

**T.C.**  
**MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Kayhan MANĖ**

**MUŞ YÖRESİNDEKİ YOĞURTLARDAN *LACTOBACILLUS***  
***PLANTARUM* İZOLASYONU VE PLAZMİT İÇERİKLERİNİN**  
**BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MUŞ-2017**

**T.C.**  
**MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Kayhan MANĖ**

**MUŞ YÖRESİNDEKİ YOĞURTLARDAN *LACTOBACİLLUS***  
***PLANTARUM* İZOLASYONU VE PLAZMİT İÇERİKLERİNİN**  
**BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Danışman**  
**Yrd. Doç. Dr. Yusuf ALAN**

**MUŞ-2017**

## FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Muş Alparslan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “Muş yöresindeki yoğurtlardan *Lactobacillus plantarum* izolasyonu ve plazmit içeriklerinin belirlenmesi” adlı tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt eder, tezimin kâğıt ve elektronik kopyalarının Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü arşivlerinde aşağıda belirttiğim koşullarda saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim-Öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

Tezimin/Raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir.

Tezim/Raporum sadece Muş Alparslan Üniversitesi yerleşkelerinden erişime açılabilir.

Tezimin/Raporumun ..... yıl süreyle erişime açılmasını istemiyorum. Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir.

22.05 2017

Kayhan MANĞ

Bu çalışma Muş Alparslan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: MŞÜ16-EMF-G02

## TEZ KABUL TUTANAĞI

### FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Yrd. Doç. Dr. Yusuf ALAN danışmanlığında, Kayhan MANĞ tarafından hazırlanan “Muş yöresindeki yoğurtlardan *Lactobacillus plantarum* izolasyonu ve plazmit içeriklerinin belirlenmesi” konulu bu çalışma 19/04/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Başkan** : Yrd. Doç. Dr. Kerem ÖZDEMİR

İmza :

**Jüri Üyesi** : Yrd. Doç. Dr. Zeynal TOPALCENGİZ

İmza :

**Jüri Üyesi** : Yrd. Doç. Dr. Yusuf ALAN

İmza :

Yukarıdaki imzalar adı geçen öğretim üyelerine aittir.

...../...../2017

**Doç. Dr. Esin KAYA**

**Enstitü Müdürü**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince büyük emeği geçen, bu süreçte sabrını ve bilgilerini esirgemeyen, tez çalışmalarımnda her türlü konuda destek olan, deneyimlerinden çok şey kazandığım değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Yusuf ALAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Sevgisini bizden esirgemeyen ve her zaman destekçimiz olan Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Yrd. Doç. Dr. Hüseyin ALLAHVERDİ 'ye teşekkür ederim. Ayrıca tez aşamasında her türlü destek ve katkılarını esirgemeyen arkadaşım Emrah AGİTOĞLU, Havva KURT, Aytekin Özhan DEMİR, Nimetullah AKÇAN ve Mehmet SÖNMEZ'e teşekkür ederim. Yine, çalışmam boyunca destek ve katkılarını esirgemeyen kuzenim Ebru GÜLTEKİNE ve aileme teşekkür ederim.

Kayhan MANĐ

Nisan, 2017

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

<b>TEŞEKKÜR</b> .....	i
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	ii
<b>ÖZET</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	vi
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	vii
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b> .....	viii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Yoğurt Tanım ve Tarihçesi .....	1
1.2. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri.....	2
1.3. Laktik Asit Bakterilerinin Fermantasyondaki Önemi .....	3
1.4. Laktik Asit Bakterilerinin Sağlık Açısından Yararları.....	4
1.5. Endüstriyel Stater Kültürlerin İşlevi .....	5
1.6. <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	6
1.7. Laktik Asit Bakterilerinin Plazmit Özellikleri .....	9
1.8. Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Direnç Özellikleri .....	11
1.9. Laktik Asit Bakterilerinin Diğer Bakteriler Üzerindeki Etkileri.....	12
<b>2. MATERYAL ve METOT</b> .....	14
2.1. Kimyasallar .....	14
2.2. Yoğurt Örnekleri.....	14
2.3. Besiyeri ve Hazırlanması .....	17
2.4. Çözeltiler ve Hazırlanması.....	18
2.5. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu.....	20
2.6. Laktik asit bakterilerinin ön tanımlanması.....	20
2.6.1. Koloni morfolojisi.....	20
2.6.2. Gram boyama.....	20
2.6.3. Katalaz testi.....	21
2.7. Moleküler Biyoloji Metotları .....	21
2.7.1. Oligonükleotit primerler .....	21

