	31
	MF239 UV6	22	17	0	29	38
	MF239 UV7	21	17	0	28	37
	MF239 KUV1	28	16	0	0	39
	MF239 KUV2	23	13	0	25	30
	MF239 KUV3	28	13	0	26	38
	MF239 EMS1	29	14	0	20	31
	MF239 EMS2	28	11	0	0	30
	MF239 Mix1	20	16	0	30	33
	MF239 Mix2	28	15	0	24	38
	MF239 Mix3	21	11	7	21	30
	MF239 Mix4	28	11	0	0	20
<i>Lb. plantarum</i> MF376	MF376 Ana suş	10	15	0	25	7
	MF376 Mix1	9	14	0	25	6
	MF376 Mix2	12	9	0	21	7
<i>Lb. plantarum</i> MF556	MF556 Ana suş	14	12	0	20	9
	MF556 UV1	11	16	0	21	8
	MF556 EMS1	9	14	0	11	9
	MF 556 Mix1	12	11	0	11	0

*C30; 30 µg kloramfenikol, AM10; 10 µg amfisilin, E15; 15 µg eritromisin, TE30; 30 µg tetramisin, K30; 30 µg kanamisin

Tablo 4.13. Mutant suşların antibiyotik dirençleri (zon çapı, mm)-devam

	Lab Suşları	TE30	E15	K30	C30	AM10
<i>P. ethanolidurans</i> MF229	MF229 Ana suş	19	18	0	18	22
	MF229 UV1	12	20	0	32	20
	MF229 UV2	17	22	0	32	20
	MF229 UV3	17	22	7	27	20
	MF229 UV4	10	15	0	18	20
	MF229 UV5	11	13	6	17	16
	MF229 UV6	8	12	0	19	17
	MF229 KUV1	9	18	0	20	17
	MF229 EtBr1	14	23	0	29	15
	MF229 EtBr2	13	22	0	23	15
	MF229 EMS1	9	13	0	22	19
	MF229 EMS2	12	20	0	22	21
	MF229 EMS3	12	24	8	26	22
	MF229 EMS4	13	22	0	30	15
	MF229 Mix1	9	17	0	18	10
	MF229 Mix2	10	20	0	24	15
	MF229 Mix3	11	12	7	21	17
<i>P. ethanolidurans</i> MF50	MF50 Ana suş	12	19	0	25	25
	MF50 UV1	30	16	0	30	10
	MF50 EtBr1	12	21	0	24	11
	MF50 EMS1	10	15	0	22	9
	MF50 Mix1	11	14	0	25	9
	MF50 Mix2	7	15	0	18	8
	MF50 Mix3	11	16	0	20	7
	MF50 Mix4	13	17	0	25	14

*C30; 30 µg kloramfenikol, AM10; 10 µg amfisilin, E15; 15 µg eritromisin, TE30; 30 µg tetramisin, K30; 30 µg kanamisin



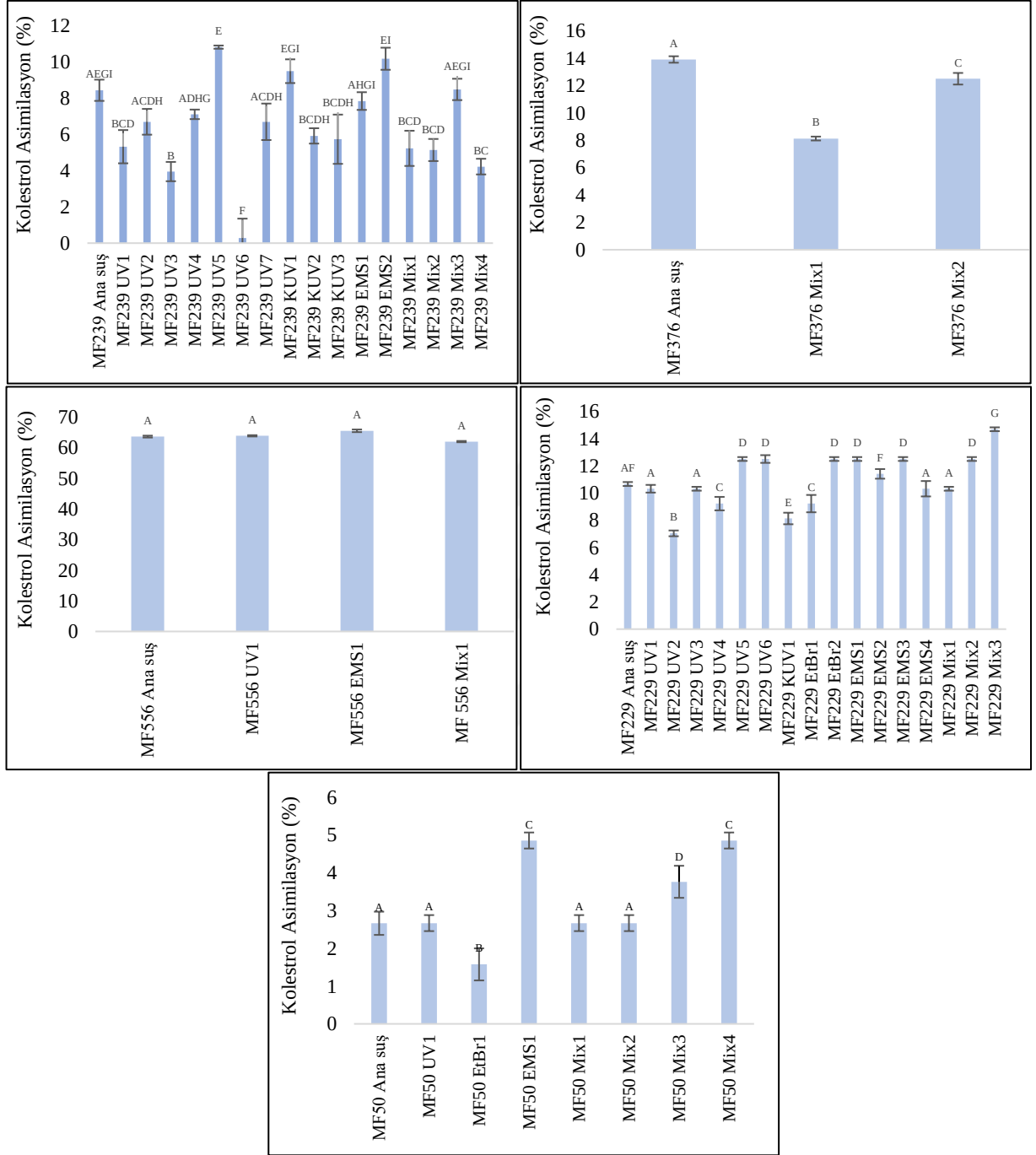
Şekil 4.9. Bazı mutant LAB suşlarına ait antibiyotik duyarlılık zonları

4.4.5. Mutant suşların kolesterol asimilasyon özellikleri

İnsanların kan akışlarındaki yüksek kolesterol konsantrasyonu, genellikle koroner kalp hastalığı için bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Bazı laktobasiller veya bifidobakteriler içeren fermente süt ürünlerinin tüketiminin insanlarda serum kolesterol düzeylerini düşürdüğü iddia edilmektedir. Kolesterol asimilasyon özelliğinin türler ve suşlar arasında değişkenlik gösterdiği görülmektedir. Ek olarak, çalışmalarda farklı başlangıç kolesterol konsantrasyonları kullanıldığından mevcut sonuçları diğer çalışmalar ile karşılaştırmak zordur. Probiyotik bakterilerin kolesterol düşürücü etkisi, safra tuzu hidrolaz

aktivitesi, 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A gibi enzimleri inhibe eden bileşiklerin üretimi ve kolesterol asimilasyonunu içeren farklı mekanizmalarla açıklanmıştır. Günümüze kadar birçok in vitro ve in vivo çalışma yapılmış ve özellikle belirli LAB türlerini içeren probiyotik ürünlerin yüksek kolesterol seviyelerini azalttığı gösterilmiştir. Probiyotik bakterilerin bu alanda kullanımına karşı olan ilgi gün geçtikçe artmaya devam etmektedir. Laktik asit bakterilerinin kolesterol düşürücü fonksiyonunun mekanizmasını açıklayabilmek için çeşitli araştırmalar yapılmış ve aşağıdaki iki temel olası mekanizmalar öne sürülmüştür; Laktobasiller diyetle alınan kolesterolün bağırsaklardan emilimini azaltırlar ya da safra tuzlarının dekonjugasyonunda rol oynarlar (Tok ve Aslım 2007).

