



**TÜRKİYE’NİN FARKLI YÖRELERİNDEN TOPLANAN  
BEYAZ PEYNİR ÖRNEKLERİNDEN LAKTİK ASİT  
BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU  
ve MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**Sumeyya ARSLAN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Mikrobiyoloji Bilim Dalı**

**Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL**

**2017**

**Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TÜRKİYE’NİN FARKLI YÖRELERİNDEN TOPLANAN BEYAZ  
PEYNİR ÖRNEKLERİNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN  
İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU ve MOLEKÜLER  
KARAKTERİZASYONU**

**Sumeyya ARSLAN**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI  
Mikrobiyoloji Bilim Dalı**

**ERZURUM  
2017**

**Her hakkı saklıdır**



**T.C.**  
**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ**  
**Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü**



**TEZ ONAY FORMU**

**TÜRKİYE' NİN FARKLI YÖRELERİNDEN TOPLANAN BEYAZ PEYNİR  
ÖRNEKLERİNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU,  
İDENTİFİKASYONU ve MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında, Sumeyya ARSLAN tarafından hazırlanan bu çalışma, 18.01.2017.. tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza :

Üye : Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun 02.02/2017 tarih ve ..05.../..58..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Cavit KAZAZ**  
**Enstitü Müdürü**

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### TÜRKİYE’NİN FARKLI YÖRELERİNDEN TOPLANAN BEYAZ PEYNİR ÖRNEKLERİNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Sumeyya ARSLAN

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı  
Mikrobiyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Laktik asit bakterileri (LAB) karbonhidrat metabolizmasının ana fermentasyon ürünlerinden biri olan laktik asiti üreten oldukça değerli mikroorganizmalardır. LAB genellikle besin içeriği zengin olan ortamlarda ve özellikle de süt ürünleri, et ve sebzelerde yaygın bir şekilde bulunurlar. Bu bilgiden yola çıkılarak, tez çalışmamızda Erzurum başta olmak üzere birçok farklı yöreden beyaz peynir örnekleri toplanarak laktik asit bakterilerinin izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler karakterizasyonu gerçekleştirildi. Sonuçta; *Lactobacillus kefir*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. paracasei*, *Pediococcus lolii*, *Prolinoborus fasciculus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Lysnibacillus sinduriensis*, *P. parvulus*, *L. paraplantarum*, *Staphylococcus hominis*, *L. buchneri*, *L. plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Micrococcus yunnanensis*, *Microbacterium paraoxydans* ve *Rothia dentocariosa* türlerine ait 42 adet bakteriyel izolat elde edildi. Bu amaçla ilk önce; bakterilerin gelişme gösterdikleri sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyon aralıkları belirlendi. İzole edilen bakterilerin büyük bölümünün 30-45°C’de, 3-6 pH’da ve %2-%8 tuz konsantrasyon değerlerinde gelişim gösterdikleri tespit edildi. Daha sonra test izolatları API, 16S rRNA gen analizi ve rep-PCR yöntemleri kullanılarak incelendi. Sonuç olarak, genomik parmak izi analiz yöntemlerinden (GTG)<sub>5</sub>-PCR’ın, BOX-PCR’a göre suşların ayrımında daha başarılı olduğu gözlemlendi. 16S rRNA sekans analiz verilerine göre ise; MA56 suşunun %98 oranında *L. buchneri*’ye, MA13 suşunun yine aynı oranda *E. faecium*’a ve MA27 suşunun ise %97 oranında *E. faecium*’a benzerlik gösterdiği ve bu üç izolatin yeni tür olabileceği sonucuna varılmıştır.

2017, 104 Sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Peynir, izolasyon, laktik asit bakterileri, API, 16S rRNA, genomik parmak izi analizi

## ABSTRACT

Master Thesis

### ISOLATION, IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA COLLECTED FROM DIFFERENT REGIONS OF TURKEY WHITE CHEESE SAMPLES

Sumeyya ARSLAN

Ataturk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Molecular Biology and Genetics  
Department of Microbiology

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Lactic acid bacteria (LAB) are highly valuable microorganisms that produce lactic acid, one of the main fermentation products of carbohydrate metabolism. LAB are commonly found in food-rich environments, particularly in dairy products, meat and vegetables. With this knowledge in our thesis work, isolation, identification and molecular characterization of lactic acid bacteria were carried out by collecting various samples of white cheese from many different localities, especially Erzurum. Eventually, 42 bacterial isolate were obtained belonging to *Lactobacillus kefir*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. paracasei*, *Pediococcus lolii*, *Prolinoborus fasciculus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Lysinibacillus sinduriensis*, *P. parvulus*, *L. paraplantarum*, *Staphylococcus hominis*, *L. buchneri*, *L. plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Micrococcus yunnanensis*, *Microbacterium paraoxydans* and *Rothia dentocariosa*. For this purpose; temperature, pH and salt concentration ranges at which the bacteria developed were firstly determined. Most of the isolated bacteria were identified to develop at 30-45°C, 3-6 pH and 2-8% salt concentration values. The test isolates were then examined using API, 16S rRNA gene analysis and rep-PCR methods. Consequently, it has been observed that (GTG)<sub>5</sub>-PCR from genomic fingerprint analysis methods is more successful than BOX-PCR in discriminating strains. According to the 16S rRNA sequence analysis data; it was concluded that of MA56 strain was similar to *L. buchneri* at a rate of 98%, MA13 strain was similar to *E. faecium* at same rate and MA27 strains was similar to *E. faecium* at a rate of 98% and these three isolates could be new species.

**2017, 104 Pages**

**Keywords:** Cheese, isolation, lactic acid bacteria, API, 16S rRNA, genomic fingerprint analysis

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca her türlü laboratuvar imkânını sağlayan, Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, tez dönemim boyunca değerli fikirlerini paylaşan hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e ve değerli eşi Sayın Doç. Dr. Gülşah ADIGÜZEL'e

Tez çalışmam boyunca her türlü sevinç ve üzüntümü paylaştığım, gerek laboratuvar çalışmalarında gerekse tez yazım aşamasında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Şeyda Nur ÇAKIR, Sayın Yeliz DEMİR ve Sayın Aslıhan BASTEM'e,

Yine tez çalışması aşamasında hem laboratuvar çalışmalarında hem de tez yazımında yardım ve bilgilerini esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Mustafa Özkan BALTACI'ya

Tez yazım aşamasında dua, destek ve sabırlarını hiçbir zaman esirgemeyen eşim Abdussamed AKBULUT'a

Ayrıca tüm hayatım boyunca maddi ve manevi hiçbir fedakarlık ve destekten kaçınmayan, dualarını her daim hissettiğim babam merhum Mürsel ARSLAN'a, annem Emine ARSLAN'a, kardeşlerim Abdussamed ARSLAN, Muhammed Sefa ARSLAN ve Selim ARSLAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

**Sumeyya ARSLAN**

**Ocak, 2017**

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ÖZET.....                                                                                                      | i         |
| ABSTRACT.....                                                                                                  | ii        |
| TEŞEKKÜR.....                                                                                                  | iii       |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....                                                                           | vi        |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                                                           | vii       |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                                                        | viii      |
| <b>1. GİRİŞ.....</b>                                                                                           | <b>1</b>  |
| 1.1. Peynir.....                                                                                               | 2         |
| 1.2. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri .....                                                        | 4         |
| 1.2.1. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal özellikleri.....                                              | 7         |
| 1.2.2. Laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak kullanılmaları .....                                       | 9         |
| 1.3. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması .....                                                        | 11        |
| 1.4. Önemli Laktik Asit Bakterileri.....                                                                       | 13        |
| 1.4.1. Lactobacillus .....                                                                                     | 13        |
| 1.4.2. Lactococcus .....                                                                                       | 15        |
| 1.4.3. Enterococcus .....                                                                                      | 15        |
| 1.4.5. Pediococcus .....                                                                                       | 16        |
| 1.4.6. Streptococcus.....                                                                                      | 16        |
| 1.5. Laktik Asit Bakterilerinin Tanılanması .....                                                              | 17        |
| 1.6. Tanılamada Kullanılan Başlıca Genotipik Yöntemler .....                                                   | 18        |
| 1.6.1. 16S rRNA dizi analizi .....                                                                             | 18        |
| 1.6.2. Restriction fragment length polymorphism-restriksiyon fragment<br>uzunluk polimorfizmi (RFLP-PCR) ..... | 21        |
| 1.6.3. Genomik parmak izi analizi .....                                                                        | 22        |
| 1.6.4. Filogenetik analiz .....                                                                                | 23        |
| <b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>                                                                                | <b>25</b> |
| <b>3. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>                                                                             | <b>29</b> |
| 3.1. Materyal.....                                                                                             | 29        |
| 3.1.1. Kimyasallar .....                                                                                       | 29        |

|                                                                                              |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1.2. Tez kapsamında kullanılan materyal ve cihazlar .....                                  | 30        |
| 3.1.3. Tez kapsamında yapılan deneylerde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı .....           | 31        |
| 3.1.4. Tez kapsamında yapılan deneylerde kullanılan besiyerlerinin hazırlanışı .....         | 32        |
| 3.2. Yöntem .....                                                                            | 33        |
| 3.2.1. Örnek Toplanması .....                                                                | 33        |
| 3.2.2. Laktik asit bakterilerinin izolasyonu .....                                           | 33        |
| 3.2.3. Seçilen izolatların klasik yöntemlerle tanılarının yapılması .....                    | 34        |
| 3.2.3.a. Morfolojik özelliklerinin belirlenmesi.....                                         | 34        |
| 3.2.3.b. Fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi .....                                        | 36        |
| 3.2.3.c. Biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi .....                                      | 37        |
| 3.2.4. Seçilen izolatların moleküler yöntemlerle tanılarının yapılması.....                  | 38        |
| 3.2.4.a. API test kiti kullanılarak laktik asit bakterilerinin tanısı .....                  | 38        |
| 3.2.4.b. 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması .....                                           | 39        |
| 3.2.5. Rep-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi .....                  | 48        |
| 3.2.5.a. BOX-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi.....                 | 48        |
| 3.2.5.b. (GTG) <sub>5</sub> -PCR Yöntemiyle Bakterilerin Gen Profillerinin Belirlenmesi..... | 50        |
| <b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>                                                          | <b>52</b> |
| 4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu .....                                             | 52        |
| 4.2. Seçilen İzolatların Klasik Yöntemlerle Tanılarının Yapılması .....                      | 53        |
| 4.2.1. Morfolojik özelliklerinin belirlenmesi .....                                          | 53        |
| 4.2.2. Fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi .....                                          | 60        |
| 4.2.3. Biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.....                                         | 65        |
| 4.2.4. Seçilen izolatların moleküler yöntemlerle tanılarının yapılması.....                  | 68        |
| 4.2.4.a. API test kiti kullanılarak laktik asit bakterilerinin tanısı .....                  | 68        |
| 4.2.4.b. 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması .....                                           | 79        |
| 4.2.5. Rep-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi .....                  | 91        |
| 4.2.5.a. BOX-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi.....                 | 91        |
| 4.2.5.b. (GTG) <sub>5</sub> -PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi..... | 92        |
| <b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>                                                            | <b>94</b> |
| KAYNAKLAR .....                                                                              | 99        |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                               | 105       |

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

|         |                                                |
|---------|------------------------------------------------|
| dk      | : Dakika                                       |
| DMSO    | : Dimetil Sülfoksit                            |
| DNA     | : Deoksiribonükleik Asit                       |
| dNTP    | : Deoksinükleotittrifosfat                     |
| gr      | : Gram                                         |
| IPTG    | : İzopropil $\beta$ -D-1- tiyogalaktopiranosid |
| KI      | : Potasyum iyodit                              |
| KOH     | : Potasyum hidroksit                           |
| L       | : Litre                                        |
| M       | : Molar                                        |
| Mm      | : Milimolar                                    |
| NaCl    | : Sodyum klorür                                |
| PCR     | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu                  |
| rep-PCR | : Genomik Parmak İzi Analiz Yöntemi            |
| RNA     | : Ribonükleik Asit                             |
| RNaz    | : Ribonükleaz Enzimi                           |
| rRNA    | : Ribozomal Ribonükleik Asit                   |
| $\mu$ g | : Mikrogram                                    |
| $\mu$ l | : Mikrolitre                                   |
| $\mu$ M | : Mikromolar                                   |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. Laktik asit fermantasyon mekanizması .....                                                                                                                                                                 | 5  |
| Şekil 1.2. Probiyotiklerin etki mekanizması .....                                                                                                                                                                     | 10 |
| Şekil 4.1. MA 34 ve MA 56 bakterilerine ait petri görüntüleri .....                                                                                                                                                   | 53 |
| Şekil 4.2. MA 34 bakterisine ait gram boyama görüntüsü .....                                                                                                                                                          | 57 |
| Şekil 4.3. MA 9 bakterisine ait endospor boyama görüntüsü .....                                                                                                                                                       | 58 |
| Şekil 4.4. MA 47 ve MA 51 bakterilerine ait hareketlilik testi sonuçları.....                                                                                                                                         | 60 |
| Şekil 4.5. MA 27, MA 47 ve MA 33 izolatlarına ait gaz üretim testi sonucu .....                                                                                                                                       | 68 |
| Şekil 4.6. Laktik asit bakterilerinin identifikasyonunda kullanılan API test kiti<br>sonucu .....                                                                                                                     | 79 |
| Şekil 4.7. Çeşitli izolatlara ait genomik DNA'ların jel görüntüsü.....                                                                                                                                                | 80 |
| Şekil 4.8. Çeşitli izolatlara ait 16S rRNA gen bölgesinin jel görüntüsü .....                                                                                                                                         | 80 |
| Şekil 4.9. Mavi beyaz koloni örnek görüntüsü .....                                                                                                                                                                    | 81 |
| Şekil 4.10. Bazı izolatların koloni PCR görüntüleri .....                                                                                                                                                             | 82 |
| Şekil 4.11. Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanan beyaz beynir örneklerinden<br>izole edilen laktik asit bakterilerinin 16S rRNA gen analiz sonuçları<br>temel alınarak oluşturulmuş olan Neighbour-Joining ..... | 85 |
| Şekil 4.12. Çeşitli izolatlara ait BOX-PCR bant profilleri.....                                                                                                                                                       | 92 |
| Şekil 4.13. Çeşitli izolatlara ait (GTG) <sub>5</sub> -PCR bant profilleri.....                                                                                                                                       | 93 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 1.1. Probiyotik ürünlerin sahip olması gereken özellikler .....                                     | 10 |
| Çizelge 1.2. Ticari olarak satılan bazı probiyotik ürünler .....                                            | 10 |
| Çizelge 1.3. Önemli laktik asit bakteri cinslerine ait özellikler .....                                     | 17 |
| Çizelge 1.4. 16S rRNA dizi analizinde kullanılan primerler .....                                            | 20 |
| Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan kimyasal maddeler ve kitler.....                                     | 29 |
| Çizelge 3.2. Tez kapsamında yapılan çözeltiler ve hazırlanışları.....                                       | 31 |
| Çizelge 3.3. Tez kapsamında kullanılan besiyerlerinin hazırlanışı.....                                      | 32 |
| Çizelge 3.4. 16S rRNA PCR işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları .....                    | 42 |
| Çizelge 3.5. 16S rRNA PCR işlemi için optimize edilmiş PCR sıcaklık döngüsü.....                            | 43 |
| Çizelge 4.1. Laktik asit bakteri suşları ve izole edildiği yöreler.....                                     | 52 |
| Çizelge 4.2. İzolatlara ait morfolojik özellikler .....                                                     | 54 |
| Çizelge 4.3. İzolatlara ait gram boyama sonuçları.....                                                      | 55 |
| Çizelge 4.4. İzolatlara ait hareketlilik testi sonuçları.....                                               | 58 |
| Çizelge 4.5. İzolatların gelişebildikleri tuz konsantrasyon aralığı(%).....                                 | 61 |
| Çizelge 4.6. İzolatların gelişme gösterdikleri sıcaklık değerleri.....                                      | 62 |
| Çizelge 4.7. İzolatların gelişme gösterdikleri pH aralığı .....                                             | 64 |
| Çizelge 4.8. İzolatların gaz üretim potansiyelleri .....                                                    | 66 |
| Çizelge 4.9. API sonuçlarına göre tanımlanan laktik asit bakterileri .....                                  | 69 |
| Çizelge 4.10. API sonuçlarına göre tanımlanan laktik asit bakterilerinin kullandığı karbon kaynakları ..... | 70 |
| Çizelge 4.11. Dizi analizi sonucu belirlenen bakteriler ve benzerlik oranları .....                         | 83 |
| Çizelge 4.12. İzolatların Eztaxon verilerine göre benzerlik yüzdeleri.....                                  | 86 |

## 1. GİRİŞ

Mikrobiyolojide fermentasyon, mikroorganizmalar tarafından serbest oksijenin veya nitrat (NO<sub>3</sub>), sülfat (SO<sub>4</sub>) gibi inorganik bileşiklerde bulunan oksijenin kullanılmasıyla ürün bileşimindeki maddelerin katabolik olarak yıkılmasıdır (Özer 2012).

Fermentasyon tekniği geçmiş yıllardan bu yana uygulanan bir yöntem olup gıdaların hem üretiminde hem korunmasında oldukça etkili bir yöntem haline gelmiştir (Pamir 1985).

Fermentasyon tekniğinde anaerobik koşullarda şekerlerden alkol ve asit üretimi gerçekleşir. Yani bu yöntemle karbonhidratlar alkol ve asite dönüşür. Ayrıca fermentasyon tekniği ile bir mikroorganizmanın gelişimi sağlanabilirken aynı zamanda ekşi gıdalarda laktik asit gelişimi sağlanarak gıda güvenliği gerçekleşmiş olur (Hayaloğlu and Güven 2002).

Fermentasyon sonucu üretilen gıdalar arasında önemli bir geçmişe ve öneme sahip olan en önemli gıdalar fermente süt ürünleridir. Fermente süt ürünleri sütün özellikle laktik asit bakterileri tarafından fermente edilmesi sonucu elde edilen ürünlerdir. Mikrobiyolojik olarak oldukça büyük öneme sahip olan fermente süt ürünleri arasında peynir, yoğurt, tereyağı, kefir ve kıymaz gibi ürünler oldukça önemli bir yere sahiptir. Ayrıca fermente süt ürünleri içeriklerinde bulunan protein, laktoz, yağ, mineral maddeler ve vitaminler bakımından oldukça zengin bir besin içeriğine sahiptir. Mikrofolara olarak içerdikleri laktik asit bakterileri bu ürünlere kendine has aroma, koku ve yapı kazandırmaktadır (Sağdıç *et al.* 2002).

Fermente süt üretiminde spesifik organizmalar tarafından sütün pH'sı düşürülür ve koagülasyonu sağlanır. Süt ürünü ısıl işlem görmediği sürece spesifik mikroorganizmalar bu ürünler içerisinde canlılığını korur (İşleroğlu and Yıldırım 2008).

Besin değeri oldukça yüksek olan fermente süt ürünleri geçmişte doğal fermantasyon ile yapılırken günümüzde güdümlü fermantasyona geçiş söz konusudur. Ülkemizin de içinde bulunduğu ılıman kesimlerde fermantasyon daha hızlı gerçekleşmektedir. Fermantasyonun oldukça etkili ve önemli ölçüde ilerlediği ülkemizde mikrobiyolojik olarak büyük öneme sahip olan fermente süt ürünleri bulunmaktadır. Bunlardan en çok tüketilen ve mikroflora olarak da en zengin grubu içeren fermente süt ürünü peynirdir (Turantaş 2003).

### **1.1. Peynir**

Peynir besin değerinin zengin olması hem de toplumun gelişen damak zevki ve isteklerine yanıt verebilmesi bakımından çok değerli ve çeşitli bir süt ürünüdür (Koçak 1994).

Peynir, sütün uygun bir proteolitik enzim veya organik asitlerin etkisi ile pıhtılaştırılıp pıhtının çeşitli şekillerde işlenmesi, süzülmesi, baskılanması ve belli koşullarda olgunlaştırılmasıyla elde edilen besin değeri yüksek bir süt ürünüdür (Erkmen 2010).

Peynir hazırlanırken süt ön işleme tabi tutulduktan sonra laktik asit bakterileri devreye girer ve ardından ön olgunlaştırma aşamasından sonra proteolitik enzimler ilave edilir. Proteolitik enzimlerle süt proteini olan kazein parçalanır ve çözünmez hale gelir. Böylece pıhtı oluşumu gerçekleşir. Peynire işlenecek sütün pastörize edilmesi patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaları ortamdan uzaklaştırmanın yanı sıra, asitlik artışını ve peynirin olgunlaşmasını sağlayacak olan laktik asit bakterilerinin de önemli bir kısmının ortadan kalkmasına sebep olur (Tekinşen and Atasever 1993; Erkmen 2010).

Peynire özgün tat ve aromayı veren etken, pastörizasyon ile yitirilen laktik asit bakterilerinin saf kültür olarak katılmasıdır (Bulut 2003).

Mikroorganizmalar süt ürünlerine arzu edilen tat ve aromayı verdikleri gibi aynı zamanda bozulmalara da sebep olmaktadır. Örneğin; iğ sütten hazırlanan peynirlerde gaz oluşturan mikroorganizmalar kötü aromaya hem de oluşan gaz nedeniyle pıhtı yapısında bozulmalara sebep olur. *Bacillus* türleri peynirlerde gaz oluşumuna sebep olmaktadır (Arıcı and Demirci 1999; Cinbaş and Kılıç 2005).

Dünyada 1000'den fazla peynir çeşidinin bulunduğu bilinmektedir. Ülkemizde ise peynir çeşidi olarak en çok beyaz peynir, kaşar peyniri ve tulum peyniri üretilmektedir (elik and zdemir 1998).

Yapılan bu tez çalışmasında ise fermente süt ürünlerinden olan peynirin önemli bir çeşidi incelenmiştir. Bu peynir türü beyaz peynirdir. Tez çalışmasında çeşitli yörelerden beyaz peynir ürünleri toplanmış ve mikroflorası detaylı olarak incelenmiştir (Göncü and AlpKent 2005; Dağdemir 2006).

Beyaz peynirin mikroflorası incelendiğinde *Lactococcus lactis*'in baskın tür olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından bilinmektedir. Bu mikroorganizmalar özellikle peynirin olgunlaşmasının ilk aşamalarında daha belirgindir. Peynirde ikinci en önemli tür olarak bildirilen mikroorganizmalar *Enterococcus faecalis* ve *E. faecium*'dur. Peynir florasında ayrıca *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *Leuconostoc lactis* ve *Leu. mesenteroides ssp. dextranicum* türleridir (Karakuş et al. 1992; Grsel et al. 2003).

Peynirin olgunlaşması sırasında olgunlaşma ilerledikçe mikroflorada değişiklikler gözlemlenir. Olgunlaşma ilerledikçe *Lactococcus* türlerinde azalma, *Lactobacillus* türlerinin sayısında ise artma görülmektedir. Olgunlaşmanın sonlarına doğru peynir mikroflorasında *L. casei* ve *L. plantarum* türlerinin baskın türler olduğu saptanmıştır (Kavas et al. 2004; ner et al. 2006).

Peynirde bulunan başlıca organizmalar (Randazzo *et al.* 2009):

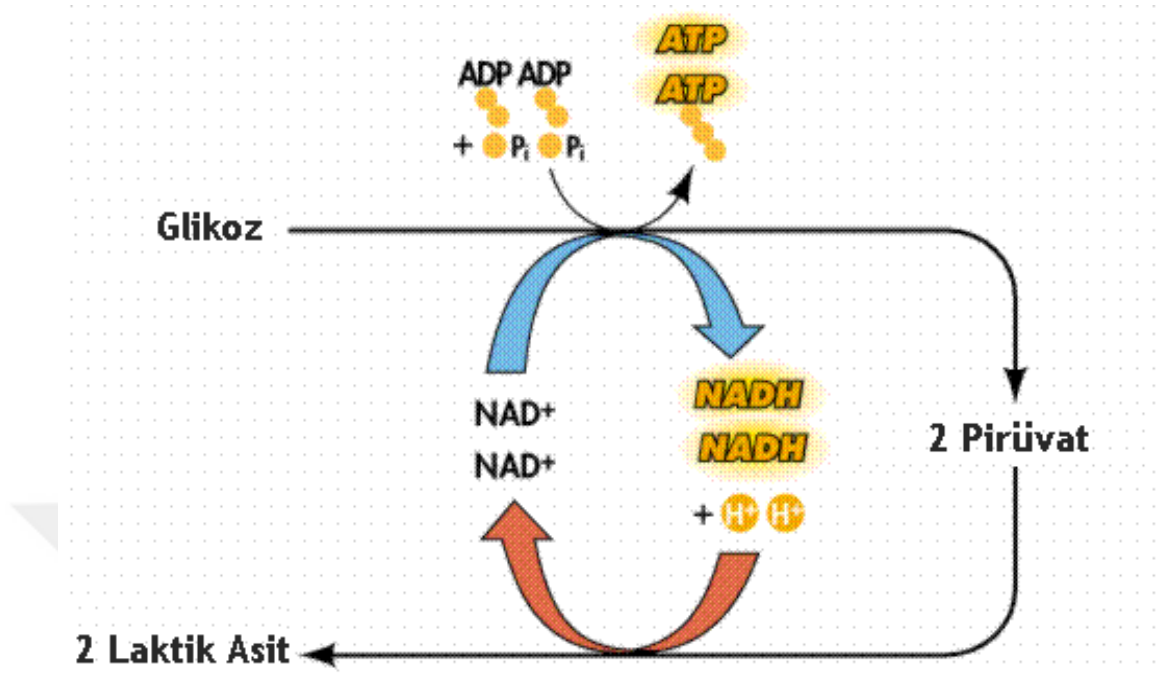
1. *Lactococcus lactis*
2. *Streptococcus thermophilus*
3. *S. cremoris*
4. *Lactobacillus helveticus*
5. *L. delbrueckii*
6. *L. casei*
7. *L. paracasei*
8. *L. plantarum*
9. *L. rhamnosus*
10. *L. curvatus*
11. *Pediococcus acidilactici*
12. *P. pentosaceus*
13. *Leuconostoc dextranicum*
14. *L. mesenteroides*

## 1.2. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri

Laktik asit bakterileri Gram (+), spor oluşturmeyen, anaerobik ya da fakültatif aerobik olan, kok ya da çubuk şekilli, karbonhidrat metabolizmasının ana fermentasyon ürünlerinden biri olan laktik asiti üreten oldukça değerli mikroorganizmalardır (Saeed and 2013).

Laktik asit bakterileri aynı zamanda asidi tolere edebilen, katalaz ve oksidaz negatif olan, nitratı redükte edemeyen mikroorganizmalardır (Adams and Moss 2004).

Laktik asit bakterileri oldukça düşük pH ve tuz konsantrasyonlarında gelişme gösterebilmektedirler (Burgain *et al.* 2014) . Laktik asit bakterilerinde oksijen, hidrojen peroksit üretilmesine ve şekerlerin dehidrogenasyonu boyunca nüretilen NADH'ın re-okside edilmesine sebep olur (Adams and Moss 2004).



**Şekil 1.1.** Laktik asit fermantasyon mekanizması (Wyszynska *et al.* 2015)

Gram (+) bakteriler içerisinde düşük düzeyde guanin ve sitozin (G+C) oranına sahip olan laktik asit bakterilerinin genom büyüklükleri genel olarak 1.8-3.4 M bp arasında değişmektedir (Wyszynska *et al.* 2015).

Laktik asit bakterileri çok farklı bölgelerde lokalize olmuşlardır. Atasal laktik asit bakterilerinin ilk olası nişleri toprak, bitki ve herbivor hayvanların bağırsakları olarak belirlenmiştir (Morelli and Calleagri 2012; Quinto and Jimenez 2014). Örneğin memeli bağırsağı sağlık için gerekli olan yaklaşık 100 trilyon mikroorganizmaya ev sahipliği eder (Hooper and Macpherson 2010; Kamada and Seo 2013).

Laktik asit bakterileri lokalizasyon açısından genellikle besin içeriği gelişmiş olan ortamlarda bulunmaktadır. Bu ortamlara; süt, et ve sebzeler örnek verilebileceği gibi, ağız, vajina ve bağırsak ortamları da örnek verilebilir (İşleroğlu and Yıldırım 2008). Bu organizmalara su ve toprakta hemen hemen hiç rastlanılmamaktadır.