	<b><u>Sayfa</u></b>
2.7.2. Kromozomal DNA izolasyonu.....	21
2.7.3. Polimeraz zincir reaksiyonu.....	22
2.7.3.1. Koloni PCR ( <i>rec A</i> gen PCR) .....	22
2.7.4. Plazmit DNA izolasyonu .....	22
2.7.4.1. Hazır kit kullanılarak yapılan plazmit DNA izolasyonu.....	22
2.7.4.2. Geleneksel plazmit DNA izolasyonu .....	23
2.7.5. DNA'nın jel elektroforezi .....	23
2.8. İzolatların Stoklanması .....	24
2.9. İzolatların Antibiyotiklere Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi.....	24
2.9.1. Disk difüzyon metodu.....	25
2.10. İzolatlarının Diğer Mikroorganizmalar Üzerindeki Etkileri.....	25
<b>3. BULGULAR ve TARTIŞMA.....</b>	<b>26</b>
3.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması .....	26
3.1.1. İzolatların morfolojik ve biyokimyasal olarak tanımlanması .....	27
3.1.2. İzolatların <i>rec A</i> gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılması.....	28
3.2. Plazmit İzolasyonu ve Antibiyotik Direnç Özellikleri.....	33
3.2.1. <i>L. plantarum</i> izolatlarından plazmit izolasyonu.....	33
3.2.2. İzolatların antibiyotik direnç özellikleri.....	34
3.3. İzolatların Diğer Mikroorganizmalar Üzerindeki Etkileri .....	39
<b>4. SONUÇ ve ÖNERİLER .....</b>	<b>44</b>
<b>5. KAYNAKLAR .....</b>	<b>46</b>
<b>6. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>55</b>

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

## MUŞ YÖRESİNDEKİ YOĞURTLARDAN *LACTOBACILLUS PLANTARUM* İZOLASYONU VE PLAZMİT İÇERİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Kayhan MANĞ

Tez Danışman: Yrd. Doç. Dr. Yusuf ALAN

2017, 55 Sayfa

Bu çalışmada, Muş'un farklı bölgelerinden rastgele toplanan 117 doğal yoğurt örneklerinden izole edilen *Lactobacillus plantarum* izolatları biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanmıştır. Moleküler tanımlama *recA* gen dizisi kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu metodu ile yapılmıştır. Tanımlanan 40 *L. plantarum* izolatının plazmit DNA izolasyonları yapılmıştır. *L. plantarum* izolatlarının hiçbirinde plazmit varlığı saptanmamıştır. İzolatlarda antibiyotik dirençliliği ortaya koymak üzere Eritromisin (10µg), Kanamisin (30µg), Penisillin (10µg), Kloramfenikol (30µg), Gentamisin (10µg) ve Trimetoprim (25µg) antibiyotikleri kullanılmıştır. *L. plantarum* izolatlarının eritromisin (% 50), kanamisin (% 100), penicilin (% 87.5), kloramfenikol (% 75), gentamisin (% 87.5) ve trimetoprim'e (% 87.5) karşı direnç gösterdikleri tespit edilmiştir. İzolatlarda antibakteriyel etkilerini belirlemek için *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus megaterium* DSM 32, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 ve *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883 bakterileri kullanılmıştır. İzolatlar en fazla antibakteriyel etkiyi *Enterobacter aerogenes* gösterirken en az etkiyi ise *Bacillus subtilis* karşı gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen verilere göre; plazmit içermeyen, antibiyotiklere karşı duyarlı ve patojen mikroorganizmalar üzerindeki etkilerine bakıldığında 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 29, 32, 34, 38 nolu *L. plantarum* izolatlarının gıda endüstrisinde kullanılabilir olduğu düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Laktik Asit Bakterileri, *Lactobacillus plantarum*, Moleküler Tanımlama, Plazmit, Antibiyotik Dirençlilik, Antibakteriyel Etki



