

HAZİRAN 2018

Yüksek Lisans Biyoloji Bölümü

MESUT ÇAY

**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YOĞURT MAYALANMASINDA KULLANILAN
BAKLAGİLLERDEN MİKROORGANİZMALARIN
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MESUT ÇAY
HAZİRAN 2018**

**Yoğurt Mayalanmasında Kullanılan Baklagillerden
Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Karakterizasyonu**

Gaziantep Üniversitesi

Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

Mesut ÇAY

Haziran 2018



© 2018 [Mesut ÇAY]

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tezin Adı: Yoğurt Mayalanmasında Kullanılan Baklagillerden Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Öğrencinin, Adı Soyadı: Mesut ÇAY

Tez Savunma Tarihi: 26/06/2018 Saat: 14:00

Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Bu tezin Yüksek Lisans olarak gerekli şartları sağladığını onaylıyorum.


Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER
Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvanı, Adı ve Soyadı):

Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

Doç. Dr. Muhittin DOĞAN

Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem KÖÇKAR

İmzası


İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

Mesut ÇAY

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MICROORGANISMS FROM LEGUMES USED IN YOGHURT FERMENTATION

ÇAY, Mesut

M.Sc. in Biology Department

Supervisor(s): Assoc. Prof. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

July 2018

72 pages

The history of the yoghurt is based on very ancient times, but there is no definite information about where and when it was first made. As yoghurt and similar fermented dairy products have proved positive effects on human nutrition and health, consumption of yoghurt and its production in the world is also increasing. However, our efforts are being made to improve yogurt quality and to produce yogurt with different techniques with new techniques. Yoghurt in the Turkish Food Codex Fermente Dairy Products Notice is defined as the fermented dairy product in which the fermentation process is generally performed using symbiotic cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbruecki* subsp *bulgaricus*. The fermentation of the yogurt in our country is carried out with cultures from foreign countries. Yoghurt samples were diluted and each sample was planted in MRS and M17 Agar medium for bacterial isolation from the diluted samples. It was then allowed to incubate for 72 hours at 37 ° C and 42 ° C for the development of microorganisms. Fresh pure cultures were obtained. By applying appropriate DNA isolation protocol from pure cultures, DNAs were obtained and stored. The new generation sequence was characterized by 16s rRNA sequence analysis and MALDI-TOF methods. The bacteria in the yogurts produced are *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbruecki* subsp *bulgaricus*. In the obtained data, the breeding bacteria in the MRS and M17 media are advisable for culture used in yoghurt production.

Key Words: Yoghurt, MRS, M17, 16S rRNA, MALDI-TOF

ÖZET

YOĞURT MAYALANMASINDA KULLANILAN BAKLAGILLERDEN MIKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU VE KAREKTERİZASYONU

ÇAY, Mesut

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

Temmuz 2018

72 sayfa

Yoğurdun tarihi çok eski zamanlara dayanmakla birlikte, ilk olarak nerde ve ne zaman yapıldığına dair kesin bir bilgi yoktur. Yoğurt ve benzeri fermente süt ürünlerinin insan beslenmesi ve sağlığı üzerinde olumlu etkileri kanıtlandıkça dünyada yoğurt tüketimi ve buna bağlı olarak üretimi de artmaktadır. Bununla birlikte yoğurt kalitesini iyileştirmek ve yeni tekniklerle farklı özelliklerde yoğurt üretmek amacıyla çalışmalar devam etmektedir. Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliğinde yoğurt, fermentasyon sırasında genel olarak *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbruecki* subsp *bulgaricus*' un simbiyotik kültürlerinin kullanıldığı fermente süt ürünü olarak tanımlanır. Ülkemizde sütün fermentasyonu ile yoğurt elde etme işlemi yurt dışından temin edilen starter kültürlerle yapılmaktadır. Yoğurt örnekleri dilüe edilerek, dilüe edilen örneklerden bakterilerin izolasyonu için MRS ve M17 Agar besiyerlerine her örnekten ekim yapılmıştır. Ardından mikroorganizmaların gelişimi için 37 °C' ve 42 °C' de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Taze saf kültürler elde edilmiştir. Saf kültürlerden uygun DNA izolasyon protokolü uygulanarak DNA'ları elde edilip stoklanmıştır. Yeni jenerasyon sekans ile 16S rRNA dizilim analizi ve MALDI-TOF yöntemleri ile karakterizasyonları yapılmıştır. Üretilen yoğurtlardaki bakterilerin *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbruecki* subsp *bulgaricus* olduğu tanımlanmıştır. Elde edilen verilerde MRS ve M17 besiyerindeki üreyen bakteriler yoğurt üretiminde ticari olarak kültür kullanımına adaydır.

Anahtar Kelimeler: Yoğurt, MRS, M17, 16S rRNA, MALDI-TOF

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince tüm bilgilerini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen ve tezimde büyük emeği olan, aynı zamanda kişilik olarak ta bana çok şey katan Gaziantep Üniversitesi öğretim üyelerinden danışman hocam, Sayın İbrahim Halil KILIÇ'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Örneklerin toplanmasında, preparasyonunda ve teşhislerinde desteklerini benden esirgemeyen değerli arkadaşlarım Bekir Sıddık KURT ve Sami Serhat TONUS'a çok teşekkür ederim.

Bu çalışmada maddi destek sağlayan Gaziantep Üniversitesi BAP Yönetim Birimine (FEF. YLT.17.10 no'lu proje) teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma süresince beni hep destekleyen ve güvenen çok sevdiğim biricik eşim Seda ÇAY ve tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



Çok kıymetli aileme.....

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ABSTRACT.....	v
ÖZET.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
TABLolar LİSTESİ	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
SEMBOLLER LİSTESİ	xvi
KISALTMALAR LİSTESİ	xvi
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Yoğurt.....	1
1.2. Laktik Asit Bakterileri.....	3
1.2.1. Yoğurtta Kullanılan Laktik Asit Bakterileri.....	7
1.2.1.1. <i>Streptococcus thermophilus</i>	7
1.2.1.2. <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	9
1.2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Tanımlanması.....	10
1.2.3. MALDI-TOF MS Yöntemi.....	12
1.3. Baklagiller (Fabaceae)	13
1.3.1. Fasulye.....	14
1.3.2. Börülce.....	15
1.3.3. Mercimek	17

1.3.4. Bakla.....	18
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ.....	20
3. MATERYAL VE METOD.....	23
3.1. Baklagillerin Toplanması ve Adlandırılması.....	23
3.2. Yoğurt Üretiminde Kullanılan Süt	23
3.3. Yoğurt Üretimi.....	24
3.4. Mikrobiyolojik Analizler.....	26
3.4.1. MRS Agar.....	26
3.4.2. %10'luk Laktoz Çözeltisi Hazırlanması.....	27
3.4.3. M17 Agar.....	28
3.4.4. %2'lik Hidrojen Peroksit(H ₂ O ₂) Çözeltisi Hazırlanması.....	28
3.4.5. Gram Boyama Çözeltisi.....	29
3.4.6. Lab İzolasyonu.....	29
3.4.7. Gram Boyama.....	30
3.4.8. Katalaz Testi.....	30
3.4.9. Gliserol.....	30
3.4.10. İzolatların Saklanması.....	30
3.5. LAB 16S rRNA Yöntemi İle Moleküler Tanımlanması.....	31
3.6. MALDI-TOF MS Yöntemi.....	34
4. BULGULAR.....	36
4.1. Dilüsyon ve Ekimler.....	36
4.2. Gram Boyama.....	37
4.3. Katalaz Testi.....	41
4.4. MALDI-TOF MS Yöntemi.....	42
4.5. LAB 16S rRNA Gen Bölgesi Dizi Analizi Yöntemi İle Tanımlanması.....	45

5. TARTIşMA VE SONUÇLAR.....	55
6. KAYNAKLAR.....	58
EKLER.....	67



TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. MRS Agar Bileşimi.....	27
Tablo 2.2. M17 Agar Bileşimi.....	28
Tablo 3.1. Katalaz Test Sonuçları.....	42
Tablo 3.2. MALDI-TOF MS Sonuçları.....	42
Tablo 3.3. 16S rRNA Gen Bölgesi Moleküler Tanımlama Sonuçları.....	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması.....	7
Şekil 1.2. <i>Streptococcus thermophilus</i>	8
Şekil 1.3. <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	10
Şekil 1.4. MALDI-TOF MS Yöntemi.....	13
Şekil 1.5. Türkiye’de Fasülye Üretimi Yapılan İller.....	15
Şekil 1.6. Türkiye’de Börülce Üretimi Yapılan İller.....	16
Şekil 1.7. Türkiye’de Mercimek Üretimi Yapılan İller.....	17
Şekil 1.7. Türkiye’de Bakla Üretimi Yapılan İller.....	19
Şekil 3.1. Kullanılan Baklagiller.....	23
Şekil 3.2. Yoğurt Üretiminde Kullanılan Süt.....	23
Şekil 3.3. Yoğurt Üretim Şeması.....	24
Şekil 3.4. UHT’siz Sütün 80°C’de Isıtılması.....	25
Şekil 3.5. Sütlere Baklagil Eklenip (45°C) İnkübasyona Bırakılması.....	25
Şekil 3.6. İnkübasyon Sonrası Oluşan Yoğurtlar.....	26
Şekil 3.7. İzolatların Moleküler Tanımlanmasında İzlenen Aşamalar.....	32

Şekil 4.1. Yoğurtların 10^{-6} Dilüe Edilmesi.....	36
Şekil 4.2. M17 ve MRS Besiyerindeki LAB.....	37
Şekil 4.3. Merkok (Mercimek'ten Üretilen Yoğurttaki Kok)	37
Şekil 4.4. Faskok (Fasülye'den Üretilen Yoğurttaki Kok)	38
Şekil 4.5. Börkok (Börülce'den Üretilen Yoğurttaki Kok)	38
Şekil 4.6. Bakkok (Bakla'dan Üretilen Yoğurttaki Kok)	39
Şekil 4.7. Merbas (Mercimek'ten Üretilen Yoğurttaki Basil)	39
Şekil 4.8. Fasbas (Fasülye'den Üretilen Yoğurttaki Basil)	40
Şekil 4.9. Börbas (Börülce'den Üretilen Yoğurttaki Basil)	40
Şekil 4.10. Bakbas (Bakla'dan Üretilen Yoğurttaki Basil)	41
Şekil 4.11. Katalaz Testi Yapılışı	41
Şekil 4.12. MALDI-TOF Merkok Grafiği.....	43
Şekil 4.13. MALDI-TOF Faskok Grafiği.....	43
Şekil 4.14. MALDI-TOF Merbas Grafiği.....	44
Şekil 4.15. MALDI-TOF Börbas Grafiği.....	44
Şekil 4.16. MALDI-TOF Fasbas Grafiği.....	45
Şekil 4.17. Merkok NCBI Bankasındaki Referans Genom Benzerliği.....	46
Şekil 4.18. Merkok NCBI Bankasındaki Referans Genom Benzerlik Grafiği.....	47
Şekil 4.19. Faskok NCBI Bankasındaki Referans Genom Benzerliği.....	47
Şekil 4.20. Faskok NCBI Bankasındaki Referans Genom Benzerlik Grafiği.....	48

Şekil 4.21.	Bakkok NCBI Bankasındaki Referans Genom Benzerliği.....	48
Şekil 4.22.	Bakkok NCBI Bankasındaki Referans Genom Benzerlik Grafiği.....	49
Şekil 4.23.	Börkok NCBI Bankasındaki Referans Genom Benzerliği.....	49
Şekil 4.24.	Börkok NCBI Bankasındaki Referans Genom Benzerlik Grafiği.....	50
Şekil 4.25.	Merbas NCBI Bankasındaki Referans Genom Benzerliği.....	50
Şekil 4.26.	Merbas NCBI Bankasındaki Referans Genom Benzerlik Grafiği.....	51
Şekil 4.27.	Fasbas NCBI Bankasındaki Referans Genom Benzerliği.....	51
Şekil 4.28.	Fasbas NCBI Bankasındaki Referans Genom Benzerlik Grafiği.....	52
Şekil 4.29.	Bakbas NCBI Bankasındaki Referans Genom Benzerliği.....	52
Şekil 4.30.	Bakbas NCBI Bankasındaki Referans Genom Benzerlik Grafiği.....	53
Şekil 4.31.	Börbas NCBI Bankasındaki Referans Genom Benzerliği.....	53
Şekil 4.32.	Börbas NCBI Bankasındaki Referans Genom Benzerlik Grafiği.....	54

SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ

LAB	Laktik Asit Bakterileri
MRS	De-man, Rogosa And Sharpe
MALDI-TOF	Matriks Assisted Lazer Desorption Ionization Time of Flight
UHT	Ultra High Temperature
YSB	Yağsız Süt Besiyeri
rRNA	Ribozomal Ribo Nükleik Asit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
NaCl	Sodyum Klorür
m/z	Kütle / Yük
mL	Mililitre
kob/ml	Koloni Oluşturan Birim/ Mililitre
µl:	Mikrolitre
g:	Gram
L:	Litre

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Yoğurt

Yoğurdun kökeni tam olarak bilinmesede en yaygın görüş Orta Asya’ da yaşayan göçebe halklarının bulduğu yönündedir. Göçebe toplulukların avcılık ve toplayıcılıktan yavaş yavaş yerleşik düzene geçiş döneminde yabani hayvanları evcilleştirmeye başlamışlardır. Bu süreçte yaklaşık olarak M.Ö 6000- 8000 yılları arasında koyun, keçi, sığır ve manda gibi hayvanların evcilleştirildiği bildirilmektedir. Hayvanların evcilleşmesi hayvansal ürünlerin çeşitliliğini arttırmıştır. Hayvansal ürünlerden sütün besin olarak kullanılması ile beraber sütün daha uzun süre muhafaza edilmesi gerekliliği doğmuştur. Bunun için ilk önce süt bir şekilde kaynatılmıştır. Sütün kaynatılması süt yoğunluğunda azalmaya, kazeinin denaturasyonuna ve patojen bakterilerin yıkımlanmasına neden olmuştur. Sonuçta o dönem içerisinde etkili bir muhafaza yöntemi geliştirilmiştir. Kısmen işlem görmüş sütte bulunan sıcaklığa dirençli laktik asit bakterileri ve doğal koşullarla bulaşan fermentatif bakterilerin etkisiyle yoğurt oluşumu başladığı tahmin edilmektedir.(Özden 2008; Tamime ve vd., 1985)

Orta Asya Türkçesinde yoğurdun; kalın, şişkin anlamına gelen “yoğun’ dan geldiği kabul edilir. Katılaşmış veya koyulaşmış anlamlarında da kullanılan yoğurdun “yoğurmak” ya da “yuğurmak”, başka bir deyişle “karıştırmak” tan da geldiği ileri sürülür. (Ögel, 1985).

Uluslararası Sütçülük Federasyonu (IDF,1983) fermente sütü; tam yağlı, yağlı, yarım yağlı, az yağlı, yağsız süt, konsantre süt ve süt tozu ile kuru maddesi artırılmış, homojenize edilmiş veya edilmemiş halde bulunabilen; sütün pastörizasyon veya sterilizasyon işleminden sonra soğutulmuş özel laktik asit bakterilerini içeren tek veya karışım haldeki starter kültürlerle fermente edildiği, inkübasyon işlemi sonrasında da soğumaya bırakıldığı bir ürün olarak tanımlamıştır.

TSE göre yoğurt (TS 1330, 1018 ve/veya TS 1019) standartlarına uygun, homojenize edilmiş sütlere *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* eklenerek laktik asit fermentasyonu sonucunda elde edilen fermente bir süt ürünüdür” şeklinde tanımlanmıştır (Giraffa vd. 2003).

Gıda Maddeleri Tüzüğü’ nde “minimum 90 °C’ de ısıtılıp, 45-50 °C dereceye kadar soğutulmuş süte, Laktik asit bakterileri katılarak laktik asit mayalanmasına tabi tutulmasıyla elde edilen bir süt ürünüdür” (Anonymous, 2001).

Süte homofermentatif starter bakterilerin eklenmesi ve sütün laktik asit fermentasyon ürünü olarak elde edilen yoğurt, dünyada en çok bilinen fermente süt ürünüdür. (Iranmanesh vd., 2012).

Genel olarak yoğurtlar; %14–20 kuru madde, %2–8 yağ, %4–8 protein ve %0.8–1.2 mineral madde içerirler (Yöney, 1967).

Geleneksel yoğurt üretiminde genellikle süte herhangi bir standardizasyon işlemi uygulanmaz.

Yoğurt kalsiyum, fosfor, magnezyum, A vitamini ve riboflavince zengindir (Erkaya ve Şengül, 2012). Yoğurt uzun süre bozulmaması ve pH değerinin az olmasından ötürü içerisinde patojen mikroorganizmaların canlılıklarını uzun süre muhafaza edememeleri ve beslenme gibi nedenler ile Türkiye’ de yoğurdun en tanınan ve kullanılan süt ürünü olmasının başlıca nedenleridir (Tekinşen ve ark., 2008).

İstenmeyen birçok mikroorganizma yoğurtta gelişemez. Yoğurt güvenilir bir ürün olarak kabul edilir. Ülkemizde sütün fermentasyonu ile yoğurt elde etme işlemi yurt dışından temin edilen starter kültürlerle yapılmaktadır (Güven, 2008).

Standart kalitede ürün elde etmek için gıda teknolojisinde kullanılan mikroorganizmalar starter kültür diye isimlendirilir. Endüstriyel üretimde süte pastörizasyon işlemi uygulandıktan sonra yoğurt starter kültür ilave edilir. Çünkü çiğ sütün pastörizasyonu sonunda yararlı bakteriler yok olmakta ve yerine geçecek bakterilere gereksinim duyulmaktadır (Polat, 2009). Yoğurt, peynir, et ürünleri, şarap ve sebze gibi süt ürünlerini de içeren fermente ürünlerin üretiminde starter kültür olarak kullanılırlar (Abdullah ve Osman, 2010).

Sağlık, teknoloji ve öncelikle bilimsel alandaki güncel çalışmalar, farklı damak tatları, yoğurt ürün modellerindeki çeşitlilik halkımızda yoğurda karşı güven ve yeni taleplerin varlığını ortaya koymuş, bu da yerli yoğurt starter kültürlerine ihtiyacı ortaya çıkarmıştır. Ülkemiz, yoğurt starter (saf) kültürünü ithalatçı firmalar aracılığıyla yurt dışından temin etmektedir. Üstelik Türkiye’ de süt sanayisi yılda yaklaşık 80 milyon doları yoğurt yapımında kullanılan ithal mayalar için harcamaktadır. Bu da ülke ekonomisine zarar vermekte, üstelik halkımızın damak tadına uygun lezzette yoğurt üretilmemektedir. Bilimsel çalışmalarla yerli yoğurtlardan izole edilecek olan mayalardan oluşturulacak yerli starter kültürün süt sanayisine aktarılması ile yoğurt ihtiyacımız daha az maliyetle giderilecektir.

1.2 Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB), ilk olarak XX. yüzyılın başında Rus bilim adamı Eli Metchnikoff tarafından keşfedilmiştir. Daha sonra, Metchnikoff’un yoğurt üzerine yaptığı araştırmalar, bu bilim insanına 1908 yılında Nobel ödülünü kazandırmıştır. Bundan sonra LAB’leri ile ilgili çalışmalar artarak devam etmiş ve günümüze kadar pek çok çalışma yapılmıştır (Tamime vd., 1980).

Laktik asit bakterileri genel olarak gram-pozitif, fakültatif anaerob, spor oluşturmayan (*Sporolactobacillus inulinus* hariç) katalaz-negatif ve sitokromdan yoksun, karbonhidrat fermentasyonu ile laktik asit üreten bakterilerdir. Morfolojik olarak kısa veya uzun çubuk (*Lactobacillus*) ya da yuvarlak veya eliptik (*Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus*) şekillidirler. Bazı kaynaklar göre bu bakteriler cins ve türe göre değişmek üzere bitki ve bitki artıklarında rastlanmıştır. (Yüksekdağ ve Beyatlı, 2009).

Geleneksel olarak LAB'nin sınıflandırılmasında fenotipik ve genotipik özellikler göz önüne alınmaktadır. Fenotipik özellikler olarak bakterilerin morfolojisi, büyüme sıcaklıkları, glikoz fermantasyon biçimleri, çeşitli karbonhidatların fermantasyonu, laktik asit konfigürasyonu, bütün hücre yada hücre duvarındaki proteinlerin şekli dikkate alınır. Fakat bu metodlardan; net sonuçlar alınamaması ve az tekrarlanabilirliği gibi sebeplerden dolayı kesin bir ayırım yapılmadığına kanaat getirilmiş, farklı arayışlar içine girilmiştir (Mohanıa vd., 2008).

LAB karbonhidrat fermantasyonunda açığa çıkan son ürüne göre homofermantatif ve heterofermantatif olarak iki gruba ayrılır. Homofermantatif laktik asit bakterileri glukozu; fruktozdifosfat yolu ile parçalayarak, heterofermantatif laktik asit bakterileri ise glukozu; heksosmonofosfat yolu ile parçalayarak laktik asit üretirler (Trias et vd., 2008).

Bakteri izolatlarının tanı ve karakterizasyonu için konvensiyonel ve moleküler teknikler kullanılmaktadır (Özkan, 2009). Konvensiyonel teknikler; bakteri izolatlarının tanımlanmasında geleneksel olarak kullanılan, morfolojik (hücre şekli, boyutu, koloni rengi ve tipi), fizyolojik (farklı sıcaklık ve pH'lardaki gelişim) ve biyokimyasal özelliklerinin incelenmesini içeren, fenotipik özelliklere dayalı yöntemlerdir (Madrid, 2001; Adıgüzel, 2006; Kıran, 2006; Mosivand, 2009). Bununla birlikte konvensiyonel yöntemlerin uzun süreli deneylere, fazla iş gücüne, yetişmiş araştırmacılara ihtiyaç duyması, ekonomik olmaması ve alınan sonuçların yoruma açık olması gibi birçok dezavantajı bulunmaktadır. Bundan dolayı, bakterilerin sadece bu özelliklerine göre sınıflandırılmaları, farklı bakteri grupları arasındaki evrimsel ilişkiyi tespit etmede ve özellikle de tür ve tür altı taksonomik grupları belirlemede yetersiz kalmaktadır. Konvensiyonel tekniklerin, bu dezavantajlarından yola çıkılarak bakterilerin tanımlanmasında moleküler teknikler geliştirilmiştir (Adıgüzel, 2006; Adıgüzel, 2009; Gırı, 2009; Khiyami, 2012).

Moleküler teknikler; özellikle PCR temelli olup mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın şekilde kullanılmaktadır. PCR yönteminin değişik formatları geliştirilerek hedef olan genomik DNA'nın yanı sıra, genomik RNA, 16S, 23S rDNA, mRNA molekülleri de kullanılmakta ve bakterilerin tür ve tür altı düzeyde tanımlamaları yapılmaktadır (Adıgüzel 2011; Durmaz 2012; Khiyami 2012). Özellikle son

zamanlarda, 16S rDNA geninin *Escherichia coli*'ye klonlanması ve sekanslanması ile bakterilerin tanılanması esas, ribozomal gen veritabanındaki sekans bilgilerinin benzerliğine dayanmaktadır. Bu yöntem özellikle klinik mikrobiyoloji ve mikrobiyal ekoloji alanlarında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir (Külekçi, 2012).