Çoğunlukla süt ve süt ürünlerinde, fermente gıdalarda, bazı bitkilerde, insan ve bazı canlıların bağırsaklarında lokalize olan laktik asit bakterileri; bu ortamlarda yer alan karbonhidrat kaynaklarından laktik asit gibi organik asitler üreterek ortamda pH düşüşüne sebep olurlar (Okereke and Montville 1991). Laktik asit bakterilerinin asit oluşturmaları bu düşük pH'lı ortamlara bağlıdır. Bu organizmaların ürettikleri başlıca asit ve maddeler arasında; laktik asit, asetik asit, karbondioksit, alkol, bazı tat ve aroma maddeleri, hidrojen peroksit, diasetil ve bakteriyosin sayılabilir.

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bu maddeler patojenlerin ve kontaminant organizmaların gelişimlerini engellemektedirler. Özellikle hidrojen peroksit birçok organizma için güçlü bir inhibitördür (Zhu *et al.* 2000).

Laktik asit bakterilerinin ayrıca biyosentetik yetenekleri sınırlı olduğundan; aminoasitler, vitaminler, pürinler ve pirimidinlerin bulunduğu kompleks besinlere gereksinim duyarlar. Ayrıca bu mikroorganizmaların bazıları zayıf proteolitik ve lipolitik özelliğe sahiptir (Madigan *et al.* 1997; Axelsson *et al.* 1998; Hayaloğlu and Erginkaya 2001).

Laktik asit bakterilerini diğer bakterilerden ayıran özellik olan karbonhidrat fermantasyonunu organizmalar yapmak için iki farklı yol kullanır:

1. Homofermantatif Fermantasyon
2. Heterofermantatif Fermantasyon

Bu sınıflandırma laktik asit bakterilerinin fermantasyonda oluşturdıkları ürünlerin cins ve miktarlarına göre yapılmaktadır (Drinan *et al.* 1976).

- Homofermantatif laktik asit bakterileri glukozu; Fruktöz Di Fosfat yolu ile parçalayarak fermantasyon sonucu %95–100 oranında laktik asit üretirler.



- Heterofermantatif laktik asit bakterileri ise glukozu; heksoz mono fosfat yolu ile parçalayarak fermantasyon sonucu %50 laktik asit üretirken, bunun yanında yüksek oranda etanol, asetik asit, gliserol, mannitol ve fruktoz oluştururlar.



Gıda mikrobiyolojisinde fermente gıdaların üretiminde özellikle laktik asit bakterilerinden yararlanılmaktadır. Laktik asit bakterilerinin fermantasyon yeteneklerinden yararlanılarak üretilen gıdalarda fermantasyon sonucu ortaya çıkan organik asitlerden dolayı raf ömrü oldukça uzamıştır. Önemli görevleri olan organik asitler dışında laktik asit bakterileri aynı zamanda istenmeyen mikroorganizmalara karşı inhibitör etkisi gösteren hidrojen peroksit, serbest yağ asitleri, amonyak, diasetil ve bakteriyosin gibi maddeler de üretmektedirler (Daeschel *et al.* 1990; Hayaloğlu and Erginkaya 2001). Laktik asit bakterilerinin bu şekilde var olan antimikrobiyal özellikleri onları oldukça önemli organizmalar kılmıştır (Kurt 2005).

Laktik asit bakterilerini bu denli önemli kılan özellikleri; gıdaların üretiminde starter kültür olarak kullanılmaları, antimikrobiyal özelliklere sahip olmaları ve özellikle probiyotik ürünlerin bileşiminde bulunmalarıdır. Geleneksel yöntemlerle doğal olarak üretilen veya starter kültür olarak kullanılarak marketlerde tüketiciye sunulan fermente ürünler, laktik asit bakteri suşları için iyi bir kaynak teşkil etmektedir (Chapot-Chartier and Kulakauskas 2014).

### 1.2.1. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal özellikleri

Laktik asit bakterilerine antimikrobiyal özelliğini, diğer mikroorganizmalara karşı inhibitör etkiye sahip olan ürettikleri hidrojen peroksit, serbest yağ asitleri, amonyak, diasetil, reuterin, karbondioksit, asetaldehit, aminoasitlerin D izomerleri ve bakteriyosin

gibi maddelerdir. Bu inhibitörler içerisinde bakteriyosinler en önemli yere sahiptir ve gıda mikrobiyolojisi açısından önemli bir yer teşkil ederler.

Gıda mikrobiyolojisinde gıdalarda gelişen istenmeyen mikroorganizmalarla savaşmak için çeşitli kimyasal koruyucular kullanılmaktadır. Ancak bu koruyucu kimyasallar, sağlığı oldukça olumsuz etkiledikleri için bunlar yerine günümüzde doğal koruyucular kullanılmaya başlanmıştır. Bu doğal koruyuculara en iyi örnek starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterileri ve bu bakteriler tarafından üretilen antagonistik etkiye sahip olan bakteriyosinlerdir (Omar *et al.* 2006).

Bakteriyosinler birçok gıda kökenli laktik asit bakterisi tarafından üretilen küçük antimikrobiyal proteinler olup, bunlara; *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium* ve *Propionibacterium* cinsinin üyeleri örnek olarak verilebilir.

Bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktivitelerinin yanında doğal, renksiz, tatsız ve kokusuz olmaları onları oldukça önemli kılmaktadır. Peptit ve protein yapılarında olmaları ise; pankreas kaynaklı proteolitik enzimlerden, mide salgılarından etkilenebildiklerini ve insan vücudunda sindirilebileceklerini göstermektedir (Garneau *et al.* 2002).

Bakteriyosinler birçok bakteriye karşı bakterisidal etki göstermekle birlikte gıdanın bozulmasını sağlayan ve gıda kaynaklı hastalıklara neden olan bazı mikroorganizmaları da inhibe etmektedir. Bakteriyosinler protein yapısında, doğal olduklarından bunların et ve süt ürünleri başta olmak üzere birçok gıdada kullanımı mümkün olmaktadır. (Martinez *et al* 2015).

Bakteriyosinler gıda maddesine doğrudan katılabildikleri gibi, bakteriyosin sentezleyen koruyucu kültürlerin gıdaya inokulasyonu veya gıdanın koruyucu ambalaj materyaliyle birlikte de kullanılabilirler. Böylelikle; uygun olan bakteriyosinin veya

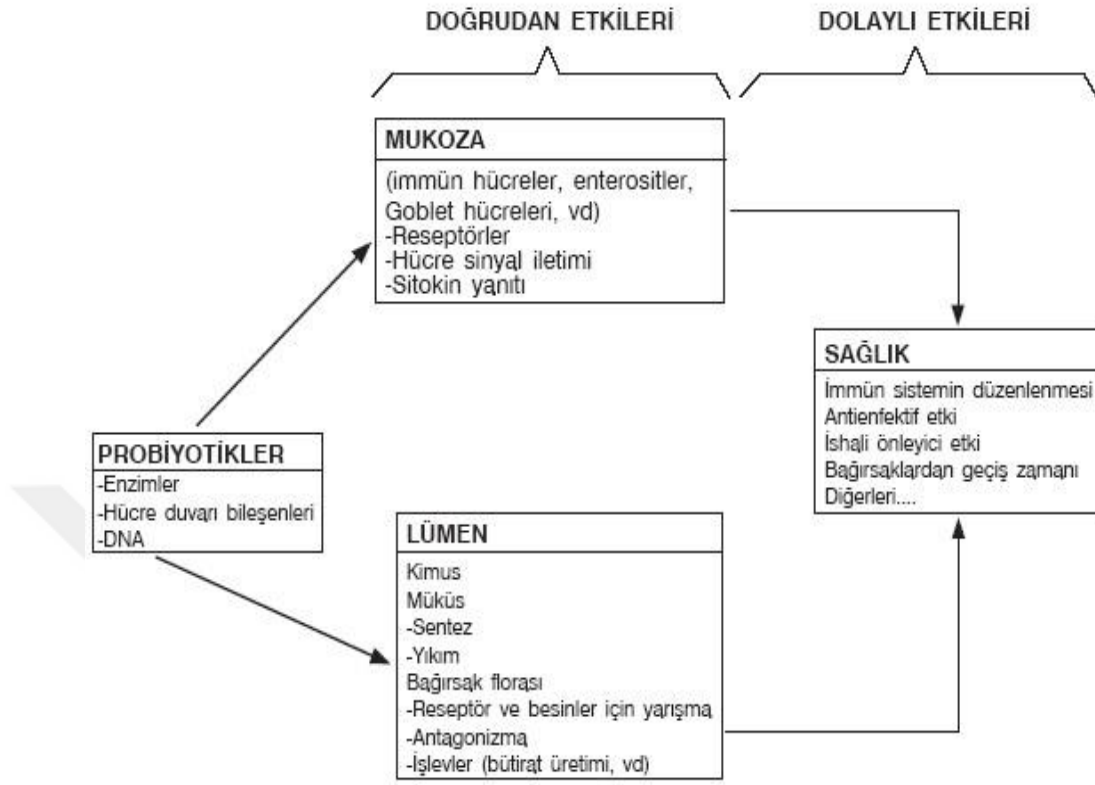
bakteriyosin üreten LAB'sinin gıdalara eklenmesi hem raf ömrünü uzatacak hem de sağlıklı kabul edilecektir (Zhu *et al.* 2000).

### **1.2.2. Laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak kullanılmaları**

Probiyotikler, mide bağırsak sisteminin mikrobiyal dengesini düzenleyerek konakçı sağlığı üzerinde yararlı etkileri olan, canlı mikrobiyal gıda katkılarıdır.

Günümüzde probiyotik tanımı, insan ve hayvan sağlığını destekleyen (güçlendiren) ve gıda, yem ya da gıda katkı maddelerine ilave edilen mikrobiyal preparatların tümünü kapsamaktadır (Quilodran-Vega *et al.* 2016).

Laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* probiyotik üretiminde yaygın olarak kullanılan bakterilerdir. Bağırsak florasında lokalizasyonları geniş olan laktik asit bakterileri yine burada birçok olumlu etkiye sahiptir. Bu organizmalar bağışıklık sistemini güçlü hale getirerek vücudun savunma sistemini geliştirir. Laktik asit bakterilerinin belirtilen bu işlevleri yerine getirebilmeleri mideden geçerken canlı kalmalarına bağlıdır. Probiyotik olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin; laktoz intoleransını hafifletmesi, kalp hastalığı riskini azaltması, kolon kanseri riskini azaltması, immun sistemi güçlendirmesi ve iltihabi veya alerjik reaksiyonları azaltması gibi yararlı birçok da etkisi bulunmaktadır (Biler 2009).



**Şekil 1.2.** Probiyotiklerin etki mekanizması (Demirbaş *et al.* 2006)

**Çizelge 1.1.** Probiyotik ürünlerin sahip olması gereken özellikler (Demirbaş *et al.* 2006)

| PROBİYOTİK OLMA ŞARTLARI |                                         |                 |
|--------------------------|-----------------------------------------|-----------------|
| Güvenirlilik             | Antagonistik etki                       | Patojen olmamak |
| Dayanıklılık             | Üretim-depolama koşullarında aktif olma | Mutajen olmamak |
| İnsan kaynaklı olma      | Konakçıya yarar sağlama                 | Toksik olmamak  |
| Stabil olma              | Bağırsakta kolonize olma                | Alerjik olmamak |

**Çizelge 1.2.** Ticari olarak satılan bazı probiyotik ürünler (Demirbaş *et al.* 2006)

| Ürün adı | Mikroorganizma                   | Kategori        | Ülke    |
|----------|----------------------------------|-----------------|---------|
| VITAGEN  | <i>Lactobacillus acidophilus</i> | Fermente içecek | Malezya |
| LEVENIN  | <i>Enterococcus faecalis</i>     | Süt tozu        | Japonya |

Çizelge 1.2. (devam)

| BIO-GRADE | <i>L. acidophilus</i>        | Fermente süt | Avusturalya |
|-----------|------------------------------|--------------|-------------|
| LCI       | <i>L. casei</i>              | Yoğurt       | Türkiye     |
| VENTRUX   | <i>Streptococcus faecium</i> | Kapsül       | İsveç       |
| LACTINEX  | <i>L. bulgaricus</i>         | Toz          | USA         |

### 1.3. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması

Uzun yıllardır çeşitli kaynaklardan izolasyonu gerçekleştirilen laktik asit bakterileri tat ve koku oluşumundaki etkisi, istenmeyen mikroorganizmalarla savaşta bakteriyosin üretimi gibi özellikleri ile farklı fermente ürün eldesi aşamalarında oldukça önemli bir yere gelmiştir (Chapot-Chartier and Kulakauskas 2014). Bu amaçla sahip oldukları önemden dolayı özellikle son yıllarda laktik asit bakterilerinin tanımlanmasına yönelik çalışmalar artmıştır.

Laktik asit bakterilerinin tanısında fenotipik yöntemler yaygın olarak kullanılsa da, özellikle identifikasyon tekniklerinde son yıllarda yaşanan gelişmelere paralel olarak, genotipik metotlarda karakterizasyonda yerini almıştır (Kıran 2006).

Laktik asit bakterileri [www.bacterio.net](http://www.bacterio.net)'in içerdiği son sistematik bilgilerine göre şu şekilde sınıflandırılmaktadır:

#### ➤ *Lactobacillales*

##### 1. *Aerococcaceae*

- ✓ *Aerococcus*
- ✓ *Abiotrophia*
- ✓ *Dolosicoccus*

## 2. *Streptococcaceae*

- ✓ *Streptococcus*
- ✓ *Lactococcus*

## 3. *Enterococcaceae*

- ✓ *Tetragenococcus*
- ✓ *Vagococcus*
- ✓ *Enterococcus*

## 4. *Carnobacteriaceae*

- ✓ *Carnabacterium*
- ✓ *Agitococcus*
- ✓ *Alloiococcus*
- ✓ *Lactosphaera*
- ✓ *Trichococcus*

## 5. *Lactobacillaceae*

- ✓ *Lactobacillus*
- ✓ *Pediococcus*

## 6. *Leuconostocaceae*

- ✓ *Oenococcus*
- ✓ *Weisella*
- ✓ *Leuconostos*

Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması içerisinde yer alan gıda ile ilişkili bakteri cinsleri şunlardır:

1. *Carnobacterium*
2. *Enterococcus*
3. *Lactobacillus*
4. *Lactococcus*
5. *Leuconostoc*
6. *Oenococcus*
7. *Pediococcus*
8. *Streptococcus*
9. *Tetragenecoccus*
10. *Vagococcus*
11. *Weissella*

#### **1.4. Önemli Laktik Asit Bakterileri**

Sistematik bilimi içerisinde önemli sayılabilecek birçok laktik asit bakterisi bulunmaktadır. Bunları önemli kılan temel özelliklerinden birisi gıda kökenli olmaları ve koruyucu olarak görev yapabilmeleridir. Bu özelliklerinden dolayı son yıllarda bu bakteriler oldukça etkili bir rol oynamaya ve önem kazanmaya başlamıştır. Özellikle gıda mikrobiyolojisi açısından önemli olan laktik asit bakteri grupları: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* ve *Weissella*'dır.

##### **1.4.1. *Lactobacillus***

*Lactobacillus* cinsi mikroorganizmalar; Gram pozitif, katalaz ve oksidaz negatif, fermantatif organizmalardır. Ayrıca bu grubun üyeleri, mutlak anaerob ve genellikle hareketsizdirler (Hammes and Vogel 1995). Morfolojik olarak ince uzun, kısa çubuk ya da kokobasil şeklindeki bakteriler olup, spor oluşturmazlar. Genellikle 5 ile 53°C

arasında yaşayabilirler. Gelişme gösterdikleri pH aralıkları ise 5,5 ile 5,8 arasında değişmektedir (Axelsson 1998).

Gıda mikrobiyolojisinde oldukça önemli bir yeri olan *Lactobacillus* cinsine ait bakteriler, gelişebilmek için kompleks besin maddelerine ve vitaminlere ihtiyaç duyarlar. Genellikle bu organizmalar bitki, toprak, süt ürünleri ve bağırsak florasında bulunur. Bundan dolayı fermente et, süt ve sebze ürünlerinin üretiminde oldukça önemli bir yere sahiptirler (Ünlütürk ve Turantaş 1999).

*Lactobacillus* cinsi temelde üç ana gruba ayrılır (Adams and Moss 2004):

### **1. Zorunlu homofermenterler:**

Bu bakteriler *Thermobacterium* olarak bilinirler. *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbruckii*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ve *L. helveticus* bu grup içerisinde bulunmaktadır. Bu bakteriler hekzozları fermente etme özelliğine sahiptir. Pentozları fermente etmede ise yetersizdirler (Todorov *et al.* 2010).

### **2. Fakültatif heterofermenterler:**

Bu bakteri grubu, hekzozları, asetatu ve pentozları da fermente etme özelliğine sahiptir. Bu grup, gıda fermantasyonunda oldukça önemli bir yeri olan *L. plantarum*, *L. casei* ve *L. sakei* türlerini içermektedir (Baele *et al.* 2002).

### **3. Zorunlu heterofermenterler:**

Bu bakteri grubu da hekzozu fermente etme özelliğine sahiptir. Grup içerisinde bulunan en önemli bakteriler; *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. buchneri*, *L. reuteri* ve *L. kefir*'dir (Kılıç 2008).

### 1.4.2. *Lactococcus*

*Lactococcus* cinsi bakteriler Gram pozitif, katalaz negatif, hareketsiz ve sporsuz bakterilerdir. Hücre şekilleri küresel veya oval olup tekli, ikili veya zincir şeklinde diziliş gösterebilirler (Samarzija *et al.* 2001). Optimum gelişme sıcaklıkları genellikle 30°C'dir. 10°C'nin altında ve 45°C'nin üstünde gelişme gösteremediklerinden dolayı diğer bakteri gruplarından ayrılırlar. *Lactococcus* laktozu fermente ederek gaz üretmeksizin L(+) laktik asit oluşturmaktadır (Teuber 1995).

Laktokokları önemli kılan özelliklerden birisi; peynir, tereyağı, krema ve yoğurt gibi fermente süt ürünlerinin fermantasyonunda rol almalarıdır. Bu bakteri grubu özellikle peynir üretiminde peynirin olgunlaştırılması esnasında oldukça önemlidir (Büyükyörük and Soyutemiz 2010).

*Lactococcus* cinsine ait türler şunlardır: *Lactococcus lactis*, *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. plantarum* ve *L. raffinolactis* (Büyükyörük and Soyutemiz 2010).

### 1.4.3. *Enterococcus*

*Enterococcus* cinsindeki mikroorganizmalar Gram pozitif, oksidaz ve katalaz negatif, aerobik ve fakültatif anaerobik organizmalardır. Bu bakteriler diğer birçok bakterinin gelişme gösterdiği pH aralığının dışında gelişmektedir (Fisher and Phillips 2009).

Bu bakteriler genellikle %6-6,5 arasındaki tuz konsantrasyonlarında gelişme göstermektedirler. Gelişme gösterdikleri pH aralığı ise oldukça geniştir(4-9,6). Enterokoklar 10-45°C'lerde hatta 50°C'de bile gelişim gösterebilmektedirler.

Enterokoklar fruktoz, galaktoz, maltoz, mellebiyoz, sellebiyoz ve laktozdan asit üretme yeteneğine sahiptirler (Gürsoy and Kınık 2006; Kılıç 2008). Bu organizmalar bakteriyosin üretme yeteneklerinden dolayı ve ayrıca probiyotik olarak

kullanılmalarından ötürü gıda endüstrisinde önemli bir yere sahiptirler (Abriouel *et al.* 2005).

Enterococcus cinsine ait var olan türler şunlardır: *Enterococcus faecium*, *E. faecalis* ve *E. durans*.

#### 1.4.5. *Pediococcus*

*Pediococcus* cinsine ait bakteriler Gram pozitif, oksidaz ve katalaz negatif bakterilerdir. Bu organizmalar genellikle mikroaerofilik ve fermantatiflerdir. Morfolojik olarak kok şeklindedirler ve koklar; tekli ve ikili şekilde bulunabilecekleri gibi kısa zincirli veya tetrad yapıda da olabilirler (Stiles and Holzapfel 1997). *Pediococcus* cinsine ait türler tuza dayanıklı homofermantatif türlerdir. Bu türlerin gıda endüstrisinde de önemli bir yeri vardır. Çünkü bu bakteriler genellikle bitkilerde, turşu, bira, şarap gibi fermente ürünlerde bulunmaktadır. Örneğin; *Pediococcus cerevisiae* ve *P. acidilactici* türleri starter kültür olarak turşu ve sucuk yapımında kullanılır.

*Pediococcus* cinsine ait var olan türler şunlardır: *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. damnosus*, *P. parvulus* ve *P. cerevisiae*.

#### 1.4.6. *Streptococcus*

*Streptococcus* cinsine ait bakteriler Gram pozitif, oksidaz ve katalaz negatif, genellikle hareketsiz olan bakterilerdir. Bu cinsteki bakteriler genellikle fakültatif fakar mikroaerofilik ve mutlak anaerobik olan türleri de vardır. *Streptococcus* cinsleri homofermantatif bakterilerdir ve gaz üretmezler. Aynı zamanda bu bakteriler kapsülsüz bakterilerdir. Genellikle 25 ile 45°C arasında gelişim gösteren *Streptococcus* cinsleri laktat üretme yeteneğine sahip bakterilerdir (Bhowmik and Marth 1990).

Bazı peynir türlerinin üretimi aşamasında starter kültür olarak kullanılmaları onları gıda endüstrisinde önemli bir yere taşımıştır. Ayrıca bu organizmalar hayvanların sindirim sisteminde, süt ve süt ürünlerinde, sebzelerde önemli miktarlarda yer almaktadırlar (Holt *et al.* 1994).

*Streptococcus* cinsine ait var olan türler şunlardır: *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae* ve *S. thermophilus*. Bu türler içerisinde *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* ve *S. agalactiae* türleri güçlü patojenlerdir. *S. thermophilus* türü ise yoğurt ve peynir üretim aşamasında, starter kültür olarak kullanılmaktadır (Stiles and Holzapfel 1997).

**Çizelge 1.3.** Önemli laktik asit bakteri cinslerine ait özellikler (Adams and Moss 2004)

| Cins adı             | Morfoloji | Gaz üretim şekli       | İzomer yapısı   |
|----------------------|-----------|------------------------|-----------------|
| <i>Lactobacillus</i> | Düz       | Homo/Heterofermantatif | DL, D, L izomer |
| <i>Lactococcus</i>   | Kok       | Homofermantatif        | L izomer        |
| <i>Enterococcus</i>  | Kok       | Homofermantatif        | L izomer        |
| <i>Pediococcus</i>   | Kok       | Homofermantatif        | DL izomer       |
| <i>Streptococcus</i> | Kok       | Homofermantatif        | L izomer        |

### 1.5. Laktik Asit Bakterilerinin Tanılanması

Laktik asit bakterilerinin tanılanması işleminde yıllardır çok farklı yöntemler kullanılmaktadır. Genel hatlarıyla tanılama yöntemleri fenotipik ve genotipik yöntemler olmak üzere iki ana grup altında toplanmaktadır (Yerlikaya 2014).

Geçmiş yıllarda tanılama işlemi için genellikle sadece morfolojik ve fizyolojik özelliklerin belirlenmesini içeren fenotipik yöntemler kullanılmaktaydı. Ancak son yıllarda bu yöntemlerin yetersiz kalması hem fenotipik yöntemlerin genişlemesine hem de yeni genotipik ve moleküler yöntemlerin çalışılmasına yol açmıştır (Kıran and Osmanoğlu 2011).

Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan yöntemler şu şekilde sıralanabilir:

### **1. Morfolojik Yöntemler**

- ✓ Gram Boyama
- ✓ Endospor Boyama
- ✓ Hareketlilik Testi

### **2. Fizyolojik Yöntemler**

- ✓ Bakterinin gelişebildiği tuz konsantrasyonunun belirlenmesi
- ✓ Bakterinin gelişebildiği pH aralığının belirlenmesi
- ✓ Bakterinin gelişebildiği optimum sıcaklığın belirlenmesi

### **3. Biyokimyasal Yöntemler**

- ✓ Katalaz testi
- ✓ Oksidaz testi
- ✓ Glikozdan gaz üretimi

### **4. Genotipik Yöntemler**

- ✓ 16S rRNA dizi analizi
- ✓ PCR ürünü restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP)
- ✓ Genomik parmak izi analizi
- ✓ Filogenetik analiz
- ✓ API test kiti kullanılarak laktik asit bakterilerinin tanısı

## **1.6. Tanılamada Kullanılan Başlıca Genotipik Yöntemler**

### **1.6.1. 16S rRNA dizi analizi**

Bakteri sistematğinde kullanılan genotipik yöntemlerden gen dizileme analizi geçmiş yıllardan beri etkinliğini sürdürmektedir. Gen dizilemede kilit nokta seçilecek olan

hedef genidir. Dizi analizi için kullanılacak olan hedef genlerin belirli özelliklere sahip olması gerekir. Bu özellikler:

- ✓ Hedef genin fonksiyonu evrim boyunca değişmemiş olmalıdır.
- ✓ Hedef gen tüm bakteriler için korunmuş olan bölgeyi içermelidir.
- ✓ Hedef genin içerdiği korunmuş bölgeyi çevreleyen değişken bölgeler de bulunmalıdır.

Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalar bakteri sistematğinde bakterilerin filogenetik olarak analiz edilmesinin genetik bilginin korunmuş bir bölgesi ile kıyaslanması sonucu gerçekleştirilebileceğini göstermiştir (Kolbert and Persing 1999).

Yapılan çalışmalarda bu amaçla incelenen korunmuş bölgelerin; 5S, 16S ve 23S rRNA'yı şifreleyen genlerden oluştuğu belirlenmiştir. Bu gen bölgeleri içerisinde bakteri sistematği için oldukça önemli bir yere sahip olan gen bölgesi 16S rRNA gen bölgesidir (Garrity and Holt 2001). Sistematik içerisinde bu gen bölgesi yalnızca bakteriler arasında değil aynı zamanda arkelerin 16S ve ökaryotların 18S rRNA gen bölgeleri ile de karşılaştırılabilir (Tortoli 2003).

16S rRNA gen bölgesinin tüm bakterilerde bulunması, fonksiyonel olarak korunmuş bir bölge olması, gen analizi için uygun büyüklükte olması (~1550 bp), iyi korunmuş ve bunun yanı sıra heterojen bölgeler içermesi ve yeterli veritabanına sahip olması onu bakteri sistematği içerisinde oldukça önemli bir yere taşımıştır (Harmsen and Karch 2004).

16S rRNA gen bölgesi korunmuş bölge olma özelliğinden dolayı hücresel fonksiyonlar için oldukça önemlidir. Ayrıca bu bölgede meydana gelebilecek herhangi bir mutasyon da kolaylıkla tolere edilebilir. 16S rRNA geni bölgesindeki değişim tam olarak açıklanmasa da organizmalar arasındaki benzerlik ve farklılığı yani bağlantıyı net bir şekilde ortaya koymaktadır (Harmsen and Karch 2004).

16S rRNA geninin antimikrobiyel olan kimyasallara duyarlılığı vardır. Gende oluşabilecek herhangi bir mutasyonun farkedilebilmesi de bu özelliğinden dolayı 16S rRNA gen bölgesine bağlıdır. Çünkü meydana gelecek mutasyon organizmanın antimikrobiyel kimyasallara karşı duyarlılığını etkiler ve bir fenotipik direnç meydana gelir. Bu da 16S rRNA gen dizilimi ile ortaya çıkar. Gen bölgesinin bu özelliği özellikle klinik mikrobiyolojide oldukça önemli bir yere sahip olmakla birlikte bakteriyal sistematik açısından da herhangi bir engel teşkil etmemektedir (Pfister *et al.* 2003a; Pfister *et al.* 2003b). Ayrıca 16S rRNA gen bölgesinin bu özelliği genetik olarak daha uzak mesafeli ilişkileri aydınlatmada oldukça büyük bir etkiye sahiptir (Garritty and Holt 2001).

Sonuç olarak 16S rRNA gen bölgesi bakterilerde ortak olarak bulunan korunmuş olan, farklı heterojen bölgeler içeren ve bundan ötürü de bakteriler arasındaki filogenetik ilişkinin belirlenmesi açısından oldukça önemli bir yere sahip olan bir gen bölgesidir. Ayrıca bahsedilen 16S rRNA gen analiz yöntemi; yeni cins ve türlerin belirlenmesi, zor üreyen mikroorganizmaların tanısı, klinik önemi olan patojenlerin tanımlanması ve antibiyotik tedavisi altında etken belirlenmesi yönüyle oldukça güçlü ve önemli bir yöntemdir (Çetinkaya 2011).