## ABSTRACT

Master's Thesis

### ISOLATION OF LACTOBACILLUS PLANTARUM FROM YOGHURT IN MUS REGION AND DETERMINATION OF PLASMID CONTENT

#### PLAZMID PROFILES

Kayhan MANĖ

Supervisor: Assit. Prof. Dr. Yusuf ALAN

2017, Page: 55

In this study, *Lactobacillus plantarum* strains were isolated from yoghurt and identified with biochemical and molecular methods. Samples were collected from different regions of Mus. The presence of *recA* gene was targeted for PCR analysis. Plasmid content were determined for the *recA* confirmed 40 *L. plantarum* isolates. No plasmid was detected from any of isolates. Erythromycin (10 µg), kanamycin (30 µg), penicillin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), gentamycin (10 µg) and trimethoprim (25 µg) antibiotics were used to demonstrate antibiotic resistance of isolates. *L. plantarum* isolates showed resistance to antibiotics as follows: erythromycin (50%), kanamycin (100%), penicillin (87.5%), chloramphenicol (75%), gentamycin (87.5%) and trimethoprim (87.5%). *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus megaterium* DSM 32, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, and *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883 were used to determine antibacterial effects of isolates. Isolates affected the growth of *Bacillus subtilis* the least and the growth of *Enterobacter aerogenes* the most. Based on plasmid content, antibiotic resistance, and antibacterial effect, isolate 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 29, 32, 34, and 38 are considered as suitable strains for industrial purposes.

**Keywords:** Lactic Acid Bacteria, *Lactobacillus plantarum*, Molecular Description, Plasmid, Antibiotic Resistance, Antibacterial Effect.

## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

<b>Çizelge 1.1.</b> Laktik asit bakterileri tarafından fermente edilmiş gıdalar .....	3
<b>Çizelge 2.1.</b> Muş yöresinin farklı köylerinden toplanan yoğurt örneklerinden izole edilen ve tanımlanan.....	14
<b>Çizelge 2.2.</b> Laktik asit bakteri kültürleri için kullanılan M17 ve MRS besi ortamlarının kompozisyonu.....	17
<b>Çizelge 2.3.</b> Laktik asit bakteri kültürleri için kullanılan Nutrient Agar besiyerlerinin kompozisyonu.....	18
<b>Çizelge 2.4.</b> <i>L. plantarum</i> 'ların <i>recA</i> genlerinin tanımlanması için kullanılan primerlerin nükleotid.....	21
<b>Çizelge 2.5.</b> Antibiyotikler ve konsantrasyonları.....	24
<b>Çizelge 3.1.</b> Farklı bölgelerden toplanan yoğurt örneklerinden elde edilen <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	26
<b>Çizelge 3.2.</b> Laktik asit bakterilerinin morfolojik ve biyokimyasal sonuçları.....	28
<b>Çizelge 3.3.</b> Doğal yoğurtlardan izole edilen <i>L. plantarum</i> suşların antibiyotik dirençlilikleri... ..	36
<b>Çizelge 3.4.</b> Standart antibiyotiklerin karşılaştırma değerleri .....	38
<b>Çizelge 3.5.</b> Doğal yoğurtlardan izole edilen <i>L. plantarum</i> suşlarının direnç-duyarlılık durumlarının standart antibiyotiklerle karşılaştırması .....	38
<b>Çizelge 3.6.</b> Doğal yoğurtlardan izole edilen <i>L. plantarum</i> suşların diğer bakterilere karşı dirençlilikleri.....	41