Şekil 4.10'da mutant LAB suşlarının kolesterol asimilasyon değerleri (%) verilmiştir. Şekil 4.10 incelendiğinde mutant suşların sadece bazılarında kolesterol asimilasyon değerlerinde küçük bir artış sağlanabildiği görülmektedir. *Lb. plantarum* MF239 Ana suşunda kolesterol asimilasyon değeri %8,43 olarak bulunmuş olup en yüksek artış MF239 UV5 suşunda %10,81 olarak Ana suş ile benzer kaydedilmiştir ($p>0,05$). Diğer taraftan MF239 UV6 suşunda ise en düşük değer olan %0,28 elde edilmiştir ($p<0,05$). *Lb. plantarum* MF376 ve *Lb. plantarum* MF556 mutant suşlarında ise Ana suşa oranla kolestrol asimilasyon değerlerinde herhangi bir artış sağlanamamıştır. *P. ethanolidurans* MF229 Mix3 ve *P. ethanolidurans* MF50 EMS1, MF50 Mix 4 mutanta suşlarında az bir düzeyde artış sağlanmış olup sırası ile %14,70, %4,86 ve %4,86 düzeylerinde kolesterol asimilasyon gerçekleşmiştir ($p<0,05$).

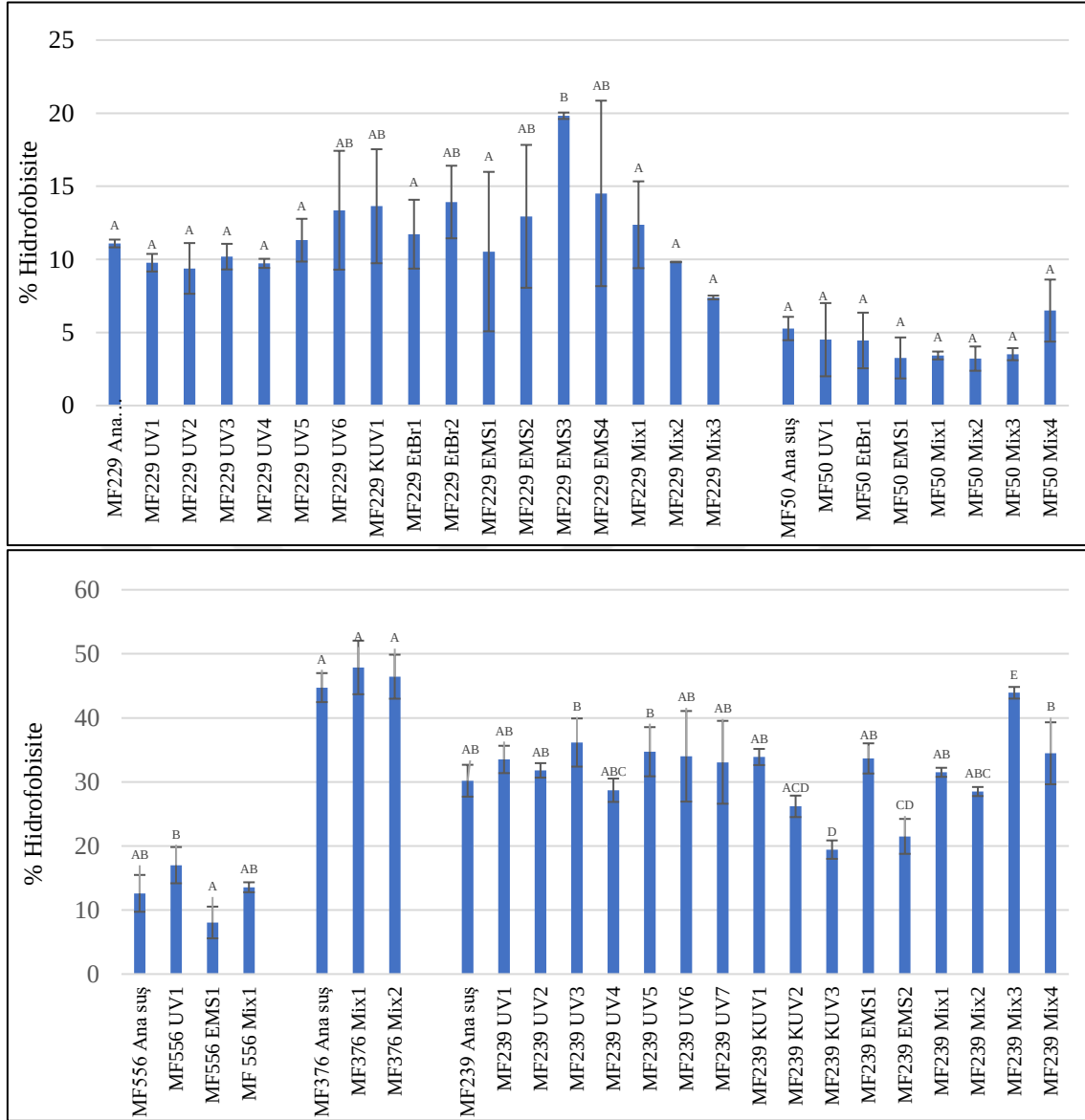


Şekil 4.10. Mutant suşların kolesterol asimilasyon değerleri (%)

4.4.6. Mutant suşların yüzey hidrofobisite özellikleri

Bağırsak duvarındaki kolonizasyon, probiyotik bakterilerin arzu edilen bir özelliği olarak kabul edilir. Bu bağlamda kolonizasyon için ön koşul olarak kabul edilen bağırsak epiteline yapışma yeteneği, probiyotik bakteri seçiminde önemli bir kriterdir. Otoagregasyon ve hidrofobiklik yüzey özellikleri hücre tek tabakalarına yapışma yeteneği ile doğrudan ilgili bir ölçüm olarak kullanılır. Bazı yazarlar hidrofobiklik ile yapışma yeteneği arasında bir ilişki bulurken, bazıları hidrofobiklik değerlerinin yapışma özellikleri ile ilişkili olmadığını bildirmiştir (Walker ve S. E. Gilliland, 1993; Iniguez-Palomares ve ark., 2007).

Şekil 4.11’de LAB mutant suşlarına ait yüzey hidrofobisite değerleri verilmiştir. *P. ethanolidurans* MF229 EMS3 mutant suşunda Ana suşa (%11,09) göre yüzey hidrofobisitesinde en yüksek artış (%19,83) sağlanmıştır ($p<0,05$). Benzer şekilde MF239 mutant suşlarında en yüksek artış MF239 Mix3 suşunda ölçülmüştür ($p<0,05$). *Lb. plantarum* MF376 ve *P. ethanolidurans* MF50 mutant suşlarında yüzey hidrofobisitesinde ise herhangi bir artış sağlanmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 4.11. Mutant suşların yüzey hidrofobisite değerleri (%)

4.5. Mutasyonların Genetik Yöntemlerle Belirlenmesi (RAPD PCR)

UV ve kimyasal (EtBr, EMS, Mix) mutasyon uygulamaları sonrası izole edilen LAB suşlarından ön seçimler ile belirlenmiş olan muhtemel mutant suşların bazı probiyotik özellikleri (pH 2.5 dayanım, safra tuzu dayanım, enzim dayanım, antibiyotik direnç, hidrofobisite, kolesterol asimilasyon) belirlenerek Ana suşlar ile aralarındaki farklılıklar ortaya konmuştur. Çalışma sonucunda önemli düzeyde probiyotik aktivitelerinde gelişme

sağlayan mutant suşlar belirlenerek mutasyonun genetik temelleri ortaya konmaya çalışılmıştır. Probiyotik özellikleri açısından pH 2.5 dayanımında önemli aktivite artışı sağlamış olan *Lb. plantarum* MF239 Mix1 mutant suşu, safra tuzu dayanımında aktivite artışı sağlamış olan *Lb. plantarum* MF376 Mix1 mutant suşu ve pankreatin enzim dayanımında aktivite artışı sağlamış olan *P. ethanolidurans* MF50 mutant suşu genetik çalışmalarda kullanılmıştır. Bu amaç ile DNA üzerinde mutasyon sonucu meydana gelen önemli düzeydeki baz değişimlerinin ortaya konması için RAPD PCR tekniği mutant suşlara ve Ana suşlara uygulanmıştır. Safılaştırılan bakteriyel DNA örnekleri 6 farklı primer (OPA2, OPA8, CRA25, OPB08, OMP05, LAB49) ile PCR işlemleri gerçekleştirilmiştir.