**Çizelge 1.4.** 16S rRNA dizi analizinde kullanılan primerler

| İSİM | DİZİ(5'-3')           | LOKALİZASYON |
|------|-----------------------|--------------|
| 27f  | AGAGTTTGATYMTGGCTCAG  | 8-27         |
| 355f | ACTCCTACGGGAGGC AGC   | 338-355      |
| 338r | GCTGCCTCCCGTAGG AGT   | 338-355      |
| 533f | GTGCCAGCMGCCGCG GTAA  | 515-533      |
| 515r | TTACCGCGGCKGCTG GCAC  | 515-533      |
| 556r | CTTTACGCCCARTRA WTCCG | 556-575      |
| 806f | ATTAGATACCTGGT AGTCC  | 787-806      |
| 787r | GGAGTACCAGGGTAT CTAAT | 787-806      |
| 926f | AAACTYAAAKGAATT GACCG | 907-926      |
| 907r | CCGTCAATTCMTTTRAGTTT  | 907-926      |

**Çizelge 1.4. (devam)**

|              |                            |                  |
|--------------|----------------------------|------------------|
| 930f         | <b>AAACTYAAAKGAATT</b>     | <b>911-930</b>   |
|              | <b>GACGG</b>               |                  |
| 911r         | CCGTCAATTCMTTTRAGTTT       | 911-930          |
| 1194f        | GAGGAAGGTTGGGGATGACGT      | 1175-1194        |
| 1175r        | ACGTCATCCCCAACCTTCCTC      | 1175-1194        |
| 1371r        | AGGCCCGGGAACGTATTCAC       | 1390-1371        |
| 1391r        | TGACGGGCGGTGWGTRCA         | 1391-1408        |
| <b>1492r</b> | <b>GGTTACCTTGTTACGACTT</b> | <b>1492-1510</b> |
| 1525r        | AAGGAGGTGWTCCARCC          | 1525-1541        |

#### **1.6.2. Restriction fragment length polymorphism-restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP-PCR)**

Sistematikte kullanılan RFLP-PCR yöntemi oldukça hızlı ve avantajlı bir yöntemdir. Yöntemde esas olarak kabul edilen unsur restriksiyon enzimleridir. Yöntemin uygulanması aşamasında seçilen hedef bölgeler öncelikle spesifik primerlerle çoğaltılır ve ardından yine spesifik restriksiyon enzimleriyle kesilir.

Restriksiyon enzimleri; çift zincirli DNA molekülündeki belirli nükleotit dizilerini tanıyıp kesen enzimlerdir. Bu enzimler, bakteri ve arkelerde bulunmaktadır. Virüslere karşı açılan savaşta oldukça önemli bir yer teşkil etmektedirler.

RFLP-PCR yönteminde esas olarak; restriksiyon enzimi belirlenen hedef bölgeye spesifik olarak seçilir. Yöntemde elde edilen fragmentlerin ayrımı jel elektroforeziyle sağlanmaktadır. Jel elektroforezi sonrasında elde edilen bantlar birbirleriyle karşılaştırılarak tanılama işlemine gidilmektedir (Kabadjova *et al.* 2002) . RFLP-PCR yönteminde spesifik genetik bölgelerin çoğaltılması ve çalışılması geniş bir alan bulduğu için bu yöntemle PCR türlerinin varyasyonu ve antimikrobiyal dirençliliğin farkları oldukça geniş bir şekilde ortaya konulmaktadır (Olive and Bean 1999).

### 1.6.3. Genomik parmak izi analizi

Genom üzerinde sayısı ve yeri türe göre değişebilen çok sayıda tekrar dizileri bulunmaktadır. Bu durum bakteri DNA'sı için de geçerlidir. Bakteri DNA'sı içerisinde sürekli tekrar eden elementler korunmuş bir yapıya sahiplerdir. Korunmuş olmalarından dolayı bu bölgeler bakteri sistematigi açısından da oldukça önemli bir yer teşkil etmektedir.

Bakteri sistematigi içerisinde bu elementlerin kullanılmasına yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda; genom içerisinde bulunan terkar dizileri PCR ile amplifiye edilmiştir. Ardından elde edilen spesifik bantların birbirleri ile kıyaslaması yapılarak sistematik bilimi içerisinde tiplendirme amacıyla kullanılmıştır (Versalovic *et al.* 1994).

Genom içerisinde bilinen tekrarlı diziler REP, ERIC, BOX ve GTG<sub>5</sub> bölgeleri arasındaki genomik bölgeler olarak bilinmektedir. Bu bölgeler korunmuş bölgeler olup sistematik açısından kullanımı tekrarlayan bu bölgelerin PCR ile amplifikasyonundan geçmektedir. Tekrarlayan dizilere spesifik olan PCR yöntemleri; REP-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR ve (GTG)<sub>5</sub>-PCR olarak adlandırılmış olup, bu yöntemlerin hepsine birden rep-PCR adı verilmektedir. Bu PCR yöntemi; bakteri genomu içerisinde korunmuş ve tekrarlayan DNA dizilerinin amplifikasyonu ile karakterize edilmiş olan bir genomik parmak izi analiz yöntemidir (Lupski and Weinstock 1992).

Genom içerisinde tekrarlayan diziler göz önünde bulundurulduğunda bu dizilerin temelde üç farklı türünün tanımlandığı görülmüştür. Bunlar:

- ✓ **REP dizileri:** Bu diziler yaklaşık 35-40 baz çifti büyüklüğündeki elementlerdir.
- ✓ **ERIC dizileri:** Bu diziler yaklaşık 124-127 baz çifti büyüklüğündeki korunmuş olan palindromik dizilerdir.
- ✓ **BOX dizileri:** Bu diziler yaklaşık 154 baz çiftlik dizilerdir. BOX diziler BOXA, BOXB ve BOXC olmak üzere üç adet korunmuş alt üniteye sahiptir.

Yapılan alışmalar sonucunda; REP ve ERIC PCR yönteminin uygulanabilirliğinin kolay olduğu, çok sayıda izolatın aynı anda ayrımının sağlanabildiği, ayırt edici özelliğinin yüksek olduğu ve yaygın bir yöntem olduğu ortaya konmuştur. (Carson *et al.* 2003).

rep-PCR metodu diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında; multilokus enzim elektroforezi, biyokimyasal karakterizasyonlar ve ribotiplendirme gibi yöntemlerden daha avantajlı olduğu görülmüştür (Clarridge *et al.* 1995).

#### **1.6.4. Filogenetik analiz**

Bakteri sistematide çeşitli mikroorganizmalar arasındaki evrimsel bağlantıyı açıklayan bilim dalı filogenetiktir. Filogenetik, organizmanın genomik bilgisinden yararlanarak bu organizmalar arasındaki ilişkiyi moleküler seviyede ortaya koymaktadır. Filogenetik analizlerde DNA ve protein dizileri temel alınmaktadır. Bu dizilere ait benzerlik ve farklılıklar organizmalar arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır. Bu bilgilerin daha net bir şekilde anlaşılabilmesi için elde edilen bilgiler ışığında filogenetik ağaçlar çizilerek analiz yapılmaktadır.

Bu ağaçlar oldukça karmaşık yöntemlerle elde edilmektedir. Yaygın olarak kullanılan ve tez çalışması esnasında da tercih edilen filogenetik ağaç yöntemlerinden birisi; NJ (Neighbor-joining; Komşu katılımı-bağlama) yöntemidir. Bu yöntem; organizmalar arasındaki genetik mesafe matrisini temel alarak kümelemeyi gerçekleştiren bir yöntem olarak bilinmektedir. Bu yöntemde; filogenetik ağaç boyunca mutasyon hızı farklıdır. Bundan dolayı OTU (Operational Taxonomic Units; üzerinde çalışılan taksonomik birimler)'lar arasındaki genetik mesafenin hesaplanması bu yöntemde oldukça olası bir hal alır (Tindal *et al.* 2010; nal 2014).

Genel olarak filogenetik bilimi üç ana başlık altında toplanabilir:

- ✓ **Bilgisayar destekli filogenetik:** Bu filogenetik çeşidinde bilgisayar algoritmaları, metotları ve programları filogenetik analizlere uygulanır.
- ✓ **Geleneksel filogenetik:** Bu filogenetik çeşidinde organizmaların fenotipik özellikleri ölçülür ve miktarları belirlenerek morfolojik bilgilere dayandırılır.
- ✓ **Moleküler filogenetik:** Bu filogenetik çeşidinde ise organizmanın genlerini kodlayan nükleotid dizilerini ya da proteinlerini kodlayan aminoasit dizileri sınıflandırılır.



## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Laktik asit bakterileri (LAB) Gram (+), spor oluşturmeyen, anaerobik ya da fakültatif, kok ya da çubuk şekilli, karbonhidrat metabolizmasının ana fermentasyon ürünlerinden biri olan laktik asiti üreten oldukça değerli mikroorganizmalardır (Saeed 2013). Bu organizmaların lokalizasyonu oldukça geniş bir alanı kapsamaktadır. Yapılan ilk çalışmalarda laktik asit bakterilerinin; toprakta, bitkilerde, herbivor hayvanların rumen ve bağırsak sistemlerinde lokalize olduğu tespit edilse de, takip eden son on yıl içerisinde bu mikroorganizmaların özellikle besin içeriği bakımından zengin ortamlarda bulunduğunu kanıtlamıştır. Özellikle bu bakteriler süt, yoğurt, krema ve tereyağı gibi süt ürünlerinde, sebzelerde, et ve et ürünlerinde de oldukça yoğun miktarda bulunurlar (İşleroğlu and Yıldırım 2008).

Ayrıca laktik asit bakterileri probiyotik ve antimikrobiyal özelliğe sahip olduklarından insan sağlığı açısından da oldukça önemlidirler (Okereke and Montville 1991).

Laktik asit bakterilerinin izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler karakterizasyonuna yönelik bilim insanları tarafından son yıllarda yapılan çalışmalara ait örnekler aşağıda verilmiştir.

Terzic-Vidojevic *et al.* (2006) tarafından yapılan çalışmada, Zlata peynirinin mikroflorası karakterize edilmiştir. Bu çalışmada bahsedilen peynir çeşidinin olgunlaşma süreci boyunca laktik asit bakterileri izole edilerek hangi aşamada hangi mikroorganizma grubu bu tespit edilmeye çalışılmıştır. *Lactococcus* cinsine ait türlerin azaldığı, *Lactobacillus* cinsine ait türlerde ise artış olduğu gözlemlenmiştir. İzolasyon çalışmaları sonucunda bahsedilen peynir örneğinde; *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *L. brevis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Enterococcus faecium* ve *E. faecalis* türlerine ait bakterilerin baskın florayı oluşturduğu ve olgunlaşma sürecinde de bu suşların önemli rol oynadıkları tespit edilmiştir. İdentifikasyon çalışmalarında ise API 50 CH ve rep-PCR analiz metodları kullanılarak bu yöntemlerin etkinliği kanıtlanmıştır. Ayrıca

yapılan araştırmalar sonucunda izolatların bir kısmının antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Lusk *et al.* (2012) tarafından yapılan çalışmada, gelişen sekans teknolojileri kullanılarak Latin tarzı peynirlerde var olan mikrofloranın karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada bahsedilen peynir örneğine ait mikroflora incelenmiş ve baskın cins olarak *Lactococcus* ve *Exiguobacterium* belirlenmiştir. Ayrıca mikrofloranın antimikrobiyal özellikleri de incelenerek, mikrofloraya bağlı olarak farklı çeşitte peynirlerdeki kontaminasyon oranı karşılaştırılmıştır. Moleküler karakterizasyon aşamasında ise 16S rRNA gen dizi analizi tercih edilmiş ve yöntemin etkinliği kanıtlanmıştır.

Kuikui *et al.* (2014) tarafından yapılan çalışmada, pirinç silajından izole edilen laktik asit bakterilerinin konvensiyonel ve moleküler yöntemlerle identifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon amacıyla gerçekleştirilen 16S rRNA ve recA dizi analiz verileri incelendiğinde; *L. plantarum* subsp. *plantarum*, *L. casei*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *E. mundtii*, *Lacyantococcus garvieae*, *E. faecium*, *L. casei* ve *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* türlerinin baskın florayı teşkil ettiği gözlemlenmiştir.

Aydemir *et al.* (2015) tarafından yapılan çalışmada, kars yöresine ait kaşar peynirlerin mikrobiyal florası peynirin olgunlaşma evresi boyunca analiz edilmiştir. Yapılan izolasyon çalışmasının ardından, izolatlar 16S rRNA gen dizi analizi ile identifiye edilmiş ve (GTG)<sub>5</sub>-PCR yöntemi ile de karakterizasyon işlemi tamamlanmıştır. Yapılan analizler sonucunda, bahsedilen peynirde *Lactobacillus* ve *Lactococcus* cinslerinin baskın olduğu, *L. casei*, *L. plantarum* ve *P. acidilactici* türlerinin de yaygın olarak lokalize olduğu tespit edilmiştir.

Ghahremani *et al.* (2015) tarafından yapılan çalışmada, probiyotik potansiyeli olan İran'ın Khorramabad şehrindeki geleneksel peynirden laktik asit bakterileri izole edilerek, bu izolatların fenotipik ve genotipik karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Araştırma sonucunda baskın floara olarak *Lactobacillus* ve *Lactococcus* cinslerinin

bulunduğu, ayrıca *E. faecium*, *E. hirae*, *L. lactis* ve *L. plantarum* türlerine ait birçok bakteriyal suşun da yer aldığı tespit edilmiştir. Elde edilen bakterilerin peynirin olgunlaşması esnasında pH değerini oldukça düşürdüğü ve bu ortamda da test izolatlarının canlılıklarını muhafaza ettiği belirlenmiştir. Çalışmada, karakterizasyon için; 16S rRNA ve ITS PCR yöntemleri kullanılmış ve her iki metodun da identifikasyonda oldukça başarılı olduğu sonucuna varılmıştır.

Carafa *et al.* (2015) tarafından yapılan çalışmada, geleneksel fermente Malga peynirinden izole edilen *Lactobacillus* ve *Pediococcus* cinslerinin identifikasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Moleküler karakterizasyon aşamasında, RAPD-PCR, 16S rRNA gen dizi analizi gerçekleştirilmiş ve sonuçta *P. pentosaceus*, *L. paracasei* ve *L. brevis* türlerinin peynir florasında yoğun olarak bulunduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca yapılan bu çalışma sonucunda identifiye edilen türlerin proteolitik ve lipolitik aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir.

Song *et al.* (2015) tarafından yapılan çalışmada, probiyotik olarak kullanılan *Lactobacillus* cinsine ait türlerin karakterizasyonuna gidilmiştir. Çalışmada elde edilen izolatlar özellikle probiyotik amaçlı kullanılmıştır. Çalışma neticesinde ise *Lactobacillus* cinsine ait olan; *Lactobacillus casei*, *L. sakei*, *L. acidophilus*, *L. fermentum* ve *L. plantarum* türleri elde edilmiştir.

de la Fuente-Salcido *et al.* (2015) tarafından yapılan çalışmada, Mexico’da geleneksel hale gelmiş olan bir fermente içecekten bakteriosinogenik laktik asit bakterilerinin izolasyonuna ve karakterizasyonuna gidilmiştir. İzolasyon çalışmaları sonucunda *Listeria innocua*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, ve *Salmonella* spp. türlerine ait bakteriler tespit edilmiştir. Bu aşamada moleküler yöntem olarak 16S rRNA dizi analizi yapılmış olup neticesinde özellikle *Lactococcus lactis* ve *Enterococcus faecium* türleri tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmada üretilen bakteriyosinler; *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *S. agalactiae*, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, ve *K. pneumoniae*’a karşı inhibitor aktivitesi göstermiştir.

Domingos-Lopes *et al.* (2016) tarafından yapılan çalışmada, geleneksel Pico peynirinden izole edilen laktik asit bakterilerinin karakterizasyonuna gidilmiştir. İzolasyon işlemi peynirin olgunlaşması boyunca devam etmiştir. Moleküler yöntem olarak 16S rRNA gen analizi ve PFGE yöntemi tercih edilmiş olup bu iki yöntemle, bahsedilen peynirde *Lactobacillus* ve *Enterococcus* cinslerinin baskın olduğu görülmüştür. İzolatları karbonhidrat kaynaklarına göre tanımlamada ise API kiti kullanılmıştır. Ayrıca izolatların, peynir üretiminde tat ve aroma oluşumuna olan katkıları da kanıtlanmıştır.

Dec *et al.* (2016) tarafından yapılan çalışmada, kümes hayvanlarından izole edilen laktik asit bakterileri 16S-ARDRA ve MALDI-TOF yöntemleriyle karakterize edilmiştir. Belirtilen iki yöntemle, baskın olarak *Lactobacillus* cinsleri tespit edilmiştir. 16S ARDRA yönteminde *MseI*, *HinfI*, *MboI* ve *AluI* restriksiyon enzimleri kullanılarak 16S rDNA'nın kesimi gerçekleştirilmiştir ve böylece bakterilerde tanılama yapılmıştır. Uygulanan yöntemler neticesinde *Lactobacillus salivarius*, *L. johnsonii* ve *L. ingluviei* türleri baskınlık göstermiştir.

Fermente süt ürünlerinde laktik asit bakterilerinin yoğun bir şekilde lokalize olması bu tez çalışmasının çıkış amaçlarından biri olmuştur. Bu bağlamda beyaz peynir örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonuna gidilmiştir. Ayrıca önemli fenotipik ve genotipik yöntemlerle bu izolatlar identifiye edilerek, moleküler olarak karakterize edilmiştir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan peynir örnekleri başta Erzurum ve ilçeleri olmak üzere, çeşitli il ve ilçelerden temin edildi.

##### 3.1.1. Kimyasallar

**Çizelge 3.1.** Tez kapsamında kullanılan kimyasal maddeler ve kitler

| KİMYASAL                                           | ŞİRKET     |
|----------------------------------------------------|------------|
| Agaroz (DNase-RNase-Protease free)                 | Sigma      |
| Amfisilin                                          | Sigma      |
| API 50 CHL (API kiti)                              | Biomerieux |
| D-Glukoz                                           | Sigma      |
| Dimetilsülfoksit (DMSO)                            | Sigma      |
| Distile su                                         | Thermo     |
| DNA Marker                                         | Thermo     |
| dNTP                                               | Thermo     |
| Etidyum Bromür                                     | Sigma      |
| Etil alkol                                         | Sigma      |
| Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA)                | Sigma      |
| Gliserol                                           | Sigma      |
| Hidrojen klorür (HCl)                              | Sigma      |
| Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | Sigma      |
| Isopropyl $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG)        | Sigma      |
| İmmersiyonyağı                                     | Sigma      |
| İzopropanol                                        | Sigma      |
| Kalsiyum klorür (CaCl <sub>2</sub> )               | Sigma      |

**Çizelge 3.1. (devam)**

|                                                                                              |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Kristal violet                                                                               | Sigma      |
| Lizozim                                                                                      | Sigma      |
| Lügol                                                                                        | Sigma      |
| Magnezyum klorür (MgCl <sub>2</sub> )                                                        | İnvitrogen |
| Malaşit yeşili                                                                               | Sigma      |
| Mineral yağ                                                                                  | Biomerieux |
| N,N,N'',N''-Tetrametilendiamin (TEMED)                                                       | Sigma      |
| Potasyum hidroksit(KOH)                                                                      | Sigma      |
| Promega Wizard <sup>R</sup> Plus Minipreps DNA Purification Systems (Plazmit izolasyon kiti) | Promega    |
| Promega wizard <sup>R</sup> genomic DNA purification kit (DNA izolasyon kiti)                | Promega    |
| RNaz A                                                                                       | İnvitrogen |
| Safranin                                                                                     | Sigma      |
| Sodyum hidroksit (NaOH)                                                                      | Sigma      |
| Sodyum Klorür (NaCl)                                                                         | Sigma      |
| Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (Oksidaz kiti)                                | Biomerieux |
| Triklorik asit (TCA)                                                                         | Sigma      |
| Tris-HCl                                                                                     | Sigma      |
| Tris Asetat EDTA (TAE)                                                                       | Sigma      |
| 5-Bromo-4-Choloro-3-Indolyl β-D-Galactopyranoside (Xgal)                                     | Sigma      |
| 6X Yükleme tamponu                                                                           | Thermo     |

**3.1.2. Tez kapsamında kullanılan materyal ve cihazlar**

3 ml'lik Kuvarz küvet, 1,5 ve 2 ml'lik tüpler ve raklar, 15 ve 50 ml'lik tüpler ve raklar, çeker ocak, derin dondurucu (-86°C), derin dondurucu (-20°C), destile su arıtma cihazı,

elektroforez cihazı, güç kaynağı, hassas terazi, ısıtıcı bloğu, kar üretme cihazı, magnetik karıştırıcı, mikrodalga fırın, mikropipet takımı, mini santrifüj, nanodrop, otoklav, pcr, ph metre, fusion görüntüleme cihazı, soğutmalı santrifüj, uv-vıs spektrofotometre, vorteks, steril kabin, inkübatör, etüv, çalkalamalı-soğutmalı inkübatör, bag mixer

### 3.1.3. Tez kapsamında yapılan deneylerde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

**Çizelge 3.2.** Tez kapsamında yapılan çözeltiler ve hazırlanışları

|                                      |                                                                                                                                                                                                             |
|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1.%0,9'luk NaCl Çözeltisi</b>     | 0,9 gr NaCl tartılıp, 100 ml saf suda çözüldü.                                                                                                                                                              |
| <b>2. Lügol Solüsyonu</b>            | 1 gr iyot ve 2 gr KCl tartılıp, son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.                                                                                                                                  |
| <b>3. Safranin Solüsyonu</b>         | 1 gr safranin %96'lık EtOH'da çözülüp, üzerine 100 ml saf su eklendi.                                                                                                                                       |
| <b>4. Kristal Violet Solüsyonu</b>   | 2 gr kristal violet %96'lık EtOH'da çözülüp, üzerine 80 ml saf su eklendi.                                                                                                                                  |
| <b>5. KOH Solüsyonu</b>              | 3 gr KOH tartılıp, 100 ml saf suda çözüldü ve otoklavlandı.                                                                                                                                                 |
| <b>6. 50 mM EDTA Solüsyonu</b>       | 1,46 g EDTA tartılıp 100 mL suda çözdürüldü ve pH'sı 8'e tamamlandı.                                                                                                                                        |
| <b>7. %70'lik EtOH</b>               | 70 mL EtOH, 30 mL distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.                                                                                                                                                      |
| <b>8. 1X TAE Tamponu</b>             | 100 ml 10X TAE'den alınıp, hacmi 1000 ml ye tamamlandı.                                                                                                                                                     |
| <b>9. CaCl<sub>2</sub> Solüsyonu</b> | 1,11 gr CaCl <sub>2</sub> , 100ml(100 mM olacak şekilde) saf su içinde çözdürüldü, ağzı pamukla kapatılarak otoklavlandı ve kullanılıncaya kadar buzdolabında +4°C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi. |

**Çizelge 3.2. (devam)**

|                                |                                                                                                                                                                                         |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>10. Amfisilin Solüsyonu</b> | 20 mg/ml olacak şekilde steril saf su ile hazırlandı ve 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirilerek steril edildi. Steril edilen çözelti -20°C’de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi. |
| <b>11. X-Gal Solüsyonu</b>     | 40 mg/ml olacak şekilde hazırlanan çözelti, ışık almayacak şekilde -20°C’de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.                                                                       |
| <b>12. IPTG Solüsyonu</b>      | 23,8 mg/ml olacak şekilde steril saf su ile hazırlandı ve 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirildi. Steril edilen çözelti -20°C’de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.               |

**3.1.4. Tez kapsamında yapılan deneylerde kullanılan besiyerlerinin hazırlanışı****Çizelge 3.3. Tez kapsamında kullanılan besiyerlerinin hazırlanışı**

|                   |                                                                       |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 1. MRS Agar       | 66,24 g MRS agar tartılıp 1000 mL saf suda çözüldü ve otoklavlandı.   |
| 2. MRS Broth      | 50 g MRS Broth tartılıp 1000 mL saf suda çözüldü ve otoklavlandı.     |
| 3. M17 Agar       | 35 g M17 Agar tartılıp 1000 mL saf suda çözüldü ve otoklavlandı.      |
| 4. M17 Broth      | 13,25 g M17 Broth tartılıp 1000 mL saf suda çözüldü ve otoklavlandı.  |
| 5. Nutrient Broth | 8 g Nutrient Broth tartılıp 1000 mL saf suda çözüldü ve otoklavlandı. |
| 6. LB Agar        | 25 g LB Agar tartılıp 1000 mL saf suda çözüldü ve otoklavlandı.       |
| 7. LB Broth       | 20 g LB Broth tartılıp 1000 mL saf suda çözüldü ve otoklavlandı.      |

### **3.2. Yöntem**

#### **3.2.1. Örnek Toplanması**

Çalışmada kullanılan peynir örnekleri başta Erzurum ve ilçeleri olmak üzere Türkiye'nin farklı yörelerinden temin edilerek aseptik koşullarda laboratuvar ortamına getirildi. Örnekler çalışma yapılncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi (Adıgüzel 2008).

#### **3.2.2. Laktik asit bakterilerinin izolasyonu**

Çeşitli yörelerden temin edilen peynir örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu için, aseptik koşullarda 25 g deney numunesi alındı ve üzerine 225 ml steril fizyolojik su (%0.9 NaCl) ilave edilerek stomacherde homojenize edildi. Daha sonra bu homojenattan steril serum fizyolojik su kullanılarak uygun dilüsyonlar hazırlandı ve laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve identifikasyonu amacıyla kullanıldı. İzolasyon için MRS (de Man Rogosa Sharpe) ve M17 Agar besiyerlerine, hazırlanan uygun dilüsyonlardan yayma ekim yapıldı ve 35°C'de, 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda gelişen tipik görünümlü kolonilerden hücre ve koloni morfolojisi bakımından farklı olduğu düşünülen izolatlar seçildi. MRS ve M17 agara 3 faz çizgi ekim yapılarak, 35°C'de inkübasyona bırakıldı (Harrigan, 1976). Saflaştırılan kolonilerin uzun süreli muhafazası için, 1.5 ml lik eppendorf tüpler içerisinde hazırlanan gliserol (%30 luk) ve nutrient broth dan oluşan karışım içerisine 2-3 öze dolusu mikroorganizma alınarak konuldu ve vortekslendi. Hazırlanan bu stok kültürler kullanılıncaya kadar kodlanarak (-86°C) muhafaza edildi (Sanchez *et al.* 2000; Adıgüzel 2008).

### **3.2.3. Seçilen izolatların klasik yöntemlerle tanımlanması**

#### **3.2.3.a. Morfolojik özelliklerinin belirlenmesi**

Seçilen izolatların morfolojik özelliklerinin ortaya konulabilmesi için stoktan alınan izolatlar, öncelikle 3 faz çizgi ekimle MRS ve M17 agar besiyerine aktarıldı ve 35°C’de 48 saat süreyle anaerobik ortamda inkübe inkübasyona bırakıldı ve sonunda gelişen kolonilerden örnek alınarak preparatlar hazırlandı. Ardından bu preparatlar özel boyalarla boyanarak mikroskop altında immersiyon objektifi ile incelendi. İnceleme sonucunda bakterilerin morfolojik özellikleri (kokoid, çomak, virgül, spiral, pleomorfik, vs.) belirlendi (Şimşek 2003).

#### **1. Gram boyama**

Bakteriler hücre duvarlarının kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre iki büyük gruba ayrılırlar (Gram pozitif ve Gram negatif). Gram boyama tekniğinde 2 farklı yöntem kullanılmaktadır.

Bu yöntemlerden birincisinde öncelikle; temiz bir lam üzerine, yaklaşık 24 saatlik bakteri kültüründen örnek alınarak smear preparat hazırlanır ve bu preparat kristal violet ile 1 dk boyanır. Bu boya hücreye nüfuz eder ve hem Gram (+), hem de Gram (-) bakteriler, mor renge boyanır. Sürenin sonunda fazla boya preparat üzerinden su ile uzaklaştırılır. Ardından preparatın üzerine sabitleştirici görevi olan lügol eklenir ve 1 dk bekletilir. Daha sonra bu preparat, %96’lık etil alkol ile dikkatli bir şekilde yıkanır. Alkol ile yıkama sonrası Gram (+) bakteriler peptidoglikan tabakalarının kalın olması nedeniyle kristal violet-lügol kompleksini bırakmaz ve mor renkli kalırken, Gram (-) bakterilerin dış membranları bozulur ve ince peptidoglikan tabakaları boyayı tutamadığı için renksizleşir. Yıkama işlemi sonrasında saf sudan geçirilen preparat, safranin ile 20 saniye süreyle boyanır. Boyama süresi sonunda hafif bir şekilde su ile yıkanan preparat kurutularak, immersiyon objektifinde inceleme yapılır. Mikroskop altında mor renkli

olarak görünen hücreler; Gram (+), pembe-kırmızı renkli olarak görünen hücreler ise; Gram (-) olarak değerlendirilir (Johnson and Case 2007; Acar 2009).