Kontrollü şartlar altında oligonükleotid primerleri kullanılarak özel olarak hedeflenmiş DNA/RNA parçalarının seçici çoğaltılmasını sağlayan polimeraz zincir reaksiyonu (PZT) çeşitli düzeylerde ayırım gücüne sahip bir metoddur (Temmerman vd., 2008).

LAB'nin sınıflandırılmasında kullanılan moleküler tiplendirme yöntemlerinden bazıları; Restriksiyon fragment polimorfizmi (RFLP), Pulse field jel elektroforezi (PFGE), Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) ve Real-time PCR'dır (Mohana vd., 2008).

Fermente gıda üretim teknolojisinde son yıllarda yapay koruyucuların yerine biyoteknolojik yöntemlere yönelim artmıştır. Bunun için hem fermentasyonu sağlayan hem de zararlı bazı patojenik bakteriler üzerinde ürettikleri maddelerle antimikrobiyal etkiye sahip LAB tercih edilmektedir. LAB'nin karbonhidrat fermentasyonu sonucunda laktik asit, diasetil ve asetaldehit, hidrojen sülfür (H₂S), hidrojen peroksit (H₂O₂), reuterin ve bakteriyosin son ürün olarak çıkmaktadır (Evren vd, 2006; Avşaroğlu vd., 2008).

Bakteriyosinler ribozom tarafından sentezlenerek salgılanan küçük, ısıya dayanıklı peptit ya da protein yapısındaki antimikrobiyal metabolik ürünlerdir (Yılmaz ve Yıldırım, 2000; Kaya ve Gökalp, 2005; Galvez vd., 2007). Bu maddeyi üreten LAB yapılan çalışmalarda patojen olan birçok bakteri üzerine antimikrobiyal etkiye sahip olduğu görülmüştür (Franz, 1997; Dündar, 2006).

LAB tarafından üretilen laktik asit fermente ve salamura gıdalarda mikroorganizma gelişimini engellemesine rağmen küf ve mayalar için etkin değildir. Laktik asit disosiye olmadan hücreye girdiğinde orada disosiye olur ve pH'nın düşmesiyle asitlik yükselir. Bu da proton motive gücünü azaltır ve elektrokimyasal dengeyi bozar. Ancak laktik asit çözünmezse bir inhibisyon etki meydana getirmez (Çon ve Gökalp, 2002a).

LAB olan *Lactobacillus* ve *Streptococcus* cinsleri tarafından aerobik şartlar altında üretilen hidrojen peroksit (H_2O_2) güçlü oksitleyici özelliğinden dolayı antimikrobiyal özelliğe sahiptir. Fakat bu etkiyi ortamın sıcaklık, pH, iyon yükü ve muamele süresi etkiler (Çon ve Gökalp, 2002b). H_2O_2 özellikle mikroorganizma DNA replikasyonunu engelleyerek kırılmalara sebep olur (Kılıç, 2008).

Süt ürünlerinin karakteristik tat ve aroması, ağırlıklı olarak mezofilik ve termofilik starter bakteriler tarafından sentezlenen laktik, asetik, formik asit, bütirik, piruvik, oksalik ve süksinik asit gibi uçucu ya da uçucu olmayan organik asitler ile asetaldehit, diasetil, aseton gibi karbonil bileşiklerinden kaynaklanmaktadır Ayrıca, birçok laktik asit bakterisi aminoasitlerden aroma bileşenleri sentezleme yeteneğine sahiptir. (Tamime and Robinson, 2007).

Fermente süt ürünü yoğurtta belirgin tadı ve aromayı veren asetaldehid üretimi *Lactobacillus bulgaricus* tarafından ortam pH'sı 5'e ulaştığında başlar ve fermentasyon tamamlandığında asetaldehid miktarı 40 mg/kg seviyesine kadar yükselir (Tunail, 2009).

Bakteri	Fermente st rnekleri
Laktokoklar	
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Fermente yağlı st, kefir
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Fermente yağlı st, kefir, dahi
<i>Lactococcus lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	Fermente yağlı st, kefir, dahi
Streptokoklar	
<i>S. thermophilus</i>	Yoğurt, dahi, mozzarella
Leuconostoc	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>	Kefir, Fermente krema
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	Kefir, Fermente krema
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i>	Kefir, Fermente krema
Lactobacillus	
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>	Fermente st iecekleri, yoğurt
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	Fermente st iecekleri
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Yoğurt, Bulgar yağlı st, Mozzarella
<i>L. helveticus</i>	Kefir, kımız, Mozzarella
<i>L. acidophilus</i>	Asidofilus st, kefir
<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	Fermente st iecekleri
<i>L. johnsonii</i>	Probiyotik yoğurt, fermente st iecekleri
<i>L. casei</i>	Probiyotik yoğurt
<i>L. paracasei</i>	Probiyotik yoğurt
<i>L. reuteri</i>	Probiyotik yoğurt
<i>L. rhamnosus</i>	Kefir
<i>L. plantarum</i>	Kefir
<i>L. kefir</i>	Kefir
<i>L. kefiranoferiens</i>	Kefir
<i>L. brevis</i>	Kefir
<i>L. fermentum</i>	Kefir
Bifidobacterium	
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Fermente stler
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Yoğurt benzeri rnler
<i>Bifidobacterium breve</i>	
<i>Bifidobacterium infantis</i>	
<i>Bifidobacterium longum</i>	

Şekil 1.1 Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması

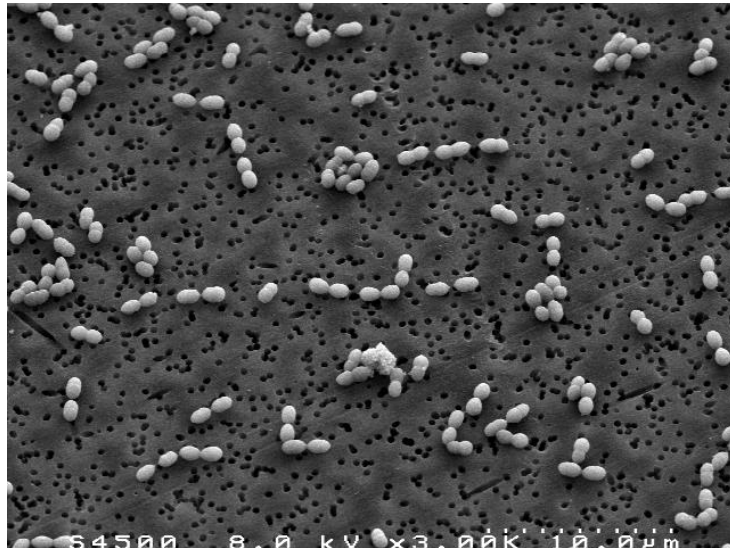
1.2.1 Yoğurta Kullanılan Laktik Asit Bakterileri

1.2.1.1 *Streptococcus thermophilus*

S. thermophilus laktik asit bakterileri grubuna ait termofilik Gram pozitif bakteridir. Yoğurtlarda, İtalyan, İsviçre tipi Mozzarella ve Emmantal peynirlerinde sütü fermente ederek galaktozdan hızlı asidifikasyon ile laktik asit üretiminde görevlidir. Bunun yanında birçok biyoteknolojik olayda şeker metabolizması, proteolitik aktivite ve üreaz aktivitesinde görevlidir. Metabolik aktivitelerin sonunda biyojen amin (triamin, histamin, kadaverin ve putresin) gibi toksik bileşiklerde üretebilir.

Genel özellikleri;

- Gram pozitif
- Hareketsiz
- Kok: Oval 0.7- 0.9µm büyüklüğünde çiftler halinde veya 10- 20 hücreden oluşan uzun zincirli
- Homofermantatif L (+) laktik asit
- Fakültatif anaerob
- Katalaz negatif
- Gelişme sıcaklığı Optimum 40- 45 °C, minimum 20- 25 °C ve maksimum 50- 52 °C dir.
- 60 °C de 30 dakika ısıya dirençlidir
- % 2 lik NaCl zayıf gelişir ya da gelişmez
- G- C oranı % 37- 40



Şekil 1.2 *Streptococcus thermophilus*

S. thermophilus aynı zamanda fermantasyon aşamasında *S. aureus* ve *L. monocytogenes* gibi patojen bakterilerin üremesini kontrol eden antimikrobiyal maddeler üretmektedir. Antimikrobiyal madde üretiminde ilk sırada *thermophilus* adında bakteriosin yer almaktadır.

S. thermophilus gelişme için monosakkarit ve disakkarit karbonhidratları kullanır. Sınırlı sayılabilecek proteolitik aktiviteye sahiptir. Gelişmesi ve üreyebilmesi için serbest aminoasitlere ihtiyacı vardır. Bu serbest aminoasitler glutamik asit, histidin, sistein, metionin, valin, leusin, izoleusin, triptofan, arjinin ve tirozin grubu aminoasitlerdir. Fakat bunlar sütte başlangıçta sınırlıdır. Süte uygulanan ısı işlemi ve *L. bulgaricus* üremeye başlaması serbest aminoasit miktarı artması ile sonuçlanmakta bu durumda *S. thermophilus* üremesi hızlanmaktadır ((Erkuş, 2007; Franca vd., 2013; Gezginç ve ark., 2013).

1.2.1.2 *Lactobacillus delbrueckii*

Bu grup fermantatif özelliklerine göre kendi içerisinde;

1. Obligat homofermantatif,
2. Fakültatif heterofermantatif,
3. Obligat heterofermantatif

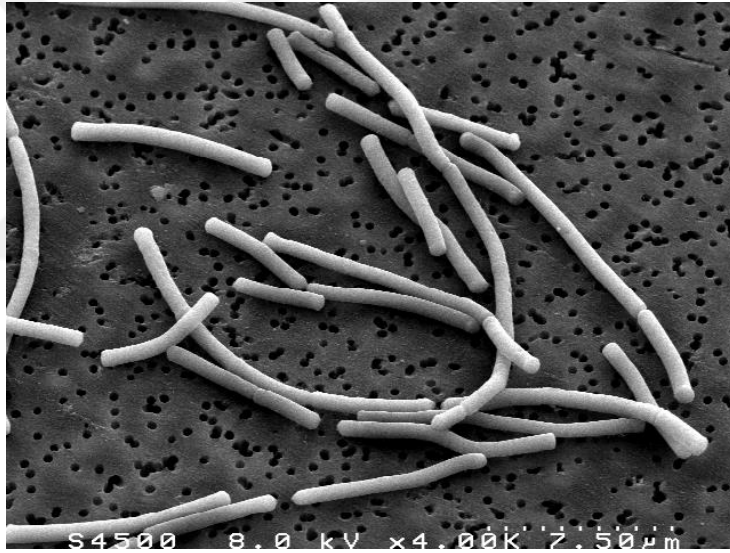
laktobasiller olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Birinci ve ikinci gruptaki birçok laktobasil ve üçüncü gruptan pek azı gıda fermantasyonunda önemli rol oynamaktadır. Üçüncü grupta yer alan laktobasillerin çoğu gıdaların bozulmasında önemli rol oynayan mikroorganizmalardandır.

L. delbrueckii, obligat homofermantatif laktobasil grubu içinde yer almaktadır. Bu grup da yer alan 4 tür bulunmaktadır. Bunlar *L. delbrueckii* alttür *delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* alttür *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* alttür *lactis* ve *Lactobacillus delbrueckii* alttür *inducus* dur. *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus*, *L. delbrueckii* alttür *lactis* ile DNA ları %80 oranında benzemektedir (Erkuş 2007; Michael vd. 1997). Bu dört tür içinde *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* ve alttür *inducus* laktoz, glukoz, fruktoz ve mannoz şekerleri kullanırken, *L. delbrueckii* alttür

lactis galaktoz, sukroz, maltoz, trehaloz ve diğerkarbonhidratlarıda kullanabilirler (Kıtazawa ve vd., 2000).

Genel özellikleri ;

- Gram pozitif,
- Hareketsiz uçları yuvarlanmış çubuk 2– 9µm,
- Tek ya da 3– 4 hücreden oluşan zincir şeklinde
- Laktik asit D(-) % 1.8 oranında
- Fakültatif anaerop oksijene karşı oldukça duyarlı
- Katalaz negatif



Şekil 1.3 *Lactobacillus delbrueckii*

1.2.2 Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Yöntemlerle Tanınması

Fenotipik tekniklerin yararlı olduğu kanıtlanmış olmasına rağmen, benzer fenotiplere sahip suşların her zaman birbiriyle yakından alakalı genotiplere sahip olmadığı bilinmektedir. Ayrıca fenotipik metotların tekrarlanabilirliği ve ayırt ediciliği zayıftır. Doğal habitatlardan izole edilen yabancı suşlar fenotipik değişkenlik gösterir ve “atipik” olarak sınıflandırılır (Miller vd., 1996). Fenotipik tanımlama yalnız

başına laktobasillerin tanımlanması için yeterli bir yöntem değildir. Dolayısıyla 16S rRNA gen dizisindeki farklılıklar kullanılarak PCR ile daha güvenilir tanımlama yapılabilmektedir (Courret vd., 2003, Tabasco vd., 2007, Tokatlı, 2013).

Genotipik teknikler; tür seviyesinden, ayrı ayrı suş seviyesine kadar, farklı ayırt etme düzeyine sahiptir. Bunların birçoğu, kontrollü reaksiyon koşulları altında, tasarlanmış primerlerin kullanımı ile hedeflenen DNA kısımlarının büyütülmesine olanak tanıyan polimeraz zincir reaksiyona dayanmaktadır.

Moleküler tanımlama teknikleri; plazmid profil analizleri, kromozomal DNA'nın restriksiyon endonükleaz analizi, RFLP PCR, RAPD-PCR, PFGE olarak sıralanabilir. Bu tekniklerin spesifik ayırım gücü, tekrarlanabilirlik ve tiplendirebilirliklerine göre avantajları ve dezavantajları vardır (Ünal ve İstanbulluoğlu, 2009).

En güçlü ve en yaygın filogenetik işaretleyici 16S ribozomal RNA ve onun genetik kodudur. Ribozomların erken dönem prokaryotik hücrelerde bulunuyor olmasının verdiği avantaj ile ribozom bileşenleri fonksiyonlarını değiştirmemiş ve çoklu rRNA gen kodlamasının varlığı, yatay gen transferinin oluşma olasılığının ortadan kaldırmıştır. Bu nedenle tRNA gen serileri içerisinde korunma derecesi yüksektir. Gen bankalarında 12000'den fazla 16S rDNA serisi bulunduğunu belirtmiştir (Erkuş, 2007).

16S rRNA gen bölgesi dizi analizi, moleküler yöntemler içinde sıklıkla kullanılmakta olup ilk defa Woese adlı araştırmacının 1987 yılında, prokaryotik türler arasında korunan 16S bölgesinin fonksiyonunu ortaya koyması sonucu açıklığa kavuşmuştur (Woese, 1987, O'Sullivan, 1999, Çakır, 2003).

16S, 23S ve 5S rRNA genleri bakteriyel kromozom üzerinde bir operonla birlikte düzenlenmiştir ve 16S ile 23S rRNA arasındaki ayırıcı bölgenin baz dizi sırası türe özgü olup çok değişken bir yapıya sahiptir. 16S rRNA bölgesinin spesifik primerler kullanılarak PCR'da çoğaltılması ve baz dizisinin belirlenmesi ile (500-750 bp) ayırıcı bölgenin dizi sırası tespit edilmekte, dolayısı ile türlerin %97 oranında

tanımlanması sağlanmaktadır (Stackebrandt ve Goebel, 1994). 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi yöntemi ile bakterilerin tanımlanması; DNA izolasyonu, 16S ileri ve geri primerleri kullanılarak izole edilen DNA' nın PCR' da çoğaltılması, çoğaltılan DNA'nın baz dizi sırasının belirlenmesi ve bu sıranın, veri tabanında bulunan mikroorganizmalara ait baz dizi sıraları ile karşılaştırılarak isimlendirilmesi aşamalarından oluşmaktadır (Sanger vd. 1977, Brosius vd., 1978, Kullen vd., 2000, Çakır, 2003, Balcazar vd., 2007).

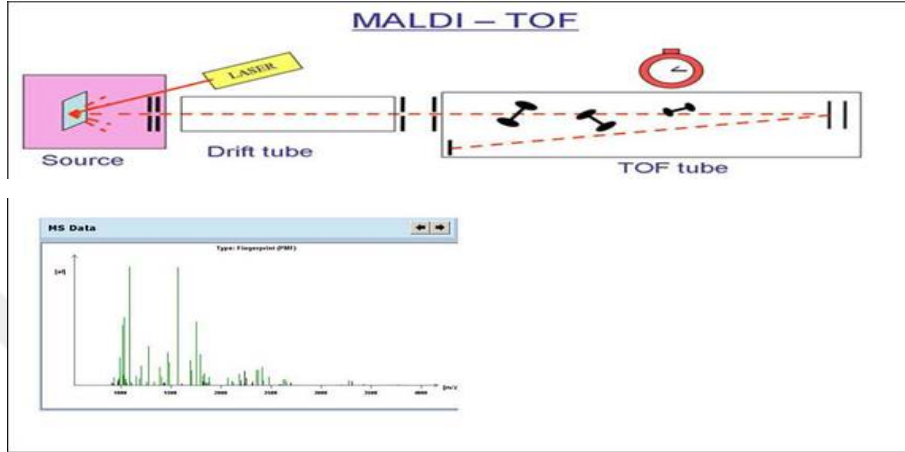
1.2.3 MALDI-TOF MS Yöntemi

Proteom kelimesi, "protein genom" kelimelerinden türetilmiş olup, belli bir zamanda, belli bir hücrede, belli bir dokuda, belli bir organizmada bulunan, gereken tüm biyokimyasal tepkimeleri yürüten proteinlerin tamamını ifade eder. Proteomiks, yani proteom analizi ise belli bir organizmada bulunan proteinlerin toplamını incelemek için kullanılan yöntemlerin tümüdür (Yalınay, 2007).

Protein analizinin bu çapta yapılabilmesi, iki boyutlu jel elektroforezinin geliştirilmesi ile başlamıştır. Kompleks protein karışımlarının incelenmesine olanak veren iki boyutlu elektroforez iki yöntemin kombinasyonundan oluşmaktadır. Proteinler birinci boyutta izoelektriksel noktalarına (pI), ikinci boyutta ise rölatif moleküler ağırlıklarına (Mr) göre ayrılmaktadır. Proteinler jel içerisinde bu özelliklerine göre ayrıldıktan sonra çeşitli yöntemler ile boyanarak görünür kılınabilmektedir. Bu sayede jeller üzerinde her örneğe has bir proteom şekli elde edilmektedir. Sonrasında yapılacak olan proteinlerin identifikasyonu için başlıca kütle spektrometrisi ve mikrosekanslama yöntemleri kullanılmaktadır (Aksu, 2002).

Yöntemin geliştirildiği erken dönemlerde bakteriyel lipidler gibi düşük moleküle sahip biyomarkerlar kullanılırken, 1980'li yıllarda önemli bir gelişme olan "Soft ionization MS technology" nin devreye girmesi ile biyomoleküller (protein, oligonükleotid), bileşenlerine ayrılmaksızın yani likit kromatografi yada elektroforez gibi kimyasal bir önışleme tabi tutulmadan direk incelenebilir hale gelmiştir (Croxatto vd., 2002).

Kütle spektrometreleri, yüklü partiküllerin manyetik ya da elektriksel bir alandan geçerken diğer yüklü partiküllerden kütle/yük ($=m/z$) oranlarına göre ayrılmaları prensibine göre çalışırlar. Kütle spektrometreleri üç fonksiyonel bölümden oluşmaktadır. Bütün kütle spektrometreleri; numune girişi, iyonlaştırma kaynağı, kütle analizörleri, dedektör, vakum sistemi, data sistemi bölümlerinden oluşur. Moleküller normalde yüklü partiküller değildir (Biberoğlu, 2003).



Şekil 1.4 MALDI-TOF MS Yöntemi

1.3 Baklagiller (Fabaceae)

Baklagiller (Fabaceae) dünyanın en geniş üç bitki familyasından birisidir (Ceyhan, 2007). Fabaceae familyası Dünyada 350 cins içerisinde 10,000 türü, Türkiye’de ise yaklaşık 61 cins içerisinde 900’den fazla türü bulundurmaktadır (Tabur vd., 2009). Otsu veya odunsu bir yapıya sahip olabilirler.

Türkiyede kuru baklagillerin 2013 yılında toplam ekim alanı 8,066,462 dekar, toplam 1,147,735 ton üretilmiştir. Toplam üretimin %44’ü nohut, % 34’ü kırmızı mercimek, % 17’si fasulye ve % 5’i diğer baklagillerdir (TÜİK, 2013).

Baklagiller dünya nüfusunun beslenmesinde gerekli proteinin yaklaşık % 10’unu karşılamaktadır (Anonim, 2004a).

1.3.1 Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)

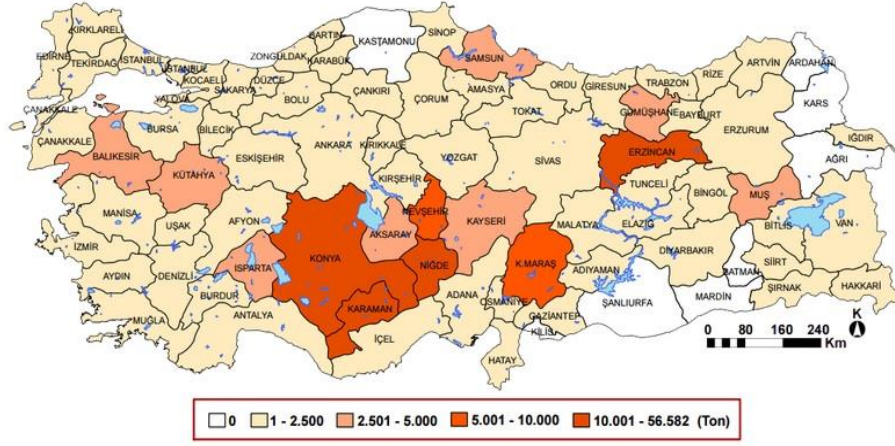
Ülkemizde geniş oranda kültürü yapılan bir yıllık ve sarılıcı veya tırmanıcı bir bitkidir. Orijininin Tropikal Amerika olduğu yönünde güçlü veriler vardır. Fasulye, Fabaceae familyasının, Phaseolus cinsindendir. İnsanlar ve hayvanlar için çok önemli gıda maddesi olan türleri vardır. Birçok türü süs bitkisi olarak kullanılır. İlaç sanayinde kullanılan türleri de vardır. Fasulye, bu bitkinin meyvesine ve tohumuna verilen isimdir.

Fabaceae'ye ait olan *Phaseolus* türlerinin on önemli gen havuzu bulunmaktadır. Bunların altısı Orta Amerika'ya dördü de Güney Amerika'daki merkezlere aittir. *Phaseolus vulgaris* L. bu bölgelerde en fazla yetiştirilen türlerden biridir. Toplam fasulye üretiminin % 90'ını karşılamaktadır (Duke vd., 1983)

Ülkemizde yetiştirilen fasulyelerin hemen tamamı *Phaseolus vulgaris* türü içinde yer almaktadır. Bunun yanında *Phaseolus coccineus*'un ülkemizde çok az oranda gıda olarak kullanıldığı bilinmektedir. Gösterişli parlak, büyük ve renkli çiçeklere sahip olduğundan büyük ölçüde süs bitkisi olarak yetiştirilir. Çok iri tohumları sadece meze olarak kullanılmaktadır (Eşiyok, 2012). *Phaseolus vulgaris* L. yemeklik türleri arasında en yaygın yetiştirilen türdür (Şehirli, 1988).