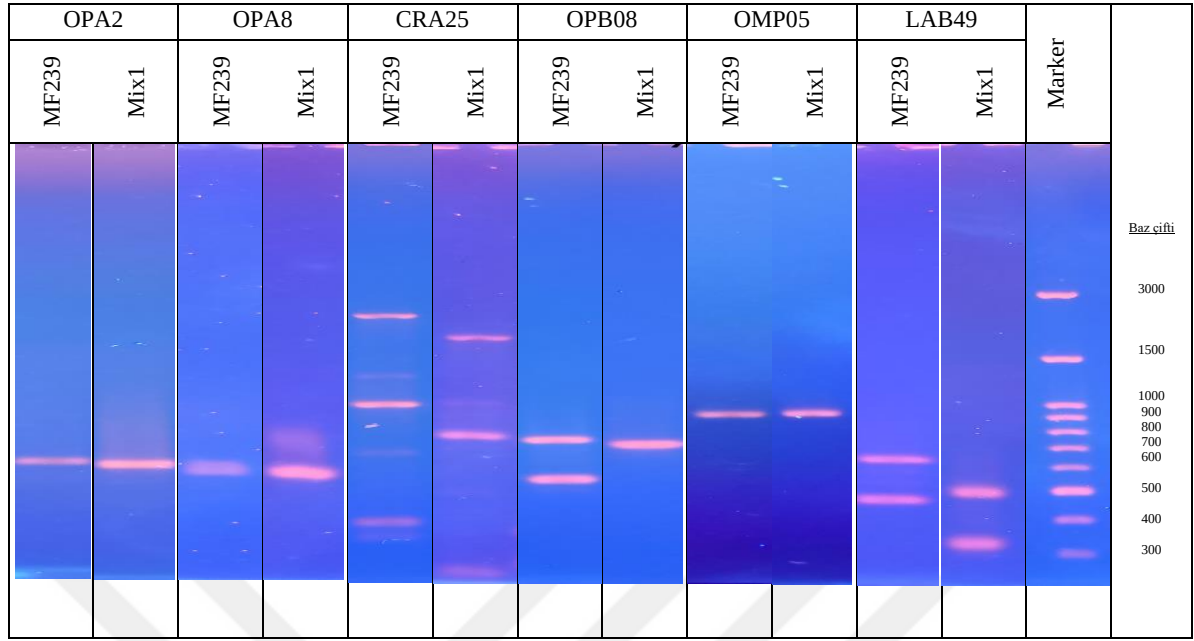
Lb. plantarum MF239 Mix1 mutant suşu ve Ana suş PCR ürünlerine ait agaroz jel görüntüleri Şekil 4.12’de verilmiştir. MF239 Mix1 mutant suşunun primerler ile elde edilen bantları Ana suş bantları ile karşılaştırıldığında OPA2, OPA8, CRA25 ve OMP05 primerleri ile elde edilen bantların aynı olduğu görülmektedir. Diğer taraftan OPB08 ve LAB49 primerleri ile elde edilen bantlarda farklılıklar görülmektedir. OPB08 primerinden elde edilen yaklaşık 550 baz çifti (bp) boyutundaki bandın mutant suşta kaybolduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde LAB49 primerinde Ana suşta elde edilen yaklaşık 700 bp ve 450 bp boyutundaki bantlar mutant suşta 500 bp ve 350 bp boyutunda yer almıştır. İncelenen toplam 14 bant içerisinde mutant suş ile Ana suş arasında 5 bandın farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak *Lb. plantarum* MF239 suşuna ait RAPD PCR bantlarında mutant suşta farklılıklar tespit edilmiş ve mutasyonun genetik düzeyde belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

Lb. plantarum MF376 Mix1 mutant suşu ve Ana suş PCR ürünlerine ait agaroz jel görüntüleri Şekil 4.13’de verilmiştir. MF376 Mix1 mutant suşunda elde edilen bantlar incelendiğinde Ana suş ile aynı boyutlarda bantların elde edildiği primerler OPA2, OMP05 ve LAB49 olmuştur. OPA2 primerinde yaklaşık 600 bp 1 bant, OMP05 primerinde yaklaşık 300 bp 1 bant ve LAB49 primerinde yaklaşık 500 bp boyutunda 1 bant ortak olarak Ana suş ve mutant suşta gözlemlenmiştir. OPA8, CRA25 ve OPB08 primerlerinden elde edilen bantlarda ise farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Buna göre OPA8 primerinde 900 bp boyutunda ortak bir bant var iken yaklaşık 600 bp boyutunda çok silik bir bant oluşumu gözlemlenmiştir. CRA25 primerinden elde edilen ürünlerde ise Ana suşta 700 bp bölgesinde yer alan bandın mutant suşta olmadığı ve bu bandın yaklaşık 500 bp bölgesinde konumlandığı belirlenmiştir. OPB08 primerinden elde edilen bantlar incelenecek olursa Ana

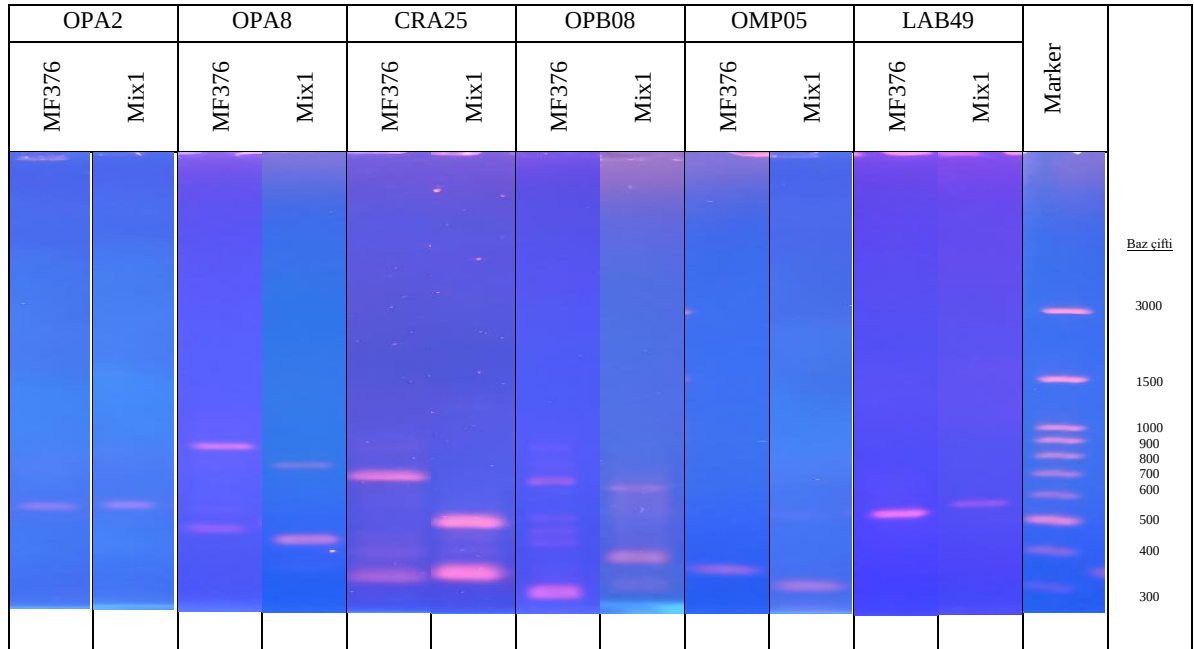
suşta 500-300 bp aralığında yer alan silik 3 lü bant topluluğunun mutant suşta kaybolduğu ve özellikle 375 bp bölgesinde daha yoğun tek bir bantın oluştuğu gözlemlenmiştir. *Lb. plantarum* MF376 suşlarına ait toplamda 15 bant incelenmiş olup Ana suş ve mutant suş arasında 7 bantın farklılık oluşturduğu ortaya konmuştur.