Bu metodlardan ikincisinde; bakteriler %3'lük potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi ile muamele edilir. Bu metodda Gram(-) bakterilerin %3'lük KOH çözeltisi ile muamelesi sonucu, hücre duvarının parçalanması ile sitoplazma ve nükleer materyal açığa çıkar ve bundan ötürü viskoz bir yapı oluşur. Lam üzerine damlatılan %3'lük KOH solüsyonu üzerine MRS'de geliştirilen 24-48 saatlik kültürden alınan bir öze dolusu bakteri, KOH solüsyonu ile 5-10 saniye karıştırıldıktan sonra, öze yukarı ve aşağıya doğru hareket ettirilir. Hareket sonucu sakız gibi bir uzamanın gerçekleşmesi durumunda bakteriler Gram (-), bu uzamanın gerçekleşmemesi durumunda ise bakteriler Gram (+) olarak değerlendirilir (Saygılı *et al.* 2006).

## **2. Endospor varlığının belirlenmesi**

Çalışmadaki izolatların tanısının gerçekleşmesi için yapılan klasik yöntemlerden biri de endospor boyamadır. İzolatların endospor ihtiva edip etmediklerini belirlemek için, öncelikle bakteriler MRS ve M17 agar besiyerine ekildi ve endospor oluşumuna neden olan stres şartlarında (sıcak-soğuk, yaşlanma, kuruma) bekletildi. Daha sonra bu kültürlerden örnek alınarak lam üzerinde smear hazırlandı ve hazırlanan smear, kaynayan su banyosu üzerine yerleştirildi. Preparat malaşit yeşili kullanılarak tamamen boyandı ve üzerine kurutma kağıdı konuldu. Kurutma kağıdının sürekli olarak ıslak kalması sağlanarak, 5-7 dk malaşit yeşili ile boyamaya devam edildi. Süre sonunda, preparatın üzerindeki kurutma kağıdı kaldırılıp, preparat hafif su akımı ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırıldı. Preparat, safranin ile 20-30 saniye kadar boyandı. Bu karşıt boya uygulamasından sonra, preparat hafif su akımı ile tekrar yıkanıp kurutuldu ve immersiyon objektifinde endospor durumları incelendi (Harley and Prescott 2002; Adıgüzel 2006).

### 3. Hareketlilik testi

Bu test için deney izolatları, MRS ve M17 Broth + %0,6'lık agar içeren tüplere iğne öze yardımıyla ekildi ve 24-48 saat süreyle inkübasyon gerçekleştirildi. Tüplerde oluşan ekim çizgisine göre gelişim gözlemlenerek hareketlilik durumu incelendi (Arda 2000; Temiz 2000).

#### 3.2.3.b. Fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi

##### 1. İzolatların gelişebildikleri tuz konsantrasyonlarının belirlenmesi

İzolatların gelişme gösterdikleri tuz aralığının belirlenmesi için; farklı tuz konsantrasyonlarına (%2, %4, %6, %8, %10 ve %12'lik) sahip MRS ve M17 Broth besiyerleri hazırlandı. Daha sonra test izolatları farklı tuz konsantrasyonları içeren besiyerlerine inoküle edildi ve ardından 35°C'deki çalkalamalı inkübatörde 24-48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda laktik asit bakterilerinin üreyebildikleri minimum ve maksimum tuz konsantrasyon değerleri belirlendi. Bunun için spektrofotometrede OD<sub>600</sub>'de ölçüm gerçekleştirildi (Holzapfel and Schillinger 1992).

##### 2. İzolatların gelişme sıcaklıklarının belirlenmesi

İzolatların gelişme gösterdikleri sıcaklıkların belirlenmesinde yine MRS Broth besiyeri kullanıldı. Sıcaklık belirlenmesi testinde öncelikle izolatların, bu hazırlanan MRS ve M17 Broth besiyerlerine inokülasyonu gerçekleştirildi. İnokülasyonun ardından izolatlar farklı sıcaklıklarda (10°C, 15°C, 30°C, 35°C ve 45°C) inkübasyona bırakıldı. 24-48 saat süreyle inkübasyonu gerçekleştirilen izolatların inkübasyon sonucunda gelişme gösterdikleri maksimum, minimum ve optimum büyüme sıcaklıkları belirlendi. Bu amaçla; spektrofotometrede (OD<sub>600</sub>) ölçüm gerçekleştirildi (Facklam *et al.* 2002).

### 3. İzolatların gelişebildikleri pH aralıklarının belirlenmesi

İzolatların gelişme gösterdikleri pH aralığının belirlenmesinde; öncelikle farklı pH değerlerine (pH: 3, pH: 5, pH: 7, pH:9 ve pH:11) sahip MRS ve M17 Broth besiyerleri hazırlandı. Ardından test izolatları, MRS ve M17 Broth besiyerlerine inoküle edildi ve 24-48 saat süreyle 35°C’de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra spektrofotometrede ( $OD_{600}$ ) ölçüm yapılarak, izolatların büyüebildikleri maksimum ve minimum pH aralıkları tespit edildi (Tekinşen *et al.* 2002).

#### 3.2.3.c. Biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

##### 1. Katalaz Testi

Bu test ile elde edilen izolatların katalaz enzimine sahip olup olmadıkları belirlendi. Katalaz enzimi, elektron transfer zincirinin sonunda açığa çıkan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )’i parçalayıp,  $H_2O$  ve  $O_2$  gazına dönüştür ve  $O_2$  gazının oluşumu, kabarcıklar şeklinde gözlenebilir. Aerobik solunum yapan veya fakültatif olan mikroorganizmalarda bu enzim vardır. Enzim varlığının araştırılması amacıyla öncelikle bakteriler MRS ve M17 agar besiyerlerinde 24-48 saat süreyle büyütüldü. Daha sonra agar ortamında büyüyen bakterilerden bir öze dolusu alınarak lam üzerine konuldu. Ardından bakteri üzerine bir damla %5’lik  $H_2O_2$  damlatıldı. Öze ile dairesel hareketlerle bakterinin  $H_2O_2$  içerisine nüfuz etmesi sağlandı. Ardından kabarcık oluşması veya oluşmaması durumu gözlemlendi. Kabarcık oluşması bakterinin katalaz enzimini ürettiğini ve katalaz pozitif olduğunu gösterirken, kabarcık oluşmaması katalaz enziminin üretilmediğini ve bakterinin katalaz negatif olduğunu gösterdi (Arda 2000; Harley and Prescott 2002; Adıgüzel 2006).

##### 2. Oksidaz testi

Oksidaz testi ile bakterilerin, elektron transferinde bulunan sitokrom c proteinine sahip olup olmadıkları belirlendi. Sitokrom c proteini (oksidaz c), mitokondrilerde bulunan

büyük bir transmembran proteindir. Solunum olayında görev almakta ve dört sitokrom c molekülünün her birinden birer elektron alarak bunları bir oksijen molekülüne transfer edip, moleküler oksijeni iki su molekülüne çevirir. Bundan dolayı elektron transfer sisteminde hücrel enerji oluşumuna sebep olmaktadır. Yani; elektron taşıma zincirinin terminal elektron alıcısıdır. Yapılan test; organizmanın sitokrom-c oksidase enzimine sahip olması durumunda, bu enzimin reaksiyona girmesi sonucu mavi renk oluşturması esasına dayanır. Bu test için %1 Tetra methyl-p-phenyldiamine dihydrochloride içeren kit halindeki diskler kullanıldı. Bu diskler 1 damla steril saf su ile doyurulup, üzerine MRS ve M17 agar besiyerinde geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen bir öze dolusu eklendi. Bakteride sitokrom c proteini varsa, bu diskte kodlu olan substratıyla reaksiyona girerek, mavimsi mor bir renk oluşumuna neden olur. Mavi mor renk oluşması durumunda bakteri oksidaz pozitif; renk değişiminin görülmemesi durumunda ise bakteri oksidaz negatif olarak değerlendirildi (Harley and Prescott 2002; Adıgüzel 2006; Acar 2009).

### **3. Glikozdan gaz üretim testi**

Bu test için öncelikle 9 ar ml'lik glikoz içeren MRS ve M17 broth besiyerleri hazırlandı ve içerisine durham tüpleri ters çevrilerek yerleştirildi. Ardından sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Sterilizasyonun ardından deney tüplerine steril öze ile bakterilerin ekimi gerçekleştirildi. Tüpler 37°C'de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda gaz üretim potansiyeli gözlemlendi. Gaz üreten bakteriler pozitif ve heterofermantatif, gaz üretmeyen bakteriler ise negatif ve homofermantatif olarak değerlendirildi. (Holzapfel and Schillinger 1992; Stiles and Holzapfel 1997).

#### **3.2.4. Seçilen izolatların moleküler yöntemlerle tanılarının yapılması**

##### **3.2.4.a. API test kiti kullanılarak laktik asit bakterilerinin tanısı**

API Test kiti ile elde edilen izolatların kullandıkları karbon kaynaklarına göre tanısı yapılır. Bu test için öncelikle saf olarak elde edilen laktik asit bakterilerinin MRS ve

M17 agar a üç faz ekim yöntemiyle çizimi gerçekleştirildi. Çizimi gerçekleştirilen petriler 35°C’de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda öncelikle koloniler sretil öze ile toplanarak steril fizyolojik su içerisinde süspanse hale getirildi. Süspanse hale getirilen hücrelere daha sonra McFarland 2 yoğunluğu ayarlaması yapıldı. McFarland 2 yoğunluğu için gerekli olan bakteri miktarı belirlendi ve bu orandaki bakteri süspansiyonu alınarak API 50 CHL Medium a aktarıldı. Medium içerisinde bakteri süspansiyonunun homojen dağılımı gerçekleştirildi. Elde edilen homojenizattan stripler üzerindeki 50 mikrotüpe belirtilen ölçüde steril pastör pipeti yardımıyla inokülasyon gerçekleştirildi. Mikrotüplerin üzeri 2-3 damla mineral yağ ile kaplandı. İnokülasyonu tamamlanan API 50 CHL stripleri 35°C’de 24-48 saat, nemlendirilmiş etüv şartlarında inkübe edildi (Tserovska *et al.* 2002). İnkübasyon sonunda sonuçlar APILAB Plus Ver. 3.3 (BioMérieux Diagnostik A, İstanbul) yardımıyla değerlendirildi.

### **3.2.4.b. 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması**

#### **1. Genomik DNA izolasyonu**

İzolasyon öncesinde saf kültürleri elde edilen laktik asit bakterileri MRS ve M17 agar besiyerlerine çizgi ekim yöntemiyle ekilerek 35°C’de 24-48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Petrilerde gelişen organizmalardan tek koloni alınıp MRS ve M17 Broth besiyerlerine inokülasyon gerçekleştirildi. 24-48 saat’lik 35°C’deki ikinci bir inkübasyonun ardından izolasyona başlandı. İzolasyon için Promega wizard<sup>R</sup> genomic DNA purification kit (A2360) protokolü uygulandı.

#### **İzolasyon prosedürü:**

- MRS ve M17 Broth besiyerinde gelişen hücreler 2ml’lik ependorflara aktarılacak şekilde çöktürüldü. Çökelek 480 µl, 50 Mm EDTA (pH=8) içinde çözüldü. 120 µl, 10 mg/ml lizozim ilave edilerek, homojenize edildi ve 37°C’de 1 saat süre ile inkübasyona bırakıldı.

- Elde edilen karışım 13000 rpm’de 2 dk santrifüjlenip süpernatant atıldı. Tüpe 600 µl Nüklei Lizis Solüsyonu eklenip, hafifçe pipetajlandı.
- Karışım 80°C’de 5 dk inkübe edilip, oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutuldu. Üzerine 3 µl RNase A eklenip, 3-5 kez alt üst edildi ve 37°C’de 30 dk inkübasyona bırakıldı.
- Karışımın oda sıcaklığına gelmesi beklenerek üzerine 200 µl Protein Presipitasyon Solüsyonu eklendi ve 20 saniye vortexlendi.
- 5 dk buzda inkübe edildikten sonra 13000 rpm’de 30 saniye santrifüj edildi ve süpernatant, içerisinde 600 µl oda sıcaklığında bekletilmiş, izopropanol bulunan yeni tüplere aktarıldı. Ependorflarda pellet oluşuncaya kadar alt üst edildi.
- 13000 rpm’de 2 dk santrifüjlenip, süpernatant döküldü. Kurutma kağıdıyla sıvı iyice uzaklaştırıldı.
- Ependorflara 600 µl %70’lik EtOH eklenip, alt üst edildi ardından 13000 rpm’de 2 dk santrifüjlendi.
- Süpernatant atılıp, EtOH uzaklaşsın diye 15-20 dk 37°C’de inkübasyona bırakıldı.
- Ependorflara 100 µl DNA Rehidrasyon Solüsyonu eklenip, 65°C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda DNA’ları içeren ependorf tüpler kullanılıncaya kadar +4°C’de muhafaza edildi.

#### **DNA konsantrasyonlarının ölçülmesi ve çalışma solüsyonlarının hazırlanması:**

DNA miktarı, direkt olarak 260 nm’deki absorbans ölçümüyle belirlenirken, genetik materyalin temizliği yani protein kirliliği taşıyıp taşımadığı ise 280 nm’de okunan absorbans değeriyle tespit edilir. Kuvarz küvet içerisine 998 µl TE çözeltisi konularak 260 nm’ye ayarlı spektrofotometrede absorbansı ölçüldü ve elde edilen değer kör olarak kaydedildi. Ardından küvete 2 µl DNA ilave edilerek karışımın homojen olması sağlandıktan sonra 260 nm’de yeniden bir absorbans ölçüldü. Okunan bu değerden köre ait değer çıkarılarak DNA’nın absorbans değeri bulundu ve yapılan işlemlerin aynısı 280 nm için de tekrarlanarak,  $A_{260}$  ve  $A_{280}$  değerlerine bakıldı  $A_{260}/A_{280}=1-1,7$  olan örnekler çalışma solüsyonu hazırlamak için kullanıldı (Adıgüzel 2006).

### **DNA örneğinin ve çalışma solüsyonunun konsantrasyonunun belirlenmesi (µg/ml)**

DNA Konsantrasyonu (µg/ml)= $A_{260}$  x Seyreltme Faktörü (500) x 50 (DNA için sabit değer) formülü kullanılarak stok solüsyonun DNA konsantrasyonu belirlendi.

DNA çalışma solüsyonunun konsantrasyonu ise; İstenen Konsantrasyon (100ng/µl) x İstenen Hacim (200 µl) / Stok DNA Konsantrasyonu (µg/ml) formülü ile DNA çalışma solüsyonu hazırlandı ve bu hesaplardan elde edilen değer, stok DNA çözeltisinden alınacak miktarı verir. Bu miktar TE çözeltisi ile 200 µl'ye tamamlanarak 100 ng/µl konsantrasyondaki DNA çalışma solüsyonu yapıldı ve DNA tüpleri -86°C'de sonraki çalışmalarda kullanılıncaya kadar saklandı (Adıgüzel 2006).

## **2. 16S rRNA PCR işlemi**

16S rRNA gen bölgesi bakteri sistematigi açısından oldukça önemlidir ve evrimsel açıdan da korunmuş bölge olma özelliği taşımaktadır. Bu amaçla hedef bölge olarak 16S rRNA gen bölgesi seçildi ve evrensel primerler kullanılarak *in vitro* koşullar altında çoğaltıldı.

### **Reaksiyonun hazırlanması**

Öncelikle PCR'ı yapılacak her bir örnek için, 30 µl'lik reaksiyon hazırlandı. Bu amaçla;

- 3 µl 10 x PCR tamponu
- 0,6 µl dNTP
- 0,3'er µl 5 µM primer
- 27F (forward 5' - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3')
- 1492R (reverse 5' - GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3')
- 1,2 µl DMSO
- 1,8 µl MgCl<sub>2</sub>

- 0,3 µl 5 unit/µl *Taq* DNA polimeraz
- 14,1 µl steril saf su

kullanıldı ve 25 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışıma son olarak 3µl kalıp DNA (100 ng) eklenerek son hacim 30 µl'ye tamamlandı (Adıgüzel 2016).

**Çizelge 3.4.** 16S rRNA PCR işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları

| Reaktif            | Konsatrasyon | Miktar (µl) |
|--------------------|--------------|-------------|
| PCR Buffer (sigma) | 10X          | 3           |
| dNTP               | 25 mM        | 0,6         |
| MgCl <sub>2</sub>  | 25 mM        | 1,8         |
| 27F                | 5 pmol       | 3           |
| 1492R              | 5 pmol       | 3           |
| DMSO               | %99          | 1,2         |
| ddH <sub>2</sub> O | -            | 14,1        |
| Kalıp DNA          | 100 ng       | 3           |

**PCR programı:** Örnekler PCR cihazına konuldu ve pcr programı için cihaz şu şekilde programlandı (Adıgüzel 2006):

- 94°C'de 2 dk (Denatürasyon)
  - 94°C'de 1 dk (Denatürasyon)
  - 49°C'de 1 dk (Bağlanma)
  - 72°C'de 2 dk (Uzama)
  - 72°C'de 5 dk (Uzama)
- } 36 Döngü

**Çizelge 3.5.** 16S rRNA PCR işlemi için optimize edilmiş PCR sıcaklık döngüsü

| İşlem           | Sıcaklık | Süre     | Döngü Sayısı |
|-----------------|----------|----------|--------------|
| Ön Denatürasyon | 94       | 2        | 1            |
| Denatürasyon    | 94       | 1        | 36           |
| Bağlanma        | 49       | 1        | 36           |
| Uzama           | 72       | 2        | 36           |
| Son Uzama       | 72       | 5        | 1            |
| Saklama         | 4        | $\infty$ |              |

### 3. 16S rRNA PCR ürünlerinin jel elektroforezi

Jel elektroforezi için öncelikle 0,8 gr agaroz üzerine 80 ml 1X TAE (%1'lik agaroz jel) tamponu ilave edilerek, karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatıldı. Daha sonra jel 50°C'ye kadar soğutuldu ve 4 µg/ml miktarında etidyum bromür eklenerek, içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine döküldü. 30-35 dk beklenerek jelin donması sağlandı ve donan jelden taraklar dikkatlice çıkarıldı. Ardından içerisinde 1X TAE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirildi. Jeldeki ilk çukura, 10 kb DNA markırından [50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma D-7058) 10 µl ve diğer çukurlara ise her bir örnek için 2,5 µl 6X yükleme tamponu, 5 µl PCR ürünü ile karıştırılarak yüklendi. Elektroforez jel düzeneği 90 volta ayarlanarak örnekler 120 dk yürütüldü. Jel üzerinde bulunan ve etidyum bromür ile boyanan DNA bantları jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip bilgisayar ortamında (Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System) analiz edildi.

### 4. Kompetent hücrenin hazırlanması

- *Escherichia coli* JM101 suşu stoktan canlandırıldı (3-4 faz ekim), gelişen bu kültürde ki tek bir koloni deney tüpüne aktarıldı ve 37°C'de 1 gece süre ile çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.

- 300 µl kültür 2700 µl su ile seyreltilip spektrofotometede 600 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Çıkan değer (Trüper and Schleifer) 10 ile çarpılır (seyreltme oranı).  $3/zX10$  formülü kullanılarak elde edilen rakam bize alınması gereken kültürü verir.
- 30 ml LB broth üzerine, hesaplamadan çıkan değer kadar kültür eklenerek, 37°C'de 60 – 90 dk inkübe edildi.
- 40. dk da çalkalamalı inkübatörden alınan kültür, 10 kat seyreltilerek, OD<sub>600</sub> ölçümü yapıldı ve 0,044-0,055'e ulaşıncaya kadar her 10 dk'da bir ölçüme devam edildi.
- Uygun değeri veren kültür 5 - 10 dk süre ile 4400 rpm'de çöktürüldü.
- Daha sonra süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Hücre çökeltisi üzerine soğuk 10 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> eklenerek, 30 – 45 dk süre ile buzda bekletildi.
- Süre sonunda 4°C'de 10 dk 4400 rpm'de karışımın çökmesi sağlandı. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Hücre çökeltisi üzerine soğuk 2 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> eklendi ve buzdolabında bir gün bekletildi.

## 5. Ligasyon işlemi

Ligasyon işlemi için kullanılan kimyasallar:

- 5 µl, 2X Ligasyon buffer
- 3 µl, PCR ürünü
- 1 µl vektör
- 1 µl T<sub>4</sub> DNA ligaz

0,2 ml'lik tüplerde bir araya getirilen karışım 1 gece 16°C'de 13-15 saat bekletildikten sonra, kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

## 6. Transformasyon işlemi

- Her bir ependorf tüpüne buzdolabından çıkardığımız kompetentten 200 µl konuldu.

- Üzerine 2,5 µl ligasyon ürünü eklenerek, 30 dk buzda bekletildi.
- 2 dk süre ile 42°C'ye ayarlı su banyosunda sıcaklık şokuna uğratıldı.
- Üzerlerine 200 µl LB konulup yaklaşık 1 saat 40 dk süre ile 37°C'de bekletildi.
- Daha sonra buzdolabında muhafaza edilen ve kullanılmadan önce oda ısısına gelmesi sağlanan amfisilinli katı besi yerine, 40 µl X-Gal ve 40 µl IPTG yayıldı.
- Yüzey yeterince kuruduktan sonra, Ligasyon ürünü + Kompetent hücre karışımından 150 µl alınarak petrinin ortasına konuldu ve drigalski özesi ile iyice yayılımı sağlandı. Daha sonra petriler, 37°C'de yaklaşık 12-14 saat süre ile inkübasyona bırakıldı.

## 7. Koloni seçme ve sıvı kültüre aktarma

İnkübasyon sonunda petriler, inkübatörden çıkarılarak +4°C'de bir gece bekletildi ve petrilere mavi ve beyaz koloni oluşumu gözlemlendi. Daha sonra her petriden 5–10 kadar beyaz koloni kürdan ile alınıp, içerisinde 3 ml amfisilinli LB broth bulunan tüplere inoküle edildi ve 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

## 8. Koloni PCR için hazırlık ve PCR reaksiyonu

- Amfisilinli LB broth'da geliştirilen kültürden 4 µl alınarak, 16 µl steril saf su bulunan tüplere aktarıldı.
- 10 dk kaynayan su banyosunda tutulduktan sonra, 2 dk süreyle buzda bekletilerek 15°C şokuna tabi tutuldu.
- Süre sonunda tüpler 5 dk 12000 rpm'de santrifüjlendi.
- Ardından elde edilen süpernatant üzerinden PCR işlemi gerçekleştirildi. PCR işlemi için kullanılan kimyasallar:

- 16,1 µl dH<sub>2</sub>O
- 3 µl tampon (MgCl<sub>2</sub>'li)
- 0,6 µl dNTP mix

- 1,8 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM)
- 2'şer µl 5 µM primer
- ✓ **T7** (5'-AATACGACTCACTATAG-3')
- ✓ **SP6** (5'- ATTTAGGTGACACTATAG-3')
- 0,3 µl *Taq* DNA polimeraz
- 1,2 µl DMSO
- 3 µl süpernatant

**PCR programı:** Örnekler PCR cihazına konuldu ve PCR programı için cihaz şu şekilde programlandı (Adıgüzel 2006):

- 94°C'de 2 dk (Denatürasyon)
  - 94°C'de 30 s (Denatürasyon)
  - 55°C'de 30 s (Bağlanma)
  - 72°C'de 2 dk (Uzama)
  - 72°C'de 10 dk (Uzama)
- } 35 Döngü

- EtBr ilaveli %1'lik agaroz jele, markır ve içerisinde istenen geni içeren (pozitif)- içerisinde gen bulunmayan (negatif) kontroller yüklenerek 90 voltta 1 saat süre ile yürütüldü.
- İstenen geni taşıyan koloniler, PCR görüntülerine göre seçilip, plazmit izolasyonu için amfisilinli LB broth'a ekildi.

## 9. Plazmit izolasyonu

Plazmit izolasyonu için Promega firmasına (A1330) ait izolasyon kiti kullanıldı.

Bu amaçla;

- 4 ml amfisilinli LB broth besiyerinde üretilen bakteriyal hücreler, 10000–12000 rpm’de 10 dk santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pelletin üzerine Cell Resuspension Solüsyonundan 250 µl eklendi ve pipetlenerek homojenize olması sağlandı.
- Üzerine 250 µl Cell Lysis Solution ilave edilip, alt üst edilerek 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- 10 µl Alkaline Protease Solüsyonu karışıma eklendikten sonra 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- 350 µl Neutralization Solution ilave edildi ve 12000-14000 rpm’de 10 dk süre ile santrifüjlendi.
- Süpernatanttan yaklaşık 650–750 µl alınarak, içerisinde kolon bulunan ependorf tüpüne aktarıldı ve 12000-14000 rpm’de 1 dk süre ile santrifüjlendi.
- Daha sonra kolonun üzerine 750 µl Wash Solution eklenip, tekrar 1 dk 12000-14000 rpm’de santrifüjlendi.
- Kolonun üzerine 250 µl Wash Solution ilave edilip tekrar 2 dk süre ile 12000-14000 rpm’de santrifüjlendi ve alta geçen sıvı uzaklaştırıldı.
- Tekrar 1 dk süre ile 12-14000 rpm’de oda ısısında santrifüjlendi.
- Kolon yeni bir tüpün içerisine alındı. Üzerine 100 µl Nuclease-Free Water eklendi ve 1 dk süre ile 12000-14000 rpm’de santrifüjlendi.
- Kolon çıkarılıp uzaklaştırıldıktan sonra, tüpler ölçüm yapılmaya kadar –20°C’de muhafaza edildi.

## 10. Plazmitlerin kontrol edilmesi

Koloni PCR ile bu basamak kısmen aşılmış olsa da, elde edilen sonuçları desteklemek amacıyla örnekler *EcoRI* ile kesime tabi tutuldu ve agaroz jelde yürütüldü.

## 11. Plazmitlerin konsantrasyonlarının ölçülmesi ve ayarlanması

1- 998 µl saf su+2 µl plazmit konularak OD<sub>260</sub> da ölçüm yapıldı.

2-  $A_{260} \times 50$  (sabit)  $\times 500$  (dilüsyon oranı) formülü ile plazmitin konsantrasyonu 100–200 ng olacak şekilde ayarlandı.

3- Uygun konsantrasyona sahip örneklerden 30-50  $\mu$ l alınarak sekans analizi için MacroGen (Hollanda) firmasına gönderildi.

## 12. DNA dizi analiz sonuçlarının işlenmesi

Gelen sekans sonuçları BioEdit ile analiz edildi ve FASTA formatına çevirildi. Primer içeren bölgeler ve tekrar dizileri tespit edilerek sekanslar anlamlı hale getirildi.

## 13. Sonuçların değerlendirilmesi

Anlamlı hale getirilen sekans verilerinin blast çalışması [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) ve <http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/identify> internet adresleri kullanılarak blastlandı ve %benzerlik oranları belirlendi. Daha sonra bu veriler genbank'a girilerek her bir örnek için genbank numarası alındı.

### 3.2.5. Rep-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi

#### 3.2.5.a. BOX-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi

Test izolatlarının genomik parmak izi analizleri için kullanılan yöntemlerden bir diğeri de BOX-PCR yöntemidir. Bu yöntem evrensel primer kullanılarak gerçekleştirildi.

### Reaksiyonun Hazırlanması

PCR yapılacak her bir örnek için;

- 12,7  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

- 5 µl 10X Buffer
- 2,5 µl DMSO
- 1.25 µl BSA
- 1,25 µl dNTP(deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP 10Mm
- 4 µl primer BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3')
- 0,3 µl 5 unit/µl Taq DNA polimeraz
- 3 µl kalıp DNA (70 ng/µl)

kullanılarak 30 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı ve PCR işlemi tamamlandı (Adıgüzel 2006).