Fasulye hemen her tür toprakta yetişir. Fasulye tarımı genellikle ılıman kuşakta fazlaca yapılmaktadır. Fasulye bitkisinin don olaylarına karşı oldukça hassastır ve 0 °C' nin altındaki sıcaklıklarda çok kısa sürede zarar görebilmektedir. 32 °C nin üzerindeki sıcaklıklarda ve özellikle çimlenme mevsiminde döllenme biyolojisini etkilemek suretiyle daha az tane verimi alınmasına neden olmaktadır. Optimum büyüme gelişme sıcaklığı ise 20–25 °C'dır (Chen vd., 2003).

Fasulye tarımının yoğun olarak yapıldığı Orta Anadolu Bölgesinin ortalama verimi Türkiye ortalamasının altında gerçekleşmektedir. Ekim alanları düşünüldüğünde ülkemizde fasulye tarımının en yoğun olarak Orta Anadolu bölgesinde yapılmasına rağmen (Çiftçi, 2004), ortalama verimi Türkiye ortalamasının altında gerçekleşmektedir. Ülkemizde kuru fasulye tarımının en yaygın olduğu iller sırasıyla Konya, Karaman, Erzincan, Niğde, Nevşehir, Samsun ve Kahramanmaraş'tır (TÜİK, 2016).



Şekil 1.5 Türkiye’de Fasulye Üretimi Yapılan İller

1.3.2 Börülce (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)

Börülce, en eski gıda kaynaklarından biridir. Neolitik dönemden beri kültür bitkisi olarak kullanılmaktadır (Summerfield vd., 1974). Fabaceae familyası sebzeleri arasında *Vigna* türlerinin anavatanı hakkında farklı görüşler olmasına karşın yapılan araştırmalar kültürü yapılan türlerin Asya, veya Afrika orijinli olduğunu bildirmektedir (Pasquet ve Baudoin, 2001). Ülkemizde yetiştirilen börülcenin (*Vigna unguiculata* L. Walp.) orijininin Afrika olduğu bildirilmektedir (Ba vd., 2004). Börülcenin taze baklaları, kuru tohumları, taze ve kuru genç yaprakları sebze olarak tüketilmekte ayrıca hayvan yemi ve lif endüstrisinde kullanılmaktadır (Pasquet ve Baudoin, 2001)

Börülce, sıcak ve kurak koşullara toleranslı, dona ise hassas bir bitki olup tohumları 18.3 °C’nin üzerindeki sıcaklıklarda hızla çimlenmektedir. Kurak koşullara toleransı yüksek sebzelerdendir (Davis vd., 1991).

Börülce tanelerinin bileşimlerinde; %20-25 protein, %1.9 oranında yağ, %6.3 lif, %63.6 karbonhidrat, %0.00074 Tiamin, %0.00042 Riboflavin ve %0.00281 Niasin bulunmaktadır. Börülce tohumlarındaki protein, hayvansal proteinlere göre methionine ve sistine yönünden yetersiz olmasına rağmen, tahıl tohumlarına göre,

aminoasit, lisin ve triptofan yönünden zengindir (Davis vd, 1991). Ayrıca, börülce taneleri karotin, vitamin B ve C bakımından da oldukça zengindir (Azkan, 1994).

Vigna cinsi, günümüzde tropik bölgelerde yayılma gösteren 80 tür içermektedir. Bu cins, beşi Asya, ikisi Afrika orijinli toplam 7 kültür formunu da içermektedir (Ba vd., 2004). IITA, gen bankasında, 89 ülkeden toplanmış 15.003 börülce çeşidi muhafaza edilmektedir (Mahalakshmi vd., 2007). Çeşitliliğin bir sonucu olarak, arzulanan tohum rengi ve tüketim şekli bölgeden bölgeye büyük değişiklikler göstermektedir (Barrett, 1987; Singh vd., 2003;).

Dünyada Asya, Güney ve Kuzey Amerika kıtasında yer alan birçok ülkede börülce yetiştiriciliği devam ederken ülkemizde Ege ve Akdeniz bölgelerinde üretim ve tüketiminin yaygın olarak yapıldığı görülmektedir. (Langyintuo vd., 2003, Fang vd. 2007; Eşiyok ve ark., 2012;).

Dünyada üretilen yaklaşık 60 milyon ton baklagiller içerisinde 11 milyon hektar alanda 5.127.000 tonluk kuru börülce üretim miktarına sahiptir. (FAO, 2012).



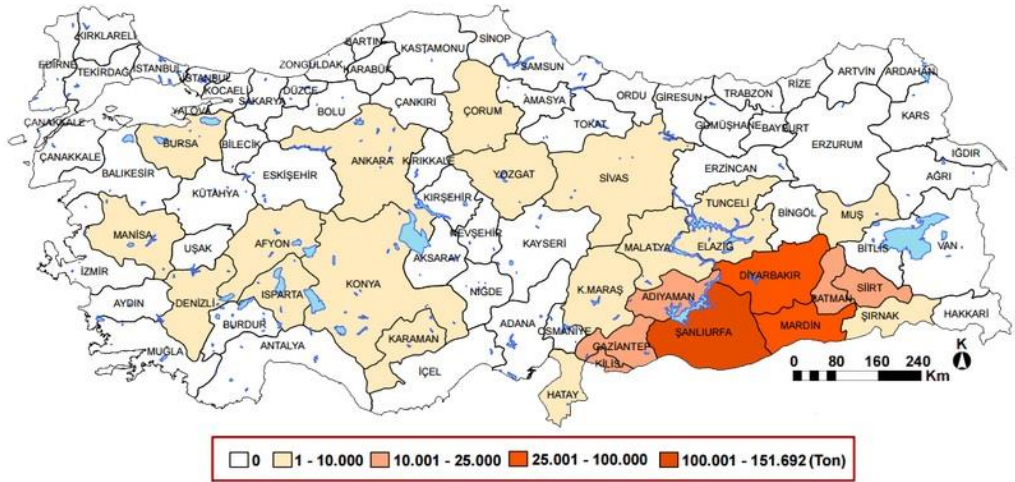
Şekil 1.6 Türkiye’de Börülce Üretimi Yapılan İller

1.3.3 Mercimek (*Lens Culinaris*)

Mercimek (*Lens*), *leguminoseae* (baklagiller) takımında yer alan *Papilionaceae* (kelebek çiçekliler) familyasına bağlı *Viceae* oymağına bağlı beş önemli cinsten (*Vicia* L., *Lathyrus* L., *Pisum* L., *Cicer* L. ve *Lens* Miller) biridir.

Mercimeğin Neolitik Dönemde, Milattan önce 7000 yıllarında Doğu Akdeniz’de kültüre alındığı düşünülmektedir. Mercimek yine Neolitik Dönemde hızlı bir şekilde Nil Vadisi’ne, Avrupa’ya ve Asya’nın merkezine yayılmıştır. Mercimeğin kültürünün Pakistan’a ve kuzeybatı Hindistan’a yayılması Milattan önce 2250 ve 1750 yılları arasında olmuştur. Milattan sonra 1500 yıllarından sonra İspanyollar mercimeği Şili üzerinden Güney Amerika’ya tanıtmışlardır. Mercimek son zamanlarda ise Meksika, Kanada, Amerika ve Avustralya’ya tanıtılmıştır. Günümüzde hemen hemen neredeyse dünyadaki mercimek ekim alanının (%48.2) yarısı Güney Asya ülkelerindedir.

Mercimek, genel olarak insan beslenmesinde kullanılmak üzere, yüksek oranda protein, karbonhidrat, vitamin ve mineral madde içeren taneleri için yetiştirilir (Eser, 1978).



Şekil 1.7 Türkiye’de Mercimek Üretimi Yapılan İller

1.3.4 Bakla (*Vicia faba*)

Bakla (*Vicia faba* L.), *Leguminosae* familyasının *Papilionoideae* alt familyasından bir yıllık otsu bir bitkidir (Uluocak, 1984; Demiriz, 1965). Marmara, Ege, Akdeniz bölgelerinde tohumu için (iç bakla) üretilen bakla, son yıllarda turfanda olarak da yetiştirilmektedir. Bakla; çabuk olgunlaştığı ve tarlada kısa süre kaldığı için bir “ara ürün bitkisi” olarak bilinir, asıl üründen önce veya sonra ekilir. Yeşil iken sürülüp toprağa karıştırılarak toprağın azot ve organik madde birikiminde olumlu rol oynar (Uluocak, 1984).

Ilıman iklim bitkisi olan bakla, börülce, fasulye ve bezelyeye nazaran soğuklara daha dayanıklıdır (Vural ve ark., 2000). Bakla bitkisi yüksek besin değerine sahip olup, genotiplere göre değişmekle beraber % 27-34 oranında ham protein içermektedir (Nachi ve Guen, 1996).

Bakla; taze bakla, taze iç bakla ve bunların konserveleri, enginarla karışık yemekleri ve özellikle kış aylarında pişirilen ve fava adı verilen bakla ezmesi gibi değişik şekillerde de tüketilmektedir (Akçin, 1988).

Bakla; Çin, Etiyopya, Mısır, Fransa ve Avustralya gibi ülkelerde, hayvan yemi ve insan besini olarak nişasta ve protein kaynağı olması bakımından ayrı bir önem taşımaktadır. Bakla ayrıca, insan ve hayvan beslenmesinde önemli faydalar sağlayan, antioksidan özelliğine sahip olan polifenollerini içermektedir (Prestamo vd., 2006).

Dünyada baklagiller içerisinde üretim bakımından fasulye, bezelye ve nohuttan sonra dördüncü sırada yer alan bakla bitkisi, Dünya baklagil kültürleri ekiliş alanlarının yaklaşık % 6’sını oluşturmaktadır. Asya Kıtası ekiliş alanı ve üretim yönünden ilk sırayı almaktadır. (FAO, 2013).

Ülkemiz bakla yetiştiriciliği açısından oldukça elverişli ekolojik yapıya sahip olmasına rağmen, kuru bakla üretimi olması gereken seviyede değildir. Ülkemizde de bakla üretimi nohut, mercimek ve fasulyenin ardından dördüncü sırada yer almaktadır. Ekim ve üretim alanı bakımından en fazla bakla yetiştirilen illerimiz sırasıyla Çanakkale, Manisa, Bursa, Balıkesir ve Antalya’ dır. Adana ilinde daha çok

taze bakla üretimi (yemeklik) yapılmakta olup, bakla ekim alanı 40 dekar, bakla üretimi ise 22 tondur (TÜİK, 2014).

Türkiye’de Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından Eresen-87, Filiz-99, Kıtık-2003 ve Salkım isimleri ile tescil ettirilmiş bakla üretimine uygun dört bakla çeşidi bulunmaktadır. (TTSM, 2015).



Şekil 1.8 Türkiye’de Bakla Üretimi Yapılan İller

BÖLÜM 2

LİTERATÜR ÖZETLERİ

Skriver vd., (2003) fermente sütlerde starter kültürlerin gelişmesinin en az iki *Streptococcus thermophilus* ve bir *Lactobacillus bulgaricus* suşunun birleşimlerine bağlı olduğunu tanımlamışlardır. Starter kültürlerin birleşimlerinin hızlı asitleşme oranı, uygun yapı ve aroma gibi her bir suşun önemli özelliklerinin birleştirileceği belirtilmiştir.

Issazadeh vd., (2013) laktik asit bakterilerinin geniş çapta doğada yaygın olduğunu ve çiğ süt, yoğurt vb. mikroflorasında doğal olarak meydana geldiğini, çoğu gıda fermantasyon işlemlerinde önemli role sahip olan laktik asit bakterilerinin gram pozitif olduğunu belirtmişler. 2011 ve 2012 süresince toplam 50 yoğurt örneğini Kuzey İran'ın farklı kısımlarından topladıklarını, bu örnekleri laboratuvarında incelenen steril tüplerde 4°C de muhafaza ettiklerini, her bir örnekten 10⁻¹ dilüsyondan sonra, 10 kat seri seyreltme yapılmasının ardından alt kültürlendikten sonra kullanılarak gram pozitif ve katalaz negatif reaksiyonları ile LAB suşları izolasyonu için kullanılan M17 ve MRS agar içerisinde çoğalttıkları ve sonuç olarak özellik tanımlama için kullandıklarını bildirilmişler.

Çin' in kuzeybatı bölgesindeki özel ekolojik konumlarında bulunan geleneksel mandıra ürünlerinin 7 örneğinden toplam 32 doğal laktik asit bakteri izolatu elde edilen bir başka araştırmada; 32 izolat arasından 9 LAB suşu fermente süt ürünleri potansiyeli için seçilmiş ve 16S rDNA nükleotid dizi analiziyle tanımlanmış olduğu, ve bu 9 izolatın birbirleriyle birleştiği ve 8 kombinasyonun yoğurt üretiminde fermantasyon karakteristiklerine göre seçildiği, bu 8 kombinasyonun asitleşmeye etkisini, post asidifikasyonu, yoğurdun yapısı ve duyu kalitesinin analiz edildiği bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *Streptococcus thermophilus* SP1.1 ile kombinlenen *Lactobacillus bulgaricus* 3 4.5'un en iyi kombinasyon olduğu ve yoğurt fermantasyon zamanı ve duyu kalite açısından ticari starter kültürlerden

daha iyi olduğu belirlenmiştir. Bu kombinasyonun yoğurt kalitesini geliştirmek için ticari starter olarak onerilebileceği bildirilmiştir (Han vd., 2014).

Mete (2011) laboratuvar koşullarında geleneksel yöntemle üretilmiş şalgam suyundan fermentasyon süresince LAB izolasyonu gerçekleştirmiş ve izole edilen 85 adet bakteriden biyokimyasal testler kullanarak 56 adedinin cins bazında LAB olduğunu saptamıştır. Gezginç ve Akyol (2010) geleneksel yoğurtlardan izole edilen *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus*'ların tanımlanması amacıyla, kimyasal tanımlama ile moleküler tanımlamalardan 16S rRNA'yı kodlayan DNA bölgeleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) metodunun birbirini tamamlayan çalışmalar olduğu sonucuna varmışlardır.

Özer, (2006) yaptığı çalışmada; Yoğurt retiminde kullanılan *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* birbirleriyle olan metabolik ilişkilerini ortaya koymuştur. *Lactobacillus bulgaricus* tarafından meydana çıkarılan oligopeptitler *Streptococcus thermophilus* gelişimini teşvik etmektedir. *Streptococcus thermophilus* tarafından üretilen peptitler, pürin ve primidinler oksalik asit, fumarik asit, formik asit, pirüvik asit ve CO₂ gibi metabolitler ise *Lactobacillus bulgaricus*'un gelişimine yardımcı olmaktadır.

Beyatlı (1982) tarafından yapılan bir çalışmada, Ankara ilinde toplanan yoğurt örneklerinden izole edilmiş olan LAB identifikasyonu fenotipik yöntemlerle yapılmış ve bu suşların proteolitik aktivite ve laktik asit üretimi gibi özellikleri incelenmiştir. Bundan sonra starter yoğurt bakterisi için kombinasyonlar oluşturularak yoğurt üretimine uygunlukları duysal, mikrobiyolojik ve aroma maddelerinin oluşması açısından incelenerek ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Tavşanlı (2015) tarafından yapılan çalışmada geleneksel yöntemlerle üretilen yoğurtlardan, aynı zamanda bitki, yağmur suyu ve çiy damlalarından yoğurt üretilerek, üretilen yoğurtlarda doğal ortamda bulunan laktik asit bakterilerinin izolasyonu, tanımlanması ve suşların teknolojik karakterizasyonlarını belirlemek amacıyla yapılmış. MALDI-TOF ile tanımlanması neticesinde, geleneksel yöntemlerle üretilen yoğurtlardan 27 adet, bitki kullanarak pıhtılaştırılan sütlerden 3 adet, yağmur suyu ile pıhtılaştırılan sütlerden 8 adet ve çiy damlaları ile pıhtılaştırılan sütlerden 7 adet olmak üzere toplam 45 adet *Lactobacillus delbrueckii*

suşu izole edilmiştir. Aynı şekilde, geleneksel yöntemlerle üretilen yoğurtlardan 42 adet, bitki kullanarak pıhtılaştırılan sütlerden 4 adet, yağmur suyu ile pıhtılaştırılan sütlerden 8 adet ve çiy damlaları ile pıhtılaştırılan sütlerden 12 adet olmak üzere toplam 66 adet *Streptococcus thermophilus* suşu elde edilmiştir.

Demirci (2017) tarafından yapılan çalışmada, Ağrı ilinde bazı yöresel yoğurt örneklerindeki çeşitli bakterinin izolasyonu, kültüre alınması ve tanımlanması yapılmıştır. Ağrı ilini temsil edecek şekilde 28 izolat elde edilmiştir. İzolatların ilk olarak morfolojik testleri, fizyolojik testleri, biyokimyasal testleri ve antibiyotiğe direnç testleri yapılmıştır. Moleküler testler kapsamında 28 izolatın DNA izolasyonu ve 16S rDNA gen bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır. 24 izolatın sekans verileri alınmış ve sekans verisi alınamayan 4 izolat ise VİTEK yöntemiyle karakterize edilmiştir. LAB'lerin NCBI'daki nükleotit blastlama verilerine izolatların 4 tanesi *Sphingomonas* sp. Ve *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus casei* ve *Lactobacillus paracasei* türlerinin her birinden birer izolat %99 benzerlik göstermiştir. Bu çalışma sonucuna göre yöresel yoğurtta LAB'lerinin yanında patojenlerin de bulunması; sütün yeterince ısıtılma işlemi görmediğini, ana kaynağı yoğurt olmayan patojenlerin bulaşmış olabileceğini, sağım yapılan hayvanların hastalıklı (mastitis) olabileceğini, sağım yapan insanda hastalık olabileceğini ve kullanılan alet - ekipmanın yeterince temiz olmadığı düşünülmektedir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1 Baklagillerin Toplanması ve Adlandırılması

Ticari olarak temin edilen baklagillerin (Şekil 3.1 de) tür düzeyinde adlandırma işlemi, Gaziantep Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1 Kullanılan baklagiller

3.2 Yoğurt Üretiminde Kullanılan Süt

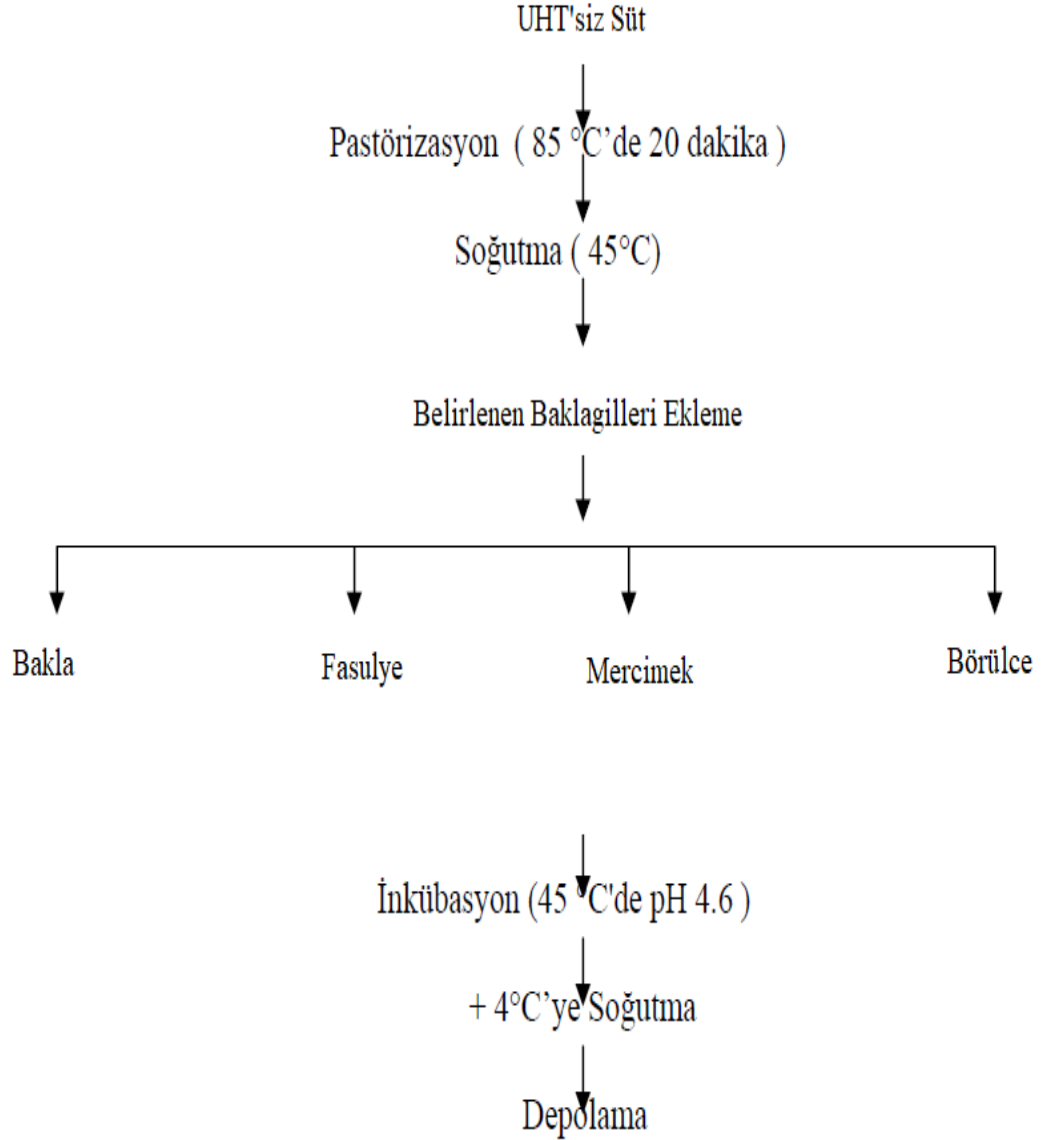
Yoğurt üretiminde, alışveriş mağazalarından temin edilmiş (Şekil 3.2 de) olan günlük pastörize süt (UHT' siz) kullanılmıştır.