P. ethanolidurans MF50 Mix2 mutant suşu ve Ana suş PCR ürünlerine ait agaroz jel görüntüleri Şekil 4.14’de verilmiştir. MF50 Ana suş ve MF50 Mix2 mutant suşa ait RAPD primer bantları incelendiğinde tüm primerlerde ortaya çıkan bantların aynı olduğu belirlenmiştir. Özellikle OPA8, CRA25 ve OMP05 primerlerinden oluşan bantlar yoğun ve sık aralıklarla gözlemlenmiştir. CRA25 primerinde 3000 bp ve 300 bp aralığında yaklaşık 9 bant, OPA8 primerinde 1600 bp ve 450 bp aralığında 5 bant ve OMP05 primerinde 1400 bp ve 600 bp aralığında 5 bant mutant suşta benzer olarak gözlemlenmiştir. MF50 suşunda 6 farklı primerden elde edilen toplamda 22 bant değerlendirilmeye alınmiş ve mutant suş ile Ana suş arasında tam bir benzerlik elde edilmiştir.

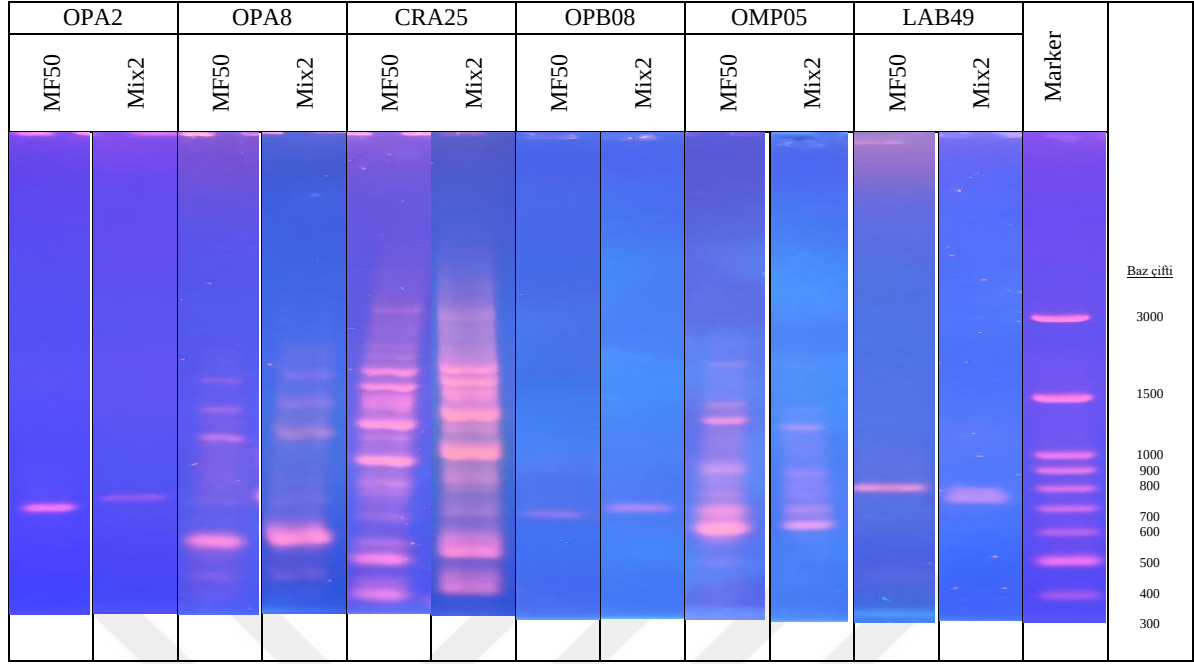
Khattap ve ark. (2016) yaptıkları bir çalışmada, yabani tip suşla korelasyon içinde elde edilen mutantların DNA nükleotid dizisi üzerindeki EMS mutasyonunun genetik etkisini saptamak ve incelemek için OTA biyosorpsiyonunu arttırdığı düşünölen beş mutant arasındaki genetik değişkenliği tanımlamak için üç rastgele primer kullanılarak, genomik DNA’nın belirli fragmanlarını etkili bir şekilde amplifiye etmişlerdir. RAPD tekniğini genetik belirteçlerin OTA biyosorpsiyonuyla ilişkilendirilip ilişkilendirilemeyeceğini test etmek için kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlar, beş mutantın, orijinal suşları ile aynı güçlendirilmiş bantları ürettiğini göstermiştir. Ayrıca, mutant suşlar için 1600 ve 250 bp boyutunda ek bantlar oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca, üç mutant orijinal suşta yer almayan 1500 ve 700 bp’lik çok soluk bantlar gözlemlemişlerdir.



Şekil 4.12. *Lb. plantarum* MF239 Ana suş ve Mix1 mutant suşuna ait OPA2, OPA8, OPB08, OMP05 ve LAB49 RAPD primerleri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri



Şekil 4.13. *Lb. plantarum* MF376 Ana suş ve Mix1 mutant suşuna ait OPA2, OPA8, OPB08, OMP0,5 ve LAB49 RAPD primerleri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri



Şekil 4.14. *P. ethanolidurans* MF50 Ana suş ve Mix2 mutant suşuna ait OPA2, OPA8, OPB08, OMP0,5 ve LAB49 RAPD primerleri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri

5. SONUÇ

Tez çalışması kapsamında, daha önceki bir çalışmada ortaya konmuş olan probiyotik özellikleri açısından düşük pH dayanımı gösteren *Lb. brevis* MF105, *Lb. plantarum* MF239 suşları, düşük safra tuzu dayanımı gösteren olan *Lb. plantarum* MF376, *Lb. plantarum* MF556 suşları ve düşük pepsin/pankreatin enzim dayanımı gösteren *P. ethanolidurans* MF229, *P. ethanolidurans* MF50 suşlarında UV ve kimyasal (EtBr, EMS, EtBr/EMS) mutasyonlar yolu ile öncelikle zayıf oldukları probiyotik özellikleri ve sonra diğer probiyotik özelliklerindeki değişimler ortaya konmaya çalışılmıştır.

Suşlara uygulanacak UV ışık ve kimyasal doz aralıkları ön çalışmalar ile belirlenmiş olup, UV ışık için MF556 suşu hariç diğer tüm LAB suşları için 60-100 saniye aralığında, MF556 suşu için ise 80-130 saniye aralığında ve ayrıca 40 saniye süre ile 4 kez kesikli UV uygulaması gerçekleştirilmiştir. Kimyasal mutasyonlar için ise 1 mg/mL dozda 6 saatlik uygulama kullanılmıştır. Uygulamalar sonrası LAB suşlarında canlılık kayıpları ortaya konmuştur. UV radyasyon uygulama süresi 100 saniyede en yüksek logaritmik azalma değeri *Lb. plantarum* MF239 suşunda hesaplanmıştır. Diğer taraftan *P. ethanolidurans* MF229 ve *P. ethanolidurans* MF50 suşlarında birbiri ile benzer logaritmik azalma değerleri hesaplanmıştır. LAB suşlarında EtBr, EMS ve Mix ile gerçekleştirilen mutasyonlarda tüm suşlarda EtBr uygulamasının hücre canlılığında meydana getirdiği azalmanın diğer kimyasallara kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Probiyotik özelliklerin geliştirilmesi için kimyasal (EtBr, EMS, Mix) ve fiziksel (UV) mutasyonlar uygulanan ve canlı kalabilen LAB suşlarının hedeflenen probiyotik özellikler açısından mutasyonlara uğradıklarının belirlenmesi için hızlı yöntemler ile ön seçim işlemleri yapılmıştır. *Lb. brevis* MF105 suşundan 81 izolasyondan hiçbiri ön seçimde mutant özellik göstermemiş ve sonraki ileri analizlere dahil edilmemiştir. Diğer taraftan 16 adet *Lb. plantarum* MF239 mutant suşu, 2 adet *Lb. plantarum* MF376 mutant suşu, 3 adet *Lb. plantarum* MF556 mutant suşu, 16 adet *P. ethanolidurans* MF229 mutant suşu ve 7 adet *P. ethanolidurans* MF50 mutant suşu ön seçimi yapılmış ve toplamda 44 muhtemel mutant suş denemelere alınmıştır.