### PCR Programı

Örnekler PCR cihazına (3x32-well ProFlex™ PCR system) konarak aşağıda belirtilen PCR döngüsü programlandı:

- 95°C'de 7 dk (Denatürasyon)
- 94°C'de 1 dk (Denatürasyon)
- 53°C'de 1 dk (Bağlanma)
- 65°C'de 8 dk (Uzama)
- 65°C'de 16 dk (Uzama)



35 Döngü

### BOX-PCR Ürünlerinin Elektroforezi

Jel elektroforezi için öncelikle 0,8 gr agaroz üzerine 80 ml 1X TAE (%1'lik agaroz jel) tamponu ilave edilerek, karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatıldı. Daha sonra jel 50°C'ye kadar soğutuldu ve 4 µg/ml miktarında etidyum bromür eklenerek, içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektforez jel küvetine döküldü. 30-35 dk beklenerek jelin donması sağlandı ve donan jelden taraklar dikkatlice çıkarıldı. Ardından içerisinde 1X TAE tamponu bulunan elektforez tankının içine yerleştirildi.

Jeldeki ilk çukura, 10 kb'lık DNA markırından [50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma D-7058) 10 µl ve diğer çukurlara ise her bir örnek için 2,5 µl 6X yükleme tamponu, 5 µl PCR ürünü ile karıştırılarak yüklendi. Elektroforez jel düzeneği 90 volta ayarlanarak örnekler 120 dk yürütüldü. Jel üzerinde bulunan ve etidyum bromür ile boyanan DNA bantları jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip bilgisayar ortamında (Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System) analiz edildi.

### **3.2.5.b. (GTG)<sub>5</sub>-PCR Yöntemiyle Bakterilerin Gen Profillerinin Belirlenmesi**

Test izolatlarının genomik parmak izi analizleri için kullanılan yöntemlerden birisi (GTG)<sub>5</sub>-PCR yöntemidir. Bu yöntem evrensel primer kullanılarak gerçekleştirildi.

#### **Reaksiyonun Hazırlanması**

PCR yapılacak her bir örnek için;

- 12,7 µl ddH<sub>2</sub>O
- 5 µl 10X Buffer
- 2,5 µl DMSO
- 1,25 µl BSA
- 1,25 µl dNTP(deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- 4 µl primer GTG<sub>5</sub> (GTG GTG GTG GTG GTG)
- 0,3 µl 5 unit/µl Taq DNA polimeraz
- 3 µl kalıp DNA (70 ng/µl)

kullanılarak 30 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı ve PCR işlemi tamamlandı (Adıgüzel 2006).

## PCR Programı

Örnekler PCR cihazına (3x32-well ProFlex™ PCR system) konarak aşağıda belirtilen PCR döngüsü programlandı:

- 95°C'de 7 dk (Denatürasyon)
  - 94°C'de 1 dk (Denatürasyon)
  - 53°C'de 1 dk (Bağlanma)
  - 65°C'de 8 dk (Uzama)
  - 65°C'de 16 dk (Uzama)
- } 35 Döngü

## (GTG)<sub>5</sub>-PCR Ürünlerinin Elektroforezi

Jel elektroforezi için öncelikle 0,8 gr agaroz üzerine 80 ml 1X TAE (%1'lik agaroz jel) tamponu ilave edilerek, karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatıldı. Daha sonra jel 50°C'ye kadar soğutuldu ve 4 µg/ml miktarında etidyum bromür eklenerek, içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine döküldü. 30-35 dk beklenerek jelin donması sağlandı ve donan jelden taraklar dikkatlice çıkarıldı. Ardından içerisinde 1X TAE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirildi. Jeldeki ilk çukura, 10 kb'lık DNA markırından [50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma D-7058) 10 µl ve diğer çukurlara ise her bir örnek için 2,5 µl 6X yükleme tamponu, 5 µl PCR ürünü ile karıştırılarak yüklendi. Elektroforez jel düzeneği 90 volta ayarlanarak örnekler 1 saat yürütüldü. Jel üzerinde bulunan ve etidyum bromür ile boyanan DNA bantları jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip bilgisayar ortamında (Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System) analiz edildi.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada Erzurum ve ilçeleri başta olmak üzere çeşitli illerden peynir örnekleri toplandı. Aseptik şartlarda çalışmalara başlanarak çeşitli laktik asit bakterilerinin izolasyonu gerçekleştirildi. Araştırmada toplam 42 adet laktik asit bakterisi izole edilerek bu bakterilerin öncelikle morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri belirlendi. Daha sonra bu izolatlar farklı moleküler yöntemler (API, 16S rRNA gen analizi ve rep-PCR) kullanılarak identifikasyon çalışmasına devam edildi.

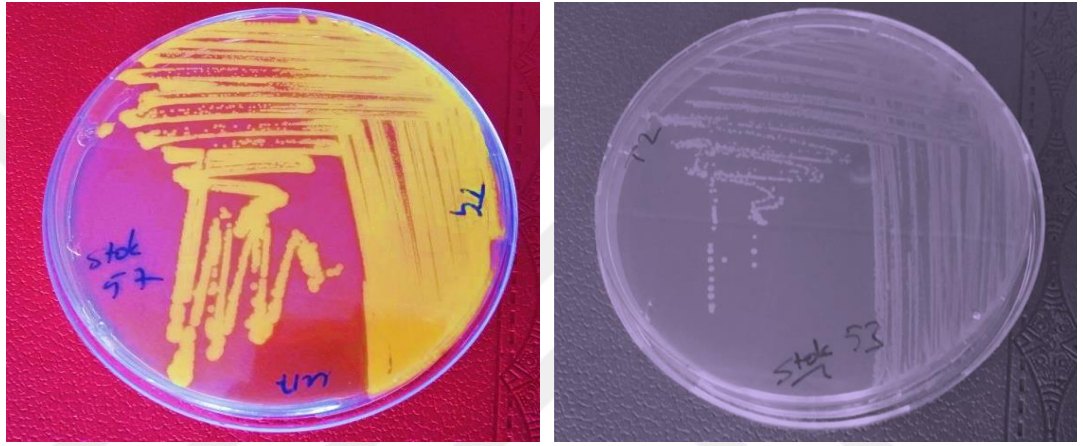
##### 4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Çalışma kapsamında laktik asit bakterilerinin izolasyonu için Erzurum (Merkez, Hasankale, Tekman), Kars, Karaman, Konya ve Van illerinden temin edilen peynir örneklerinden izolasyon çalışması sunucunda toplam 42 adet bakteriyal izolat elde edildi ve stok kültürleri hazırlandı (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** Laktik asit bakteri suşları ve izole edildiği yöreler

| İzolatların ait oldukları yöreler | İzole edilen suşlar                                |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------|
| <b>Erzurum</b>                    | MA 2, MA 4, MA 7, MA 8, MA 28,<br>MA 30, MA 34     |
| <b>Hasankale</b>                  | MA 3, MA 5, MA 35, MA 47, MA 51                    |
| <b>Tekman</b>                     | MA 12, MA 19, MA 25, MA 26, MA 31,<br>MA 38, MA 55 |
| <b>Kars</b>                       | MA 10, MA 33, MA 37, MA 46, MA 56,<br>MA 57        |
| <b>Karaman</b>                    | MA 9, MA 11, MA 20, MA 43, MA 54                   |
| <b>Konya</b>                      | MA 13, MA 41, MA 44, MA 36, MA 52,                 |
| <b>Van</b>                        | MA 21, MA 23, MA 27, MA 39, MA 50,<br>MA 53, MA 60 |

İzolasyonu gerçekleştirilen bakterilerin yapılan işlemlerin ardından stok kültürleri hazırlandı. Bunun için petride saf kültürleri bulunan bakterilerden bir öze dolusu alınarak Nutrient Broth ve gliserol içeren tüplere inokülasyon gerçekleştirildi. Ardından bu tüpler kullanılıncaya kadar  $-86^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Böylelikle bakterilere ait stok kültür koleksiyonları hazırlandı. Saf kültürleri elde edilen bakterilere ait petri görüntüleri Şekil 4.1'de verilmiştir.



**Şekil 4.1.** MA 34 ve MA 56 bakterilerine ait petri görüntüleri

## **4.2. Seçilen İzolatların Klasik Yöntemlerle Tanılarının Yapılması**

### **4.2.1. Morfolojik özelliklerinin belirlenmesi**

Bakterilerin morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla basit boyama yapıldı ve immersiyon objektifinde incelendi. Sonuçta izolatların hücre morfolojilerinin kok ya da çubuk şeklinde olduğu görüldü (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.2.** İzolatlara ait morfolojik özellikler

| İzolât kodu | Morfoloji |
|-------------|-----------|
| MA 2        | Kok       |
| MA 3        | Çubuk     |
| MA 4        | Çubuk     |
| MA 5        | Çubuk     |
| MA 7        | Çubuk     |
| MA 8        | Çubuk     |
| MA 9        | Çubuk     |
| MA 10       | Çubuk     |
| MA 11       | Çubuk     |
| MA 12       | Çubuk     |
| MA 13       | Kok       |
| MA 19       | Kok       |
| MA 20       | Çubuk     |
| MA 21       | Çubuk     |
| MA 23       | Kok       |
| MA 25       | Kok       |
| MA 26       | Kok       |
| MA 27       | Kok       |
| MA 28       | Çubuk     |
| MA 30       | Çubuk     |
| MA 31       | Kok       |
| MA 33       | Kok       |
| MA 34       | Çubuk     |
| MA 35       | Kok       |
| MA 36       | Çubuk     |
| MA 37       | Kok       |
| MA 38       | Kok       |
| MA 39       | Kok       |
| MA 41       | Çubuk     |
| MA 43       | Çubuk     |
| MA 44       | Kok       |
| MA 46       | Kok       |
| MA 47       | Kok       |
| MA 50       | Kok       |
| MA 51       | Çubuk     |
| MA 52       | Çubuk     |
| MA 54       | Çubuk     |
| MA 55       | Kok       |
| MA 56       | Çubuk     |
| MA 57       | Çubuk     |
| MA 60       | Kok       |

## 1. Gram boyama sonuçları

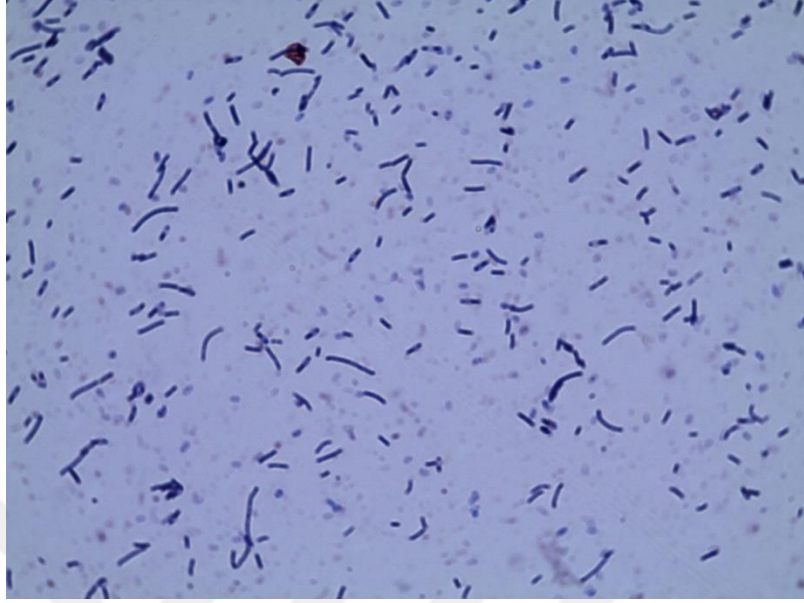
Gram testinde iki farklı metot kullanıldı. Birinci yöntemde bakterilerin smear preparatları hazırlanarak özel boyamalar yapılırken; ikinci yöntemde bakteriler %3'lük KOH ile muamele edildi. Birinci yöntem sonucu mikroskopta incelenerek ortaya konurken; ikinci yöntem görsel olarak izlendi. İlk yöntemde, mikroskop altında mor renkli olarak görünen hücreler; Gram (+), pembe-kırmızı renkli olarak görünen hücreler ise; Gram (-) olarak değerlendirildi. İkinci yöntemde ise, hareket sonucu sakız gibi bir uzamanın gerçekleşmesi durumunda bakteriler Gram (-), bu uzamanın gerçekleşmemesi durumunda ise bakteriler Gram (+) olarak değerlendirildi. Değerlendirmeler sonucu izolatların ikisi hariç tümünün Gram(+) olduğu gözlemlendi (Çizelge 4.3). M 34 bakterisine ait mikroskop görüntüsü Şekil 4.2'de verilmiştir.

**Çizelge 4.3.** İzolatlara ait gram boyama sonuçları

| İzolat kodu | Gram |
|-------------|------|
| MA 2        | +    |
| MA 3        | +    |
| MA 4        | +    |
| MA 5        | +    |
| MA 7        | +    |
| MA 8        | +    |
| MA 9        | +    |
| MA 10       | +    |
| MA 11       | +    |
| MA 12       | +    |
| MA 13       | +    |
| MA 19       | +    |
| MA 20       | +    |
| MA 21       | +    |
| MA 23       | +    |

Çizelge 4.3. (devam)

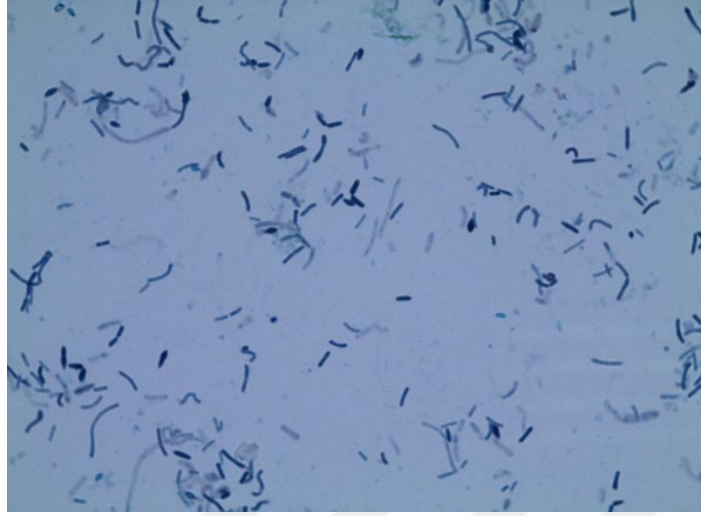
|       |   |
|-------|---|
| MA 25 | + |
| MA 26 | - |
| MA 27 | + |
| MA 28 | + |
| MA 30 | + |
| MA 31 | + |
| MA 33 | + |
| MA 34 | + |
| MA 35 | + |
| MA 36 | + |
| MA 37 | + |
| MA 38 | - |
| MA 39 | + |
| MA 41 | + |
| MA 43 | + |
| MA 44 | + |
| MA 46 | + |
| MA 47 | + |
| MA 50 | + |
| MA 51 | + |
| MA 52 | + |
| MA 54 | + |
| MA 55 | + |
| MA 56 | + |
| MA 57 | + |
| MA 60 | + |



**Şekil 4.2.** MA 34 bakterisine ait gram boyama görüntüsü

## **2. Endospor Boyama Sonuçları**

İzolatların klasik yöntemlerle tanısının gerçekleştirilmesi için gerekli olan yöntemlerden birisi de endospor boyamadır. Endospor boyama, öncelikle bakterilerden smear hazırlanarak yapıldı. Smear üzerinde özel endospor boyama yapıldı. Daha sonra yıkama işlemi yapılarak mikroskop altında endospor varlığı incelendi. Yapılan çalışma sonucunda MA 12 ve MA 41 hariç hiçbir test izolatının endospor içermediği tespit edildi (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** MA 9 bakterisine ait endospor boyama görüntüsü

### 3. Hareketlilik Testi Sonuçları

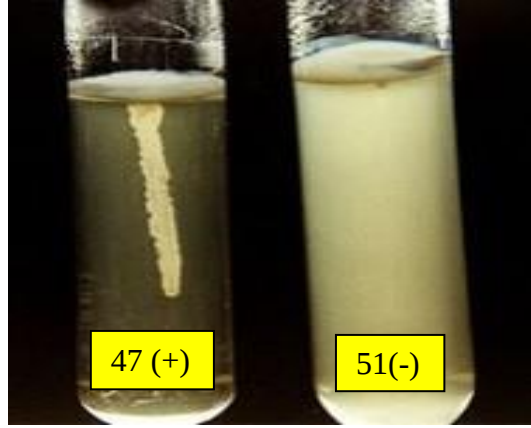
Hareketlilik testi için deney izolatları, MRS ve M17 Broth + %0,6'lık agar içeren tüplere iğne öze yardımıyla ekim yapıldı ve oluşan ekim çizgisine göre gelişim durumları incelenerek hareketlilikleri hakkında yorum yapıldı. Bunun sonucunda bazı izolatların hareketli bazılarının ise hareketsiz olduğu gözlemlendi (Çizelge 4.4). İzolatlara ait hareketlilik test sonuçları görüntü Şekil 4.4'te verilmiştir.

**Çizelge 4.4.** İzolatlara ait hareketlilik testi sonuçları

| İzolat kodu | Hareketlilik |
|-------------|--------------|
| MA 2        | -            |
| MA 3        | +            |
| MA 4        | -            |
| MA 5        | +            |
| MA 7        | -            |
| MA 8        | +            |
| MA 9        | -            |
| MA 10       | -            |
| MA 11       | -            |

Çizelge 4.4. (devam)

|       |   |
|-------|---|
| MA 12 | - |
| MA 13 | + |
| MA 19 | + |
| MA 20 | - |
| MA 21 | + |
| MA 23 | + |
| MA 25 | - |
| MA 26 | - |
| MA 27 | - |
| MA 28 | - |
| MA 30 | - |
| MA 31 | + |
| MA 33 | - |
| MA 34 | - |
| MA 35 | - |
| MA 36 | - |
| MA 37 | - |
| MA 38 | - |
| MA 39 | - |
| MA 41 | + |
| MA 43 | - |
| MA 44 | - |
| MA 46 | - |
| MA 47 | + |
| MA 50 | + |
| MA 51 | - |
| MA 52 | - |
| MA 54 | - |
| MA 55 | - |
| MA 56 | - |
| MA 57 | + |
| MA 60 | - |



**Şekil 4.4.** MA 47 ve MA 51 bakterilerine ait hareketlilik testi sonuçları

#### **4.2.2. Fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi**

##### **1. İzolatların gelişebildikleri tuz konsantrasyonlarının belirlenmesi**

İzolatların gelişebildikleri tuz konsantrasyonunun belirlenebilmesi için %2, %4, %6, %8, %10 ve %12'lik NaCl kullanıldı. OD 600 nm'de yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda bakterilerin gelişebildikleri tuz konsantrasyon aralığı belirlendi. Sonuçlar Çizelge 4.5'te verilmiştir.

**Çizelge 4.5.** İzolatların gelişebildikleri tuz konsantrasyon aralığı(%)

| İzolat kodu | Gelişebildiği tuz konsantrasyon aralığı(%) |
|-------------|--------------------------------------------|
| MA 2        | 2-8                                        |
| MA 3        | 2-9                                        |
| MA 4        | 2-9                                        |
| MA 5        | 2-11                                       |
| MA 7        | 2-11                                       |
| MA 8        | 2-8                                        |
| MA 9        | 2-8                                        |
| MA 10       | 2-9                                        |
| MA 11       | 4-6                                        |
| MA 12       | 2-8                                        |
| MA 13       | 2-11                                       |
| MA 19       | 4-6                                        |
| MA 20       | 2-6                                        |
| MA 21       | 2-12                                       |
| MA 23       | 2-4                                        |
| MA 25       | 2-6                                        |
| MA 26       | 2-5                                        |
| MA 27       | 2-10                                       |
| MA 28       | 2-11                                       |
| MA 30       | 2-10                                       |
| MA 31       | 2-8                                        |
| MA 33       | 2-6                                        |
| MA 34       | 2-8                                        |
| MA 35       | 2-8                                        |
| MA 36       | 2-11                                       |
| MA 37       | 2-8                                        |
| MA 38       | 2-8                                        |
| MA 39       | 2-8                                        |

**Çizelge 4.5. (devam)**

|       |      |
|-------|------|
| MA 41 | 2-8  |
| MA 43 | 2-5  |
| MA 44 | 2-6  |
| MA 46 | 2-11 |
| MA 47 | 2-8  |
| MA 50 | 2-11 |
| MA 51 | 2-11 |
| MA 52 | 2-8  |
| MA 54 | 2-10 |
| MA 55 | 2-10 |
| MA 56 | 2-8  |
| MA 57 | 2-6  |
| MA 60 | 2-6  |

## 2. İzolatların gelişme sıcaklıklarının belirlenmesi

İzolatların en iyi gelişim gösterdiği sıcaklıkların belirlenebilmesi için 10°C, 15°C, 30°C, 35°C, 37°C ve 45°C’de inkübasyon gerçekleştirildi ve sonuçlar Çizelge 4.6’da verildi.

**Çizelge 4.6. İzolatların gelişme gösterdikleri sıcaklık değerleri**

| İzolat kodu | 10°C | 15°C | 30°C | 35°C | 37°C | 45°C |
|-------------|------|------|------|------|------|------|
| MA 2        | -    | +    | +    | +    | +    | +    |
| MA 3        | -    | -    | +    | +    | +    | -    |
| MA 4        | -    | -    | +    | +    | +    | -    |
| MA 5        | -    | +    | +    | +    | +    | +    |
| MA 7        | -    | -    | +    | +    | +    | -    |
| MA 8        | -    | -    | +    | +    | +    | -    |
| MA 9        | -    | +    | +    | +    | +    | +    |
| MA 10       | -    | +    | +    | +    | +    | +    |

Çizelge 4.6. (devam)

|       |   |   |   |   |   |   |
|-------|---|---|---|---|---|---|
| MA 11 | - | + | + | + | + | + |
| MA 12 | - | - | + | + | + | - |
| MA 13 | - | + | + | + | + | + |
| MA 19 | - | - | + | + | + | - |
| MA 20 | - | + | + | + | + | + |
| MA 21 | - | - | + | + | + | - |
| MA 23 | - | + | + | + | + | + |
| MA 25 | - | - | + | + | + | - |
| MA 26 | - | - | + | + | + | - |
| MA 27 | - | + | + | + | + | + |
| MA 28 | - | + | + | + | + | + |
| MA 30 | - | + | + | + | + | + |
| MA 31 | - | + | + | + | + | + |
| MA 33 | - | - | + | + | + | - |
| MA 34 | - | - | + | + | + | - |
| MA 35 | - | + | + | + | + | + |
| MA 36 | - | - | + | + | + | - |
| MA 37 | - | - | + | + | + | - |
| MA 38 | - | - | + | + | + | - |
| MA 39 | - | - | + | + | + | - |
| MA 41 | - | - | + | + | + | - |
| MA 43 | - | - | + | + | + | - |
| MA 44 | - | - | + | + | + | - |
| MA 46 | - | + | + | + | + | + |
| MA 47 | - | - | + | + | + | - |
| MA 50 | - | - | + | + | + | - |
| MA 51 | - | - | + | + | + | - |
| MA 52 | - | + | + | + | + | + |
| MA 54 | - | + | + | + | + | + |
| MA 55 | - | - | + | + | + | - |
| MA 56 | - | + | + | + | + | + |
| MA 57 | - | + | + | + | + | + |
| MA 60 | - | - | + | + | + | - |

### 3. İzolatların gelişebildikleri pH aralıklarının belirlenmesi

İzolatların gelişebildikleri pH aralıklarının belirlenebilmesi için; pH: 3, pH: 5, pH: 7, pH:9 ve pH:11'deki gelişimleri izlendi ve sonuçlar Çizelge 4.7'de verildi.

**Çizelge 4.7.** İzolatların gelişme gösterdikleri pH aralığı

| İzolat kodu | Gelişebildiği pH aralığı(%) |
|-------------|-----------------------------|
| MA 2        | 4-7                         |
| MA 3        | 3-5                         |
| MA 4        | 4-6                         |
| MA 5        | 4-6                         |
| MA 7        | 4-6                         |
| MA 8        | 3-6                         |
| MA 9        | 3-5                         |
| MA 10       | 4-6                         |
| MA 11       | 4-6                         |
| MA 12       | 5-6                         |
| MA 13       | 4-6                         |
| MA 19       | 3-6                         |
| MA 20       | 4-6                         |
| MA 21       | 4-6                         |
| MA 23       | 3-5                         |
| MA 25       | 4-6                         |
| MA 26       | 4-6                         |
| MA 27       | 4-6                         |
| MA 28       | 4-5                         |
| MA 30       | 5-6                         |
| MA 31       | 4-6                         |
| MA 33       | 4-6                         |
| MA 34       | 4-6                         |
| MA 35       | 4-6                         |

**Çizelge 4.7. (devam)**

|       |     |
|-------|-----|
| MA 36 | 4-6 |
| MA 37 | 4-6 |
| MA 38 | 5-7 |
| MA 39 | 5-7 |
| MA 41 | 4-5 |
| MA 43 | 4-6 |
| MA 44 | 5-6 |
| MA 46 | 4-7 |
| MA 47 | 4-6 |
| MA 50 | 3-5 |
| MA 51 | 4-6 |
| MA 52 | 3-6 |
| MA 54 | 5-7 |
| MA 55 | 4-6 |
| MA 56 | 4-6 |
| MA 57 | 3-5 |
| MA 60 | 4-6 |

#### 4.2.3. Biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

##### 1. Katalaz Testi

Yapılan analiz sonucunda izolatların hiçbirinin ilgili enzimi içermediği yani katalaz negatif olduğu tespit edildi.

## 2. Oksidaz testi

Yapılan be test sonucunda bakterilerin tamamının sitokrom C proteinine sahip olmadığı yani oksidaz negatif oldukları belirlendi.

## 3. Glikozdan gaz üretim testi

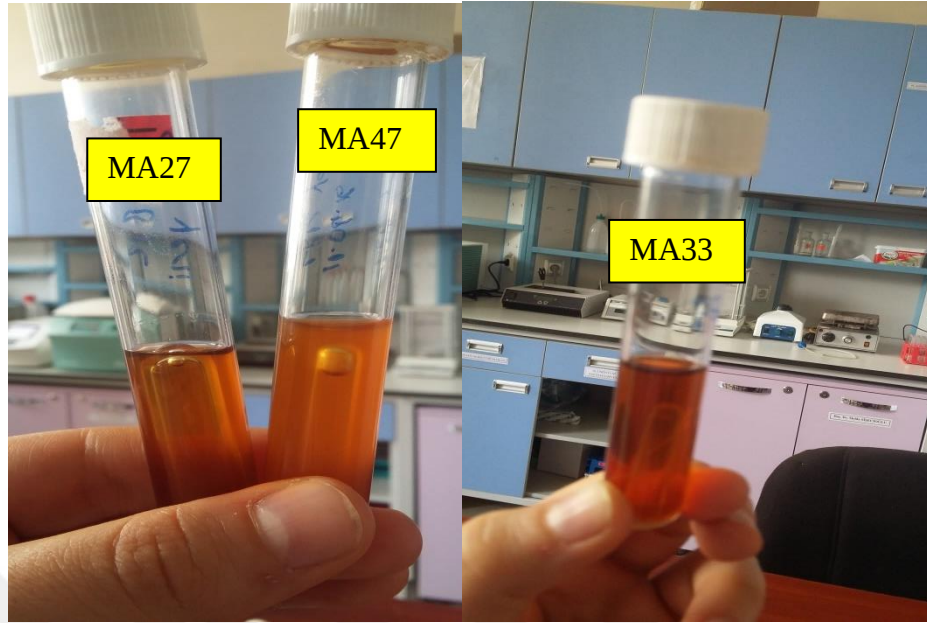
Bu test ile izolatların gaz üretim potansiyelleri araştırıldı. Gaz üreten bakteriler pozitif ve heterofermantatif, gaz üretmeyen bakteriler ise negatif ve homofermantatif olarak değerlendirildi (Çizelge 4.8). Gaz üretimini gösteren örnek görüntü Şekil 4.5'te verilmiştir.