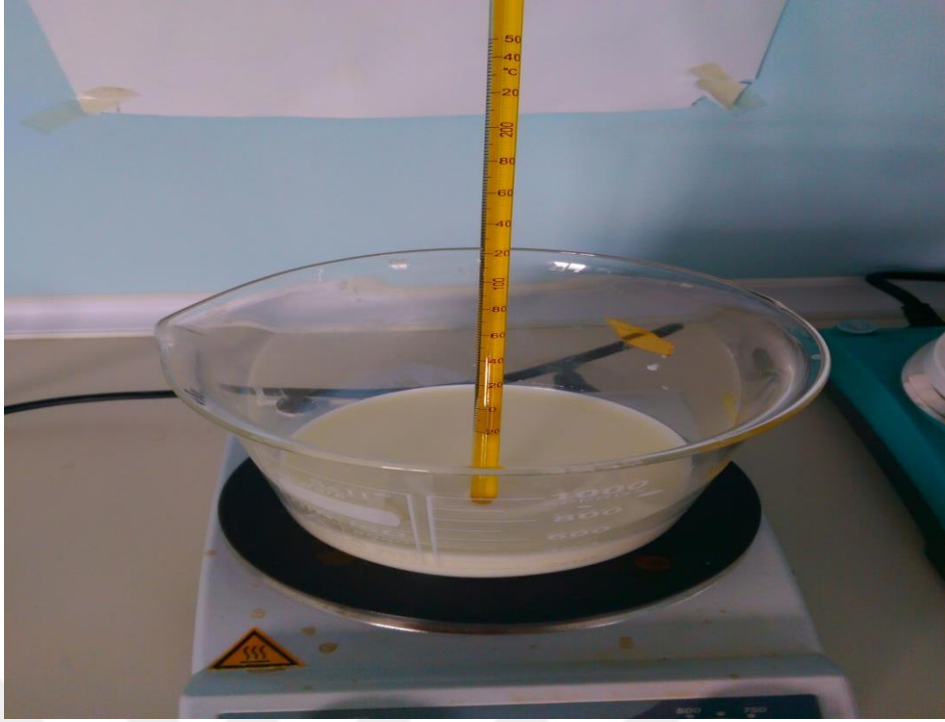
Şekil 3.2 Kullanılan UHT'siz sütler

3.3 Yoğurt Üretimi

Yoğurt üretim akış şeması Şekil 3.3’ te verilmiştir. Üretilen yoğurtlar +4°C’lik ortamda muhafaza edilmiştir. Depolamayı takiben 2. Gününde yoğurtların dilüe edilerek besiyerine ekimleri yapılmıştır.



Şekil 3.3 Yoğurt üretim şeması



Şekil 3.4 UHT'siz sütün 80 °C ısıtılması

Sütler 80°C ısıtıldıktan sonra tekrar 45°C soğutulup içerisine belirlenen baklagiller eklenmiştir. Baklagiller eklenip 6 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.5 Sütlere baklagil eklenip (45 °C) inkübasyona bırakılması



Şekil 3.6 İnkübasyon Sonrası Oluşan Yoğurtlar

6 saatlik İnkübasyon sonrası oluşan yoğurtlar daha sonraki aşamalar için +4 depolanmıştır.

3.4 Mikrobiyolojik Analizler:

Aseptik koşullar altında 10 g tartılan örnekler 90 mL steril %0,1 YSB dilüsyon sıvısına katılarak homojenize edilmiştir. Homojenizasyon ve sonraki seyreltmeler 1:9 oranında yapılmıştır. Wahr ve Frank (2004)'e göre MRS Agar, M17 Agar ve Lee's Agar (Lee vd., 1974)'a ekim yapılmış ve inkübasyon sonrası, gram boyama ve katalaz testleri yapılmıştır.

3.4.1 MRS Agar

Lactobacillus izolasyonu için pH' sı 5,4' e ayarlanmış MRS Agar kullanılmıştır. MRS Agar, pH' sı 5,4' e düşürülmüş MRS Agar ile hazırlanmıştır. MRS Agar ticari besiyerinin bileşimi 1 L besiyeri için Tablo 2.1' de verilmiştir.

Bileşen	Bileşim miktarı (g/ L)
Proteaz pepton No: 3	10,0
Sığır eti ekstraktı	10,0
Maya ekstraktı	5,0
Dekstroz	20,0
Polysorbat	1,0
Amonyum sitrat	2,0
Sodyum asetat	5,0
Magnezyum sülfat	0,1
Manganez sülfat	0,05
Dipotasyum fosfat	2,0
Agar	15,0

Tablo 2.1 MRS agar bileşimi

MRS Agar’ dan 70 g tartılmış, tartılan miktar 1000 ml distile suda çözündürülmüştür. Çözelti, sürekli karıştırılarak kaynama noktasına kadar ısıtılmış ve besiyerinin tamamen berrak şekilde çözünmesi sağlanmıştır. Çözünmüş besiyerinin pH’ sı sitrik asit ilavesi ile 5,4’ e ayarlanmıştır. Bu işlem sırasında karıştırıcı ısıtıcı yardımıyla çözünmüş besiyeri sürekli karıştırılarak besiyerinin sıcaklığı ve sıvı fazı korunmuştur. pH kontrolü 25 °C sıcaklıkta yapılmıştır. pH ayarlandıktan sonra besiyeri şişelere dağıtılarak 121 °C’ de 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Otoklavlama işlemi sonunda pH’ nın, 25 °C’ de, $5,4 \pm 0,1$ olduğu kontrol edilmiştir. Besiyeri hazırlandıktan sonra hemen kullanıldığı için 45 °C’ ye soğutularak kullanıma hazır hale getirilmiştir (Anonymous, 2002 a).

3.4.2 % 10’ luk Laktoz Çözeltisi Hazırlanması

Streptococcus izolasyonunda kullanılan M17 Agar’ ın hazırlanmasında % 10’ luk laktoz çözeltisi kullanılmıştır. Laktoz çözeltisi hazırlanırken; laktoz (Oxoid L70)’ dan 10 g tartılmış ve 100 ml suda çözündürülmüştür (Anonymous,2002b).

3.4.3 M17 Agar

Streptococcus izolasyonunda M17 Agar kullanılmıştır. M17 Agar ticari besiyerinin bileşimi 1 L besiyeri için Tablo 2.2’ de verilmiştir.

Bileşen	Bileşim miktarı (g/ L)
Trypton	5,0
Soya pepton	5,0
Et ekstraktı	5,0
Maya ekstraktı	2,5
Askorbik asit	0,5
Magnezyum sülfat	0,25
Di- sodyum-β- gliserofosfat	19,0
Agar	11,0

Tablo 2.2 M17 Agar Bileşimi

M17 Agar’ dan 48,25 g tartılmış, tartılan miktar 950 ml distile suda çözündürülmüştür. Çözelti, sürekli karıştırılarak kaynama noktasına kadar ısıtılmış ve besiyerinin tamamen berrak şekilde çözünmesi sağlanmıştır. Çözünmüş besiyeri 50 °C civarına soğutulmuştur. Soğutulan besiyerine, % 10’ luk laktoz çözeltisinden 50 ml ilave edilerek dikkatlice karıştırılmıştır. Daha sonra besiyeri şişelere dağıtılarak 121 °C’ de 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Otoklavlama işlemi sonunda pH’ nın, 25 °C’ de, $6,9 \pm 0,2$ olduğu kontrol edilmiştir. Besiyeri hazırlandıktan sonra hemen kullanıldığı için 45 °C’ ye soğutularak kullanıma hazır hale getirilmiştir (Anonymous, 2002 b).

3.4.4 % 2’ lik Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Çözeltisi

2 ml analitik saf (%35’ lik) Hidrojen peroksit (H₂O₂) 100 ml’ lik balon jojeye aktarılmıştır. Balon joje içeriği distile su ile çizgisine tamamlanmıştır. Balon joje, meydana gelen ısınma sebebiyle oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve yine distile su ile çizgisine tamamlanmıştır. Çözelti 24 saat bekletildikten sonra kullanılmıştır.

3.4.5 Gram Boyama Çözeltileri

Gram boyamada kullanılan reaktif çözeltiler set halinde BioMérieux' den temin edilmiştir.

3.4.6 LAB İzolasyonu

Laktik asit bakterilerinin izole edilmesi için yoğurt örnekleri steril dilüsyonlar kullanılarak 10^{-6} dilüsyon oranına kadar seyreltilmişlerdir. 10^{-5} ve 10^{-6} dilüsyon oranındaki tüplerden ekim yapılmıştır. Ekimlerde *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* izolasyonu için pH' sı 5,4' e ayarlanmış MRS Agar (Difco 288210), *Streptococcus thermophilus* izolasyonu için besiyerinin litresine 50 ml %10' luk (m/ v) laktoz çözeltisi ilave edilen M17 Agar besiyerleri kullanılmıştır (Anonymous, 2002 a, 2002 b).

Yoğurt örneklerinin besiyerine inokülasyonun yapıldığı andan itibaren, *Lactobacillus* izolasyonu için MRS agar besiyerinde geliştirilerek incelemeye alınan bakteriler Xbas, Ybas, Zbas, Wbas,..., *Streptococcus* izolasyonu için M17 agar besiyerinde geliştirilerek incelemeye alınan bakteriler de Xkok, Ykok, Zkok, Wkok,..., tanımlamaları ile adlandırılmıştır. Bu tanımlamalar, araştırmanın tüm aşamalarında aynı şekilde kullanılmıştır.

Ürünlerin üretilmesi için gereken kültürlerin hazırlanması aşamasında da kültürlerin hangi bakterilerden oluştuğu belirtilirken izolatlar için yine aynı tanımlamalar kullanılmıştır.

Petri kutuları, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* izolasyonu için anaerobik ortamda 37 °C' de 5 gün, *Streptococcus thermophilus* izolasyonu için aerobik ortamda 37 °C' de 3 gün inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonunda elde edilen kolonilerden saf bakteri stoğu hazırlayabilmek için birer tane alınıp *Streptococcus thermophilus* için M17 broth (Merck 15029), *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* için MRS broth (Merck 10661) besiyerine aktarılmıştır. Tüplere aktarma işleminden önce, koloniler üzerinde gram boyama ve katalaz testleri (Ellner, 2001)

uygulanmış, Gram pozitif ve katalaz negatif koloniler degerlendirmeye alınmıştır.

3.4.7 Gram Boyama

Temizlenip alev ile fikse edilen lam üzerine steril öze ucu ile distile su aktarılmıştır. Gram boyama yapılacak olan bakteri kolonisi steril öze ile lam üzerine alınarak lamdaki su yardımı ile dağıtılmış ve ince bir tabaka haline gelmesi sağlanmıştır. Lam, üzerine sürülen tabaka kuruyuncaya kadar kendi haline bırakılmıştır. Kuruma gerçekleşikten sonra lam, hızla iki üç kez alev üzerinden geçirilmiştir. Daha sonra sırasıyla aşağıdaki adımlar takip edilerek Gram Boyama (HUCKER'e göre Kristalviolett- Safranin boyaması) işlemi gerçekleştirilmiştir (Ellner, 2001); Kurutma ile kontrole hazırlanan preparata immersiyon yağı damlatılarak 100' lük objektif ile kontrol yapılmıştır. Mavi renkli hücreler Gram (+), kırmızı- pembe renkli hücreler Gram (-) olarak tanımlanmıştır (Ellner, 2001).

3.4.8 Katalaz Testi

Araştırmada besiyeri üzerinde gelişmiş koloniden steril öze yardımı ile bos ve steril petri plağı içine aktarılmıştır. % 2' lik H₂O₂ çözeltisinden bir iki damla koloni üzerine damlatılarak gaz çıkışı olup olmadığı gözlemlenmiştir. Gaz çıkışı olan koloniler Katalaz (+) ve gaz çıkışı olmayan koloniler Katalaz (-) olarak tanımlanmıştır.

3.4.9 Gliserol

Ticari olarak satılan gliserol alınarak 121 °C' de 15 dakika süre ile otoklavda steril edildikten sonra araştırmada kullanılmıştır.

3.4.10 İzolatların Saklanması

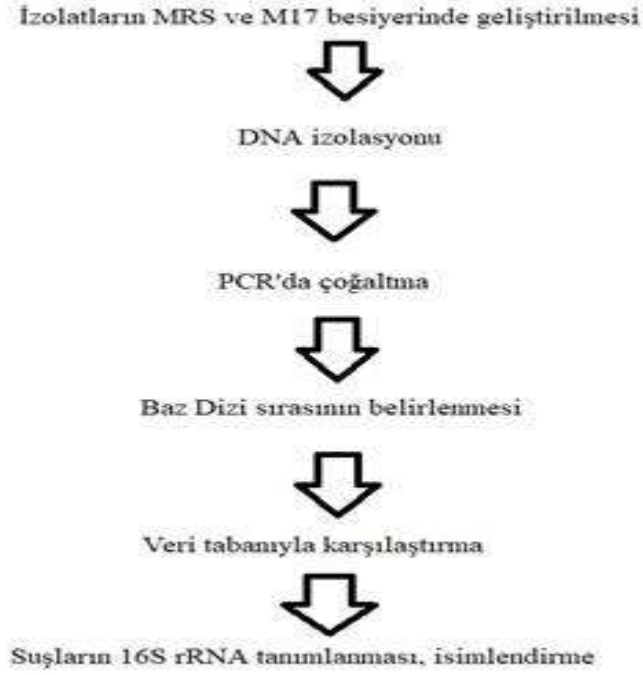
Gram (+) ve katalaz (-) olduğu teyit edilen çubuk ve kok bakterilere ait tek bir koloni Gram (+) ve katalaz (-) olduğu teyit edilen çubuk ve kok bakterilere ait tek bir koloni aktarılan sıvı besiyeri 37 °C' de inkübasyona bırakılmış ve tortu ve/ veya bulanıklık oluşumu takip edilmiştir. Tortu ve/ veya bulanıklık oluşan tüplerdeki tortu/bulanıklıktan yaklaşık 2 ml alınarak içinde 600 µL gliserol

bulunan steril tüplere aktarılarak stok izolatlar oluşturulmuştur. Stok izolatlar derin dondurucuda (-50 °C) muhafaza edilmişlerdir.

3.5 Laktik Asit Bakterilerinin 16S rRNA Yöntemi ile Moleküler Tanımlanması

PCR teknolojisi ile 16S rRNA genlerinin direk sekansı bilinmeyen bir suşun tek bir basamak ile tanımlanmasında oldukça etkili bir yöntemdir. 16S ve 23S rRNA bölgeleri yüksek derecede korunmuş dizileri içeren bölgelerdir. Bu bölgelere özgü primerler kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilerek sekanslama işlemi neticesinde sonuca gidilebilir (Leblond-Bourget *vd.*, 1996).

Çalışmada; Elde edilmiş olan yoğurtlardan izole edilmiş 8 adet izolatın moleküler tanımlanması aşaması 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi yöntemi (Sanger *vd.* 1977) ile Ankara Sentegen Firmasında iki kez tekrarlanarak doğrulanmıştır. Şekil 3.7’de izolatların tanımlanmasında izlenen aşamalar görülmektedir. Buna göre; moleküler tanımlama aşamasında ilk olarak bakteriyel DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.7 İzolatların Moleküler Tanımlanmasında İzlenen Aşamalar

DNA izolasyon aşaması EK 1’de belirtildiği gibi yapılmıştır. Moleküler tanımlama sırasında, bakteriyel genomik DNA izolasyonu amacıyla Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit kullanılmıştır. DNA izolasyonundan sonra DNA’lar, önce %1’lik agaroz jelde kontrol edilmiştir. Agaroz jel elektroforez aşaması EK 3’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra saflık ve miktar değerlerinin belirlenmesi için NanoDrop ND-1000 spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır.

Çalışmamızda PCR denemelerinde Sanger (1977) yöntemi kullanılmıştır. Saflık ve miktarı kontrol edilen bakteriyel DNA, PCR’da çoğaltılmış ve ardından baz dizi sırası tespit edilmiştir. Bilindiği gibi PCR 3 aşamalı bir yöntem olup; DNA’nın; çift sarmallı DNA’dan tek sarmallı DNA’ya dönüştürülmek üzere denature edilmesi; oligonükleotit primerlerin, hedef DNA’daki tamamlayıcı bölgelere bağlanması; son olarak DNA’nın, 20 DNA polimeraz aktivitesi süresince nükleotit eklenmesi ile primerlerden uzatılması ve bunun sonucunda çift sarmallı ürünler oluşması şeklindedir. DNA çoğaltımı ve PCR optimizasyon çalışmaları için Biometra ve MJ Research Thermocycler cihazları kullanılmış ve PCR optimizasyon çalışmaları

yapılmıştır. PCR’ da kullanılan reaktifler; 15-200 ng DNA (2 µl), 10 pmol ileri (forward) primer (2 µl), 10 pmol floresan işaretlenmiş ters (revers) primer (2 µl), 2,5 mM toplam dNTP (1µl), 0.5 unit Go Taq DNA Polymerase (0,6 µl)(Promega), 25 mM MgCl₂ (2,4 µl), 10 µl buffer 5x buffer olacak şekilde toplam 50µl PCR karışımı şeklinde hazırlanmıştır.

DNA çoğaltımı için kullanılan PCR programı;

1. 94°C’de 3 dakika (1 döngü)
 2. 94°C’de 1 dakika (35 döngü)
 3. 53°C’de 1 dakika
 4. 72°C’de 2 dakika
 5. 72°C’de 10 dakika (1 döngü)
- (10°C’de sabit tutulmuştur)

PCR sonrasında DNA’lar agaroz jelde yürütülmüştür. Daha sonra görünen bantlar kesilip Promega kit yardımıyla saflaştırılmıştır. PCR sonrası saflaştırma işlemi Ek 4’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Saflaştırılan PCR ürünleri 5µl AB Gene Plate’e alınmıştır. Seal ile iyice kapatıldıktan sonra PCR’da 94°C’de 4 dakika denatüre edilmiştir. Bu sürenin sonunda hemen buz üzerine alınıp soğutulularak, 1500 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bu aşamanın ardından saf DNA örnekleri sekans PCR aşamasına tabi tutulmuş olup PCR protokolü (dizi analizi) EK 5’da belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

Sekans PCR ürünlerinin temizlenmesi Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification kit kullanılmıştır. DNA dizi analizi saflaştırması BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing ile yapılmış ve DNA dizi analizi Beckman Coulter CEQ 8000 otomatik dizi analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Dizi analizinden çıkan sonuçlar NCBI gen bankasındaki referans genomlarla eşleştirilmiştir.

3.6 MALDI-TOF Yöntemi

MALDI-TOF kütle spektrometresinde analiti iyonize etmek için organik, aromatik ve zayıf asidik bir matriks kullanılır. Test edilecek mikroorganizma direk transfer metoduyla çelik bir plak üzerine ince bir film olarak sürülür. Üzerine matriks solüsyonu eklenir ve oda ısısında kurutulur (Posteraro vd., 2013).

Numune sisteme girdikten sonra üzerine lazer atışları gönderilerek lazer enerjisinin matriks tarafından absorbe edilmesi sağlanır. Matriks moleküllerinin fotoeksitasyonu ya da fotoiyonizasyonu, matriksten analite proton transferini, dolayısı ile analitin iyonizasyonunu kolaylaştırır (Douglass, 2006).

İyonizasyon işlemi sonucunda moleküller uyarılarak katı veya likit halden yüklü iyonize gaz molekülleri haline dönüştürülürler. Uçuş zamanlı kütle analizörlerinde, üretilen iyonların iyon kaynağı içerisinde dedektöre ulaşmak için sabit bir mesafeyi katetmeleri prensibi kullanılmaktadır. Bu amaçla iyonlara yaklaşık 1 metre uzunluğundaki bir tüp içerisinde hareket etmeleri için hızlandırıcı voltaj uygulanmaktadır (Biberoğlu, 2003).

Levhadan ayrılan iyonize analit molekülleri, uygulanan voltaj ile hızlandırılarak uçuş tüpü içerisinde dedektöre ulaşana kadar sürüklenirler ve kütle/ yük oranlarına (yük genellikle 1' dir) göre ayrılırlar (Posteraro vd., 2013).

Tüm moleküllere aynı kinetik enerji verildiğinden, analit moleküllerinin uçuş tüpü uzunluğunu katetme süresi, moleküllerin kütlesi ile orantılıdır. Moleküllerin uçuş zamanı, molekül ağırlıklarının belirlenmesinde kullanılır (Douglass JF, 2006). Dolayısıyla değişik kütledeki iyonlar değişik hızlarda yol alır ve detektöre değişen zamanlarda ulaşırlar (Biberoğlu, 2003).

Dedektöre ulaşan veriler işlenerek; önceden iyi karakterize edilmiş mikroorganizmaların toplamının profilleriyle kıyaslanır, tepe noktaları 2000-20 000 arasında değişen kütle spektrumlarıyla sonuçlanır. Kütle spektrumları türe özgü parmak izleridir, tekrarlanabilirliği yüksektir ve üreme koşullarından minimal etkilenir. İdentifikasyon için; elde edilen kütle spektrum parmak izi, uygun

algoritmalar ile referans kütüphanelerdeki temel spektrumlarla kıyaslanarak yapılır (Posteraro vd., 2013).

MALDI-TOF-MS yönteminin uygulandığı dört ticari sistem bulunmaktadır. Bunlar; MALDI Biotyper, AXIMA/SARAMIS database, ANDROMAS (Andromas) ve VITEK MS (bioMe'rieux) sistemleridir (Willinger vd., 2014; Bader, 2013).

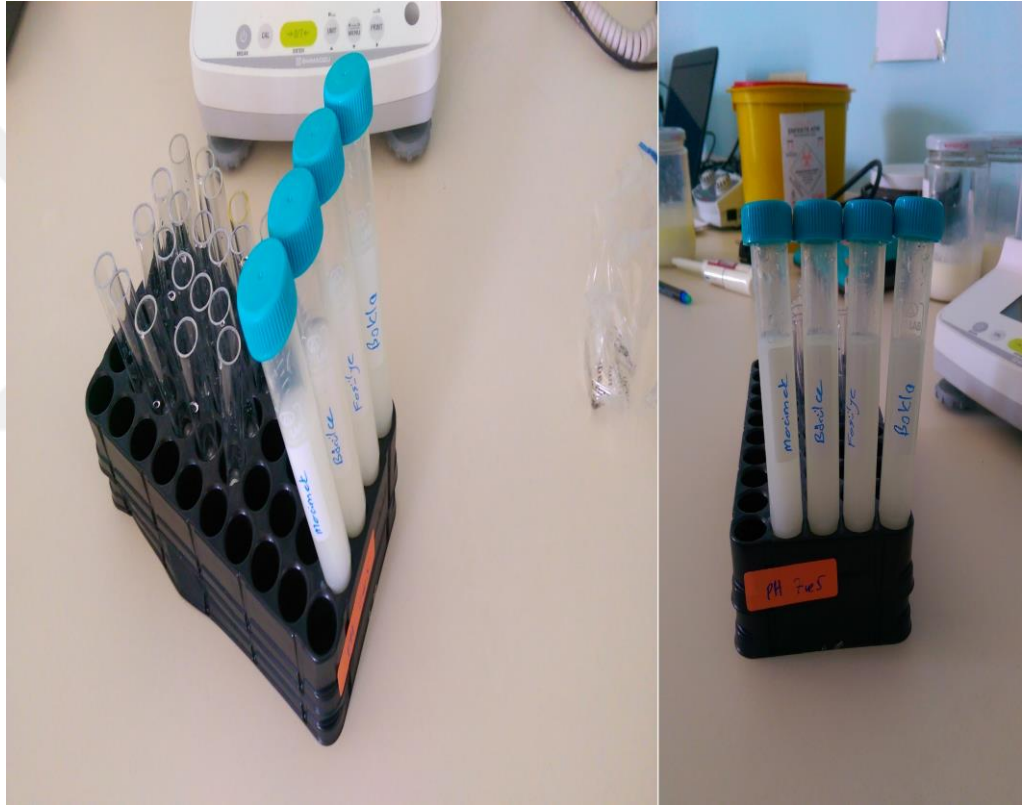
MALDI-TOF-MS yöntemi bakterilerin ve birçok mantarın tanımlanmasında hızlı ve doğru tanımlama yapabilen bir sistemdir (Willinger vd. 2014). Oldukça kısa sürede sonuç veren bir sistem olup; tek bir suş çalışıldığında yaklaşık 11 dakikada sonuçlanırken, 96 suş toplu çalışıldığında her bir izolat için yaklaşık 2,5 dakikada sonuç alınmaktadır. Yayınlarda ortalama 4-6 dakika olarak bildirilmiştir (Larone, 2011). Gram boyama, katalaz testi ve mikroskopta 100 imersiyon objektifinde morfolojik olarak tanımlandıktan sonra elde edilen koloniler MALDI-TOF MS yöntemi için Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü/Bursa'ya gönderildi.