Ön seçimi yapılmış olan LAB suşlarının probiyotik özelliklerindeki değişimi belirlemek için pH 2.5 dayanıklılık, safra tuzu dayanım, pepsin-pankreatin dayanımı, kolesterol asimilasyonu, antibiyotik direnci ve yüzey hidrofobisitesi gibi özelliklerinin vitro olarak belirlenmiştir. Gastrik pH dayanım testlerinde en düşük canlılık kaybı MF239 Mix1 mutant

suşunda ölçülmüş ve sırasıyla %91,37 canlılık düzeyi ve Ana suşa göre +27,27 birim canlılık düzeyinde artış sağlanmıştır. Safra tuzu dayanımında en yüksek canlılık artışı *Lb. plantarum* MF376 suşunun MF376 Mix1 mutantında ölçülmüştür ve %51,55 olan Ana suş canlılık düzeyi mutant suşda %76,62 bulunarak +25,07'lik bir canlılık düzeyi artışı sağlanmıştır. Pankreatin enzim dayanımı açısından *P. ethanolidurans* MF50 suşunun mutant MF50 Mix2 suşunda en yüksek pankreatin enzim dayanım artışı sağlanmış olup +14,07'luk bir değer elde edilmiştir. Kloramfenikol antibiyotik direncinde (C30) Ana suşa kıyasla MF239 KUV1 (0 mm zon) ve MF239 EMS2 (0 mm zon) mutant suşlarında tam bir direnç olduğu gözlemlenmiştir. İncelenen probiyotik özelliklerden kolesterol asimilasyon ve yüzey hidroforisite değerlerinde ise bazı mutant suşlarda düşük artışlar yakalanabilmiştir.

Probiyotik özelliklerin belirlenmesinden sonra sonuçlar ışığında pH 2.5 dayanımında önemli aktivite artışı sağlamış olan *Lb. plantarum* MF239 Mix1 mutant suşu, safra tuzu dayanımında aktivite artışı sağlamış olan *Lb. plantarum* MF376 Mix1 mutant suşu ve pankreatin enzim dayanımında aktivite artışı sağlamış olan *P. ethanolidurans* MF50 Mix 2 mutant suşunun RAPD PCR tekniği ile Ana suşlardan genetik farklılıkları ortaya konmuştur. Yapılan çalışmada *Lb. plantarum* MF239 Mix1 ve *Lb. plantarum* MF376 Mix1 mutant suşlarında Ana suşa göre RAPD primer bantlarında farklılıklar gözlemlenmiş ve yaklaşık 5-7 bant farklılığı oluşmuştur. *Lb. plantarum* MF239 Mix1 mutant suşunda OPB08 ve LAB49 primerlerinde, *Lb. plantarum* MF376 Mix1 mutant suşunda ise OPA8, CRA25 ve OPB08 primerlerinden elde edilen bantlarda farklılıklar oluşmuştur. *P. ethanolidurans* MF50 Mix2 mutant suşunun primer bantlarında ise Ana suşa göre farklılık oluşmamıştır.

Mutant laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliklerinde gelişmelerin sağlanması ile, yerel suşların probiyotik starter kültür olarak kullanım potansiyellerinin artırılması sağlanmıştır. Tez kapsamında elde olunan verilerin mutasyon ve probiyotik çalışmalarına bilimsel bilgi birikimine önemli katkılar sağlayacağı ve probiyotik özellikleri geliştirilen suşların starter kültür geliştirme çalışmaları ve bilimsel çalışmalar için biyomateryal olarak kullanılabileceği öngörülmüştür.

6. KAYNAKLAR

- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y. ve Sonomoto, K., 2013. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology advances*, 31(6), 877-902.
- Abosereh, A.N., Soliman, E.A.M. ve El-Khalek, A.B.A., 2006. Mutation Induction for Genetic Improvement of *Saccharomyces boulardii* Which Used as Probiotic Yeast. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 2 (6), 478-482.
- Adebayo-Tayo, B., Ishola, R. ve Oyewunmi, T., 2018. Characterization, antioxidant and immunomodulatory potential on exopolysaccharide produced by wild type and mutant *Weissella confusa* strains. *Biotechnology Reports*, 19, e00271.
- Adrio, J.L. ve Demain, A.L., 2005. Genetic Improvement Of Processes Yielding Microbial Products. *FEMS Microbiol Rev*, 30 (2006), 187–214.
- Agrawal, R., Satlewal, A. ve Verma, A.K., 2012. Development of a b-glucosidase Hyperproducing Mutant By Combined Chemical And UV Mutagenesis. *Biotech*, 3, 381–388.
- Ahmadova, A., Todorov, S. D., Choiset, Y., Rabesona, H., Zadi, T. M., Kuliyeve, A. ve Haertlé, T., 2013. Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Control*, 30(2), 631-641.
- Akkaya, D., 2009. Laktik Asit Bakterilerine (LAB) ait çeşitli susların RAPD-PCR (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile Karakterizasyonu ve Genetik Çeşitliliğin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Al-Awwad, N. J., Haddadin, M. S. ve Tahruri, H. R., 2009. The characteristics of locally isolated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* isolates as probiotics strains. *Jordan J. Agric. Sci*, 5(2), 192-206.
- Arihara, K. ve Itoh, M., 1999. UV-İnduced *Lactobacillus gasseri* Mutants Resisting Sodium Chloride And Sodium Nitrite For Meat Fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 56 (2000), 227–230.
- Bağder Elmacı, S., Tokatlı, M., Dursun, D., Özçelik, F. ve Şanlıbaba, P., 2015. Phenotypic And Genotypic Identification Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Traditional Pickles Of The Çubuk Region in Turkey. *Folia Microbiologica*, 60 (3), 241-251.
- Baker-Austin, C. ve Dopson, M., 2007. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends in microbiology*. 15 (4), 165-171.

- Balcázar, J. L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J. L. ve Girones, O., 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, 278(1-4), 188-191.
- Beckner, M., Ivey, M. L. ve Phister, T. G., 2011. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Letters in applied microbiology*, 53 (4), 387-394.
- Beggs, C. B., 2002. A quantitative method for evaluating the photoreactivation of ultraviolet damaged microorganisms. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1(6), 431-437.
- Behera, S. S., Ray, R. C. ve Zdolec, N., 2018. *Lactobacillus plantarum* with functional properties: an approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. *BioMed Research International*.
- Bhat, T. A., Khan, A. H. ve Parveen, S., 2005. Comparative analysis of meiotic abnormalities induced by gamma rays, EMS and MMS in *Vicia faba* L. *J Indian Bot Soc*, 84, 45-48.
- Bintsis, T., 2018. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS microbiology*, 4 (4), 665.
- Björkroth, K. J. ve Korkeala, H. J., 1996. Evaluation of *Lactobacillus* sake contamination in vacuum-packaged sliced cooked meat products by ribotyping. *Journal of food protection*, 59 (4), 398-401.
- Carr, F.J., Chill, D. ve Maida, N., 2002. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Journal Critical Reviews İn Microbiology*, 28 (4), 281-370.
- Cesur, S. ve Demiröz, A., 2013. Antibiotics and the mechanisms of resistance to antibiotics. *World*, 1, 3.
- Cho, S. S. ve Finocchiaro, T., 2009. Handbook of prebiotics and probiotics ingredients: health benefits and food applications. CRC press.
- Conway, P.L., Gorbach, S.L. ve Goldin, B.R., 1987. Survival Of Lactic Acid Bacteria İn The Human Stomach And Adhesion To İntestinal Cells. *J. Dairy Sci.*, 70, 1-12.
- Cutting, S. M., 2011. Bacillus probiotics. *Food microbiology*, 28(2), 214-220.
- da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J. M. D. ve de Souza Oliveira, R. P., 2014. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 527-536.
- Dash, S. K., 2009. Selection criteria for probiotics. *Indian Dairyman*, 61 (3), 69-73.
- de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Júnior, A. I. M., Thomaz-Soccol, V. ve Soccol, C. R., 2018. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology advances*, 36 (8), 2060-2076.