**Çizelge 4.8.** İzolatların gaz üretim potansiyelleri

| İzolat kodu | Gaz üretim potansiyeli |
|-------------|------------------------|
| MA 2        | Heterofermantatif      |
| MA 3        | Homofermantatif        |
| MA 4        | Heterofermantatif      |
| MA 5        | Homofermantatif        |
| MA 7        | Heterofermantatif      |
| MA 8        | Homofermantatif        |
| MA 9        | Heterofermantatif      |
| MA 10       | Homofermantatif        |
| MA 11       | Heterofermantatif      |
| MA 12       | Heterofermantatif      |
| MA 13       | Heterofermantatif      |
| MA 19       | Homofermantatif        |
| MA 20       | Heterofermantatif      |
| MA 21       | Homofermantatif        |
| MA 23       | Heterofermantatif      |
| MA 25       | Heterofermantatif      |

Çizelge 4.8. (devam)

|       |                        |
|-------|------------------------|
| MA 26 | <b>Homofermantatif</b> |
| MA 27 | Heterofermantatif      |
| MA 28 | Heterofermantatif      |
| MA 30 | Homofermantatif        |
| MA 31 | Heterofermantatif      |
| MA 33 | Homofermantatif        |
| MA 34 | Heterofermantatif      |
| MA 35 | Homofermantatif        |
| MA 36 | Homofermantatif        |
| MA 37 | Homofermantatif        |
| MA 38 | Homofermantatif        |
| MA 39 | Homofermantatif        |
| MA 41 | Homofermantatif        |
| MA 43 | Heterofermantatif      |
| MA 44 | Heterofermantatif      |
| MA 46 | Homofermantatif        |
| MA 47 | Heterofermantatif      |
| MA 50 | Homofermantatif        |
| MA 51 | Heterofermantatif      |
| MA 52 | Heterofermantatif      |
| MA 54 | Heterofermantatif      |
| MA 55 | Homofermantatif        |
| MA 56 | Heterofermantatif      |
| MA 57 | Heterofermantatif      |
| MA 60 | Homofermantatif        |



**Şekil 4.5.** MA 27, MA 47 ve MA 33 izolatlarına ait gaz üretim testi sonucu (Sol taraftaki heterofermantatif, sağ taraftaki ise homofermantatif izolata aittir).

#### 4.2.4. Seçilen izolatların moleküler yöntemlerle tanılarının yapılması

##### 4.2.4.a. API test kiti kullanılarak laktik asit bakterilerinin tanısı

Elde edilen izolatların kullanmış oldukları karbon kaynaklarının belirlenmesi ve örneklerin identifikasyonu için API test kiti (BioMerieux) kullanıldı ve elde edilen sonuçlar APILAB Plus Ver. 3.3 (BioMérieux Diagnostik A, İstanbul) yardımıyla değerlendirildi.

Yapılan değerlendirmeler sonucunda MA3 ve MA4 %86,9 oranında *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris*, MA5 %99,9 oranında *Lactobacillus plantarum*, MA7 %99,9 oranında *L. paracasei ssp paracasei*, MA8 %98,3 *L. paracasei ssp paracasei*, MA10 %99,9, *L. plantarum*, MA12 %78,4 oranında *Leu. mesenteroides*, MA28 %95,5 oranında *L. brevis*, MA30 %95,5 oranında *L. brevis*, MA31 %84,3 oranında *L. delbrueckii ssp. lactis*, MA34 %99,7 oranında *L. paracasei ssp paracasei*, MA35 %98,1 oranında *Pediococcus acidilactici*, MA36 %86,3 oranında *L. plantarum*, MA 39 %77,9

oranında *L. delbrueckii ssp. lactis*, MA41 %78,4 oranında *Leu. mesenteroides*, MA43 %86,3 oranında *L. plantarum*, MA46 %98,3 oranında *P. acidilactici*, MA51 %99,7 oranında *L. paracasei ssp. paracasei*, MA53 %88,4 oranında *Pediococcus spp.*, MA55 %88,4 oranında *Pediococcus spp.* ve MA60 %88,4 oranında *Pediococcus spp.* olarak belirlendi.

**Çizelge 4.9.** API sonuçlarına göre tanımlanan laktik asit bakterileri

| İzolat Kodu | %Benzerlik Oranı | Tanı Sonucu                                    |
|-------------|------------------|------------------------------------------------|
| MA 3        | %86,9            | <i>Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris</i> |
| MA 4        | %86,9            | <i>Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris</i> |
| MA 5        | %99,9            | <i>Lactobacillus plantarum</i>                 |
| MA 7        | %99,9            | <i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i>   |
| MA 8        | %98,3            | <i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i>   |
| MA 9        | -                | Eşleşme bulunamadı                             |
| MA 10       | %99,9            | <i>Lactobacillus plantarum</i>                 |
| MA 11       | -                | Eşleşme bulunamadı                             |
| MA 12       | %78,4            | <i>Leuconostoc mesenteroides</i>               |
| MA 20       | -                | Eşleşme bulunamadı                             |
| MA 28       | %95,5            | <i>Lactobacillus brevis</i>                    |
| MA 30       | %95,5            | <i>Lactobacillus brevis</i>                    |
| MA 31       | %84,3            | <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis</i>   |
| MA 33       | -                | Eşleşme bulunamadı                             |
| MA 34       | %99,7            | <i>Lactobacillus paracasei ssp. paracasei</i>  |
| MA 35       | %98,1            | <i>Pediococcus acidilactici</i>                |
| MA 36       | %86,3            | <i>Lactobacillus plantarum</i>                 |
| MA 39       | %77,9            | <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis</i>   |
| MA 41       | %78,4            | <i>Leuconostoc mesenteroides</i>               |
| MA 43       | %86,3            | <i>Lactobacillus plantarum</i>                 |
| MA 46       | %98,1            | <i>Pediococcus acidilactici</i>                |
| MA 51       | %99,7            | <i>Lactobacillus paracasei ssp. paracasei</i>  |
| MA 52       | -                | Eşleşme bulunamadı                             |

Çizelge 4.9. (devam)

|       |       |                        |
|-------|-------|------------------------|
| MA 53 | %88,4 | <i>Pediococcus spp</i> |
| MA 54 | -     | Eşleşme bulunamadı     |
| MA 55 | %88,4 | <i>Pediococcus spp</i> |
| MA 56 | -     | Eşleşme bulunamadı     |
| MA 57 | -     | Eşleşme bulunamadı     |
| MA 60 | %88,4 | <i>Pediococcus spp</i> |

Çizelge 4.10. API sonuçlarına göre tanımlanan laktik asit bakterilerinin kullandığı karbon kaynakları

| Karbon Kaynakları   | MA4 | MA28 | MA30 | MA7 | MA8 | MA34 | MA3 |
|---------------------|-----|------|------|-----|-----|------|-----|
| 0 Control           | -   | -    | -    | -   | -   | -    | -   |
| 1 Gliserol          | -   | -    | -    | -   | -   | -    | -   |
| 2 Erythritol        | -   | -    | -    | -   | -   | -    | -   |
| 3 D-Arabinose       | -   | -    | -    | -   | -   | -    | -   |
| 4 L-Arabinose       | +   | +    | +    | -   | -   | -    | +   |
| 5 Ribose            | -   | +    | +    | +   | +   | +    | -   |
| 6 D-Xylose          | -   | +    | +    | -   | -   | -    | -   |
| 7 L-Xylose          | -   | -    | -    | -   | -   | -    | -   |
| 8 Adonitol          | -   | -    | -    | +   | -   | -    | -   |
| 9 β Methyl-xyloside | -   | -    | -    | -   | -   | -    | -   |
| 10 Galactose        | -   | +    | +    | +   | +   | +    | -   |
| 11 D-Glucose        | -   | +    | +    | +   | +   | +    | -   |
| 12 D-Fructose       | -   | +    | +    | +   | +   | +    | -   |
| 13 D-Mannose        | -   | -    | -    | +   | +   | +    | -   |
| 14 L-Sorbose        | -   | -    | -    | -   | +   | -    | -   |
| 15 Rhamnose         | -   | -    | -    | -   | -   | -    | -   |
| 16 Dulcitol         | -   | -    | -    | -   | +   | +    | -   |
| 17 Inositol         | -   | -    | -    | -   | -   | -    | -   |
| 18 Mannitol         | -   | -    | -    | +   | +   | +    | -   |

Çizelge 4.10. (devam)

|                                |   |   |   |   |   |   |   |
|--------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| <b>19 Sorbitol</b>             | - | - | - | + | + | + | - |
| <b>20 Methyl-D-mannoside</b>   | - | - | - | - | - | - | - |
| <b>21 Methyl-D-glucoside</b>   | - | ? | ? | - | + | - | - |
| <b>22 N Acetyl glucosamine</b> | - | ? | ? | + | + | + | - |
| <b>23 Amygdaline</b>           | - | - | - | + | + | - | - |
| <b>24 Arbutine</b>             | - | - | - | + | + | + | - |
| <b>25 Esculine</b>             | ? | - | - | + | - | - | ? |
| <b>26 Salicine</b>             | - | - | - | + | + | + | - |
| <b>27 Cellobiose</b>           | - | - | - | + | + | + | - |
| <b>28 Maltose</b>              | - | + | + | ? | + | + | - |
| <b>29 Lactose</b>              | - | + | + | + | + | - | - |
| <b>30 Melibiose</b>            | - | + | + | - | - | - | - |
| <b>31 Saccharose</b>           | - | - | - | ? | + | - | - |
| <b>32 Trehalose</b>            | - | - | - | + | + | + | - |
| <b>33 Inuline</b>              | - | - | - | - | + | - | - |
| <b>34 Melezitose</b>           | - | - | - | + | - | + | - |
| <b>35 D-Raffinose</b>          | - | - | - | - | - | - | - |
| <b>36 Amidon</b>               | - | - | - | - | - | - | - |
| <b>37 Glycogene</b>            | - | - | - | - | - | - | - |
| <b>38 Xylitol</b>              | - | - | - | - | - | - | - |
| <b>39 Gentiobiose</b>          | - | - | - | - | + | + | - |
| <b>40 D-Turanose</b>           | - | - | - | + | + | + | - |
| <b>41 D-Lyxose</b>             | - | - | - | - | + | - | - |
| <b>42 D-Tagatose</b>           | - | - | - | + | + | + | - |
| <b>43 D-Fucose</b>             | - | - | - | - | - | - | - |
| <b>44 L-Fucose</b>             | - | - | - | - | - | - | - |
| <b>45 D-Arabitol</b>           | - | - | - | - | - | - | - |
| <b>46 L-Arabitol</b>           | - | - | - | - | - | - | - |
| <b>47 Gluconate</b>            | - | ? | ? | ? | + | + | - |
| <b>48 2 ceto-gluconate</b>     | - | ? | ? | - | + | - | - |
| <b>49 5 ceto-gluconate</b>     | - | ? | ? | - | - | - | - |

Çizelge 4.10. (devam)

| Karbon Kaynakları         | MA51 | MA35 | MA38 | MA31 | MA26 | MA12 | MA55 |
|---------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| 0 Control                 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 1 Gliserol                | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 2 Erythritol              | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 3 D-Arabinose             | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 4 L-Arabinose             | -    | +    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 5 Ribose                  | +    | +    | -    | ?    | -    | -    | -    |
| 6 D-Xylose                | -    | +    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 7 L-Xylose                | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 8 Adonitol                | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 9 $\beta$ Methyl-xyloside | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 10 Galactose              | +    | +    | -    | +    | ?    | -    | +    |
| 11 D-Glucose              | +    | +    | -    | +    | -    | -    | +    |
| 12 D-Fructose             | +    | +    | -    | -    | -    | -    | +    |
| 13 D-Mannose              | +    | +    | -    | -    | -    | -    | +    |
| 14 L-Sorbose              | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 15 Rhamnose               | -    | ?    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 16 Dulcitol               | +    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 17 Inositol               | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 18 Mannitol               | +    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 19 Sorbitol               | +    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 20 Methyl-D-mannoside     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 21 Methyl-D-glucoside     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 22 N Acetyl glucosamine   | +    | +    | -    | ?    | -    | -    | +    |
| 23 Amygdaline             | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 24 Arbutine               | +    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 25 Esculine               | -    | +    | -    | -    | -    | +    | +    |
| 26 Salicine               | +    | ?    | -    | -    | -    | -    | ?    |
| 27 Cellobiose             | +    | +    | -    | -    | -    | -    | +    |
| 28 Maltose                | +    | -    | -    | +    | ?    | -    | -    |

Çizelge 4.10. (devam)

|                     |   |   |   |   |   |   |   |
|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| 29 Lactose          | - | + | - | + | ? | - | + |
| 30 Melibiose        | - | - | - | - | - | - | - |
| 31 Saccharose       | - | - | - | + | - | - | - |
| 32 Trehalose        | + | + | - | + | - | - | ? |
| 33 Inuline          | - | - | - | - | - | - | - |
| 34 Melezitose       | + | - | - | - | - | - | - |
| 35 D-Raffinose      | - | - | - | - | - | - | - |
| 36 Amidon           | - | - | - | - | - | - | - |
| 37 Glycogene        | - | - | - | - | - | - | - |
| 38 Xylitol          | - | - | - | - | - | - | - |
| 39 Gentiobiose      | + | + | - | - | - | - | + |
| 40 D-Turanose       | + | - | - | ? | - | - | - |
| 41 D-Lyxose         | - | - | - | - | - | - | - |
| 42 D-Tagatose       | + | ? | - | - | - | - | + |
| 43 D-Fucose         | - | - | - | - | - | - | - |
| 44 L-Fucose         | - | - | - | - | - | - | - |
| 45 D-Arabitol       | - | - | - | - | - | - | - |
| 46 L-Arabitol       | - | - | - | - | - | - | - |
| 47 Gluconate        | + | - | - | - | - | - | - |
| 48 2 ceto-gluconate | - | - | - | - | - | - | - |
| 49 5 ceto-gluconate | - | - | - | - | - | - | - |

| Karbon Kaynakları | MA10 | MA33 | MA56 | MA57 | MA54 | MA43 | MA9 |
|-------------------|------|------|------|------|------|------|-----|
| 0 Control         | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   |
| 1 Gliserol        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   |
| 2 Erythritol      | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   |
| 3 D-Arabinose     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   |
| 4 L-Arabinose     | +    | -    | +    | +    | +    | -    | +   |
| 5 Ribose          | +    | -    | +    | +    | +    | +    | +   |
| 6 D-Xylose        | -    | -    | +    | +    | +    | -    | +   |

Çizelge 4.10. (devam)

|                           |   |   |   |   |   |   |   |
|---------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| 7 L-Xylose                | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 Adonitol                | - | - | - | - | - | - | - |
| 9 $\beta$ Methyl-xyloside | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 Galactose              | + | + | + | + | + | + | + |
| 11 D-Glucose              | + | + | + | + | + | + | + |
| 12 D-Fructose             | + | + | + | + | + | + | + |
| 13 D-Mannose              | + | - | - | - | - | + | - |
| 14 L-Sorbose              | - | - | - | - | - | - | - |
| 15 Rhamnose               | + | - | - | - | - | - | - |
| 16 Dulcitol               | - | - | - | - | - | - | - |
| 17 Inositol               | - | - | - | - | - | - | - |
| 18 Mannitol               | + | - | - | - | - | + | - |
| 19 Sorbitol               | + | - | - | - | - | - | - |
| 20 Methyl-D-mannoside     | - | - | - | - | - | - | - |
| 21 Methyl-D-glucoside     | + | - | + | + | + | - | + |
| 22 N Acetyl glucosamine-  | + | + | + | + | + | + | + |
| 23 Amygdaline             | + | - | - | - | - | + | - |
| 24 Arbutine               | + | - | - | - | - | + | - |
| 25 Esculine               | - | - | - | - | - | + | - |
| 26 Salicine               | + | - | - | - | - | + | - |
| 27 Cellobiose             | + | - | - | - | - | + | - |
| 28 Maltose                | + | + | + | + | + | + | + |
| 29 Lactose                | + | + | + | + | + | + | + |
| 30 Melibiose              | - | - | + | + | + | + | + |
| 31 Saccharose             | + | ? | - | - | - | + | - |
| 32 Trehalose              | + | + | + | + | + | + | + |
| 33 Inuline                | - | - | - | - | - | - | - |
| 34 Melezitose             | + | - | - | - | - | + | - |
| 35 D-Raffinose            | - | - | + | + | + | - | + |
| 36 Amidon                 | - | - | - | - | - | - | - |

Çizelge 4.10. (devam)

|                     |   |   |   |   |   |   |   |
|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| 37 Glycogene        | - | - | - | - | - | - | - |
| 38 Xylitol          | - | - | - | - | - | - | - |
| 39 Gentiobiose      | + | - | - | - | - | + | - |
| 40 D-Turanose       | - | ? | - | - | - | - | - |
| 41 D-Lyxose         | - | - | - | - | - | - | - |
| 42 D-Tagatose       | - | - | - | - | - | - | - |
| 43 D-Fucose         | - | - | - | - | - | - | - |
| 44 L-Fucose         | - | - | - | - | - | - | - |
| 45 D-Arabitol       | + | - | - | - | - | ? | - |
| 46 L-Arabitol       | - | - | - | - | - | - | - |
| 47 Gluconate        | + | - | + | + | + | ? | + |
| 48 2 ceto-gluconate | - | - | - | - | - | - | - |
| 49 5 ceto-gluconate | - | - | - | - | - | - | - |

| Karbon Kaynakları   | MA11 | MA20 | MA41 | MA36 | MA52 | MA46 | MA5 |
|---------------------|------|------|------|------|------|------|-----|
| 0 Control           | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   |
| 1 Gliserol          | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   |
| 2 Erythritol        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   |
| 3 D-Arabinose       | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   |
| 4 L-Arabinose       | +    | +    | -    | -    | +    | +    | +   |
| 5 Ribose            | +    | +    | -    | +    | +    | +    | +   |
| 6 D-Xylose          | +    | +    | -    | -    | +    | +    | -   |
| 7 L-Xylose          | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   |
| 8 Adonitol          | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   |
| 9 β Methyl-xyloside | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   |
| 10 Galactose        | +    | +    | -    | +    | +    | +    | +   |
| 11 D-Glucose        | +    | +    | -    | +    | +    | +    | +   |
| 12 D-Fructose       | +    | +    | -    | +    | +    | +    | +   |
| 13 D-Mannose        | -    | -    | -    | +    | -    | +    | +   |
| 14 L-Sorbose        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   |

Çizelge 4.10. (devam)

|                          |   |   |   |   |   |   |   |
|--------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| 15 Rhamnose              | - | - | - | - | - | ? | + |
| 16 Dulcitol              | - | - | - | - | - | - | - |
| 17 Inositol              | - | - | - | - | - | - | - |
| 18 Mannitol              | - | - | - | + | - | - | + |
| 19 Sorbitol              | - | - | - | - | - | - | + |
| 20 Methyl-D-mannoside    | - | - | - | - | - | - | - |
| 21 Methyl-D-glucoside    | + | + | - | - | + | - | + |
| 22 N Acetyl glucosamine- | + | + | - | + | + | + | + |
| 23 Amygdaline            | - | - | - | + | - | - | + |
| 24 Arbutine              | - | - | - | + | - | - | + |
| 25 Esculine              | - | - | + | + | - | + | - |
| 26 Salicine              | - | - | - | + | - | ? | + |
| 27 Cellobiose            | - | - | - | + | - | + | + |
| 28 Maltose               | + | + | - | + | + | - | + |
| 29 Lactose               | + | + | - | + | + | + | + |
| 30 Melibiose             | + | + | - | + | + | - | - |
| 31 Saccharose            | - | - | - | + | - | - | + |
| 32 Trehalose             | + | + | - | + | + | + | + |
| 33 Inuline               | - | - | - | - | - | - | - |
| 34 Melezitose            | - | - | - | + | - | - | + |
| 35 D-Raffinose           | + | + | - | - | + | - | - |
| 36 Amidon                | - | - | - | - | - | - | - |
| 37 Glycogene             | - | - | - | - | - | - | - |
| 38 Xylitol               | - | - | - | - | - | - | - |
| 39 Gentiobiose           | - | - | - | + | - | + | + |
| 40 D-Turanose            | - | - | - | - | - | - | - |
| 41 D-Lyxose              | - | - | - | - | - | - | - |
| 42 D-Tagatose            | - | - | - | - | - | ? | - |
| 43 D-Fucose              | - | - | - | - | - | - | - |
| 44 L-Fucose              | - | - | - | - | - | - | - |

Çizelge 4.10. (devam)

|                     |   |   |   |   |   |   |   |
|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| 45 D-Arabitol       | - | - | - | ? | - | - | + |
| 46 L-Arabitol       | - | - | - | - | - | - | - |
| 47 Gluconate        | + | + | - | ? | + | - | + |
| 48 2 ceto-gluconate | - | - | - | - | - | - | - |
| 49 5 ceto-gluconate | - | - | - | - | - | - | - |

| Karbon Kaynakları         | MA60 | MA53 | MA39 | MA21 |
|---------------------------|------|------|------|------|
| 0 Control                 | -    | -    | -    | -    |
| 1 Gliserol                | -    | -    | ?    | -    |
| 2 Erythritol              | -    | -    | -    | -    |
| 3 D-Arabinose             | -    | -    | -    | -    |
| 4 L-Arabinose             | -    | -    | -    | -    |
| 5 Ribose                  | -    | -    | -    | +    |
| 6 D-Xylose                | -    | -    | -    | -    |
| 7 L-Xylose                | -    | -    | -    | -    |
| 8 Adonitol                | -    | -    | -    | -    |
| 9 $\beta$ Methyl-xyloside | -    | -    | -    | -    |
| 10 Galactose              | +    | +    | +    | +    |
| 11 D-Glucose              | +    | +    | +    | +    |
| 12 D-Fructose             | +    | +    | +    | +    |
| 13 D-Mannose              | +    | +    | ?    | +    |
| 14 L-Sorbose              | -    | -    | -    | +    |
| 15 Rhamnose               | -    | -    | -    | -    |
| 16 Dulcitol               | -    | -    | -    | +    |
| 17 Inositol               | -    | -    | -    | -    |
| 18 Mannitol               | -    | -    | -    | +    |
| 19 Sorbitol               | -    | -    | -    | +    |
| 20 Methyl-D-mannoside     | -    | -    | -    | -    |
| 21 Methyl-D-glucoside     | -    | -    | -    | +    |
| 22 N Acetyl glucosamine-  | +    | +    | -    | +    |
| 23 Amygdaline             | -    | -    | -    | +    |

Çizelge 4.10. (devam)

|                     |   |   |   |   |
|---------------------|---|---|---|---|
| 24 Arbutine         | - | - | - | + |
| 25 Esculine         | + | + | - | - |
| 26 Salicine         | ? | ? | ? | + |
| 27 Cellobiose       | + | + | - | + |
| 28 Maltose          | - | - | + | + |
| 29 Lactose          | + | + | + | + |
| 30 Melibiose        | - | - | - | - |
| 31 Saccharose       | - | - | + | + |
| 32 Trehalose        | ? | ? | + | + |
| 33 Inuline          | - | - | - | + |
| 34 Melezitose       | - | - | ? | - |
| 35 D-Raffinose      | - | - | - | - |
| 36 Amidon           | - | - | - | - |
| 37 Glycogene        | - | - | - | - |
| 38 Xylitol          | - | - | - | - |
| 39 Gentiobiose      | + | + | - | + |
| 40 D-Turanose       | - | - | ? | + |
| 41 D-Lyxose         | - | - | - | + |
| 42 D-Tagatose       | + | + | - | + |
| 43 D-Fucose         | - | - | - | - |
| 44 L-Fucose         | - | - | - | - |
| 45 D-Arabitol       | - | - | - | - |
| 46 L-Arabitol       | - | - | - | - |
| 47 Gluconate        | - | - | - | + |
| 48 2 ceto-gluconate | - | - | - | + |
| 49 5 ceto-gluconate | - | - | - | - |

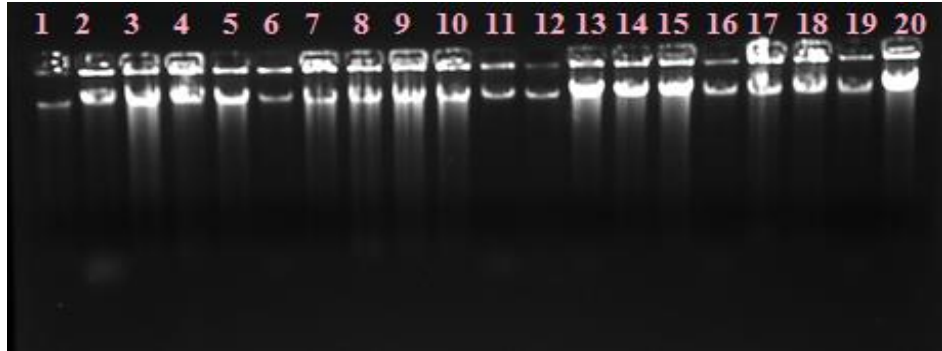


**Şekil 4.6.** Laktik asit bakterilerinin identifikasyonunda kullanılan API test kiti sonucu

#### **4.2.4.b. 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması**

##### **1. Genomik DNA izolasyonu**

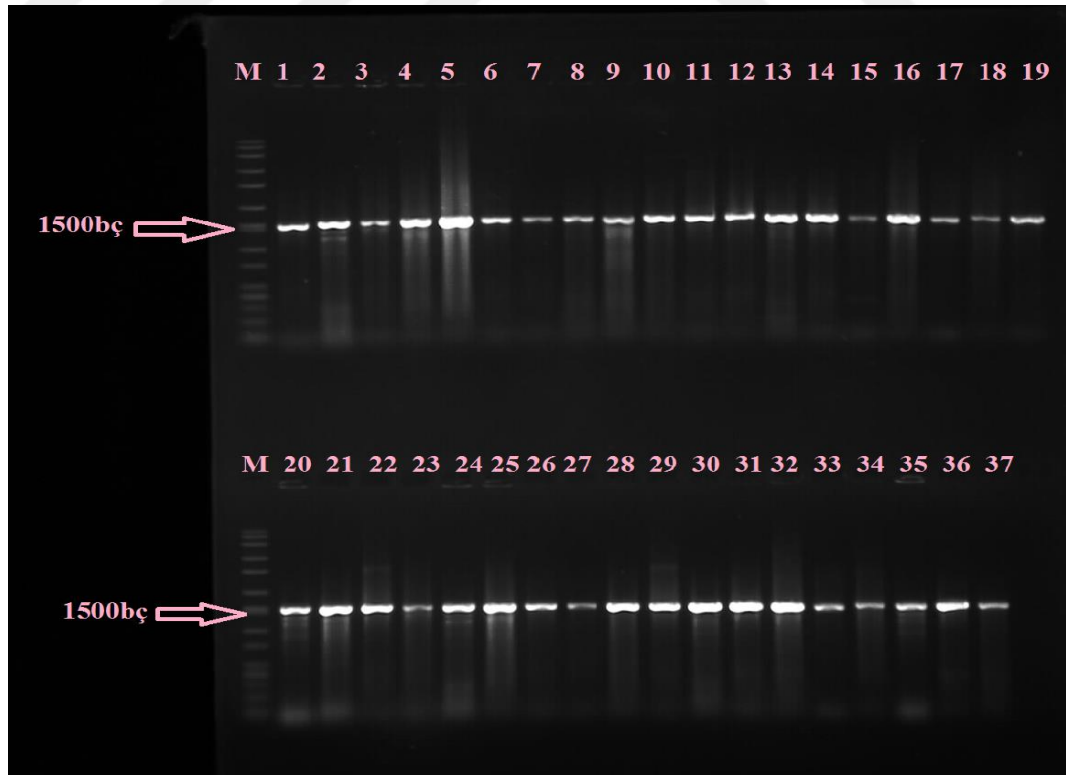
İzolatların moleküler tanımlarının yapılabilmesi için öncelikle genomik DNA'ları izole edildi. Elde edilen DNA'lar agaroz jelinde yürütülerek jel dökümantasyon sisteminde görüntülendi (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7.** Çeşitli izolatlara ait genomik DNA'ların jel görüntüsü

## 2. 16S rRNA PCR işlemi

Bakterilerde bulunan 16S rRNA gen bölgesi, 27F ve 1492R primerleri kullanılarak amplifiye edildi. Daha sonra elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve tüm izolatların 1500 bp büyüklüğünde tek bant içerdiği gözlemlendi (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8.** Çeşitli izolatlara ait 16S rRNA gen bölgesinin jel görüntüsü

### 3. Transformasyon işlemi

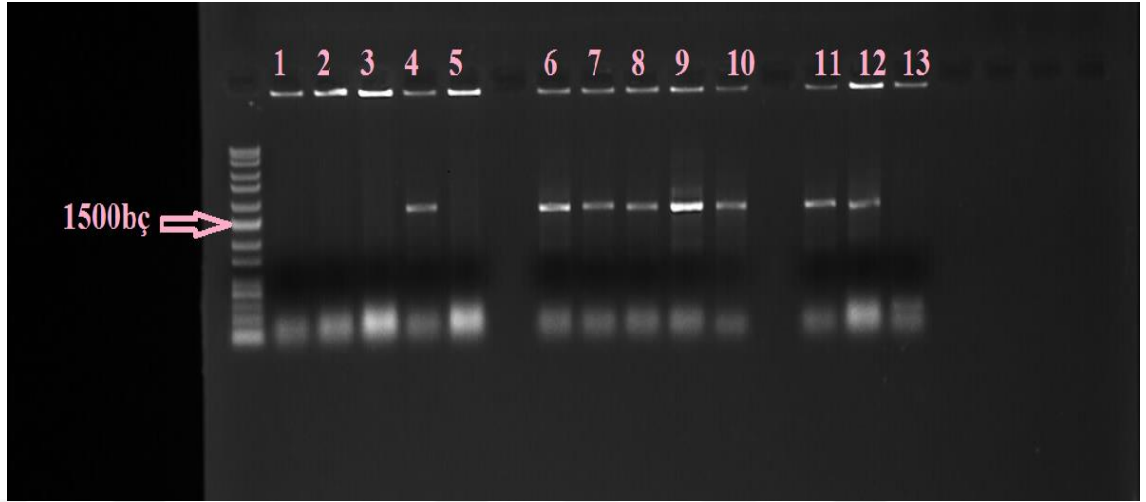
16S rRNA gen bölgesi amplifiye edildikten sonra uygun vektör sistemi kullanılarak klonlama aşamasına geçildi. Bu işlem için öncelikle ligasyon işlemi gerçekleştirildi ve transformasyon ile devam edildi. Daha sonra rekombinant ürünleri ihtiva eden E.coli izolatları amfisilin, X-gal ve IPTG içeren petrilere yayıldı ve inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından mavi-beyaz tarama işlemi yapıldı. Mavi beyaz tarama sonucunda geni içeren beyaz koloniler özellikle incelendi. Bakterilere ait mavi beyaz koloniler Şekil 4.9’da verilmiştir.