BÖLÜM 4

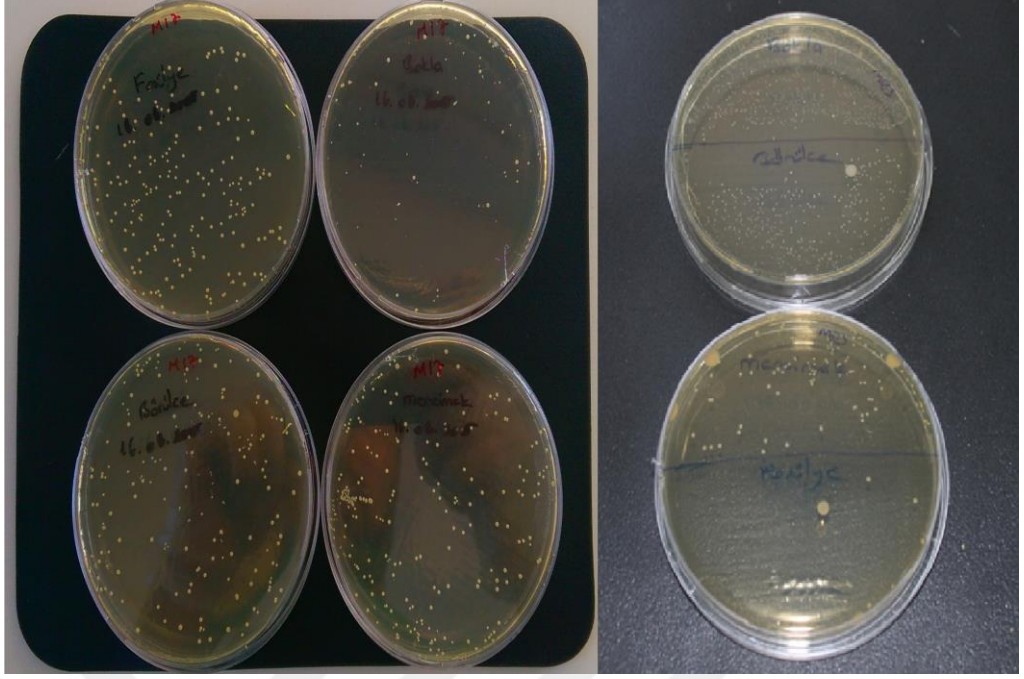
BULGULAR

4.1 Dilüsyon ve Ekimler

Şekil 4.1’de aseptik koşullar altında 10 g tartılan örnekler 90 mL steril %0,1 YSB dilüsyon sıvısına katılarak homojenize edilmiştir. Şekil 4.2 ve 4.3’ de M17 ve MRS besiyerlerinde ekimi yapılmış ve 72 saatlik inkübasyon sonrası üremiş olan laktik asit bakterlerinden 8 (Merkok, Faskok, Börkok, Bakkok, Merbas, Fasbas, Börbas, Bakbas) adet izolat elde edilmiştir.



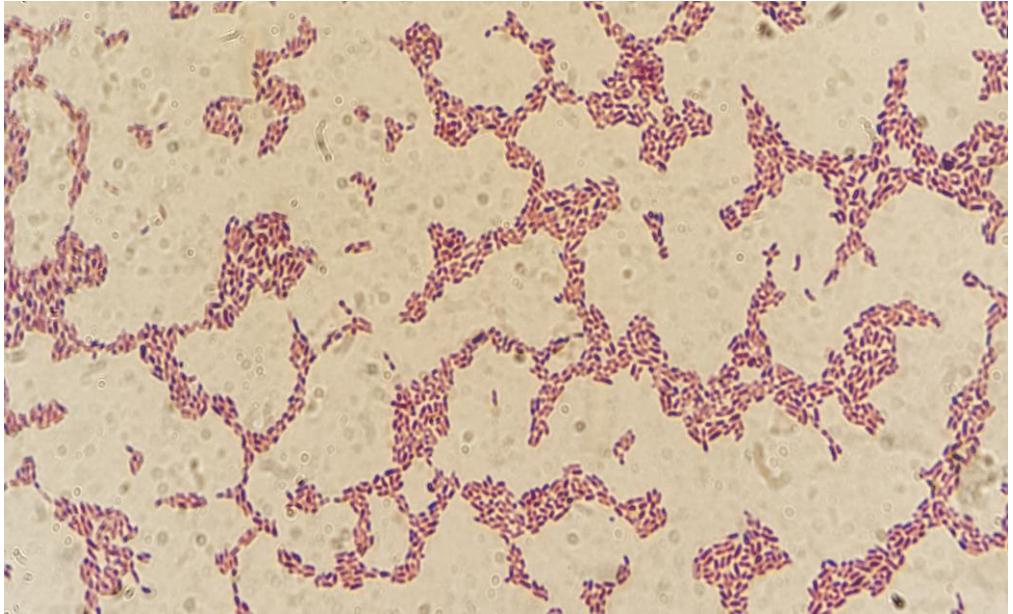
Şekil 4.1 Yoğurtların 10^{-6} dilüe edilmesi



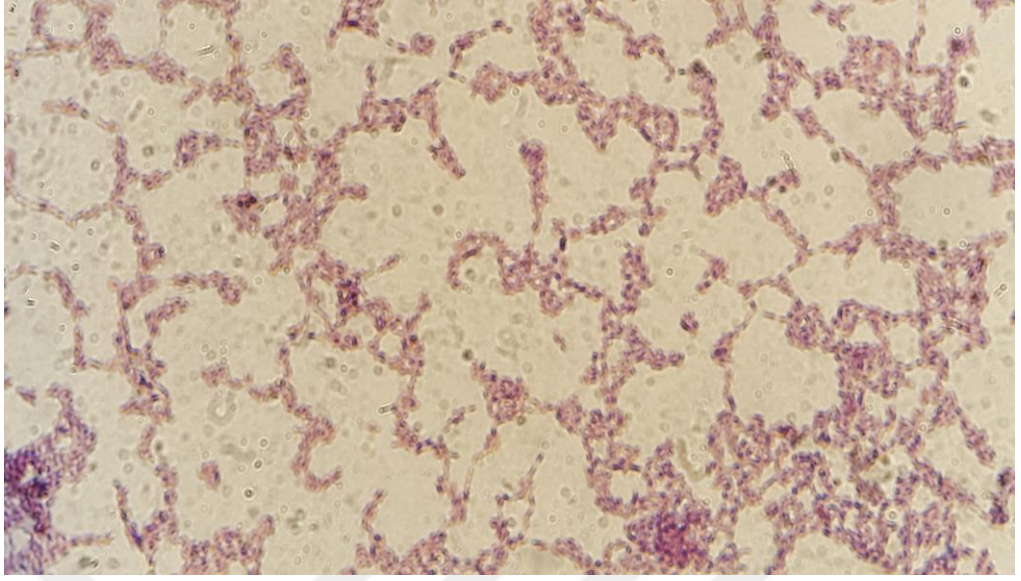
Şekil 4.2 İnkübasyon sonrası M17 ve MRS besiyerindeki LAB

4.2 Gram Boyama

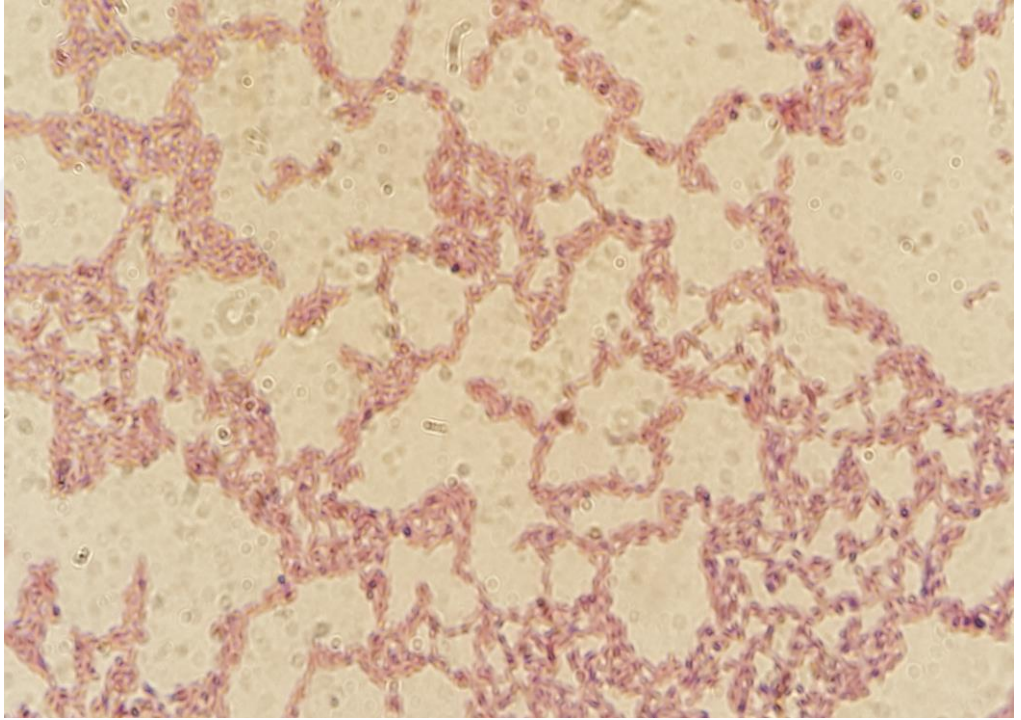
Boyamaları yapılan 8 adet izolatın morfolojik olarak kısa veya uzun çubuk (Lactobacillus) ya da yuvarlak veya eliptik (Streptococcus) şekilli, gram-pozitif olduğu gözlenmiştir. 8 adet izollattan 4 tanesi kok, 4 tanesi basil morfolojisine sahiptir. 8 izolatın tamamı gram (+) tir.



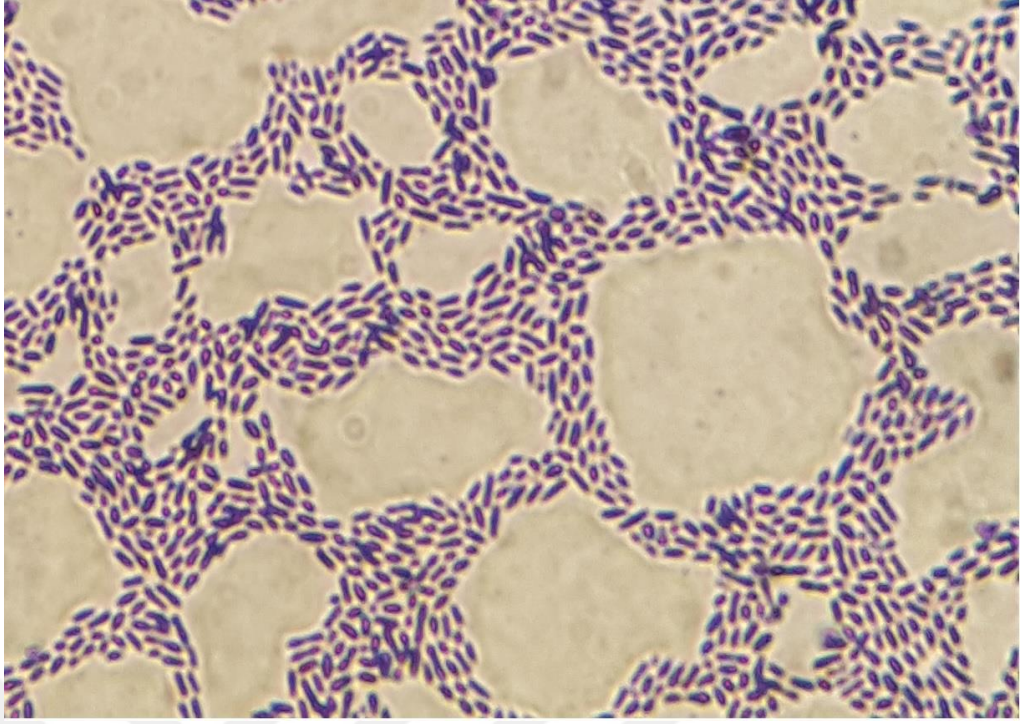
Şekil 4.3 Merkok (Mercimek'ten elde edilen yoğurttaki kok) (+)



Şekil 4.4 Faskok (Fasulye'den elde edilen yoğurttaki kok) (+)



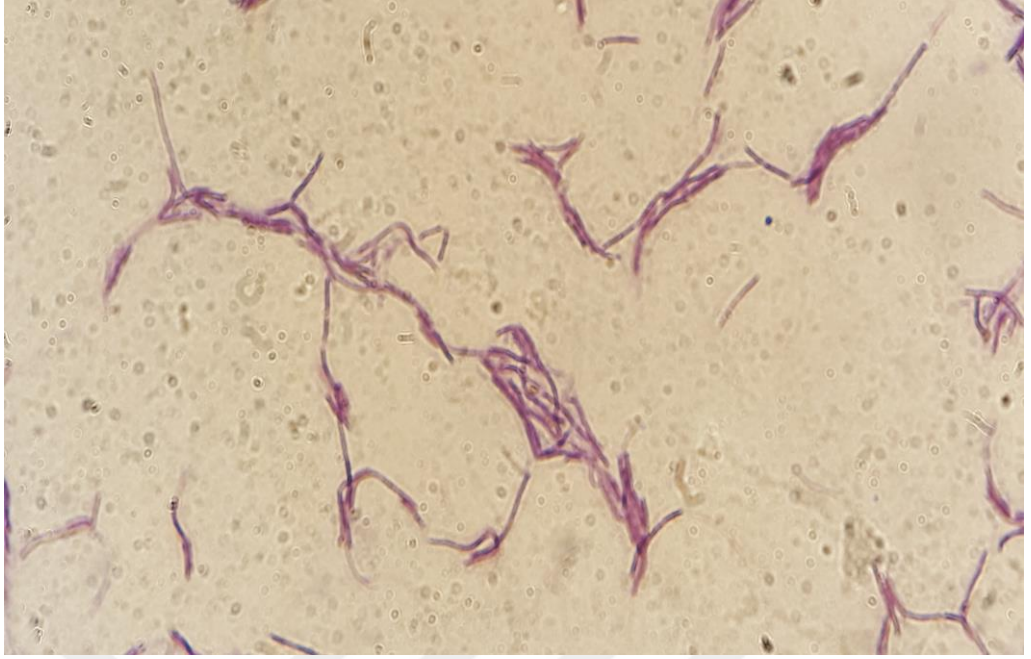
Şekil 4.5 Borkok (Börölce'den elde edilen yoğurttaki kok) (+)



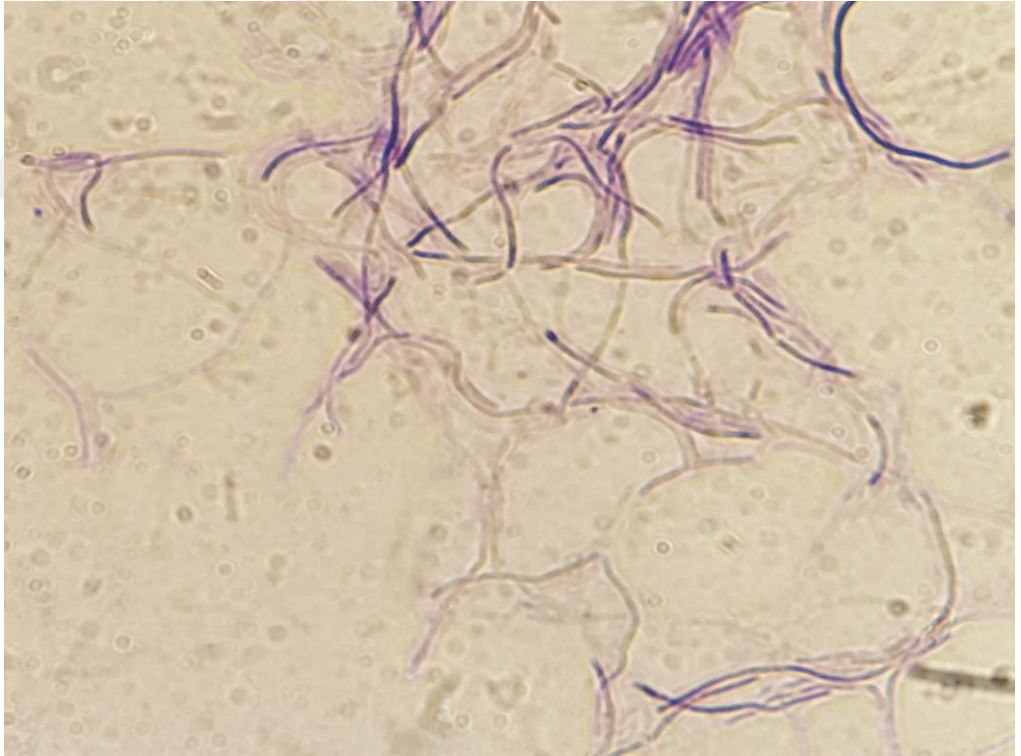
Şekil 4.6 Bakkok (Bakla'dan elde edilen yoğurttaki kok) (+)



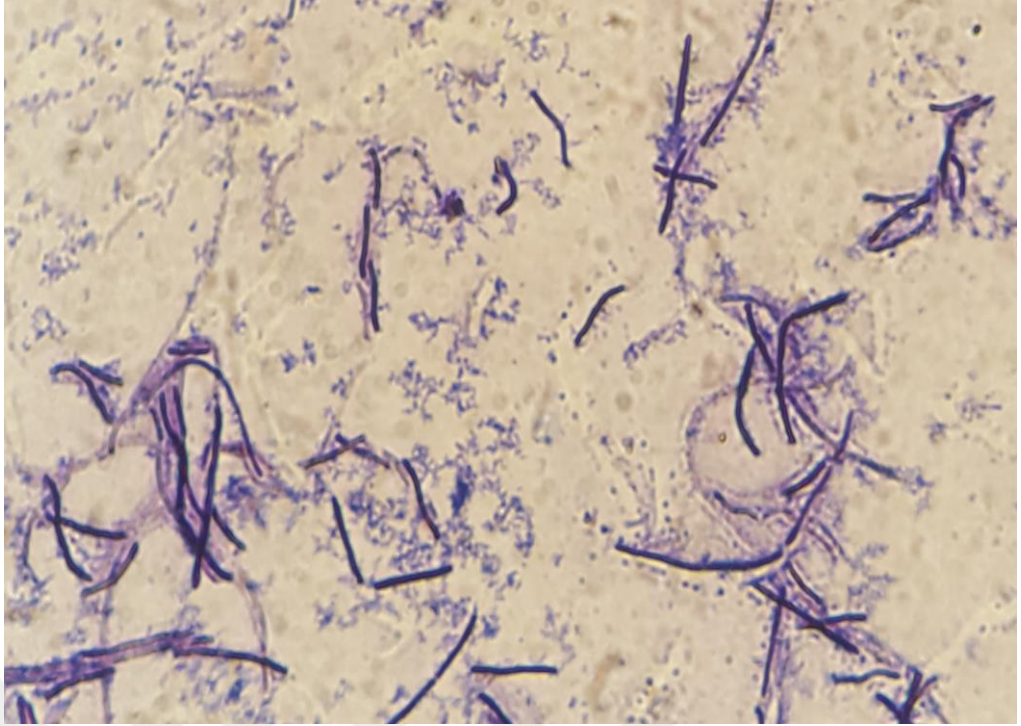
Şekil 4.7 Merbas (Mercimek'ten elde edilen yoğurttaki basil) (+)



Şekil 4.8 Fasbas (Fasulye'den elde edilen yoğurttaki basil) (+)



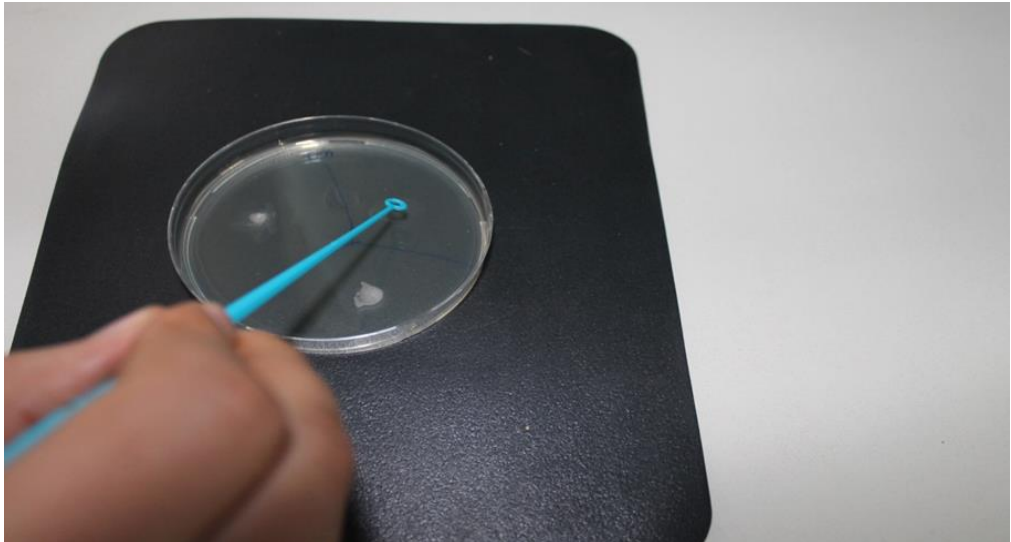
Şekil 4.9 Börbas (Börülce'den elde edilen yoğurttaki basil) (+)



Şekil 4.10 Bakbas (Bakla'dan elde edilen yoğurttaki basil) (+)

4.3 Katalaz Testi

8 izolatın katalaz testinin yapılışı Şekil 4.11'de, sonuçları ise tablo 3.1 de verilmiştir. Tüm izolatların sonuçları gaz çıkarmamıştır ve buna bağlı olarak katalaz (-) olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.11 Katalaz Testi Yapılışı

İzolatlar	Katalaz
Merkok	(-)
Faskok	(-)
Börkok	(-)
Bakkok	(-)
Merbas	(-)
Fasbas	(-)
Börbas	(-)
Bakbas	(-)

Tablo 3.1 Katalaz Test Sonuçları

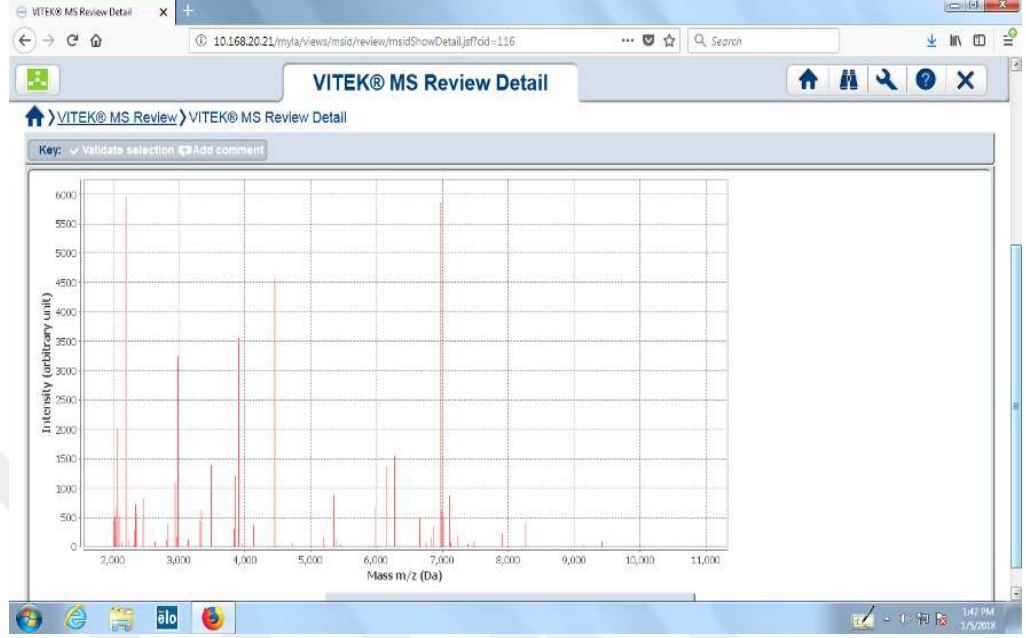
4.4 MALDI-TOF Yöntemi

Gram boyama, katalaz testi ve mikroskopta 100 imersiyon objektifinde morfolojik olarak tanımlandıktan sonra elde edilen koloniler MALDI-TOF MS yöntemi için Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü/Bursa' ya gönderilmiştir. Sonuçlar Tablo 3.2 de verilmiştir.