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

<b>Şekil 2.1.</b> Yoğurttan izole edilen LAB'ların MRS besi ortamında aktifleştirilmesi.....	20
<b>Şekil 3.1.</b> MRS agar petrilere aşılana Lactobasillus'a ait koloni görüntüsü.....	27
<b>Şekil 3.2.</b> Yoğurttan izole edilen <i>L. plantarum</i> (31 ve 20 nolu izolat) suşunun gram boyama görüntüsü.....	27
<b>Şekil 3.3.</b> Doğal yoğurtlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin (1-18. izolatlar) PCR ile çoğaltılması.....	32
<b>Şekil 3.4.</b> Doğal yoğurtlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin (19-36. izolatlar) PCR ile çoğaltılması.....	32
<b>Şekil 3.5.</b> Doğal yoğurtlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin (37-50. izolatlar) PCR ile çoğaltılması.....	32
<b>Şekil 3.6</b> İzolatların antibiyotik direnç özelliklerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi sonucu elde.....	35
<b>Şekil 3.7</b> İzolatların diğer bakteriler üzerindeki direnç özelliklerinin oyuk agar metodu sonucu elde edilen.....	40

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>A</b>	:	Adenin
<b>AFLP</b>	:	Çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi
<b>Bç</b>	:	Baz çifti
<b>°C</b>	:	Santigrad derece
<b>Cm</b>	:	Santimetre
<b>C</b>	:	Sitozin
<b>CO<sub>2</sub></b>	:	Karbondioksit
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	:	Distile su
<b>Dk</b>	:	Dakika
<b>DNA</b>	:	Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP</b>	:	Deoksi nükleotid trifosfat
<b>EDTA</b>	:	Etilen diamin tetra asetik asit
<b>Et-Br</b>	:	Etidium bromür
<b>F</b>	:	Fertilite
<b>G</b>	:	Guanin
<b>Gr</b>	:	Gram
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	:	Hidrojen peroksit
<b>Kb</b>	:	Kilobaz
<b>LAB</b>	:	Laktik asit bakterileri
<b>M</b>	:	Markör
<b>µl</b>	:	Mikrolitre
<b>ml</b>	:	Mililitre
<b>PFGE</b>	:	Pulsed Field Gel Electrophoresis
<b>R</b>	:	Dirençli
<b>RPM</b>	:	Dakikada devir
<b>Sp</b>	:	Tür
<b>Ssp</b>	:	Alt tür

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Yoğurt Tanım ve Tarihçesi

Yoğurt, sütün fermentasyonu ile oluşan bir besindir. Fermentasyon çok eski tarihlerden beri kullanılan besin saklama tekniğidir. Fermentasyon süreci kendiliğinden oluşabilir ve birçok besinin üretiminde kullanılır. Fermentasyonu mikroorganizmaların belirli bir kısmı gerçekleştirir. Bunları laktik asit bakterileri, maya, küf şeklinde sınıflandırabiliriz. Laktik asit bakterileri sütün şekerini aside dönüştürerek ekşitirler. Asitli ortamda sütün katılaştığı gibi zararlı bakterilerin çoğalması engellenir. Yoğurt; inek sütü, koyun sütü, keçi sütü, manda sütü ve pastörize sütlerden birinin veya birkaçının karışımının gerektiğinde sütün tozu eklenmesiyle homojenize hale getirilip, *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus*'un etkisiyle laktik asit fermentasyonuna yoğurt yapım kurallarına uyarak oluşan üründür (Anonymous, 1999).

Yoğurt; isteğe bağlı katkıları sütün tozu, yağlı sütün tozu, peynir altı suyu tozu vb eklenerek sütün ve sütün ürünlerinde *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*'un faaliyetiyle oluşan, laktik asit fermentasyonu ile elde edilen koagüle olmuş sütün ürünüdür (Rasic ve Kurman, 1978).

Fermente sütün ürünlerinin ortaya çıkış etkenlerinden biri, oda sıcaklığında sütün kısa sürede bozulması ve besleyici değeri yüksek bir gıda maddesi olan sütün muhafaza süresini uzatmaktır. Sütün çeşitli mikroorganizmaların yardımıyla fermentasyon sonucunda yoğurt ve diğer fermente ürünlerine dönüşmektedir (Petti ve ark, 2001). Yoğurt, fermente bir sütün ürünü olup, ilk olarak Orta Asya'da Türkler tarafından yapıldığı tahmin edilmektedir. Bazı kaynaklarda da menşenin Balkanlar olduğu belirtilmiştir (Rasic ve Kurmann, 1978; Tamime ve Robinson, 1985).