**Şekil 4.9.** Mavi beyaz koloni örnek görüntüsü

### 4. Koloni PCR

İlgili gen bölgesini ihtiva eden en uygun koloninin tespiti amacıyla koloni PCR yapıldı. Elde edilen PCR ürünleri %1’lik agaroz jelde yürütüldü ve jel dökümantasyon sisteminde analiz edildi. Sonuçta 1500 bp’de bant veren koloniler seçilerek işleme devam edildi (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** Bazı izolatların koloni PCR görüntüleri

## 5. Plazmit izolasyonu

Agaroz jelde, 1500 bp’de tek bant veren koloniler seçilerek plazmit izolasyon aşamasına geçildi. Bunun için ilgili koloniler petriden alınarak amfisilinli LB Broth’a aktarıldı ve 37°C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonunun ardından Promega firmasına ait izolasyon kiti (A1330) kullanılarak plazmit izole edildi. Daha sonra plazmitin istenen gen bölgesini taşıyıp taşımadığı EcoRI kesim enzimi kullanılarak incelendi. Pozitif sonuç veren ve en uygun konsantrasyona sahip olan örnekler MacroGen (Hollanda) firmasına gönderildi.

## 6. DNA Dizi Analiz Sonuçları

MacroGen firmasından gelen 16S rRNA sekans dataları anlamlı hale getirildikten sonra Eztaxon’daki diziler ile Blast’lama çalışmasıyla mukayese edildi. Daha sonra elde edilen veriler Genbank’a sunularak numaralar alındı.

**Çizelge 4.11.** Dizi analizi sonucu belirlenen bakteriler ve benzerlik oranları

| İzolat Kodu      | İzolat İsmi                           | Benzerlik Oranı | Genbank Numaraları |
|------------------|---------------------------------------|-----------------|--------------------|
| MA 2             | <i>Enterococcus faecium</i>           | %99             | KY425777           |
| MA 3             | <i>Lactobacillus kefir</i>            | %99             | KY425779           |
| MA 4             | <i>Lactobacillus kefir</i>            | %99             | KY425772           |
| MA 5             | <i>Lactobacillus paraplantarum</i>    | %99             | KY425806           |
| MA 7             | <i>Lactobacillus casei</i>            | %99             | KY425775           |
| MA 8             | <i>Lactobacillus paracasei subsp.</i> | %99             | KY425776           |
| <i>Tolerans</i>  |                                       |                 |                    |
| MA 9             | <i>Lactobacillus buchneri</i>         | %99             | KY425797           |
| MA 10            | <i>Lactobacillus paraplantarum</i>    | %99             | KY425790           |
| MA 11            | <i>Lactobacillus buchneri</i>         | %99             | KY425798           |
| MA 12            | <i>Lysinibacillus sinduriensis</i>    | %99             | KY425788           |
| MA 13            | <i>Enterococcus faecium</i>           | %98             | KY425800           |
| MA 19            | <i>Micrococcus yunnanensis</i>        | %99             | KY425784           |
| MA 20            | <i>Lactobacillus buchneri</i>         | %99             | KY425799           |
| MA 21            | <i>Lactobacillus paracasei</i>        | %99             | KY425813           |
| MA 23            | <i>Enterococcus faecium</i>           | %99             | KY425807           |
| MA 25            | <i>Microbacterium paraoxydans</i>     | %99             | KY425786           |
| MA 26            | <i>Prolinoborus fasciculus</i>        | %99             | KY425787           |
| MA 27            | <i>Enterococcus faecium</i>           | %97             | KY425810           |
| MA 28            | <i>Lactobacillus brevis</i>           | %99             | KY425773           |
| MA 30            | <i>Lactobacillus brevis</i>           | %99             | KY425774           |
| MA 31            | <i>Staphylococcus haemolyticus</i>    | %99             | KY425785           |
| MA 33            | <i>Staphylococcus hominis</i>         | %99             | KY425791           |
| MA 34            | <i>Lactobacillus paracasei subsp.</i> | %99             | KY425778           |
| <i>Paracasi</i>  |                                       |                 |                    |
| MA 35            | <i>Pediococcus lolii</i>              | %99             | KY425782           |
| MA 36            | <i>Lactobacillus plantarum subsp.</i> | %99             | KY425803           |
| <i>Plantarum</i> |                                       |                 |                    |
| MA 37            | <i>Micrococcus yunnanensis</i>        | %99             | KY425793           |
| MA 38            | <i>Prolinoborus fasciculus</i>        | %99             | KY425783           |
| MA 39            | <i>Rothia dentocariosa</i>            | %99             | KY425811           |
| MA 41            | <i>Lysinibacillus sinduriensis</i>    | %99             | KY425801           |

Çizelge 4.11. (devam)

|       |                                       |     |          |
|-------|---------------------------------------|-----|----------|
| MA 43 | <i>Lactobacillus plantarum subsp.</i> | %99 | KY425796 |
|       | <i>Plantarum</i>                      |     |          |
| MA 44 | <i>Micrococcus aloeverae</i>          | %99 | KY425802 |
| MA 46 | <i>Pediococcus lolii</i>              | %99 | KY425805 |
| MA 47 | <i>Micrococcus aloeverae</i>          | %99 | KY425780 |
| MA 50 | <i>Micrococcus yunnanensis</i>        | %99 | KY425812 |
| MA 51 | <i>Lactobacillus paracasei subsp.</i> | %99 | KY425781 |
|       | <i>Paracasei</i>                      |     |          |
| MA 52 | <i>Lactobacillus buchneri</i>         | %99 | KY425804 |
| MA 54 | <i>Lactobacillus buchneri</i>         | %99 | KY425795 |
| MA 55 | <i>Pediococcus parvulus</i>           | %99 | KY425789 |
| MA 56 | <i>Lactobacillus buchneri</i>         | %98 | KY425792 |
| MA 57 | <i>Lactobacillus buchneri</i>         | %99 | KY425794 |
| MA 60 | <i>Pediococcus parvulus</i>           | %99 | KY425808 |

Çalışma kapsamında elde edilen veriler kullanılarak laktik asit bakterileri arasındaki filogenetik ilişkiyi ortaya koymak amacıyla NJ (Neighbor-joining; Komşu katılımı-bağlama) yöntemi ile bir filogenetik ağaç çizildi (Şekil 4.11).



**Şekil 4.11.** Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanan beyaz beyir örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin 16S rRNA gen analiz sonuçları temel alınarak oluşturulmuş olan Neighbour-Joining (Kimura 1980; Saitou and Nei 1987) filogenetik ağacı. *Alicyclobacillus acidophilus* dış grup olarak kullanılmıştır.

**Çizelge 4.12.** İzolatların Eztaxon verilerine göre benzerlik yüzdeleri

| İzolat kodu/Benzerlik Olan Organizmalar                      | Benzerlik oranları |
|--------------------------------------------------------------|--------------------|
| <b>MA 2 → <i>Enterococcus faecium</i></b>                    | <b>%99,73</b>      |
| <i>Enterococcus durans</i>                                   | %99,39             |
| <i>Enterococcus hirae</i>                                    | %99,39             |
| <i>Enterococcus lactis</i>                                   | %99,37             |
| <b>MA 3 → <i>Lactobacillus kefir</i></b>                     | <b>%99,45</b>      |
| <i>Lactobacillus sunkii</i>                                  | %98,86             |
| <i>Lactobacillus otakiensis</i>                              | %98,86             |
| <i>Lactobacillus parabuchneri</i>                            | %98,66             |
| <b>MA 4 → <i>Lactobacillus kefir</i></b>                     | <b>%99,79</b>      |
| <i>Lactobacillus sunkii</i>                                  | %99,06             |
| <i>Lactobacillus otakiensis</i>                              | %99,06             |
| <i>Lactobacillus parabuchneri</i>                            | %98,86             |
| <b>MA 5 → <i>Lactobacillus paraplantarum</i></b>             | <b>%99,60</b>      |
| <i>Lactobacillus pentosus</i>                                | %99,40             |
| <i>Lactobacillus plantarum subsp. plantarum</i>              | %99,33             |
| <i>Lactobacillus plantarum subsp. argenteratensis</i>        | %99,26             |
| <b>MA 7 → <i>Lactobacillus casei</i></b>                     | <b>%99,87</b>      |
| <i>Lactobacillus paracasei subsp. tolerans</i>               | %99,87             |
| <i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>              | %99,75             |
| <i>Lactobacillus zeae</i>                                    | %98,49             |
| <b>MA 8 → <i>Lactobacillus paracasei subsp. tolerans</i></b> | <b>%99,60</b>      |
| <i>Lactobacillus casei</i>                                   | %99,53             |
| <i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>              | %99,53             |
| <i>Lactobacillus zeae</i>                                    | %98,99             |
| <b>MA 9 → <i>Lactobacillus buchneri</i></b>                  | <b>%99,63</b>      |
| <i>Lactobacillus sunkii</i>                                  | %98,96             |
| <i>Lactobacillus parakefir</i>                               | %98,88             |
| <i>Lactobacillus otakiensis</i>                              | %98,81             |

Çizelge 4.12. (devam)

|                                                                      |               |
|----------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>MA 10 → <i>Lactobacillus paraplantarum</i></b>                    | <b>%99,40</b> |
| <i>Lactobacillus pentosus</i>                                        | %99,19        |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>               | %99,13        |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argenteratensis</i>         | %99,05        |
| <b>MA 11 → <i>Lactobacillus buchneri</i></b>                         | <b>%99,67</b> |
| <i>Lactobacillus sunkii</i>                                          | %99,00        |
| <i>Lactobacillus parakefiri</i>                                      | %99,00        |
| <i>Lactobacillus otakiensis</i>                                      | %98,86        |
| <b>MA 12 → <i>Lysinibacillus sinduriensis</i></b>                    | <b>%99,08</b> |
| <i>Lysinibacillus chungkukjangi</i>                                  | %98,92        |
| <i>Lysinibacillus composti</i>                                       | %97,65        |
| <i>Lysinibacillus halotolerans</i>                                   | %97,55        |
| <b>MA 13 → <i>Enterococcus faecium</i></b>                           | <b>%98,44</b> |
| <i>Enterococcus hirae</i>                                            | %98,44        |
| <i>Enterococcus durans</i>                                           | %98,44        |
| <i>Enterococcus thailandicus</i>                                     | %98,44        |
| <b>MA 19 → <i>Micrococcus yunnanensis</i></b>                        | <b>%99,65</b> |
| <i>Micrococcus aloeverae</i>                                         | %99,50        |
| <i>Micrococcus luteus</i>                                            | %99,45        |
| <i>Micrococcus endophyticus</i>                                      | %99,08        |
| <b>MA 20 → <i>Lactobacillus buchneri</i></b>                         | <b>%99,67</b> |
| <i>Lactobacillus sunkii</i>                                          | %99,00        |
| <i>Lactobacillus parakefiri</i>                                      | %99,00        |
| <i>Lactobacillus otakiensis</i>                                      | %98,86        |
| <b>MA 21 → <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i></b> | <b>%99,87</b> |
| <i>Lactobacillus casei</i>                                           | %99,80        |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>               | %99,80        |
| <i>Lactobacillus zeae</i>                                            | %99,13        |

Çizelge 4.12. (devam)

|                                                                    |               |
|--------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>MA 23 → <i>Enterococcus faecium</i></b>                         | <b>%99,58</b> |
| <i>Enterococcus durans</i>                                         | %99,24        |
| <i>Enterococcus hirae</i>                                          | %99,24        |
| <i>Enterococcus lactis</i>                                         | %99,22        |
| <b>MA 25 → <i>Microbacterium paraoxydans</i></b>                   | <b>%100</b>   |
| <i>Microbacterium maritopicum</i>                                  | %99,50        |
| <i>Microbacterium oxydans</i>                                      | %99,44        |
| <i>Microbacterium luteolum</i>                                     | %99,30        |
| <b>MA 26 → <i>Prolinoborus fasciculus</i></b>                      | <b>%99,59</b> |
| <b>MA 27 → <i>Enterococcus faecium</i></b>                         | <b>%99,32</b> |
| <i>Enterococcus lactis</i>                                         | %99,08        |
| <i>Enterococcus durans</i>                                         | %99,02        |
| <i>Enterococcus hirae</i>                                          | %98,87        |
| <b>MA 28 → <i>Lactobacillus brevis</i></b>                         | <b>%99,87</b> |
| <i>Lactobacillus hammesii</i>                                      | %98,39        |
| <i>Lactobacillus senmaizukei</i>                                   | %97,92        |
| <i>Lactobacillus koreensis</i>                                     | %97,88        |
| <b>MA 30 → <i>Lactobacillus brevis</i></b>                         | <b>%99,73</b> |
| <i>Lactobacillus hammesii</i>                                      | %98,32        |
| <i>Lactobacillus senmaizukei</i>                                   | %97,99        |
| <i>Lactobacillus koreensis</i>                                     | %97,88        |
| <b>MA 31 → <i>Staphylococcus haemolyticus</i></b>                  | <b>%99,18</b> |
| <i>Staphylococcus petrasii</i> subsp. <i>jettensis</i>             | %98,74        |
| <i>Staphylococcus petrasii</i> subsp. <i>pragensis</i>             | %98,71        |
| <i>Staphylococcus devriesei</i>                                    | %98,64        |
| <b>MA 33 → <i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i></b> | <b>%99,88</b> |
| <i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>        | %99,88        |
| <i>Staphylococcus petrasii</i> subsp. <i>petrasii</i>              | %99,54        |
| <i>Staphylococcus petrasii</i> subsp. <i>jettensis</i>             | %99,52        |

## Çizelge 4.12. (devam)

|                                                                       |                |
|-----------------------------------------------------------------------|----------------|
| <b>MA 34 → <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i></b> | <b>%99,87</b>  |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>                 | <b>%99,80</b>  |
| <i>Lactobacillus casei</i>                                            | <b>%99,73</b>  |
| <i>Lactobacillus zeae</i>                                             | <b>%99,20</b>  |
| <b>MA 35 → <i>Pediococcus lolii</i></b>                               | <b>%99,73</b>  |
| <i>Pediococcus acidilactici</i>                                       | %99,67         |
| <i>Pediococcus pentasaceus</i>                                        | %98,27         |
| <i>Pediococcus stilesii</i>                                           | %97,66         |
| <b>MA 36 → <i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i></b> | <b>%99,83</b>  |
| <i>Lactobacillus pentosus</i>                                         | %99,74         |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argenteratensis</i>          | %99,65         |
| <i>Lactobacillus paraplantarum</i>                                    | %99,49         |
| <b>MA 37 → <i>Micrococcus yunnanensis</i></b>                         | <b>%99,72</b>  |
| <i>Micrococcus aloeverae</i>                                          | %99,64         |
| <i>Micrococcus luteus</i>                                             | %99,45         |
| <i>Micrococcus endophyticus</i>                                       | %99,15         |
| <b>MA 38 → <i>Prolinoborus fasciculus</i></b>                         | <b>%99,13</b>  |
| <b>MA 39 → <i>Rothia dentocariosa</i></b>                             | <b>%100,00</b> |
| <i>Rothia aerea</i>                                                   | %98,13         |
| <i>Rothia mucilaginosa</i>                                            | %97,79         |
| <i>Rothia nasimurium</i>                                              | %96,48         |
| <b>MA 41 → <i>Lysinibacillus sinduriensis</i></b>                     | <b>%99,08</b>  |
| <i>Lysinibacillus chungkukjangi</i>                                   | %98,92         |
| <i>Lysinibacillus composti</i>                                        | %97,65         |
| <i>Lysinibacillus halotolerans</i>                                    | %97,55         |
| <b>MA 43 → <i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i></b> | <b>%99,87</b>  |
| <i>Lactobacillus pentosus</i>                                         | %99,80         |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argenteratensis</i>          | %99,66         |
| <i>Lactobacillus paraplantarum</i>                                    | %99,60         |

Çizelge 4.12. (devam)

|                                                                       |               |
|-----------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>MA 44 → <i>Micrococcus aloeverae</i></b>                           | <b>%99,71</b> |
| <i>Micrococcus yunnanensis</i>                                        | %99,44        |
| <i>Micrococcus luteus</i>                                             | %99,37        |
| <i>Micrococcus endophyticus</i>                                       | %99,01        |
| <b>MA 46 → <i>Pediococcus lolii</i></b>                               | <b>%99,80</b> |
| <i>Pediococcus acidilactici</i>                                       | %99,60        |
| <i>Pediococcus pentasaceus</i>                                        | %98,33        |
| <i>Pediococcus stilesii</i>                                           | %97,73        |
| <b>MA 47 → <i>Micrococcus aloeverae</i></b>                           | <b>%99,42</b> |
| <i>Micrococcus yunnanensis</i>                                        | %99,28        |
| <i>Micrococcus luteus</i>                                             | %99,09        |
| <i>Micrococcus endophyticus</i>                                       | %98,71        |
| <b>MA 50 → <i>Micrococcus yunnanensis</i></b>                         | <b>%99,65</b> |
| <i>Micrococcus aloeverae</i>                                          | %99,45        |
| <i>Micrococcus luteus</i>                                             | %99,36        |
| <i>Micrococcus endophyticus</i>                                       | %99,08        |
| <b>MA 51 → <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i></b> | <b>%99,39</b> |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>                 | %99,32        |
| <i>Lactobacillus casei</i>                                            | %99,25        |
| <i>Lactobacillus zeae</i>                                             | %98,71        |
| <b>MA 52 → <i>Lactobacillus buchneri</i></b>                          | <b>%99,60</b> |
| <i>Lactobacillus sunkii</i>                                           | %98,93        |
| <i>Lactobacillus parakefiri</i>                                       | %98,85        |
| <i>Lactobacillus otakiensis</i>                                       | %98,80        |
| <b>MA 53 → <i>Pediococcus parvulus</i></b>                            | <b>%99,86</b> |
| <i>Pediococcus inopinatus</i>                                         | %98,60        |
| <i>Pediococcus ethanolidurans</i>                                     | %98,47        |
| <i>Pediococcus damnosus</i>                                           | %98,32        |

Çizelge 4.12. (devam)

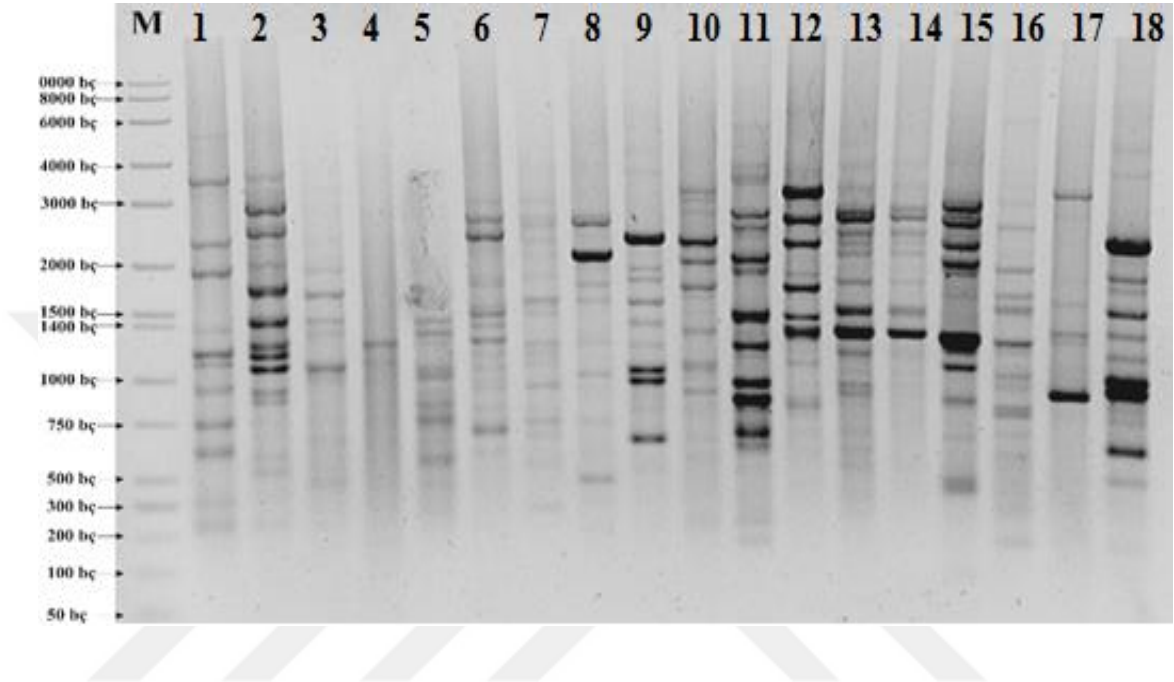
|                                              |               |
|----------------------------------------------|---------------|
| <b>MA 54 → <i>Lactobacillus buchneri</i></b> | <b>%99,53</b> |
| <i>Lactobacillus sunkii</i>                  | <b>%98,86</b> |
| <i>Lactobacillus parakefiri</i>              | <b>%98,85</b> |
| <i>Lactobacillus otakiensis</i>              | <b>%98,73</b> |
| <b>MA 55 → <i>Pediococcus parvulus</i></b>   | <b>%99,93</b> |
| <i>Pediococcus ethanolidurans</i>            | <b>%98,67</b> |
| <i>Pediococcus inopinatus</i>                | <b>%98,67</b> |
| <i>Pediococcus cellicola</i>                 | <b>%98,40</b> |
| <b>MA 56 → <i>Lactobacillus buchneri</i></b> | <b>%98,00</b> |
| <i>Lactobacillus sunkii</i>                  | %97,59        |
| <i>Lactobacillus otakiensis</i>              | %97,45        |
| <i>Lactobacillus parabuchneri</i>            | %97,31        |
| <b>MA 57 → <i>Lactobacillus buchneri</i></b> | <b>%99,67</b> |
| <i>Lactobacillus sunkii</i>                  | %99,00        |
| <i>Lactobacillus parakefiri</i>              | %99,00        |
| <i>Lactobacillus otakiensis</i>              | %98,86        |
| <b>MA 60 → <i>Pediococcus parvulus</i></b>   | <b>%99,87</b> |
| <i>Pediococcus damnosus</i>                  | %99,24        |
| <i>Pediococcus ethanolidurans</i>            | %99,13        |
| <i>Pediococcus inopinatus</i>                | %99,13        |

#### 4.2.5. Rep-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi

##### 4.2.5.a. BOX-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi

BOX-PCR, bir genomik parmak izi analiz yöntemidir. Bu metod kullanılarak yapılan analiz sonucunda elde edilen bant profilleri incelendiğinde, izolatların 100-750 bç arasında en az 4, 100-6500 bç arasında ise 12 polimorfik banta sahip olduğu

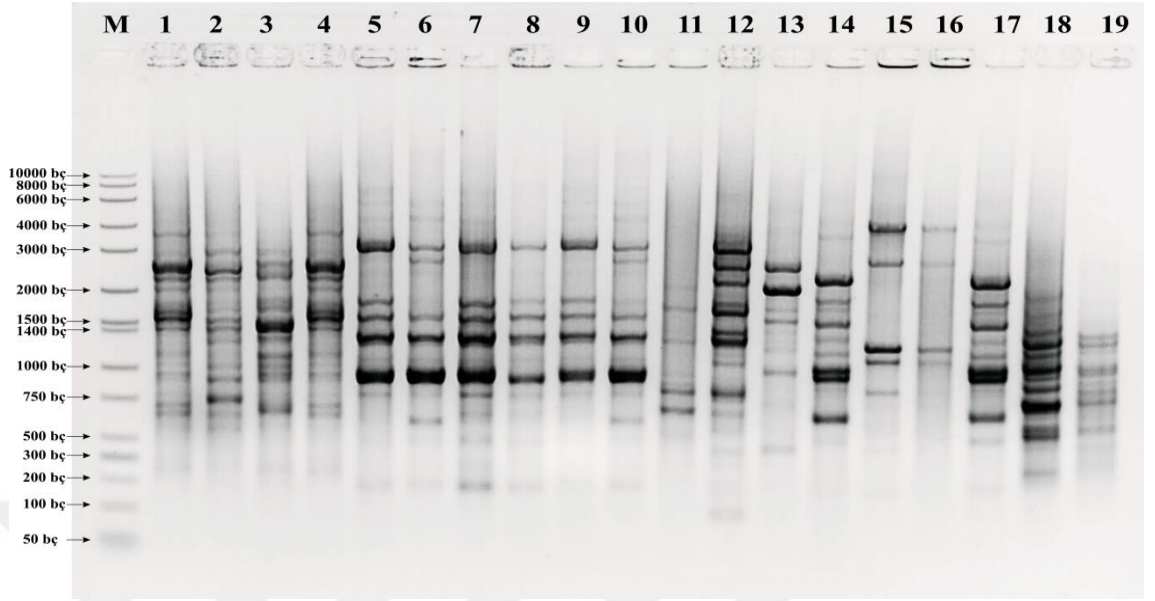
görülmüştür. Bu sonuçtan yola çıkılarak suşlar arasındaki ayrımı ortaya koymada bu yöntemin başarısız olduğu sonucunda varılmıştır (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12.** Çeşitli izolatlara ait BOX-PCR bant profilleri  
(Sırasıyla; MA4, MA28, MA7, MA8, MA2, MA34, MA47, MA35, MA38, MA19, MA31, MA25, MA12, MA10, MA33, MA13, MA39 ve MA43'e ait bant görüntüleri)

#### 4.2.5.b. (GTG)<sub>5</sub>-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi

Tür ve tür altı seviyede mikroorganizmalar arasındaki farklılıkları ortaya koymada rep-PCR yöntemi oldukça başarılı olup en önemlilerinden biri de (GTG)<sub>5</sub>-PCR'dır. Bu PCR reaksiyonu test izolatlarının; 100-750 bp arasında en az 6, 100-6500 bp arasında ise en fazla 20 polimorfik bant varlığı gözlemlenmiştir. Tüm bu veriler dikkate alındığında (GTG)<sub>5</sub>-PCR'ın BOX-PCR'a göre suşlar arasındaki genomik farklılıkları ortaya koymada daha başarılı olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.13).



**Şekil 4.13.** Çeşitli izolatlara ait (GTG)<sub>5</sub>-PCR bant profilleri

(Sırasıyla; MA56, MA57, MA54, MA41, MA8, MA3, MA47, MA28, MA30, MA 35, MA38, MA19, MA31, MA25, MA26, MA12, MA55, MA10 ve MA33'e ait bant görüntüleri)

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Fermantasyon, gıdaların hem üretimi hem de korunması açısından oldukça önemli bir prosestir. Fermantasyon teknolojisiyle üretilen gıdalar içerisinde fermente süt ürünleri önemli bir yere sahip olup, laktik asit bakterilerinin sütü fermente etmeleri sonucu üretilir. Bu ürünlere; peynir, yoğurt, tereyağı, krema ve kımız gibi ürünler örnek olarak verilebilir. Bunlardan peynir hem mikroflora çeşitliliği hem de besin değeri bakımından oldukça zengindir.