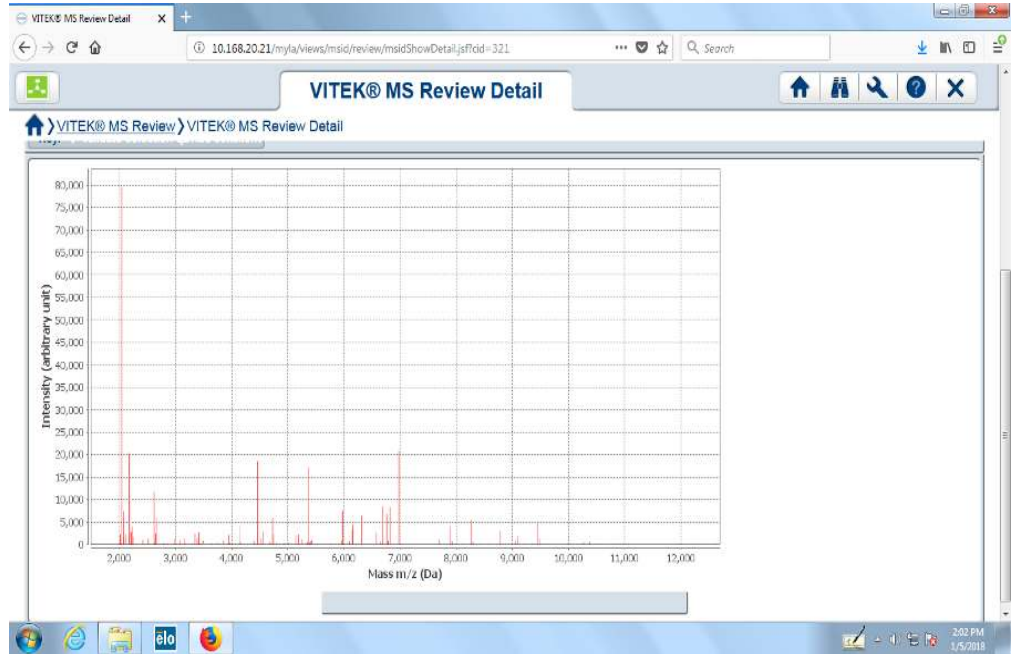
Sıra Nosu	İzolat Kodu	MALDI-TOF İdentifikasyon Sonucu
1	Merkok	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>
2	Faskok	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>
3	Bakkok	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>
4	Börkok	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>
5	Merbas	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
6	Fasbas	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>
7	Bakbas	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
8	Börbas	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>

Tablo 3.2 MALDI-TOF Sonuçları

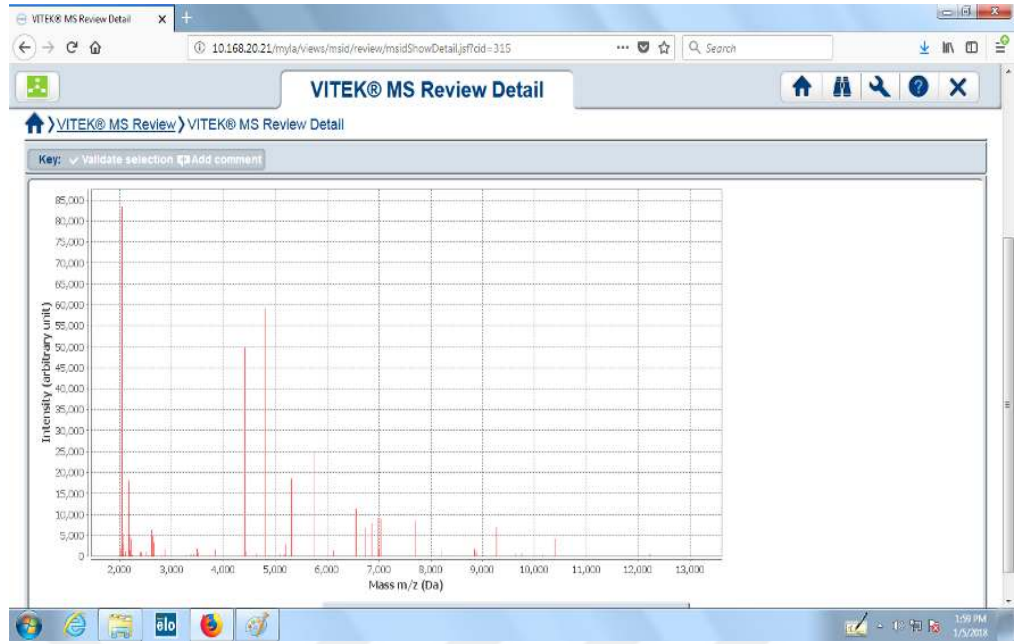
MALDI-TOF sonuçlarına göre 8 izolattan 4'ü *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, 3'ü *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, 1'i *Streptococcus mitis/oralis* olarak tanımlanmıştır.



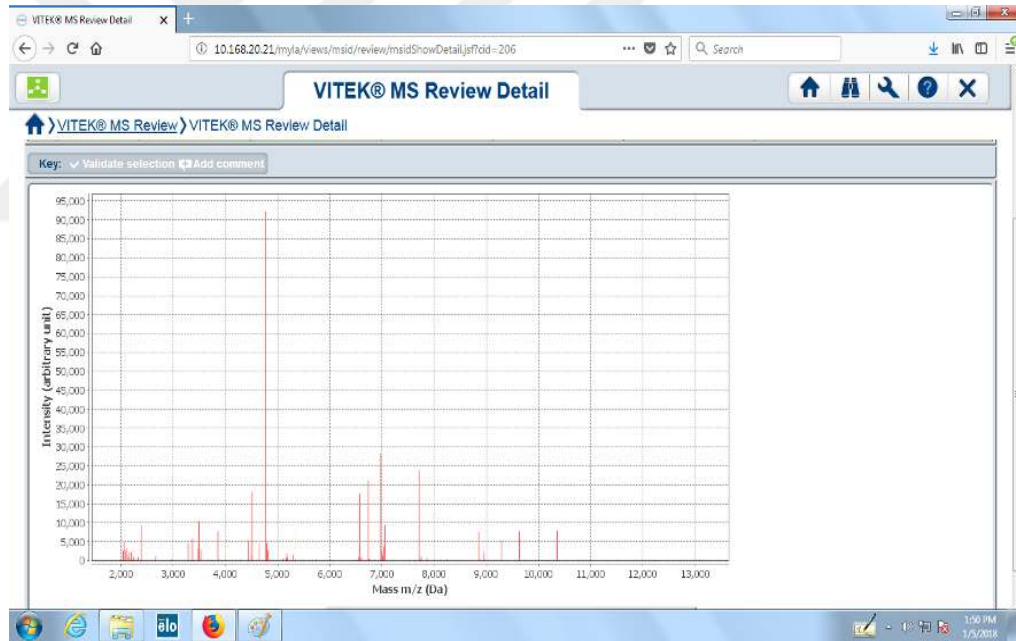
Şekil 4.12 MALDI-TOF merkok grafiği



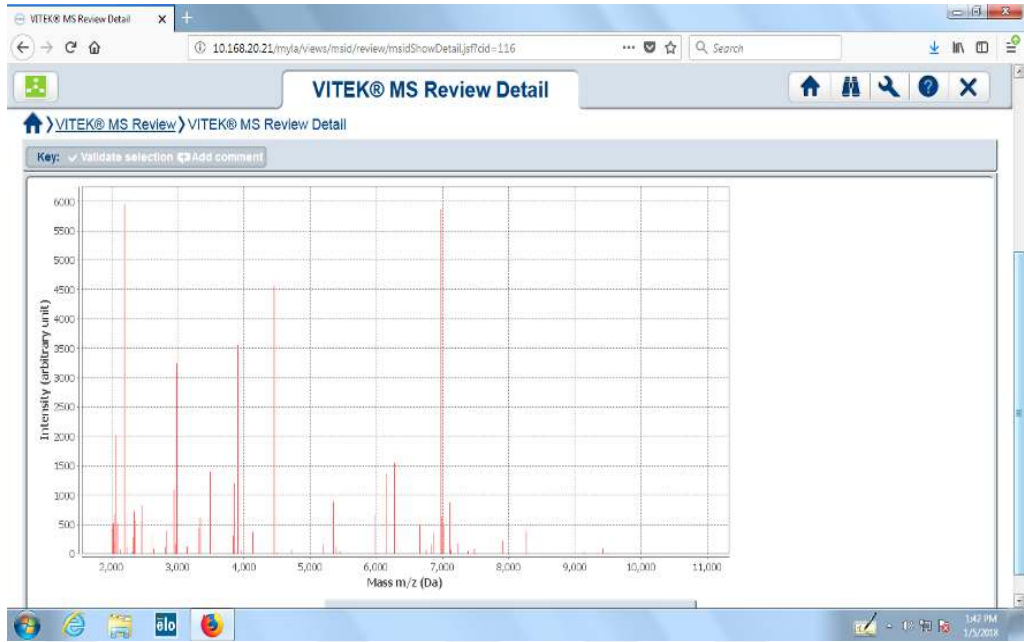
Şekil 4.13 MALDI-TOF faskok Grafiği



Şekil 4.14 MALDI-TOF merbas grafiği



Şekil 4.15 MALDI-TOF börbas grafiği



Şekil 4.16 MALDI-TOF fasbas grafiği

4.5 LAB 16S rRNA Gen Bölgesi Dizi Analizi Yöntemi ile Tanımlanması

Çalışmada; Elde edilmiş olan yoğurtlardan izole edilmiş 8 adet izolatın moleküler tanımlanması aşaması 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi yöntemi (Sanger vd., 1977) ile Ankara Sentegen Firmasında iki kez tekrarlanarak doğrulanmıştır. Dizi analizinden çıkan sonuçlar NCBI gen bankasındaki referans genomlarla eşleştirilmiştir. Bu eşleştirme sonuçları tablo 3.3 te verilmiş olup 4 izolat *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, 4 izolat *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* olarak tanımlanmıştır.

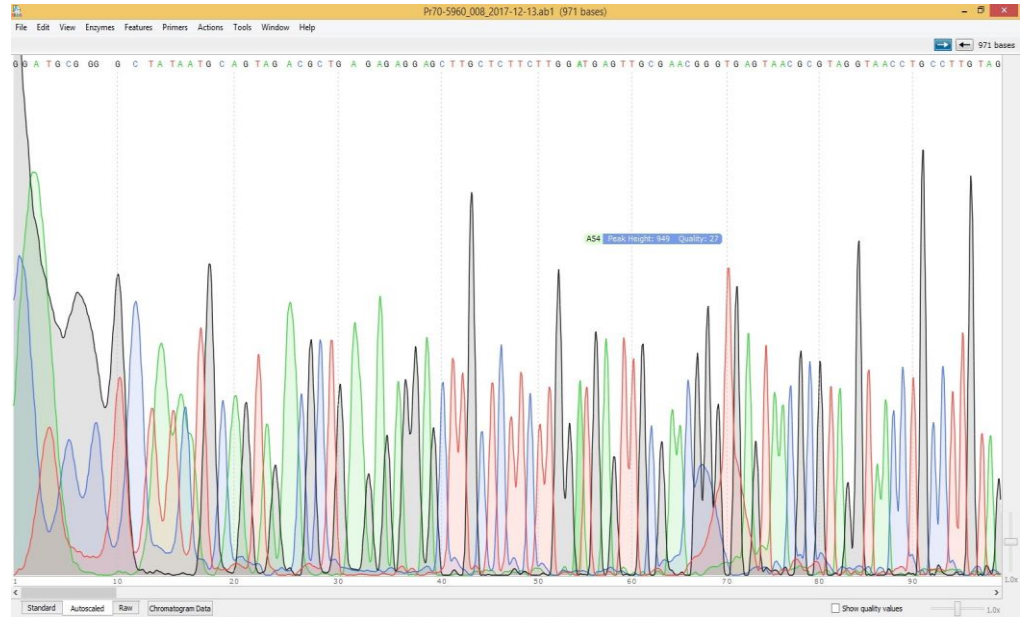
Sıra Nosu	İzolat Kodu	Moleküler Tanımlama Sonuçları	% Referans Genoma Benzerlik
1	Merkok	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	98
2	Faskok	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	98
3	Bakkok	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	97
4	Börkok	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	98
5	Merbas	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	96
6	Fasbas	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	97
7	Bakbas	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	98
8	Börbas	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	97

Tablo 3.3 16S rRNA gen bölgesi moleküler tanımlama sonuçları

Streptococcus thermophilus strain PON3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: **KC545882.1** Length: 1494 Number of Matches: 1
Range 1: 12 to 980

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1617 bits(1792)	0.0()	949/970(98%)	13/970(1%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 9	GGCTATAATGCAGTAGA-CGCTGAGAGAGGAGCTTGCTCTTCTGGATGAGTTGCGAACG	67			
Sbjct 12	GGCTATAATGCAGTAGAACGCTGAGAGAGGAGCTTGCTCTTCTGGATGAGTTGCGAACG	71			
Query 68	GGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGCGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCT	127			
Sbjct 72	GGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGCGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCT	131			
Query 128	AATACCGCATAACAATGGATGACACATGTCATTTATTTGAAAGGGGCAATTGCTCCACTA	187			
Sbjct 132	AATACCGCATAACAATGGATGACACATGTCATTTATTTGAAAGGGGCAATTGCTCCACTA	191			
Query 188	CAAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGAT	247			
Sbjct 192	CAAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGAT	251			
Query 248	ACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT	307			
Sbjct 252	ACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT	311			
Query 308	ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCTGACCGAGCAACGCCGC	367			
Sbjct 312	ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCTGACCGAGCAACGCCGC	371			
Query 368	GTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGTCAAGAACGGGTGTGAGA	427			
Sbjct 372	GTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGTCAAGAACGGGTGTGAGA	431			
Query 428	GTGGAAAGTTTACACTGTGACGGTAGCTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGC	487			
Sbjct 432	GTGGAAAGTTTACACTGTGACGGTAGCTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGC	491			
Query 488	AGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC	547			
Sbjct 492	AGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC	551			
Query 548	AGGCGGTTTGATAAGTCTGAAGTTAAAGGCTGTGGCTCAACCATAGTTTCGCTTTGGAAAC	607			
Sbjct 552	AGGCGGTTTGATAAGTCTGAAGTTAAAGGCTGTGGCTCAACCATAGTTTCGCTTTGGAAAC	611			

Şekil 4.17 Merkok NCBI bankasındaki referans genom benzerliği



Şekil 4.18 Merkok NCBI bankasındaki referans genom benzerlik grafiği

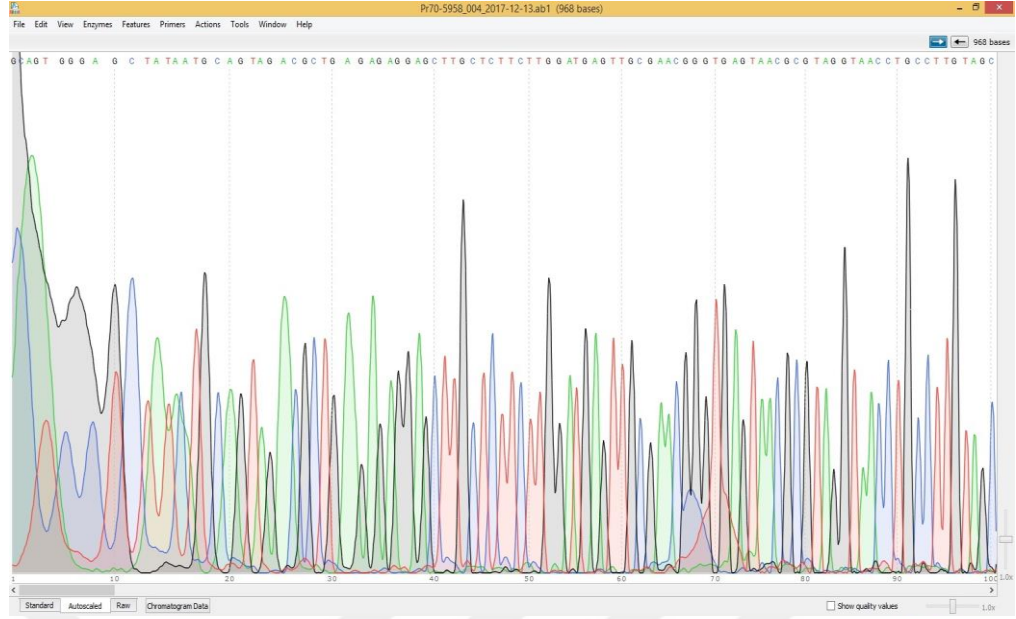
Streptococcus thermophilus strain CGLBL208 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: **KF286609.1** Length: 1482 Number of Matches: 1

Range 1: 10 to 926

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1534 bits(1700)	0.0()	901/921(98%)	14/921(1%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 6	GGGAGCTATAATGCAGTAGA-CGCTGAGAGAGGAGCTTGCTCTTCTTGGATGAGTTGCGA	64			
Sbjct 10	GGCAGCTATAATGCAGTAGAACGCTGAGAGAGGAGCTTGCTCTTCTTGGATGAGTTGCGA	69			
Query 65	ACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACTGCCTTGTAGCGGGGATAACTATTGGAACGATA	124			
Sbjct 70	ACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACTGCCTTGTAGCGGGGATAACTATTGGAACGATA	129			
Query 125	GCTAATACCGCATAACAATGGATGACACATGTCATTTATTTGAAAGGGCAATTGCTCCA	184			
Sbjct 130	GCTAATACCGCATAACAATGGATGACACATGTCATTTATTTGAAAGGGCAATTGCTCCA	189			
Query 185	CTACAAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGAC	244			
Sbjct 190	CTACAAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGAC	249			
Query 245	GATACATAGCCGACCTGAGAGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT	304			
Sbjct 250	GATACATAGCCGACCTGAGAGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT	309			
Query 305	CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGC	364			
Sbjct 310	CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGC	369			
Query 365	CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGTCAAGAACGGGTGTG	424			
Sbjct 370	CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGTCAAGAACGGGTGTG	429			
Query 425	AGAGTGGAAGTTCACACTGTGACGGTAGCTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCC	484			
Sbjct 430	AGAGTGGAAGTTCACACTGTGACGGTAGCTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCC	489			
Query 485	AGCAGCCGCGTAATACGTAGGTCCCAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAG	544			
Sbjct 490	AGCAGCCGCGTAATACGTAGGTCCCAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAG	549			
Query 545	CGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGAAGTTAAAGGCTGTGGCTCAACCATAGTTTCGCTTTGGA	604			

Şekil 4.19 Faskok NCBI Bankasındaki Referans Genom Benzerliği

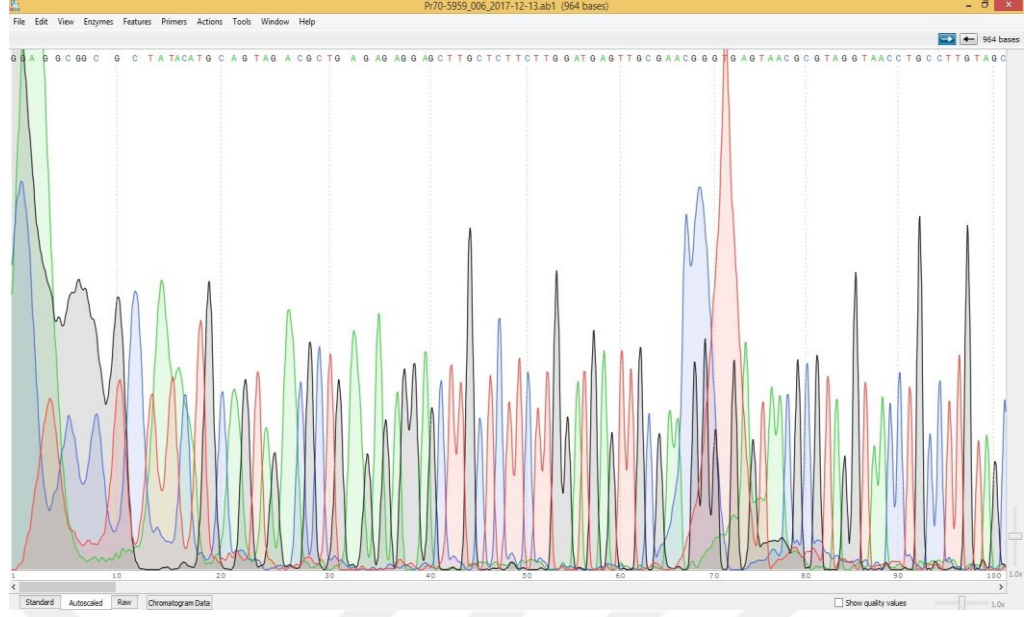


Şekil 4.20 Faskok NCBI bankasındaki referans genom benzerlik grafiği

Streptococcus thermophilus strain MaNaL33 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
 Sequence ID: **KU324914.1** Length: 1231 Number of Matches: 1
 Range 1: 7 to 978