- Derkx, P.MF., Janzen, T., Sørensen, K.I., Christensen, J.E., Stuer-Lauridsen, B. ve Johansen, E., 2014. The Art Of Strain Improvement Of Industrial Lactic Acid Bacteria Without The Use Of Recombinant DNA Technology. *Microbial Cell Factories*, 13, 5.
- Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M. ve Collins, J. K., 1999. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, 279-292.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S. ve Collins, J. K., 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American journal of clinical nutrition*, 73 (2), 386-392.
- Eisenbrand, G. Engel, K.H., Fink Gremmels, J., Hengstler, J.G., Hofmann, T., Joost, H.G., Knorr, D., Knudsen, I., Kulling, S., Marko, D., Matissek, R., Rietjens, I., Schlatter, J., Schreier, P., Schrenk, D., Steinberg, P. ve Vogel, R.F., 2010. *Microbial Food Cultures*, DFG Senate Commission on Food Safety SKLM.
- Ekinci, M. S., Akyol, I., Ramadan, A. K., Yazdic, F. C. ve Özköse, E., 2018. Molecular identification and partial characterization of *Pediococcus* sp. and *Leuconostoc* sp. isolated from traditionally made dairy products. *KSÜ Doğa Bilişeri Dergisi*, 21 (1), 44-50.
- Elmer, G. W., Macfarland, L. ve Macfarland, M., 2007. *The Power of Probiotics*. Haworth Press, inc., Washington, 1-128.
- FAO/WHO working group, 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. *FAO/WHO Working Group*, 1-11.
- Fleet, G. H., 2011. Yeast spoilage of foods and beverages. In *The yeasts*, 53-63, Elsevier.
- Flibotte, S., Edgley, M. L., Chaudhry, I., Taylor, J., Neil, S. E., Rogula, A. ve Moerman, D. G., 2010. Whole-genome profiling of mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 185(2), 431-441.
- Foligné, B., Dewulf, J., Vandekerckove, P., Pignède, G. ve Pot, B., 2010. Probiotic yeasts: anti-inflammatory potential of various non-pathogenic strains in experimental colitis in mice. *World journal of gastroenterology, WJG*, 16 (17), 2134.
- Fukuoka, M., Niitani, H., Suzuki, A., Motomiya, M., Hasegawa, K., Nishiwaki, Y. ve Masuda, N., 1992. A phase II study of CPT-11, a new derivative of camptothecin, for previously untreated non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology*, 10(1), 16-20.
- García-Díez, J. ve Saraiva, C., 2021. Use of starter cultures in foods from animal origin to improve their safety. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18 (5), 2544.

- Gilliland, S. E., Nelson, C. R. ve Maxwell, C., 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. Applied and environmental microbiology, 49(2), 377-381.
- Gil-Rodríguez, A. M., Carrascosa, A. V. ve Requena, T., 2015. Yeasts in foods and beverages: In vitro characterisation of probiotic traits. LWT-Food Science and Technology, 64 (2), 1156-1162.
- Gitler, C., Rubalcava, B. ve Caswell, A., 1969. Fluorescence changes of ethidium bromide on binding to erythrocyte and mitochondrial membranes. Biochimica et Biophysica Acta, 193, 479-481.
- Goodarzi, A., 2016. UV- Induced Mutagenesis in Lactic Acid Bacteria, International Journal of Genetics and Genomics, 4 (1), 1-4.
- Goraya, A., Asghar, F., Javaid, I. ve Ali, S., 2017. Microbial Strain Improvement For Overproduction Of Industrial Products. IJRDO-Journal of Biological Science. 3(5), 10-29.
- Greene, E. A., Codomo, C. A., Taylor, N. E., Henikoff, J. G., Till, B. J., Reynolds, S. H. ve Henikoff, S., 2003. Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in Arabidopsis. Genetics, 164(2), 731-740.
- Guan, N. ve Liu, L., 2019. Microbial response to acid stress: mechanisms and applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020 (104), 51–65.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B. ve Sanders, M. E. 2014. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nature reviews Gastroenterology & hepatology, 11, 506–514.
- Hong, H. A., Huang, J. M., Khaneja, R., Hiep, L. V., Urdaci, M. C. ve Cutting, S. M., 2008. The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. Journal of applied microbiology, 105 (2), 510-520.
- Hudson, L. E., McDermott, C. D., Stewart, T. P., Hudson, W. H., Rios, D., Fasken, M. B. ve Lamb, T. J., 2016. Characterization of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* in the healthy mucosal immune system. PloS one, 11 (4).
- Hussein, M.A., 2017. Strain Improvement Of *Lactobacillus Plantarum* For Production Of Bacteriocin And Their Purification And Characterization. European Journal of Biotechnology and Bioscience, 5 (5), 59-62.
- Iñiguez-Palomares, C., Pérez-Morales, R. ve Acedo-Félix, E., 2007. Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. Revista Latinoamericana de Microbiología, 49(3-4), 46-54.
- Issa, A. T. ve Tahergorabi, R., 2019. Milk bacteria and gastrointestinal tract: Microbial composition of milk. Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases, 265-275.

- Johansen, E., 2017. Future Access And Improvement Of Industrial Lactic Acid Bacteria Cultures. *Microb Cell Fact*, 16, 230.
- Joshi, V. S. ve Thorat, B. N., 2011. Formulation and cost-effective drying of probiotic yeast. *Drying Technology*, 29(7), 749-757.
- Kenny, D. J., Plichta, D. R., Shungin, D., Koppel, N., Hall, A. B., Fu, B. ve Xavier, R. J., 2020. Cholesterol metabolism by uncultured human gut bacteria influences host cholesterol level. *Cell host & microbe*, 28(2), 245-257.
- Khattab, A.A., Ibrahim, M.I.M. ve El-Kady, A.A., 2016. Ochratoxin A Biosorption Onto Genetically Improved Of *Lactobacillus delbrueckii* mutants. *International Food Research Journal*, 25 (2), 515-522.
- Kimura, M., Danno, K. ve Yasui, H., 2006. Immunomodulatory Function And Probiotic Properties Of Lactic Acid Bacteria Isolated Form Mongolian Fermented Milk. *Bioscience And Microflora*, 25, 147–155.
- Klug, W.S., Spencer, C.A. ve Cummings, M.R., 2011. *Genetik Kavramlar*, 11. Baskı, Ankara, Palme Yayınevi.
- Kosin, B. ve Rakshit, S. K., 2006). Microbial and processing criteria for production of probiotics: a review. *Food Technology and Biotechnology*, 44(3), 371-379.
- Kriaa, A., Bourgin, M., Potiron, A., Mkaouar, H., Jablaoui, A., Gérard, P. ve Rhimi, M., 2019. Microbial impact on cholesterol and bile acid metabolism: current status and future prospects. *Journal of lipid research*, 60 (2), 323-332.
- Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A. ve Yadav, H., 2012. Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Experimental diabetes research*, 14.
- Leroy, F. ve Devuyst, L., 2004. Lactic Acid Bacteria As Functional Starter Cultures For The Food Fermentation Industry. *Trends Food Sci. Technol*, 15, 67–78.
- Li, N., Duan, J., Gao, D., Luo, J., Zheng, R., Bian, Y., Zhang, X. ve Ji, B., 2015. Mutation And Selection Of *Oenococcus Oeni* For Controlling Wine Malolactic Fermentation. *Eur Food Res Technol*, 240, 93–100.
- Lichtenstein, A. H. ve Goldin, B. R., 2004. Lactic acid bacteria and intestinal drug and cholesterol metabolism. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*, (Ed. 3), 507-514.
- Liu, C. H., Wu, K., Chu, T. W. ve Wu, T. M., 2018. Dietary supplementation of probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth performance and disease resistance against *Vibrio alginolyticus* in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Aquaculture International*, 26 (1), 63-74.
- Liu, Y., Tang, H., Lin, Z. ve Xu, P., 2015. Mechanisms of acid tolerance in bacteria and prospects in biotechnology and bioremediation. *Biotechnology advances*, 33(7), 1484-1492.