Bu bilgiler ışığında Türkiye'nin farklı yörelerinden toplanan beyaz peynir örneklerinden yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda ilk etapta 61 adet bakteri izole edilmiştir. Bu bakterilerden farklı olduğu düşünülen 42 adedi ile yola devam edilmiş ve karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

İzolasyon çalışmalarının ardından elde edilen izolatların öncelikle morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlendi. Morfolojik özellikleri kapsamında izolatların çubuk ya da kok şeklinde oldukları ve spor oluşturmadıkları belirlendi. Ayrıca yalnızca bir tür hariç bütün türlerin gram pozitif özellikte olduğu tespit edildi.

İzole edilen laktik asit bakterilerinin fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda;

- İzolatların büyük bir bölümünün %2-6 tuz konsantrasyonunda gelişim gösterdikleri, MA5, MA7, MA10, MA31, MA35, MA36, MA43 ve MA46 kodlu izolatların ise %11-12 gibi çok yüksek tuz konsantrasyonlarında üreyebildikleri görüldü.
- 10, 15, 30, 35, 37 ve 45°C değerlerinde yapılan sıcaklık denemelerinde, izolatların hemen hemen hepsinin 30, 35, 37 ve 45°C'lerde gelişim gösterdikleri, MA2, MA5, MA9, MA10, MA11, MA13, MA23, MA27, MA28, MA30, MA31, MA35, MA52, MA54, MA56 ve MA57 kodlu izolatların ise bu sıcaklık değerlerinin yanı sıra, 15°C gibi düşük bir sıcaklıkta da üreyebildikleri belirlendi.

- pH: 3, 5, 7, 9 ve 11 değerlerindeki pH denemelerinde ise izolatların tümünün pH: 3-6 gibi düşük pH değerlerinde gelişim gösterdikleri gözlemlendi.

İzolatların tanısı amacıyla yapılan API test kiti sonucunda ise; *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris*, *Lactobacillus plantarum*, *L. paracasei ssp paracasei*, *L. brevis*, *L. delbrueckii ssp. lactis*, *Pediococcus acidilactici* ve *Pediococcus spp.* türleri belirlendi.

16S rRNA gen analizinde ise; 16S rRNA gen bölgesi klonlama prosedürü ile klonlanarak sekans analizi yaptırıldı. Sekans analizleri sonucunda; 2 adet izolat (MA4, MA3) *Lactobacillus kefir*, 2 adet izolat (MA28, MA30) *L. brevis*, 1 adet izolat (MA7) *L. casei*, 4 adet izolat (MA8, MA34, MA51, MA21) *L. paracasei*, 2 izolat (MA35, MA46) *Pediococcus lolii*, 2 izolat (MA38, MA26) *Prolinoborus fasciculus*, 1 izolat (MA 31) *Staphylococcus haemolyticus*, 2 izolat (MA12, MA41) *Lysnibacillus sinduriensis*, 3 izolat (MA55, MA60, MA53) *Pediococcus parvulus*, 2 izolat (MA10, MA5) *Lactobacillus paraplantarum*, 1 izolat (MA33) *Staphylococcus hominis*, 7 izolat (MA56, MA57, MA54, MA9, MA11, MA20, MA52) *Lactobacillus buchneri*, 2 izolat (MA43, MA36) *Lactobacillus plantarum* ve 1 izolat (MA39) *Rothia dentocariosa* olarak değerlendirildi.

Yapılan bu tez çalışması genel itibariyle göz önünde bulundurulacak olursa elde edilen sonuçlar şu şekilde sıralanabilir:

1. Araştırma sonucunda Türkiye'nin farklı yörelerinden toplanan peynir örneklerinin oldukça geni bir mikrofloraya sahip oldukları gözlemlendi.
2. *Lactobacillus* ve *Enterococcus* cinslerine ait türlerin baskın florayı teşkil ettiği anlaşıldı.
3. Konvensiyonel test sonuçlarının mutlaka moleküler yöntemlerle desteklenmesi gerektiği sonucuna varıldı.
4. 16S rRNA gen analiz sonucuna göre %97-%98 arasında benzerlik veren 3 organizmanın (MA13, MA27 ve MA56) yeni tür olabileceği ve eldeki 16S rRNA sekans

analiz verilerinin daha ileri bir tanı yöntemi olan “house-keeping” gen bölgelerinin analizi ile desteklenmesi gerektiği sonucuna varıldı.

5. Yapmış olduğumuz çalışma neticesinde API ve 16S rRNA sekans analiz verilerinin birbirleriyle uyuşmamasından dolayı birden fazla moleküler yöntemin mukayeseli olarak analizlerde kullanımının faydalı olabileceği sonucu çıkartıldı.

6. İzolatların geniş bir pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonuna dayanıklı olması bu test suşlarının biyoteknolojik proseslerde uygulanabilirliğinin yüksek olduğunu gösterdi.

7. Rep-PCR yönteminin laktik asit bakterilerinin tür ve alt tür seviyesinde ayırımında oldukça başarılı olduğu görüldü. Bu yöntem içerisinde yer alan (GTG)<sub>5</sub>-PCR yönteminin BOX-PCR yöntemine göre ayırmda daha başarılı olduğu sonucuna varıldı.

Yöntemler sonucunda çok çeşitli türde bakterinin tanılanması gerçekleştirilirken türler arasındaki benzerlik ve farklılıklar da ortaya konmuştur. Yöntemlerin etkinliği kanıtlanmış olup yapılmış olan literatür çalışmalarıyla karşılaştırılıp bu etkinlik gün yüzüne çıkarılmıştır.

Terzic-Vidojevic *et al.* (2006) tarafından yapılan çalışmada Zlatar beyaz peynirinin mikroflorası incelenmiş ve baskın cins olarak *Lactobacillus* belirlenmiş olup identifikasyon amacıyla API 50 CH sistemi kullanılmıştır. Sonuçta; *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *L. brevis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Enterococcus faecium* ve *E. faecalis* türleri tespit edilmiştir. Biz ise API test kiti sonucunda ise; *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Lactobacillus plantarum*, *L. paracasei* ssp. *paracasei*, *L. brevis*, *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, *Pediococcus acidilactici* ve *Pediococcus* spp. türlerinin varlığını belirledik.

Lusk *et al.* (2012) tarafından yapılan çalışmada peynir örneklerinden laktik asit bakterileri izole edilmiş, 16S rRNA sekans analizi ile identifikasyonu yapılmış ve baskın flora olarak sadece *Lactococcus* ve *Exiguobacterium* cinsleri belirlenmiştir. Ayrıca 16S rRNA sekans analiz yönteminin identifikasyonda yeterli olduğu sonucuna varılmıştır. Fakat biz yaptığımız çalışmada, literatür verilerinden farklı olarak *Lactobacillus* cinsinin baskın tür olarak bulunduğu ve mutlaka 16S rRNA

verilerinin House keeping (Korunmuş bölge) bölgelerinin çalışılmasıyla desteklenmesi gerektiğinin sonucuna vardık.

Kuikui *et al.* (2014) tarafından yapılan çalışmada, laktik asit bakterilerinin izolasyonuna ve karakterizasyonuna ve bu bakteriler hem fenotipik hem de genotipik yöntemler kullanılarak identifiye edilmiştir. Fenotipik karakterizasyon sonrasında, izolatların çoğunun 45°C’de, pH 3 gibi düşük pH değerlerinde hiç gelişim göstermedikleri, tuz konsantrasyonu olarak ise en fazla %6,5 değerinde gelişim gösterdikleri belirtilmiştir. Ancak tez çalışmamızda izolatların, yaklaşık 20 tanesinin 45°C’de, hemen hemen hepsinin pH 3’de ve 8 adedinin %11 ve %12 gibi tuz konsantrasyonlarında gelişim gösterdiği tespit edilmiştir. Bu da bize elde ettiğimiz izolatların biyoteknolojik proseslerde kullanılabilirliğinin oldukça fazla olduğunu göstermektedir.

Aydemir *et al.* (2015) tarafından yapılan çalışmada, kars yöresine ait peynirlerden laktis asit bakteri izole edilmiş ve yalnızca *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* türleri tespit edilmiştir. Kullanılan yöntemlerin etkinliği ve güvenilirliği açısından oldukça farklı metodların kullanıldığı bu çalışmada ise aynı yöreden alınan peynir örneklerinden farklı laktik asit bakterileri tanılanmıştır. Bu da bize gerek izolasyon ve gerekse de identifikasyon aşamasında kullanılan yöntemler ve çalışan kişiye bağlı olarak identifikasyon sonucunda tür çeşitliliğinde farklılıklar olabileceğini göstermiştir.

Ghahremani *et al.* (2015) tarafından yapılan çalışmada, peynir örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyon ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir, baskın flora olarak *Lactobacillus* ve *Lactococcus* cinsleri gözlemlenmiştir. Buna kıyasla yapmış olduğumuz tez çalışmasında bu bakterilere ek olarak, *Enterococcus* cinslerinin varlığı ortaya konulmuştur. Ayrıca bu çalışmada bakterilerin identifikasyonunda sadece 16S rRNA gen analizi ve ITS PCR yöntemi kullanılırken, biz ise yapmış olduğumuz tez çalışmasında; 16S rRNA gen analizi, rep-PCR yöntemi ve API 50 CH sistemi gibi daha fazla tanılama yöntemi kullanarak, çalışmanın doğruluğunu arttırmaya çalıştık.

Dec *et al.* (2016) tarafından laktik asit bakterilerinin izolasyonuna yönelik olarak çeşitli çalışmada 16S-ARDRA ve MALDI-TOF yöntemleri kullanılmış ve sonuçta; *Lactobacillus salivarius*, *L. johnsonii* ve *L. ingluviei* türleri baskın microflora olarak gözlemlenmiştir. Ayrıca MALDI-TOF yönteminin diğer yöntemlere göre oldukça hızlı bir yöntem olduğu belirtilmiştir. Yapmış olduğumuz bu çalışma sonucunda, literatür verilerinden farklı organizmalar baskın flora olarak belirlenmiş, bu da farklı kaynak ve lokalizasyonlardan alınan örneklerde mikrobiyal içeriğinin değişiklik gösterdiği tezine dayandırılmıştır.



## KAYNAKLAR

- Abriouel, F., Lucas, R., Ben, Omar N., Valdivia, E., Maqueda, M., Martinez-Canamero M., Galvez, A. 2005. Enterocin AS-48RJ: a variant of enterocin AS-48 chromosomally encoded by *Enterococcus faecium* RJ 16 isolated from food. Systematic and Applied Microbiology, 28: 383-397.
- Acar, S., 2009. Hasanabdal Köyü Termal Tesislerinden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Adams, MR., Marteau, P. 1995. On the safety of lactic acid bacteria from food. Int. J. Food. Microbiol. 27(2-3):2634.
- Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Adıgüzel, G., *Fermente Türk Sucuğundan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Fenotipik Ve Genotipik Yöntemlerle Karakterizasyonu*. 2008.
- Adiguzel, G., Gulluce, M., Bozoglu, C., Yanmis, D., Gormez, A., Atasever, M., Adiguzel, A., 2012. Molecular Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail beef in Erzurum, Turkey. Journal of Pure and Applied Microbiology, 6(3), 1033-1041.
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi No: 46: 548s.
- Arıcı, M., Demirci, M., Gündüz, H. H. 1999. *Listeria monocytogenes*'in inek ve koyun sütünden yapılan Beyaz peynirlerin imalat, olgunlaşma ve depolama aşamalarındaki durumu. Turk. J. Agric. For., 23; 1133-1137
- Aydemir, O., Harth, H., Weeks, S., Dervişoğlu, M., De Vuyst, L. 2015. Microbial communities involved in Kaşar cheese ripening. Food Microbiol. 46:587-95.
- Baele M, Vanechoutte M, Verhelst R, Vancanneyt M, Devriese LA, Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W and Schleifer K. Bacteria, Microbiology and Functional Aspect, edited by S. Salminen and A. Von. New York, USA,
- Bhowmik T, Marth EH. Rote of Micrococcus and Pediococcus species in cheese ripening : A Review. Journal of Dairy Science, 1990, 73: 859-866.
- Biler B. 2002. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi *Pediococcus acidilactici* Pbf Suşu Tarafından Üretilen Bakteriyosinin Karakterizasyonu ve Saflaştırılması.
- Bulut Ç. 2003. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from cheese. İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 112s, İzmir.
- Burgain, J., Scher, J., Francius, G., Borges, F., Corgneau, M., Revol-Junelles, A.M., Cailliez-Grimal, C., Gaiani, C., 2014. Lactic acid bacteria in dairy food: surface characterization and interactions with food matrix components. Adv Colloid Interface Sci., 213: p. 21-35.
- Büyükyörük, S, Soyutemiz, GE., 2010. Geleneksel olarak üretilmiş İzmir tulum peynirinden *Lactococcus lactis* suşlarının izolasyonu, fenotipik ve moleküler teknikler ile identifikasyonu. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 7:81-87

- Carafa, I., Nardin, T., Larcher, R., Viola, R., Tuohy, K., Franciosi, E. 2015. Identification and characterization of wild lactobacilli and pediococci from spontaneously fermented Mountain cheese. *Food microbiol.* 48:123-32.
- Carson, C.A., Shear, B.L., Ellersieck, M.R. and Schnell, J.D. 2003. Comparison of ribotyping and repetitive extragenic palindromic-PCR for identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals. *Applied and Environmental Microbiology.* 69, 1836–1839.
- Chapot-Chartier, M.P. and Kulakauskas, S., 2014. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microb Cell Fact*, 13 Suppl 1: p. S9.
- Cinbaş, T., Kılıç, M. 2005. Proteolysis and lipolysis in white cheeses manufactured by two different production methods. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 40; 1-8.
- Clarridge, J.E., Raich, T.J., Pirwani, D., Simon, B., Tai, L., Rodriguez-Barradas, M.C., Regnery, R., Zollo, A., Jones, D.C. and Rambo, C. 1995. Strategy to detect and identify *Bartonella* species in routine clinical laboratory yields *Bartonella henselae* from human immunodeficiency virus-positive patient and unique *Bartonella* strain from his cat. *Journal of Clinical Microbiology.* 33, 2107-2113.
- Çelik, Ş., Özdemir, C., Özdemir, S., Sert, S. 1998. Diyarbakır yöresinde tüketime sunulan salamura Beyaz peynir örneklerinin mikrobiyolojik, fiziksel ve kimyasal özellikleri. *Milli Prodüktivite Merkezi Yayınları* No:621;351-360
- Çetinkaya, E. 2011. Gıdalardan izole edilen *Enterobacter* sp. ve *Cronobacter sakazakii* suşlarının biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 88s.(Basılmamış).
- Daeschel, M.A., McKenney, M.C. and McDonald, L.C. 1990. Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C11. *Food Microbiology.*
- Dağdemir, E. 2006. Salamura Beyaz Peynirlerden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması ve Seçilen Bazı İzolatların Kültür Olarak Kullanılabilme İmkanları. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum, 190s
- de la Fuente-Salcido, NM., Castañeda-Ramírez, JC., García-Almendárez, BE., Bideshi, DK., Salcedo-Hernández, R., Barboza-Corona, JE. 2015. Isolation and characterization of bacteriocinogenic lactic bacteria from MTuba and Tepache, two traditional fermented beverages in México. *Food Sci Nutr.* 3(5): 434-42.
- Dec, M., Puchalski, A., Urban-Chmiel, R., Wernicki, A. 2016. 16S-ARDRA and MALDI-TOFF mass spectrometry as tools for identification of *Lactobacillus* bacteria isolated from poultry. *BMC Microbiol.* 13; 16:105.
- Demirbaş N., Oktay D., Tosun D., 2006. AB sürecindeki Türkiye’de gıda güvenliği açısından geleneksel gıdaların üretim ve pazarlaması. *Hr.Ü.Z.F.Dergisi*, 10 (3/4):47- 55.
- Domingos-Lopes, MF., Stanton, C., Ross, PR., Dapkevicius, ML., Silva, CC. 2017. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiol.* 63:178-190.
- Drinan, D.F., S. Robin, and Cogan, T.M., 1976. Citric acid metabolism in hetero- and homofermentative lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 31(4): p. 481-6.
- Durlu-Özkaya, F., Gün İ., 2007. Anadolu’da peynir kültürü. *Uluslararası Asya ve Kuzey Afrika Çalışmaları Kongresi Kitabı*, 10-15 Eylül 2007, Ankara: Türkiye. Sayfa 485.
- Education, Inc., United States of America, 2007; 35-37.

- Facklam, R., R., Sahm, D., S., Teixeira, L., M., 2002. Standart Laboratory Methods For Identifyig and Growing Enterococci. Manual of Clinical Microbiology, ASM Press.
- Fisher, K., Phillips, C., 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology, 155: 1749-57.
- Garneau, S., Martin, N.I. and Vederas, J.C. 2002. Two peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Biochimie, 84; 577-592.
- Garrity, G. M., Holt, JG. 2001. The road map to the manual, p. 119–166. In G. M. Garrity (ed), Bergey’s manual of systematic bacteriology. Springer-Verlag, New York, N.Y.
- Ghahremani, E., Mardani, M., Rezapour, S. 2015. Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria from traditional cheese in Khorramabad city of Iran with probiotic potential. Appl. Biochem. Biotechnol. 175(5):2516-27
- Erkmen, O., (ed.). 2010. Gıda Mikrobiyolojisi. (4. Baskı) Efil Yayınevi, İstanbul
- Göncü, A., Alpkent, Z. 2005. Sensory and chemical properties of white pickled cheese produced using kefir, yoghurt or a commercial cheese culture as a starter. Int. Dairy J., 15; 771- 776.
- Gürsel, A., Gürsoy, A., Şenel, E., Deveci, O., Karademir, E. 2003. The use of freeze-shocked lactic starters in low-fat White pickled cheese. Milchwissenschaft, 58(5/6); 279-282.
- Gürsoy, O., Kınık, Ö. 2006. Peynir teknolojisinde enterokoklar: Biyokimyasal özellikleri ve peynir teknolojisindeki önemleri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 43: 79-90.
- Haesebrouck, F., 2002. Identification of *Lactobacillus* Species Using tDNA-PCR. J Microbiol Methods; 50: 263-271.
- Hammes, W.P, Vogel, R.F. 1995. The Genera of Lactic Acid Bacteria. The Genus of *Lactobacillus*. Ed: Wood BJB and Holzapfel WH UK. 19-54.
- Harley, J.P., Prescott, L.M., 2002. Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edition New York: The McGraw–Hill Companies, 466p.
- Harmsen, D., Karch, H. 2004. 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. Am. Soc. Microbiol. New., 70: 19–24.
- Harrigan FW, McCance EM. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. London, Academic Press, 1976.
- Hayaloğlu, A. A., Güven M., Fox, P. F. 2002. Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White Cheese ‘Beyaz Peynir’. Int. Dairy J., 12; 635-648
- Hayaloğlu, A.A., 2001. Gıda Endüstrisinde Kullanılan Laktik Asit Bakterileri.
- Hooper, L.V. and Macpherson, A.J. 2010. Immune Adaptations That Maintain Homeostasis with the Intestinal Microbiota. Nature Reviews Immunology, 10, 159-169.
- İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., Yıldırım, M., 2008. Yöresel Peynirden Antimikrobiyal Aktiviteye sahip laktik asit bakterisinin izolasyonu ve tanısı. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 25: 1-6.
- Kabadjova, P., Dousset, X., Le Cam, V. and Prevost, H. 2002. Differentiation of closely related *Carnobacterium* food isolates based on 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer region polymorphism. Applied and Environmental Microbiology. 68, 5358-5366.

- Kamada, N., Seo, S.-U., Chen, G.Y. and Núñez, G., 2013. Role of the Gut Microbiota in Immunity and Inflammatory Disease. *Nature Reviews Immunology*, 13, 321-335.
- Karakuş, M., Borçaklı, M., Alperden, I., 1992. Beyaz peynirin olgunlaşması sürecinde laktik asit bakterileri. *Gıda*, 17; 363- 369.
- Kavas, G., Oysun, G., Kınık, Ö., Uysal, H. 2004. Effect of some fat replacers on chemical, physical and sensory attributes of low-fat White pickled cheese. *Food Chem.*, 88; 381-388.
- Kılıç, S., 2008. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri.
- Kıran, F., Osmanoğlu, Ö., 2011. Laktik asit bakterilerinin identifikasyonunda kullanılan moleküler yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 27: 62-74.
- Kıran, F. 2006. Hücre Duvarı Protein Profilleri Ve Pilazmid İçeriklerine Göre Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Tanısı. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı
- Koçak, C., 1994. Mayalama teknikleri ve pıhtı işleme. In: Demirci M, ed. Her yönüyle peynir. Tekirdağ: Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi Yayınları, 94-102
- Kolbert, CP., Persing, DH. 1999. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2: 299–305.
- Kurt, Ş., 2005. Bakteriyosinler ve gıdalarda kullanım olanakları.
- Lupski, J.R. and Weinstock, G.M. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *Journal of Bacteriology*. 174, 4525– 4529.
- Lusk, TS., Ottesen, AR., White, JR., Allard, MW., Brown, EW., Kase, JA. 2012. Characterization of microflora in Latin-style cheeses by next-generation sequencing technology. *BMC Microbiol.* 7;12:254.
- Morelli, L., Callegari, M.L., Vogensen, F.K. and von Wright, A., 2012. Genetics of Lactic Acid Bacteria. In: Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S. and von Wright, A., Eds., *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 4th Edition, Taylor & Francis Group LLC, CRC Press, Boca Raton, 17-38.
- Ni, K., Wang, Y., Li, D., Cai, Y., Pang, H. 2015. Characterization, identification and application of lactic acid bacteria isolated from forage paddy rice silage. *Plos One*. 10(3):e0121967.
- Okereke, A. and Montville, T.J., 1991. Bacteriocin-mediated inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria at refrigeration and abuse temperatures. *Appl Environ Microbiol*, 57(12): p. 3423-8.
- Olive, D.M. and Bean, P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. 37, 1661–1669.
- Omar, NB., Abriouel, H., Lucas, R., Martinez-Canamero, M., Guyot, JP., Galvez, A., 2006. Isolation of bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* strains from ben saalga, a traditional fermented gruel from Burkina Faso. *Int J Food Microbiol.*, 15;112(1):44-50.
- Öner, Z., Karahan, A. G., Aloğlu, H. 2006. Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal Turkish white cheese. *Food Sci. Technol.*, 39; 449-454.

- Özer B., 2012. Fermente süt ürünleri, probiyotik organizmalar ve peynir. İçinde: Aran N (editör). Gıda Biyoteknolojisi, Ankara, Nobel Yayın Dağıtım, 198-220.
- Pamir, M., 1985, Fermentasyon Mikrobiyolojisi, Ankara Üniversitesi Basımevi, s. 10-12, 118-130.
- Pfister, P., Hobbie, S., Vicens, Q., Bottger, EC., Westhof, E. 2003b. The molecular basis for A-site mutations conferring aminoglycoside resistance :relationship between ribosomal susceptibility and X-ray crystal structures. *Biochem.*, 4: 1078– 1088.
- Pfister, P., Risch, M., Brodersen, DE., Bottger, EC. 2003a. Role of 16S rRNA helix 44 in ribosomal resistance to hygromycin B. *Antimicrob. Agents Ch.*, 47: 1496–1502.
- Piard J., Hautefort, I., Fischetti, V. A., Ehrlich, S. D., Fons, M. and Gruss, A., 1997. Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. *J Bacteriol*, **179**(9): p. 3068-72.
- Prakash, O., Verma, M., Sharma, P., Kumar, M., Kumari, K., Singh, A., Kumari, H., Jit, S., Gupta, S.K., Khanna, M. and Lal, R. 2007. Polyphasic approach of bacterial classification: An overview of recent advances. *Indianian Journal of Microbiology*. 47, 98-108.
- Quinto, E. J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J., Gírbés, T., 2014. Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review *Food and Nutrition Sciences*, 5, 1765-1775.
- Quilodrán-Vega, SR., Villena, J., Valdebenito, J., Salas, MJ., Parra, C., Ruiz, A., Kitazawa, H., García, A. 2016. Isolation of lactic acid bacteria from swine milk and characterization of potential probiotic strains with antagonistic effects against swine-associated gastrointestinal pathogens. *Can J Microbiol*. 62(6):514-24.
- Randazzo, C.L., Caggia, C. and Neviani, E. 2009. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods*, 78: 1–9.
- Rodgers, S. 2001. Preserving non- fermented refrigerated food wiht microbial cultures a review. *Trends in Food Science& Technology*. 12; 276–284.
- Saeed A. Hayek., Salam A. Ibrahim, 2013. “Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review “*Food and Nutrition Sciences*, 4, 73-87.
- Sağdıç O., Arıcı M., Şimşek O., 2002. Selection of starters for a traditional Turkish yayık butter made from yoghurt. *Food Microbiology*, 19, 303-312.
- Samarzija, D., Antunac, N., Havranek, J., 2001. Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*. *Mljekarstvo*, 51: 34-48.
- Sanchez, I., Palop, L., Ballesteros, C., 2000. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of ‘Almagro’ eggplants. *International Journal of Food Microbiology*, 59: 9-17.
- Saygılı, H., Sahin, F. ve Aysan Y., 2006. *Fitobakteriyoloji*, Meta Basım Matbaacılık, İzmir, Türkiye, pp 550.
- Song, M., Yun, B., Moon, JH., Park, DJ., Lim, K., Oh, S. 2015. Characterization of selected *Lactobacillus* strains for use as probiotics. *Korean J Food Sci Anim Resour*. 35(4):551-6.
- Stiles ME., Holzapfel, WH. 1997. Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*; 36, 1-29

- Şimşek, Ö., 2003. Uşak ve Yöresi Ekşi Hamurlarından İzole Edilen Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması ve Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Denizli
- Tekinşen, O., Atasever, M., Keleş, A., Tekinşen, K., 2002. Süt, Yoğurt, Tereyağı, Peynir Üretim Kontrolü, 2.Baskı. Konya Selçuk Üniversitesi Basımevi.
- Tekinşen, O.C. 1993. Beyaz peynirin yapım metotları üzerinde karşı- laştırmalı incelemeler. Ankara Üni Vet Fak Derg 30: 449-66.
- Temiz, A., 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
- Terzic-Vidojevic, A., Vukasinovic, M., Veljovic, K., Ostojic, M., Topisirovic, L. 2006. Characterization of microflora in homemade semi-hard white Zlata cheese. Int. J Food Microbiol. 28;114(1):36-42.
- Tindall, J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.J., Ludwig, W., Kämpfer, P., 2010. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 60, 249-266.
- Todorov, S.D. 2010. Diversity of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from boza, a cereal-based fermented beverage from Bulgaria. Food Control, 21:1011-1021
- Todorov, S.D., Martinez, R., Saad, S., 2015. Bacteriocin production and inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a in a potentially synbiotic cheese spread. Food Microbiology. 143–152
- Tortoli, E. 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. Clin. Microbiol. Rev., 16: 319–354.
- Turantaş, F. 2003. Fermente gıdalar. İçinde: Ünlütürk A, Turantaş F (editörler). Gıda Mikrobiyolojisi, İzmir, Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, 447-457.
- Ünal, E.M. 2014. Ege Denizi'ndeki *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh populasyonlarının filogenetik ilişkilerinin DNA barkodlama tekniği ile belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 93, Ankara.
- Ünlütürk A., Turantaş F., 1999. Gıda Mikrobiyolojisi 2.Baskı, Mengi Tan Basımevi, İzmir
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J. and Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). Methods in Molecular and Cellular Biology. 5, 25–40.
- Wyszyńska, A., Kobińska, P., Bardowski, J., Jagusztyn-Krynica, E.K. 2015. Lactic acid bacteria-20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. Appl Microbiol Biotechnol, 99(7): p. 2967-77.
- Yerlikaya, O., 2014. Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan başlıca fenotipik ve moleküler yöntemler. Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi, 14:8-22.
- Zhu, W.M., Liu, W. and Wu, D.Q. 2000. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7. J Appl Microbiol, 88(5): p. 877-86.

## ÖZGEÇMİŞ

28.06.1991 yılında Erzurum’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2010 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nden 2014 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı.