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1577 bits(1748)	0.0()	943/973(97%)	18/973(1%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 4	GGCGGC--GCTATACATGCAGTAGA-CGCTGA-GAGAGGAGCTTGCTCTTCTGGATGAG				59
Sbjct 7	GGCGGCATGCTATACATGCAGTAGAACGCTGAAGAGAGGAGCTTGCTCTTCTGGATGAG				66
Query 60	TTGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGCGGGGATAACTATTGGAA				119
Sbjct 67	TTGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGCGGGGATAACTATTGGAA				126
Query 120	ACGATAGCTAATACCGCATAACAATGGATGACACATGTCATTTATTTGAAAGGGCAATT				179
Sbjct 127	ACGATAGCTAATACCGCATAACAATGGATGACACATGTCATTTATTTGAAAGGGCAATT				186
Query 180	GCTCCACTACAAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTA				239
Sbjct 187	GCTCCACTACAAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTA				246
Query 240	GGCGACGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC				299
Sbjct 247	GGCGACGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC				306
Query 300	CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGCAACCCTGACCGAG				359
Sbjct 307	CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGCAACCCTGACCGAG				366
Query 360	CAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGTCAAGAACG				419
Sbjct 367	CAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGTCAAGAACG				426
Query 420	GGTGTGAGAGTGGAAAGTTCACACTGTGACGGTAGCTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTA				479
Sbjct 427	GGTGTGAGAGTGGAAAGTTCACACTGTGACGGTAGCTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTA				486
Query 480	CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAA				539
Sbjct 487	CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAA				546
Query 540	AGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGAAGTTAAAGGCTGTGGCTCAACCATAGTTTCG				599

Şekil 4.21 Bakkok NCBI bankasındaki referans genom benzerliği



Şekil 4.22 Bakkok NCBI bankasındaki referans genom benzerlik grafiği

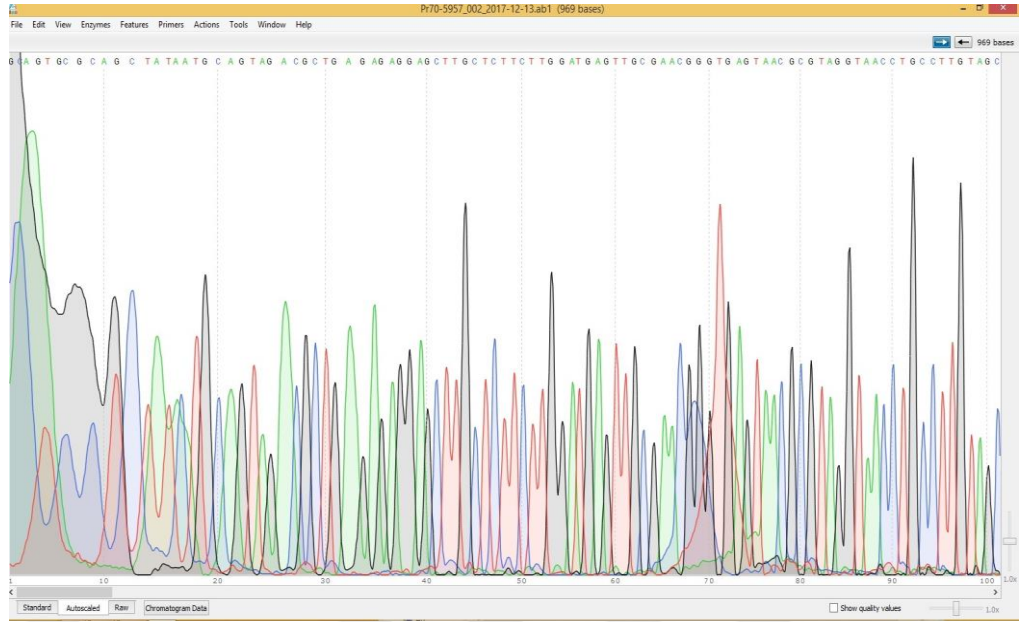
Streptococcus thermophilus strain CGLBL208 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: **KF286609.1** Length: 1482 Number of Matches: 1

Range 1: 11 to 972

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1597 bits(1770)	0.0()	944/967(98%)	17/967(1%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 8		GCAGCTATAATGCAGTAGA-CGCTGAGAGAGGAGCTTGCTCTTCTTGGATGAGTTGCGAA			66
Sbjct 11		GCAGCTATAATGCAGTAGAACGCTGAGAGAGGAGCTTGCTCTTCTTGGATGAGTTGCGAA			70
Query 67		CGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGCGGGGATAACTATTGGAAACGATAG			126
Sbjct 71		CGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGCGGGGATAACTATTGGAAACGATAG			130
Query 127		CTAATACCGCATAACAATGGATGACACATGTCAATTTATTTGAAAGGGCAATTGCTCCAC			186
Sbjct 131		CTAATACCGCATAACAATGGATGACACATGTCAATTTATTTGAAAGGGCAATTGCTCCAC			190
Query 187		TACAAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACG			246
Sbjct 191		TACAAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACG			250
Query 247		ATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC			306
Sbjct 251		ATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC			310
Query 307		CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCC			366
Sbjct 311		CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCC			370
Query 367		GCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGTCAAGAACGGGTGTGA			426
Sbjct 371		GCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGTCAAGAACGGGTGTGA			430
Query 427		GAGTGGAAAGTTCACACTGTGACGGTAGCTTACCAGAAAGGACGGCTAATACGTGCCA			486
Sbjct 431		GAGTGGAAAGTTCACACTGTGACGGTAGCTTACCAGAAAGGACGGCTAATACGTGCCA			490
Query 487		GCAGCCGCGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGATTATTGGGCGTAAAGCGAGC			546
Sbjct 491		GCAGCCGCGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGATTATTGGGCGTAAAGCGAGC			550

Şekil 4.23 Borkok NCBI bankasındaki referans genom benzerliği

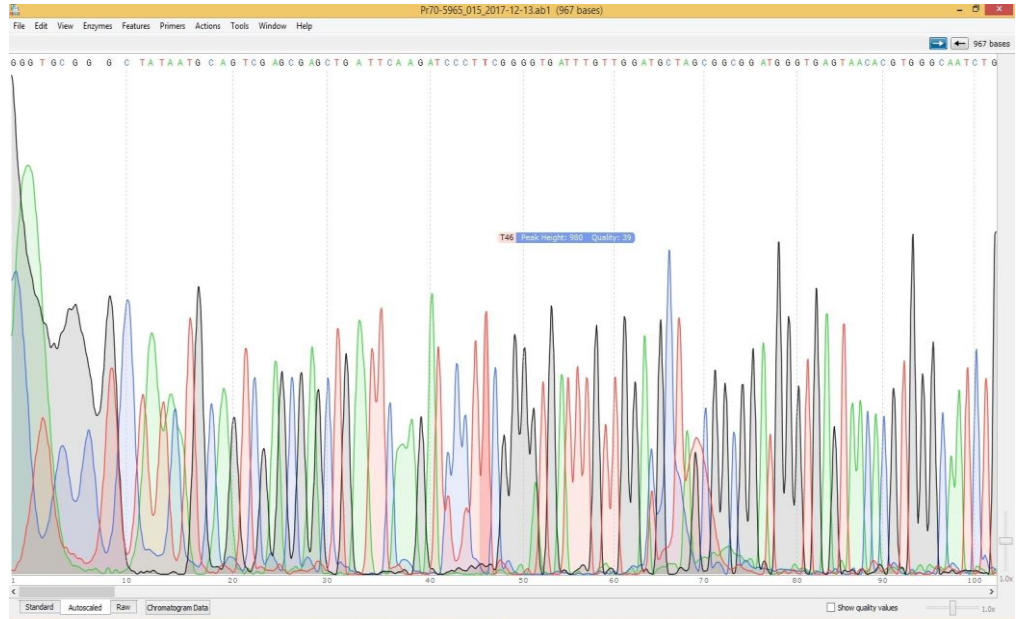


Şekil 4.24 Börkok NCBI bankasındaki referans genom benzerlik grafiği

Lactobacillus delbrueckii subsp. indicus strain P7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: **KY658466.1** Length: 1463 Number of Matches: 1
 Range 1: 2 to 978

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1535 bits(1702)	0.0()	941/980(96%)	22/980(2%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 1	GGGTGCGGGCTATAATGCAGTCGAGCGAGCTGA-TTCAA-GATCCCTTCGGGGTGATTTG	58			
Sbjct 2	GGGGGGGGCTATAATGCAGTCGAGCGAGCTGAATTCAAAGATCCCTTCGGGGTGATTTG	61			
Query 59	TTGGATGCTAGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTAAAGACTGGGAT	118			
Sbjct 62	TTGGACGCTAGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTAAAGACTGGGAT	121			
Query 119	ACCAC TTGAAACAGGTGCTAATACCGGATAACAACATGAATCGCATGATTCAAGTTTGA	178			
Sbjct 122	ACCAC TTGAAACAGGTGCTAATACCGGATAACAACATGAATCGCATGATTCAAGTTTGA	181			
Query 179	AAGGCGGCGCAAGCTGTCACTTTAGGATGAGCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGT	238			
Sbjct 182	AAGGCGGCGCAAGCTGTCACTTTAGGATGAGCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGT	241			
Query 239	AAAGGCCTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGA	298			
Sbjct 242	AAAGGCCTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGA	301			
Query 299	CTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCACAATGGACGC	358			
Sbjct 302	CTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCACAATGGACGC	361			
Query 359	AAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTG	418			
Sbjct 362	AAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTG	421			
Query 419	TTGGTGAAGAAGGATAGAGGCAGTAAC TGGTCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGT	478			
Sbjct 422	TTGGTGAAGAAGGATAGAGGCAGTAAC TGGTCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGT	481			
Query 479	CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATT	538			
Sbjct 482	CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATT	541			
Query 539	TATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGGAATGATAAGTCTGTGTGAAAGCCACGGCTCA	598			
Sbjct 542	TATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGGAATGATAAGTCTGTGTGAAAGCCACGGCTCA	601			

Şekil 4.25 Merbas NCBI bankasındaki referans genom benzerliği



Şekil 4.26 Merbas NCBI bankasındaki referans genom benzerlik grafiği

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* strain CAU:233 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: **MF369884.1** Length: 1466 Number of Matches: 1
Range 1: 15 to 978

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1543 bits(1710)	0.0()	933/966(97%)	23/966(2%)	Plus/Plus	

Features:

Query	13	CTATAATGCAGTCGAGCGAGCTGATTCAA-GATCCCTTCGGGGTGATTTGTTGGATGCTA	71
Sbjct	15	CTATAATGCAGTCGAGCGAGCTGATTCAAAGATCCCTTCGGGGTGATTTGTTGGACGCTA	74
Query	72	GCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTAAAGACTGGGATACCACTTGGA	131
Sbjct	75	GCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTAAAGACTGGGATACCACTTGGA	134
Query	132	AACAGGTGCTAATACCGGATAACAACATGAATCGCATGATTCAAGTTTGAAAGCGGGCGC	191
Sbjct	135	AACAGGTGCTAATACCGGATAACAACATGAATCGCATGATTCAAGTTTGAAAGCGGGCGC	194
Query	192	AAGCTGTCACTTTAGGATGAGCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTAC	251
Sbjct	195	AAGCTGTCACTTTAGGATGAGCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTAC	254
Query	252	CAAGGCAATGATGCGTAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG	311
Sbjct	255	CAAGGCAATGATGCGTAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG	314
Query	312	GCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGCAAGTCTGATG	371
Sbjct	315	GCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGCAAGTCTGATG	374
Query	372	GAGCAACGCCCGGTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGA	431
Sbjct	375	GAGCAACGCCCGGTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGA	434
Query	432	AGGATAGAGGCAGTAAGTGGTCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTACGGCTAAC	491
Sbjct	435	AGGATAGAGGCAGTAAGTGGTCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTACGGCTAAC	494
Query	492	TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTATTGGGCGT	551
Sbjct	495	TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTATTGGGCGT	554
Query	552	AAAGCGAGCGCAGGCGGAATGATAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAAC	611
Sbjct	555	AAAGCGAGCGCAGGCGGAATGATAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAAC	614

Şekil 4.27 Fasbas NCBI bankasındaki referans genom benzerliği



Şekil 4.28 Fasbas NCBI bankasındaki referans genom benzerlik grafiği

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain CAU:321 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: **MF369882.1** Length: 1470 Number of Matches: 1
Range 1: 4 to 957

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1611 bits(1786)	0.0()	938/957(98%)	12/957(1%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 2	AGTGC	AGCTATAATGCAGTCGAGCGAGCTGA-TTCAAAGATTCCTTCGGGGTGATTTG	60		
Sbjct 4	AGTGC	AGCTATAATGCAGTCGAGCGAGCTGAATTCCAAAGATCCCCTTCGGGGTGATTTG	63		
Query 61	TTGGATGCTAGCGCGGATGGGTGAGTAACACGTTGGCAATCTGCCCTAAAGACTGGGAT	120			
Sbjct 64	TTGGACGCTAGCGCGGATGGGTGAGTAACACGTTGGCAATCTGCCCTAAAGACTGGGAT	123			
Query 121	ACCACCTTGGAAACAGGTGCTAATACCGGATAACAACATGAATCGCATGATTCAAGTTTGA	180			
Sbjct 124	ACCACCTTGGAAACAGGTGCTAATACCGGATAACAACATGAATCGCATGATTCAAGTTTGA	183			
Query 181	AAGGCGGCGCAAGCTGTCACTTTAGGATGAGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGGGGT	240			
Sbjct 184	AAGGCGGCGCAAGCTGTCACTTTAGGATGAGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGGGGT	243			
Query 241	AAAGGCCTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGA	300			
Sbjct 244	AAAGGCCTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGA	303			
Query 301	CTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGC	360			
Sbjct 304	CTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGC	363			
Query 361	AAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTG	420			
Sbjct 364	AAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTG	423			
Query 421	TTGGTGAAGAAGGATAGAGGCAGTAACCTGGTCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGT	480			
Sbjct 424	TTGGTGAAGAAGGATAGAGGCAGTAACCTGGTCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGT	483			
Query 481	CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATT	540			
Sbjct 484	CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATT	543			
Query 541	TATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAATGATAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCA	600			
Sbjct 544	TATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAATGATAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCA	603			

Şekil 4.29 Bakbas NCBI bankasındaki referans genom benzerliği



Şekil 4.30 Bakbas NCBI bankasındaki referans genom benzerlik grafiği

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* strain CAU:233 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: **MF369884.1** Length: 1466 Number of Matches: 1
Range 1: 15 to 980

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1552 bits(1720)	0.0()	937/969(97%)	23/969(2%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 14	CTATAATGCAGTCGAGCGAGCTGATTCAAAGATCCCTTCGGGGTGATTTGTTGGATGCTA	73			
Sbjct 15	CTATAATGCAGTCGAGCGAGCTGATTCAAAGATCCCTTCGGGGTGATTTGTTGGACGCTA	74			
Query 74	GCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTAAAGACTGGGATACCACTTGA	133			
Sbjct 75	GCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTAAAGACTGGGATACCACTTGA	134			
Query 134	AACAGGTGCTAATACCGGATAACAACATGAATCGCATGATTCAAGTTTGAAAGCGGCGC	193			
Sbjct 135	AACAGGTGCTAATACCGGATAACAACATGAATCGCATGATTCAAGTTTGAAAGCGGCGC	194			
Query 194	AAGCTGTCACTTTAGGATGAGCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTAC	253			
Sbjct 195	AAGCTGTCACTTTAGGATGAGCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTAC	254			
Query 254	CAAGGCAATGATGCGTAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG	313			
Sbjct 255	CAAGGCAATGATGCGTAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG	314			
Query 314	GCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATG	373			
Sbjct 315	GCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATG	374			
Query 374	GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGA	433			
Sbjct 375	GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGA	434			
Query 434	AGGATAGAGGCAGTAACCTGGTCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAAC	493			
Sbjct 435	AGGATAGAGGCAGTAACCTGGTCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAAC	494			
Query 494	TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTATTGGGCGT	553			
Sbjct 495	TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTATTGGGCGT	554			
Query 554	AAAGCGAGCGCAGGCGGAATGATAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGAAC	613			
Sbjct 555	AAAGCGAGCGCAGGCGGAATGATAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGAAC	614			

Şekil 4.31 Börbas NCBI bankasındaki referans genom benzerliği



Şekil 4.32 Börbas NCBI bankasındaki referans genom benzerlik grafiği

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇ

Süt endüstrisi günümüzde tüketici beklentileri doğrultusunda çeşitli lezzet ve sağlık beklentilerini karşılayacak ve kişi başına süt tüketimini arttıracak yeni üretim teknolojileri ya da aktif pazarlama stratejilerinin geliştirilmesine yönelik büyük gayret sarf etmektedir.

Doğal topluluklardaki bakteriyel farklılıklar oldukça zor anlaşılmakta ve genellikle tür düzeyinde tespit edilmektedir (Dykhuizen, 1998). Suş düzeyinde bakteriyel farklılıklara ait bilgiler oldukça nadirdir. Son yıllarda mikroorganizmalara ait genotiplendirme çalışmalarında güçlü teknikler ortaya konulmuş ve bu tekniklerin LAB'a ait suşlar üzerindeki uygulamaları halen devam etmektedir çünkü LAB'ların endüstriyel kullanımı için amaç en uygun LAB suşlarının seçimidir. Bu nedenle, herhangi bir suşun spesifik ve belirgin olarak ayrımını sağlayan güvenilir yöntemlerin uygulanması oldukça önemlidir ve özellikle son yıllarda bu amaçla kullanılmaya başlanan moleküler yöntemler var olan çalışmalara tamamlayıcı ve doğrulayıcı olmaları bakımından güvenilir, basit ve pahalı olmayan yöntemler olarak değerlendirilmektedir.

Yapılan bu çalışma kapsamında yoğurt mayalanmasında kullanılan baklagillerden mikroorganizmaların izolasyonu ve karakterizasyonu araştırılmış, elde edilen izolatların, literatür taraması sonucu olarak geleneksel yoğurtların izolatları ile yapılan karakterizasyon çalışmalarının yoğunlukta olduğu fakat çalışılan baklagillerle yoğurt yapımı ve izolatların moleküler tanımları üzerine yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yüzden tez çalışmamız özgünlük açısından da oldukça önemlidir. Baklagillerden mikroorganizmaların izolasyonu ve karakterizasyonu ilk defa deneniyor olması da çalışmanın özgünlüğü açısından önemlidir.

Standart yoğurt kültürüne destek olması açısından; gerek fiziksel, gerek kimyasal, gerekse mikrobiyolojik ve duyuşal özelliklerinin iyileştirilmesi ve aday starter kültür ortaya konulması amaçlanmıştır. Genel olarak elde edilen verilere bakacak olursak,

Dört farklı baklagilin UHT'siz sütü fermente etmesiyle önce maya daha sonra yoğurt olarak ürün elde edilmiştir.

Yapılan gram boyamalarda tüm örneklerin gram (+) olduğu belirlenmiştir.

Morfolojik olarak M17 besiyerinde üremiş olan kolonilerin kok, MRS besiyerinde üremiş olan kolonilerin basil olduğu gözlemlenmiştir.

MALDI-TOF ve 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi ile tanımlama sonuçlarına göre MALDI-TOF' da Merkok, Faskok, Bakkok, Börkok izolatları *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, Merbas, Bakbas, Börbas *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, Fasbas izolatu *Streptococcus mitis/oralis* olarak tanımlanmıştır.

16S rRNA gen bölgesi dizi analizi ile moleküler tanımlama sonucunda Merkok, Faskok, Bakkok, Börkok numaralı izolatlar *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* olarak tanımlanmıştır. Merbas, Bakbas, Börbas, Fasbas numaralı izolatlar *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* olarak tanımlanmıştır.

İdentifikasyonda negatif sonuçlardan kurtulup kesin tanımlama yapabilmek için moleküler identifikasyon teknikleri kullanılmıştır.

Çalışmamızda 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi ile kesin tanımlama yapılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmada; Merkok, Faskok, Bakkok, Börkok suşları birbirleriyle Merbas, Bakbas, Börbas suşlarında birbiriyle moleküler tanımlama sonuçlarının tür bazında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Fasbas örneğinde farklı türler olarak tanımlanmıştır fakat 16s rRNA ile yapılan analizler sonucunda bu suşunda *Lactobacillus delbrueckii* olduğu tanımlanmıştır. Bu suşların prosese katkısı, gelecek çalışmalar için potansiyel bir veri kaynağı olabilir.

Yeni tanımlanan suşlar, kontrollü şartlarda yoğurt üretiminin yapılması ve suşların endüstriyel olarak kullanılmasına şüphesiz olumlu katkı sağlayacaklardır.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar laktik asit bakterisi ile çalışan araştırmacılar için bir veri tabanı oluşturacak ve tanımlama için harcanacak zaman böylece ortadan kalkmış olacaktır.



KAYNAKLAR

- A.Y. Tamime and H. C. Deeth (1980) Yogurt: *Technology and Biochemistry. Journal of Food Protection*: December 1980, 43 (12), pp. 939-977.
- Abdullah, S.A., Osman, M.M., (2010). Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw cow milk, white cheese and rob in Sudan. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9 (12): 1203-1206.
- Adıgüzel A, Inan K, Sahin F, vd. Molecular diversity of thermophilic bacteria isolated from Pasinler hot spring (Erzurum, Turkey) *Turk J Biol.* (2011);**35**:267–274
- Adıgüzel A, Ozkan H, Baris O, vd. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *J Microbiol Meth.* 2009;**79**:321–328. [PubMed]
- Adıgüzel A., Molecular Characterization of Thermophilic Bacteria Isolated From Water Samples Taken From Various Thermal Plants. Ph. D. Thesis, Ataturk University, Graduate School at Natural and Applied Sciences, Erzurum, Turkey, 2006.
- Akçin, A. (1988). Yemeklik Tane Baklagiller. Selçuk Üniversitesi Yayınları: 43, Ziraat Fakültesi Yayınları: 8, Konya.
- Aksu S. Proteomiks ve Candida'larda Proteomiks Çalışmaları. Candida Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Simpozyumu, Tutanaklar. Eskişehir: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını. 2002;43:93-99.
- Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem.* 1975;**47**: 219-25.
- Anonim, 2004a. II. Tarım Şurası Çalışma Belgesi. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. 29 Kasım -01 Aralık 2004.Sayfa: 113. Ankara.
- Anonim, (2011). TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu. www.tuik.gov.tr
- Anonymous, (2001). Türk Gıda Kodeksi Fermente Sütler Tebliği. Tebliğ No: 2001/21.
- Anonymous, (2011). FAO: Food and Agricultural Organization of United Nations: Economic and Social Department: Statistical Division. www.fao.org
- Azkan, N., (1994). Yemeklik Tane Baklagiller. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Ders Notları No: 40, Bursa.

Ba F.S., Remy, S. P., Gepts P. (2004). Genetic diversity in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] as revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51:539–550.

Bader O. MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics*. 2013;**13**(5):788-99.

Balcazar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Girones, O. and Muzquiz, L. 2007. Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids. *Comparative Immunol., Microbiology and Infectious Diseases* 30, 111-118.

Barrett, R.P. 1987. Integrating leaf and seed production strategies for cowpea (*Vigna unguiculata*). MSc thesis, Michigan State University, East Lansing, MI, USA.

Beyatlı, Y.A.H., 1982. Yoğurtlardan izole edilen kimi bakterilerin starter olarak seçilme olanakları, Doktora Tezi, A.Ü.Z.F.,Ankara, s.**138**.

Biberoğlu G. Kütle spektrometresi ve tıp alanında kullanımı. *T Klin Tıp Bilimleri* 2003;**23**:491-498

Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J. and Noller, H.F. 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. October*, **75**(10), 4801–4805, USA.