- Mackill, D. J., 1995. Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers. *Crop Science*, 35 (3), 889-894.
- Maillet, S., 1969. Action mutagène spécifique de trois colorants, sur la mutation reverse d'un gène ProA chez *E. coli* K12. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 269, 1708-1711.
- Mâni-López, E., García, H. S. ve López-Malo, A., 2012. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research International*, 45(2), 713-721.
- Margolles, A., García, L., Sánchez, B., Gueimonde, M., ve de los Reyes-Gavilán, C. G., 2003. Characterisation of a *Bifidobacterium* strain with acquired resistance to cholate a preliminary study. *International Journal of Food Microbiology*, 82 (2), 191-198.
- Masci, E., 2013. Bacteria And Intestinal Health In Adult And Pediatric Population: Moving From The Field Of Alternative Medicine To Evidence-Based Treatment. *International Journal Of Probiotics And Prebiotics*, 8, 1-4.
- Meuth, M. ve Arrand, J. E., 1982. Alterations of gene structure in ethyl methane sulfonate-induced mutants of mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, 2(11), 1459-1462.
- Mishra, V. ve Prasad, D. N., 2005. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International journal of food microbiology*, 103(1), 109-115.
- Morgunov, I. G., Kamzolova, S. V. ve Lunina, J. N., 2013. The citric acid production from raw glycerol by *Yarrowia lipolytica* yeast and its regulation. *Applied microbiology and biotechnology*, 97 (16), 7387-7397.
- Musikasang, H., Tani, A., H-kittikun, A. ve Maneerat, S., 2009. Probiotic Potential Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Chicken Gastrointestinal Digestive Tract. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25(8), 1337-1345.
- Najafi, M.B.H. ve Pezeshki, P., 2013. Bacterial Mutation; Types, Mechanisms And Mutant Detection Methods: A Review. *European Scientific Journal*, 4, 1857 – 7881.
- Nandani, K. ve Thakur, S. K., 2014. Randomly amplified polymorphic DNA-a brief review. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 9(1), 6-13.
- Nemcova, R., 1997. Criteria For Selection Of *Lactobacilli* For Probiotic Use. *Veterinary Medicine (Praha)*, 42 (1), 19-27.
- Noohi, N., Ebrahimipour, G., Rohani, M., Talebi, M. ve Pourshafie, M. R., 2016. Evaluation of potential probiotic characteristics and antibacterial effects of strains of *Pediococcus* species isolated from broiler chickens. *British poultry science*, 57 (3), 317-323.

- Özalpar, B., 2018. Proteazın üretimini arttırmak için kimyasal mutagenез (Etidyum bromid, EtBr) ve fiziksel mutagenез (UV) yoluyla *Bacillus subtilis* E6-5'den mutant suş geliştirilmesi ve üretim ortamının optimizasyonu (Yüksek Lisans Tezi) Bursa Uludağ Üniversitesi, Bursa.
- Pandey, K.R., Shinde, P.S. ve Vakil, B.V., 2015. Evaluation Of Molecular Variations İn Probiotic *Bacillus coagulans* and İts Bacteriophage Resistant Mutants. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 4 (4), 343-35.
- Papagianni, M. ve Anastasiadou, S., 2009. Pediocins: The bacteriocins of Pediococci. Sources, production, properties and applications. Microbial cell factories, 8 (1), 1-16.
- Pathak, S.S., Sandhu, S.S. ve Rajak, R.J., 2015. Mutation Studies On Fungal Glucoamylase: A Review. International Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 5 (2), 297-308.
- Peng, K., Koubaa, M., Bals, O. ve Vorobiev, E., 2020. Recent insights in the impact of emerging technologies on lactic acid bacteria: A review. Food research international, 137, 109544.
- Peng, K., Koubaa, M., Bals, O. ve Vorobiev, E., 2020. Recent insights in the impact of emerging technologies on lactic acid bacteria: A review. Food research international, 137, 109544.
- Pereira, D. I. ve Gibson, G. R., 2002. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. Applied and environmental microbiology, 68(9), 4689-4693.
- Perez, P.F., Minnaard, Y., Disalvo, E.A. ve de Antoni, G.L., 1998. Surface Properties Of Bifidobacterial Strains Of Human Origin. Applied And Environmental Microbiology, 64, 21–26
- Pessione, E., 2012. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. Frontiers in cellular and infection microbiology, 2, 86.
- Pfeiler, E. A. ve Klaenhammer, T. R., 2007. The genomics of lactic acid bacteria. Trends in microbiology, 15 (12), 546-553.
- Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F. ve Matuchansky, C., 2005. Bifidobacteria as probiotic agents—physiological effects and clinical benefits. Alimentary pharmacology & therapeutics, 22 (6), 495-512.
- Pradhan, D., Mallappa, R.H. ve Grover, S., 2019. Comprehensive Approaches For Assessing The Safety Of Probiotic Bacteria. Food Control, 108, 106872.
- Pradhan, D., Mallappa, R.H. ve Grover, S., 2019. Comprehensive Approaches For Assessing The Safety Of Probiotic Bacteria. Food Control, 108, 106872.

- Pullman, A. ve Pullman, B., 1963. On the mechanism of ultraviolet-induced mutations. *Biochimica et Biophysica Acta* (Netherlands), 75.
- Qian, Q., Hong, C., Zongxiu, S. ve Lihuang, Z., 1996. The study on determining true and false hybrid rice II you 63 using RAPD molecular markers. *Chinese Journal of Rice Science*, 10(4), 241.
- Radha, S., Babu, R. H., Sridevi, A., Prasad, N. B. L. ve Narasimha, G., 2012. Development of mutant fungal strains of *Aspergillus niger* for enhanced production of acid protease in submerged and solid state fermentation. *European Journal of Experimental Biology*, 2 (5), 1517-1528.
- Rafi, S., Kamili, A. N., Ganai, B. A., Mir, M. Y. ve Parray, J. A., 2016. Morpho-biochemical evaluation of EMS regenerated mutants of *Bergeia ciliata* (Haw.) Sternb. under in Vitro conditions. *Journal of nature and natural sciences*, 1(01), 1-4.
- Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Adams, M. C. ve Baines, S. K., 2014. Effect of dairy probiotic combinations on in vitro gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell adhesion and cytokine secretion. *Journal of Functional Foods*, 8, 18-25.
- Revin, V., Atykyan, N., Lyovina, E., Dragunova, Y. ve Ushkina, V., 2017. Effect Of Ultraviolet On Physiological And Biochemical Properties Of Yeast *Saccharomyces cerevisiae* During Fermentation Od Ultradispersed Starch Raw Material. *Electronic Journal of Biotechnology*, 31, 61-66.
- Ripert, G., Racedo, S. M., Elie, A. M., Jacquot, C., Bressollier, P. ve Urdaci, M. C., 2016. Secreted compounds of the probiotic *Bacillus clausii* strain O/C inhibit the cytotoxic effects induced by *Clostridium difficile* and *Bacillus cereus* toxins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60 (6), 3445-3454.
- Rodríguez, H., Curiel, J.A., Landete, J.M., Rivas, B., Felipe, F.L., Gómez-Cordovés, C. ve Mancheño, J.M., 2009. Food Phenolics And Lactic Acid Bacteria, *International Journal Of Food Microbiology*, 132, 79-90.
- Rohwerder, T., Gehrke T., Kinzler, K. ve Sand, W., 2003. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: Fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, 239- 248.
- Rudel, L. L. ve Morris, M. D., 1973. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. *Journal of Lipid Research*, 14 (3), 364-366.
- Ruiz, L, Margolles, A. ve Sanchez, B., 2013. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Frontiers in Microbiology*, 4 (396), 1-8.
- Russell, D. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. ve Stanton, C., 2011. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International journal of food microbiology*, 149 (1), 88-105.
- Saeed A, H. ve Salam A, I., 2013. Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*, 2013 (4), 23-87.