Ceyhan, E. 2007. Yemeklik Tane Baklagiller Ders Notları. Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Konya.

Chen, Y.X., He, Y.F., Yang, Y., Yu, Y.L., Zheng, S.J., Tian, G.M., Luo, Y.M., Wong, M.H., Effect of Cadmium on Nodulation and N₂-Fixation of Soybean in Contaminated Soils, *Chemosphere*, **50**, 781-787, 2003.

Couret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M. and Vernoux, J.P. 2003. Isolation characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait*, **83**, 269–306.

Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;**36**(2): 380-407.

Çakır, İ. 2003. *Lactobacillus* ve *bifidobacter*lerde bazı probiyotik özelliklerin belirlenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, **92**, Ankara.

Çiftçi CY. 2004. Dünyada ve Türkiyede Yemeklik Tane Baklagiller Tarımı. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası Teknik Yayınları Dizisi. No.**5**, Ankara, 88s.

Çon, A. H., ve Gökalp, H. Y. 2002. Afyon'da Büyük Kapasiteli Etçifli işletmelerinde Üretilen Sucuk Örneklerinin Bazı Mikrobiyolojik Özelliklerinin Periyodik Olarak Belirlenmesi. Turk J Vet Anim Sci, **26**, 11-16.

Davis, D. W., Oelke, E. A., Oplinger, E. S., Doll, J. D., Hanson, C. V., Putnam, D.H., 1991. Cowpea. University of Minnesota. Center for Alternative Plant and Animal Products and the Minnesota Extension Service.

Demirci, 2007. Ağrı Yöresindeki Bazı Yoğurt Örneklerinde Çeşitli Bakterilerinin izolasyonu Ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İ.Ç.Ü, **52**, Ağrı

Demiriz, H.: “ Bitki Sistematığı II (Tohumlu Bitkiler) Ders Notları” İstanbul (1965)

Devos, P., 1988. Mercimek ve nohutun besin değeri ve proses sırasındaki değişiklikler (Nutritional value of lentils and chickpeas and changes during processing), Herkes İçin Mercimek Sempozyumu (Lentils for Everyone Symposium) (29-30 Eylül 1988), Marmaris/Muğla, 174-196.

Douglass JF. Tanı ve Aşı Adaylarının Kütle Spektrometrisi ve Proteomik ile Aydınlatılması. (Karabulut HG. çev.) İçinde: Persing DH. Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar. (Tekeli A, Ustaçelebi Ş. çev. ed.) Ankara: Palme Yayıncılık. 2006;307-319.

Dündar, H., 2006. Characterization and purification of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Middle East Technical University, Department of Biotechnology, Ph.D. Thesis, Ankara, **195**.

Dykes, G.A and von Holy A. 1994. Strain typing in the genus *Lactobacillus*. Letters in Applied Microbiology, **19**, 63-66.

Dykhuizen, D.E. 1998. Santa Rosalia revisited: Why are there so many species of bacteria? Antonie Van Leeuwenhoek *International Journal of General and Molecular Microbiology*, **V73**; 25-33.

Ellner, R. (2001). Soru ve cevaplarla Süt Mikrobiyolojisi Çevirenler; Arıcı, M., Demirci, M., Tekirdag.

Erkaya, T., Şengül, M., (2012). A comparative study on some quality properties and mineral contents of yoghurts produced from different type of milks. Kafkas Univ Vet Fak Derg, **18** (2), 323-329.

Erkuş O. Yoğurt kültürlerinin izolasyonu fenotipik ve genotipik karakterizasyonu. Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Fakültesi Doktora tezi, Haziran 2007.

Erkuş, O. 2007. Isolation, phenotypic and genotypic characterization of yoghurt starter bacteria. Yüksek Lisans Tezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, 117, İzmir.

Eser, D., 1978. Yemeklik Dane Baklagiller Ders Notu. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fak. Yayınları, Sf.98. Ankara.

Eşiyok D., Bozokalfa M.K., Kaygısız Aşçıoğlu T., 2012. Türkiye'nin Farklı Bölgelerinden Toplanmış Yerel Börülce (*Vigna unguiculata* L. Walp.) Genotiplerinin Agro-Morfolojik Karakterizasyonu. 9. Ulusal Sebze Tarımı Sempozyumu 12-14 Eylül, Konya s421-427.

Evren, M., Albayram, C., ve Apan, M. 2006. Laktik Asit Bakterilerinin Oluşturduğu Antimikrobiyal Maddeler. Türkiye, **9**, 24-26.

Fang; J., Chao, C.T., Robert, A., Ehler, J.D., 2007. Genetic diversity of cowpea Cowpea (*Wigna unguilata* (L.) Walp. in four West African and USA breeding programs determined by AFLP analysis. Genetic Resources and Crop Evolution 54:1197-1209.

Franca R, Martzotto M, Cremonese S, Rizzotti L, Torriani S. Diversity of *Streptococcus thermophilus* in bacteriocin production: inhibitory spectrum and occurrence of thermophilin genes. Food Microbiology, **1**: 27-33,2013.

Franz, D. R., Jahrling, P. B., Friedlander, A. M., McClain, D. J., Hoover, D. L., Bryne, W. R., and Eitzen, E. M. 1997. Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. Jama, **278**(5), 399-411.

Galvez, A., Abriouel, H., López, R. L., and Omar, N. B. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International journal of food microbiology*, **120**(1), 51-70.

Gezginç Y, Aksoy İ, Kuley E, Özoğlu F. Biogenic amines formation in *Streptococcus thermophilus* isolated from home-made natural yogurt. Food Chemistry **1**: 655-662, 2013.

Giraffa, G., Lazzi, C., Gatti, M., Rossetti, L., Mora, D., Neviani E., 2003. Molecular typing of *Lactobacillus delbrueckii* of dairy origin by PCR-RFLP of protein-coding genes. *International Journal of Food Microbiology*. **82**: 163- 172.

Güven, M.N. (2008). Starter kültür (saf kültür) üretim işletmesi, dizaynı ve fizibilite raporu, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.

Han, X., Zhang, L., Yu, P., Yi H., Zhang, Y., 2014. Potential of LAB starter culture isolated from chinese traditional fermented foods for yoghurt production. *International Dairy Journal*, **34** (2) : 247-71.

Iranmanesh, M., Ezzatpanah, H., Mojgani, N., Torshizi, M.A.K., Aminafshar M., Maohamadi M., (2012). Isolation of lactic acid bacteria from ewe milk, traditional yoghurt and sour buttermilk in Iran. *European Journal of Food Research & Review*, **2**(3), 79-92.

Issazadeh, K., Ali Abadi, M.A., Kazemi Darsanaki, R., Alikhani, F., Dadras, H., Tajehmiri, A., 2013. Isolation, identification and analysis of probiotic properties of *Lactobacillus* spp from traditional yoghurts in North of Iran. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, **7**(4):2965-71.

İzmirli, M. 2010. Prostat kanserinin ELAC2 ve SRD5A2 genlerindeki polimorfizmler ile ilişkisinin araştırılması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, 182, Adana.

Kaya, M., ve Gökalp, H. Y. 2005. The behavior of *Listeria monocytogenes* in sucuks produced with different lactic starter cultures. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **28**(6), 1113-1120.

Keskin, Prof. Dr. H.: “Besin Kimyası”, İstanbul Üniversitesi Yayınları Sıra: 2888. Kimya Fak. No : 47 Fatih Yayınevi Matbaası İST. (1981)

Khiyami MA, Serour EA, Shehata MM, vd. Thermo-aerobic bacteria from geothermal springs in Saudi Arabia. *Afr J Biotechnol*. 2012;**11**:4053–4062

Kılıç, S., 2008. Süt endüstrisinde laktik asit bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi

Kıtazawa H, Yasuyuki I, Uemura J, Kawai Y, Saito T, Kaneko T, Noda K, Itoh T. Augmentation of macrophage functions by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Food Microbiology*. **17**: 109-118, 2000.

Kullen M.J., Sanozky-Dawes, R.B., Crowell, D.C. and Klaenhammer, T.R. 2000. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *J. Appl. Microbiol.*, September, 511-516.

Langyintuo, A.S., Lowenberg-DeBoer, J., Faye, M., Lambert, D., Ibro, G., Moussa, B., Kergna, A., Kushwaha, S., Musa, S., Ntougam, G., 2003. Cowpea supply and demand in West Africa. *Field Crops Research* **82**:215-231.

Larone DH. *Medically Important Fungi*. 5th edn. Washington DC: American Society for Microbiology Press. 2011

Lawes, D. A., D. A. Bond ve M. H. Poulsen. 1983. Classification, origin, breeding methods and objectives. (In: *Faba Bean (Vicia faba L., A Basis for Improvement*, Ed: Hebblethwaite, P.D.), Butterworths, London.

Leblond-Bourget, N., Philippe, H., Mangin, I. & Decaris, B. (1996). 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* *Int J Syst Bacteriol* **46**, 102-111

Lee, S.Y., Vedamuthu, E.R. and Waham, C.J. 1974. An agar medium for the differential enumeration of yogurt starter bacteria. *J. or Milk, Food Tech.*, Vol. **37** (5); pp. 272-276.

Mahalakshmi, V., Ng, O., Lawson, M., Ortiz, R., 2007. Plant genetic resources: characterization and utilization. Cambridge University Press. **5**: 113-119.

Mete, A. 2011. Şalgamdan izole edilen laktik asit bakterilerinin dekarboksilasyon aktivitelerinin belirlenmesi ve biyogen amin üretme yeteneklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, **51**, Sakarya.

Michael E, Stiles W, Holzapfel H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, **36**: 1-29. 1997.

Miller, K.G., Alfonsott, A., Nguyen, M., Crowell, J.A., Johnson, C. D. and Rand, J.B. 1996. A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Neurobiology*, **93**, 12593–12598.

Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj, A., Yadav, M., Jain, S., Marotta, F., Singh, V., Parkash, O. and Yadav, H., 2008. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria, *Journal of Digestive Diseases*, **9**: 190 – 198p.

O’Sullivan, D.J. 1999. Methods for analysis of the intestinal microflora. *Curr Issues Intest Microbiol.*, 2000 Sep;**1**(2), 39-50.

Özden A. Yoğurdun tarihi. *Güncel Gastroenteroloji*, 2: 128-132, 2008.

Özer, B., 2006. Yoğurt Bilimi ve Teknolojisi. Sidas Matbaacılık. İZMİR. 168-169s.

Pasquet R.S. and Baudoin J.P., 2001. Cowpea. In: Charrier A., 1194–1199. Jacquot M., Hamon S. and Nicolas D. (eds), *Tropical Plant* Vaillancourt R.E.,

Polat, S., (2009). Farklı starter kültür kullanılarak üretilen ayranların kalite özellikleri, Çukurova Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Yüksek Lisans Tezi, Adana.

Posteraro B, De Carolis E, Vella A, Sanguinetti M. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. *Expert Rev Proteomics* 2013;**10**(2):151-164.

Prestamo, G., García-Criadoa, B., Vazquez-De-Aldanaa, B.R., De Haro, A. Ve García-Ciudada, A. 2006. "Protein content and phenolic compounds in okara (soya residue) from the preparation of the soya drink", *Aliment.* 378,108–112.

Rasic, J., Kurman, J., 1978. Yoghurt. Technical Dairy Publishing House, Denmark.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977. DNA Sequencing with chainterminating inhibitors. PNAS **74**(12), 5463-5467.

Schiffrin, E.J., Brassart, D., Servin, A.L., Rochat, F. And Donnet-Hughes, A. (1997) Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *American Journal of Clinical Nutrition* **66**, 515S-520S

Singh, B. B., Hartmann, P., Fotokun, C., Tamo, M., Tarawali, S., Ortiz, R., 2003. *Chronica Horticulturae*, 43 (2); 8-12.

Skriver, A., Stenby, E., Folkenberg, D., Runge, M., Bang Jensen, N., 2003. Tools in the development of future starter cultures for fermented milk. In: Proceedings of the IDF seminar on aroma and texture of fermented milk held in Kolding, Denmark, June 2002, IDF Special Issue 0301. ISBN **92 9098 036-2**.s. 55-61.

Stackebrandt, E. and Goebel, B.M. 1994. Taxonomic Note: A Placa for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **44** (4), 846- 849.

Şehirali S. 1988.Yemeklik Dane Baklagiller A.Ü Ziraat Fakültesi Yayınları: 1089, Ders kitabı: 314. 435s

Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Peláez, C., Requena, T. 2007. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *International Dairy Journal*, **17**, 1107–1114.

Tabur, M., IZCILER, M., GUL, F. and KARACAN, I. (2009). Abrasive wear behavior of boronized AISI 8620 steel. *Wear*, 266(11): 1106-1112.

Tamime Ay, Robinson Rk. Introduction in yoghurt. Science and Technology, Pergamon Pres, Great Britain, page 1-5, 1985.

Tamime, A. Y., and Robinson, R. K., 1988. Fermented milks and their future trends. Part II. Technological aspects. *Journal of Dairy Research*, **55**(02), 281-307.

Tamime, A. Y., and Robinson, R. K., 2007. Tamime and Robinson's yoghurt: science and technology. Elsevier.

Tavşanlı, 2015 Geleneksel Tekniklerle Üretilen Yoğurtlardan Ve Doğadaki Bitkisel Örneklerden Yoğurt Kültürlerinin İzolasyonu İdentifikasyonu ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, U.Ü, **85**, Bursa

Tekinşen K.K., Nizamlioğlu M., Bayar N., Telli N., Köseoğlu İ.E., 2008. Konya’ da üretilen süzme (torba) yoğurtların bazı mikrobiyolojik ve kimyasal özellikleri. *Vet. Bil. Derg.* **24**,1: 69-75.

Tokatlı, M. 2013. Ankara Çubuk Yöresi Turşularından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmaları, Teknolojik ve Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi ve Starter Olarak Kullanılma Olanaklarının Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, 183, Ankara.

Trias, R., Bañeras, L., Seguí, E. M., and Romanyó, E. B., 2008. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International microbiology: official journal of the Spanish Society for Microbiology*, **11**(4), 231-236.

TUİK, 2013. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=100 [Erişim: 01.02.2014]

Tunail, N. 2009. Mikrobiyoloji. Danone Enstitüsü Derneği.

Uluocak, Dr. N.: “II Baklagiller. Toprak Korunması ve Yem Niteliği Bakımından Türkiye’nin Önemli Doğal Otlak Bitkileri”, İstanbul Üniv. Orman Fak. Yayınları İ.Ü. Yayın No: 3198, O. F. Yayın No: 358, (1984)

Ünal, N. ve İstanbulluoğlu, E. 2009. İnsan ve sığır kökenli *Staphylococcus aureus* izolatlarının fenotipik ve genetik özelliklerinin araştırılması. Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, **56**, 119-126.

Vural H., Eşiyok D., Duman İ., 2000. Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme). Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 440 s.

Wahr, M.H. and Frank, J.F. 2004. Lactic Acid Bacteria, Standart methods for the examination of dairy products 17th Edition, NW, pp. 235-247, Washington.

Weeden N.F. and Barnard J. 1993. Isozyme Breeding. Science publishers, Enfield, pp. 177–198.

Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics- identification of microorganisms and beyond. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;**93**(3):965-74.

Willinger B, Kienzl D, Kurzai R. Diagnostic of fungal infections. In: Esser K, Kurzai O. The Mycota. Human fungal Pathogens. 2nd edn. Vol **12**. New York: Springer 2014;229-253.

Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, **51**, 221-271.

Yalınay Çırak M. Genomik, Transkriptomik, Proteomik. Durmaz R. IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu 3-7 Eylül 2007, Malatya. Kurs Kitabı: 125-136.

Yıldırım, Z., ve Yıldırım, M. 2000. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin genel karakteristikleri. Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri, VI. Süt ve Süt Ürünleri Tebliğler Kitabı, 247-253.

Yüksekdağ, Z. N., ve Beyatlı, Y. 2009. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Fizyolojik, Biyokimyasal, Plazmit DNA ve Protein Profil Özelliklerinin İncelenmesi. Gıda Dergisi, **34**(2).



EKLER

- EK 1 Gram Pozitif Bakterilerden Genomik DNA İzolasyonu
- EK 2 DNA İzolasyonu Aşamasında Kullanılan Malzemeler
- EK 3 Agaroz Jel Elektroforezi
- EK 4 PCR Saflaştırma Protokolü
- EK 5 PCR Protokolü (Dizi analizi)
- EK 6 Cycle Sekans PCR mix:

EK 1 Gram Pozitif Bakterilerden Genomik DNA İzolasyonu

1. MRS Agar ve M17 Agar besiyerinde 18 saat süre ile geliştirilen hücreler (10 ml) 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir.
2. Pellet 500µl TE tampon içerisinde çözülerek 14.000 g'de 1 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilir.
3. Pellet 500 µl SET tampon içinde çözülür, 50 µl lizozim eklenir ve 30 dakika 37 °C'de inkübe edilir.
4. Hücre süspansiyonu iki mikrosantrifüj tüpüne bölünür. 200 µl TE tampon ve 30 µl %20'lik SDS (her tüpe ayrı ayrı) eklenir. Birkaç kez karıştırılır.
5. 100 µl 5 M NaCl eklenir ve hemen karıştırılır.
6. Eşit hacimde (≈500µ) fenol eklenir ve emülsiyon oluşana kadar iyice karıştırılır. Kısa süre vortekslenir.
7. 14.000g'de 15 dakika santrifüj edilir ve fazların ayrılması sağlanır. (+4°C'de)
8. Kesik uç ile üst faz yeni bir tüpe aktarılır.
9. Eşit hacimde (≈500µl) kloroform/izoamil alkol eklenir ve nazikçe karıştırılır. (Bu basamak 2 kez yapılabilir.)
10. 14.000 g'de 15 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilir ve üst faz yeni tüplere aktarılır.
11. Tüpte bulunan süpernatantın 2 katı kadar hacimde -20°C'de saklanan %100'lük etanolden eklenir.
12. 12.000 rpm'de +4°C'de 15 dakika santrifüj işlemine tabi tutulur.
13. Pellet havada kurutulur.
14. 100 µl TE tampon ya da suda çözülür.
15. DNA saflığı spektrofotometrede (A260/A280 oranı) kullanılarak ölçülür.

EK 2 DNA İzolasyonu Aşamasında Kullanılan Malzemeler

- 1) Sakaroz-EDTA-TrisHCl (SET) Tampon: %20 sakkaroz, 50 mM TrisHCl, pH:7.6
- 2) 10mg/ml RNaz A
- 3) 20mg/ml proteinaz K
- 4) 5mg/ml lizozim
- 5) %20 SDS (otoklavlamak gerekmektedir.)
- 6) 5M NaCl
- 7) %100 etanol

- 8) Fenol (tuz ile doyurulmuş)
- 9) Kloroform/izoamil alkol
- 10) TE tampon

Tris (tris hidroksimetil amino metan) / EDTA (etilen diamin tetra asetik asit)

Tris 21g

EDTA 0.37g

Distile su 100 ml

pH 2N HCl kullanılarak 7,4'e ayarlanır. Sterilizasyon için 121°C'de 15 dakika sıcaklık uygulanır.

SET (sucrose-EDTA-tris HCl) Tampon

Tris HCL 0.788g

EDTA 1,86g

Sakarov 20g

dH₂O 100ml

Mix (50µl): Su 29,75µl, Tampon 10µl, dNTP (2mM) 1µl, F (20pmol) 1µl, R (20pmol)

1µl, MgCl₂ 4µl, Taq 0.25µl, DNA 3µl

EK 3 Agaroza Jel Elektroforezi

Agaroz Jel Hazırlanması

1-Gerekli miktarlarda agaroz tartılır ve erlene koyulur.

Malzemeler	%1'lik 50 ml
Agaroz	1 g
TBE 0.5X	50 ml
EtBr	2 µl

2-Gerekli miktarda TBE eklenir.

3-Hafifçe çalkalanıp mikrodalga fırına koyulur.

4-Mikrodalga fırın örnek kaynamaya başlayana kadar yüksek ayar da çalıştırılır.

5-Aralıklarla erlen mikrodalga fırından çıkarılıp çalkalanır.

- 6-Kaynamaya başladıktan sonra mikrodalga fırın ayarı düşürülür. Tamamen eriyene kadar çalkalanarak ısıtılır.
- 7-EtBr eklenir ve çalkalayarak tüm çözeltiye dağılması sağlanır.
- 8-Trayin çatlamaması için çözelti muslukta biraz soğutulur.
- 9-Traye yavaşça dökülür ve polimerize olması için en az 15 dakika beklenir.

EK 4 PCR Saflaştırma Protokolü

1. Jelden alınan bantların ağırlıkları ölçülür.
2. Üzerine 1:1 oranında (ağırlık:hacim) “membran binding” solüsyonundan eklenir ve 65°C’de eritilir.
3. Kolonlar temiz tüpe takılır ve üzerlerine örnekler yüklenir. 1 dakika beklenilir.
4. 14000 rpm’de, oda sıcaklığında, 1 dakika santrifüj yapılır.
5. Alt solüsyonları dökülür.
6. Kolonlara 700 µl “membran wash” solüsyonu eklenir.
7. 4000 rpm’de, oda sıcaklığında, 1 dakika santrifüj yapılır.
8. Alt solüsyonları dökülür.
9. “Membran wash” solüsyonundan 500 µl eklenerek işlem tekrarlanır.
10. 14000 rpm’de 5 dakika santrifüj yapılır.
11. Kolonlar temiz tüplere takılıp, 25 µl “Nuclease Free” (=DNAaz ve RNAaz’sız su)membrana değmeden tam ortasına bırakılır.
12. 1 dakika bekletilir.
13. 14000 rpm’de, oda sıcaklığında, 1 dakika santrifüj yapılır.
14. Kolonlar atılıp, tüplerin kapakları kapatılır ve +4°C’de saklanır.
15. DNA’nın miktar ve saflığı kontrol edilir.

EK 5 PCR Protokolü (Dizi analizi)

1. PCR ürünü PCR’da 94°C’de 4 dakika denatürasyon gerçekleştirilir.
2. 4 dakikanın sonunda hemen buz üzerine alınarak soğutulur, 1500 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.

PCR protokolü (dizi analizi)

PCR Ürünü	4-5 µl (100-300ng)
Forward Primeri	2,0 µl
**Premix	5,0 µl
ddH ₂ O	x.x µl
Toplam	20,0 µl

PCR ürünü 94°C’de 4 dakika denatüre edilir.

**Premix

10X sequencing reaction Buffer	200 µl
dNTP(I) veya dNTP (G) Mix	100 µl dNTP(I) Mix
ddUTP Dye Terminator	200 µl
ddGTP Dye Terminator	100 µl
ddCTP Dye Terminator	200 µl
ddATP Dye Terminator	200 µl
DNA Polymerase Enzyme	100 µl
Toplam	1100 µl

Hazırlanan karışım bölünerek -20°C’de saklanır.

PCR programı

96° C	3 dakika
96°C 20 sn.	34 döngü
53°C 20 sn	
60°C 4 dakika	

EK 6 Cycle sequencing PCR mix:

BigDye 0.5 μ l

5X Sequencing buffer 2 μ l

DEPC treated water unto 10 μ l

Primer 0.5 μ l

DNA 2 μ l

Thermal cycler conditions

96°C 1 min

96°C 10 sec

50°C 25 sec 25 cycle

60°C 4 min

4°C ∞