- Salminen, S. ve Wright, A., 1998. Lactic Acid Bacteria, Microbiology And Functional Aspects. Marcel Dekker Inc., New York, 1-73.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. ve Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Saravanan, S., Kalanthoden, A.N., Karthikayan, R., Kavitha, M. ve Rani, S.K., 2017. Improvement Of Invertase Synthesis By The Mutant *Saccharomyces cerevisiae* Through UV Mutagenesis. Universal Journal of Microbiology Research, 5 (2), 17-24.
- Serrat, X., Esteban, R., Guibourt, N., Moysset, L., Nogués, S. ve Lalanne, E., 2014. EMS mutagenesis in mature seed-derived rice calli as a new method for rapidly obtaining TILLING mutant populations. Plant methods, 10(1), 1-14.
- Shah, D., Kamili, A. N., Wani, A. A., Nazir, N., Sajad, N., Khan, I. ve Shah, S., 2016. Mutagenic action of ethyl methane sulphonate (EMS): A review. J. Res. Dev. (Srinagar), 16, 63-68.
- Shewale, R. N., Sawale, P. D., Khedkar, C. D. ve Singh, A., 2014. Selection criteria for probiotics: a review. International Journal of Probiotics & Prebiotics, 9 (1/2), 17.
- Shinde, S. A., Chavhan, S. A., Sapkal, S. B. ve Shrikhande, V. N., 2018. Recombinant DNA Technology and its Applications: A Review. International Journal of MediPharm Research. 04 (02), 79-88
- Sikora, P., Chawade, A., Larsson, M., Olsson, J. ve Olsson, O., 2011. Mutagenesis as a tool in plant genetics, functional genomics, and breeding. International journal of plant genomics, 2011.
- Singh, J., Birbian, N., Sinha, S. ve Goswami, A., 2014. A critical review on PCR, its types and applications. Int J Adv Res Biol Sci, 1 (7), 65-80.
- Singh, V., Ganger, S. ve Patil, S., 2020. Characterization of *Lactobacillus brevis* with potential probiotic properties and biofilm inhibition against *Pseudomonas aeruginosa*. In Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings, 66 (1), 14.
- Sobrun, Y., Bhaw-Luximon, A., Jhurry, D. ve Puchooa, D., 2012. Isolation Of Lactic Acid Bacteria From Sugar Cane Juice And Production Of Lactic Acid From Selected Improved Strains, Advances in Bioscience and Biotechnology, 3, 398-407.
- Sorokulova, I. B., Pinchuk, I. V., Denayrolles, M., Osipova, I. G., Huang, J. M., Cutting, S. M. ve Urdaci, M. C., 2008. The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use. Digestive diseases and sciences, 53 (4), 954-963.
- Stiles, M. E. ve Holzapfel, W. H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International journal of food microbiology, 36 (1), 1-29.

- Sudi, I. Y., De, N. ve Ali-Dunkrah, U., 2008. Mutagenesis and selection of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* for potential use as starter culture. *Journal of American Sciences*, 4(3), 80-87.
- Suleiman, A.M., 2019. *Microbial Starter Cultures*. LAP LAMBERT Academic Publishing, 1, Mauritius.
- Syed, Q., Nadeem, M. ve Nelofer, R., 2008. Enhanced Butanol Production by Mutant Strains of *Clostridium acetobutylicum* in Molasses Medium. *Türk Biyokimya Dergisi (Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem)*, 33 (1), 25-30.
- Tambekar, D.H. ve Bhutada, S.A., 2010. Acid And Bile Tolerance, Antibacterial Activity, Antibiotic Resistance And Bacteriocins Activity Of Probiotic *Lactobacillus* Species. *Recent Research In Science And Technology*, 2 (4), 94-98.
- Tarhan, G., 2019. Membrane Receptors: The Basic Structure and Functions. *System*. 5 (3), 458-463.
- Taskila, S., 2017. Industrial production of starter cultures. *Starter cultures in food production*, 79-100.
- Tegin, R.A.A. ve Gönülalan, N., 2014. Bütün Yönleriyle Doğal Fermente Ürün, Kımız. *Manas, Journal Of Engineering*, 2(1), 23-34.
- Thirabunyanon, M., Boonprasom, P. ve Niamsup, P., 2009. Probiotic Potential Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Fermented Dairy Milks On Antiproliferation Of Colon Cancer Cells, *Biotechnology Section, Faculty of Science, Maejo University, Thailand, Biotechnol Lett*, 31 (4), 571-576.
- Tok, E. ve Aslım, B., 2007. Probiyotik olarak kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyonu ve safra tuzları dekonjugasyonundaki rolleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 37(1), 62-68.
- Tokatlı, M., 2013. Ankara Çubuk Yöresi Turşularından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmaları, Teknolojik ve Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi ve Starter Olarak Kullanılma Olanaklarının Değerlendirilmesi. (Doktora Tezi). Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Tokatlı, M., Arık, G., Bağder Elmacı, S., Arslankoz İşleyen, N. ve Özçelik, F., 2015. In Vitro Properties of Potential Probiotic Indigenous Lactic Acid Bacteria Originating from Traditional Pickles, *BioMed Research International*, 2015, 1–8.
- Tokatlı, M., Bağder Elmacı, S., Arslankoz İşleyen, N. ve Özçelik, F., 2017. Technological Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated From Traditional Pickles, *Gıda*, 42 (6), 693–707.
- Tokatlı, M., Dursun, D., Arslankoz, N., Şanlıbaba, P. ve Özçelik, F., 2012. Turşu Üretiminde Laktik Asit Bakterilerinin Önemi. *Akademik Gıda*, 10 (1), 70-76.

- Tomchick, R. ve Mandel, H.G., 1964. Biochemical effects of ethidium bromide in microorganisms. *Microbiology*, 36, 225-236.
- Tribst, A. A., Franchi, M. A. ve Cristianini, M., 2008. Ultra-high pressure homogenization treatment combined with lysozyme for controlling *Lactobacillus brevis* contamination in model system. *Innovative food science & emerging technologies*, 9(3), 265-271.
- Tribst, A. A., Franchi, M. A. ve Cristianini, M., 2008. Ultra-high pressure homogenization treatment combined with lysozyme for controlling *Lactobacillus brevis* contamination in model system. *Innovative food science & emerging technologies*, 9 (3), 265-271.
- Verma, N., Bansal, M. C. ve Kumar, V., 2008. Protoplast fusion technology and its biotechnological applications. *Chem Eng Trans*, 14, 113-120.
- Walker, D. K. ve Gilliland, S. E., 1993. Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of dairy science*, 76(4), 956-961.
- Waring, M.J., 1966. Structural requirements for the binding of ethidium to nucleic acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 114, 234-244.
- Wood, B.J.B. ve Holzapfel, W.H., 1995. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Springer US, Boston, MA.
- Yang, Y., Zhang, S., Xu, A. L., Zou, L. H., Li, L. ve Qiu, G. Z., 2010. UV-induced mutagenesis and bioleaching of *Acidiphilium cryptum* and *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Central South University (Science and Technology)*, 41(2), 393-399.
- Yavuzdurmaz, H., 2007. Isolation, Characterization, Determination Of Probiotic Properties Of Lactic Acid Bacteria From Human Milk, Master Thesis. İzmir Institute Of Technology, 69.
- Yu, M., Yurong, S., Wei, X., Yang, Y., Zhou, Y., Hao, X., Zhang, N. ve Niu, R., 2007. Depletion of mitochondrial DNA by ethidium bromide treatment inhibits the proliferation and tumorigenesis of T47D human breast cancer cells. *Toxicology Letters*, 170, 83-93.
- Zommiti, M., Bouffartigues, E., Maillot, O., Barreau, M., Szunerits, S., Sebei, K. ve Ferchichi, M., 2018. In vitro assessment of the probiotic properties and bacteriocinogenic potential of *Pediococcus pentosaceus* MZF16 isolated from artisanal Tunisian meat “Dried Ossban”. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2607.