Günümüzde yoğurt, en çok kullanılan fermente sütün ürünü olarak ortaya çıkmıştır. Kuzey Amerika, Avrupa, Asya ve Orta Doğu ülkelerinde yoğun olarak üretilmektedir (Pourahmad ve Assadi, 2007). Yoğurt diğer ülkelerde genelde son asır içinde tanınmış ve tüketimi çok fazla artmıştır. Bazı hastalıkları iyi geldiği bilimsel olarak açıklanınca yoğurda olan talep artmış ve yoğurt tüketimi dünyada iyice yaygınlaşmıştır. Yoğurt, dünyanın her bölgesinde bilinen, farklı tatlarda ve özellikle yapılan, her ülkede tüketimi hızla artan önemli bir gıda maddesi olmuştur (Yaygın, 1999).

## 1.2. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri

Güvenli bakteriler olarak da bilinen laktik asit bakterileri koruyucu kültürlerin özelliklerini bulundurlar. Gıda kökenli zararlı mikroorganizmaları inhibe etmek ve raf ömrünü uzatmak için, gıdanın duyuşal özelliklerinde değişime neden olmayan antagonistik kültürle koruyucu kültürler denir. Bazı gıdalarda doğal olarak bulunan ve başlangıç olarak kullanılan birçok laktik asit bakterisinde antagonistik etki; diğer mikroorganizmalarla besin için yarışarak ya da asetik, propiyonik ve laktik asit gibi organik asitler, hidrojen peroksit, antimikrobiyal enzimler, diasetil ve bakteriyosinler gibi bir veya daha fazla antimikrobiyal aktiviteye sahip maddeler üretmelerinden kaynaklanmaktadır (Työppönen vd., 2003; Devlieghere vd., 2004).

Laktik asit bakterileri (LAB) oynadığı önemli roller nedeniyle fermente gıdalarda ve içeceklerin üretiminde çok eski tarihlerden itibaren güvenli bir şekilde kullanılmaktadır (Caplice ve Fitzgerald, 1999). Genetik farklılıklarına rağmen bu grubun genel özellikleri gram pozitif, hareketsiz ve spor oluşturmeyen formda olmalarıdır. LAB türleri katalaz ve sitokrom üretmezler, anaerobik olarak gelişmelerine rağmen oksijene karşı toleranslıdırlar. LAB'larda saptanan bu özellikler sayesinde, doğal çevrede geniş bir alana yayılmışlardır. Fermente ettikleri karbonhidratlardan laktik asit ağırlıklı son ürünler elde ederler (Wright ve Bruce, 2003).

Laktik asit bakterileri iki familya da toplanmıştır. Streptococcaceae familyası ait *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* cinsleri bulunurken, Lactobacillaceae familyası ait *Lactobacillus* cinsi vardır (Daeschel, 1989). LAB'ların çoğunluğu biyosentez yapamadığından heterotrofik organizmalardır. Bu sebeble çoğu türler, gelişme faktörü olarak çeşitli aminoasitler, nükleotidler, peptitler, vitaminler, yağ asitleri, mineralleri ve karbonhidratlara gerek duymaktadır (Reddy vd., 2008). LAB'lar buldukları ekosistemde özellikle heterofermantatifler. Tipik LAB türleri *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. paralimentarius* ve *L. sanfranciscensis*'lerdir. Fermantasyonda LAB varlığı belirli çevresel ve teknolojik şartlara bağlıdır (De Vuyst vd., 2014).

LAB türleri gıda fermentasyonunda starter kültür olarak rol alması yada ham materyalde doğal olarak bulunmasıyla koruyucu bir etki göstermektedir. LAB insan ve hayvanların sindirim sisteminde bifidobakterilerle bulunmakta ve probiyotik özelliği

ortaya çıkarmakta, canlılığın sağlığını korumada birlikte etki göstermektedir (Ammor vd., 2008).

**Çizelge 1.1.** Laktik asit bakterileri tarafından fermente edilmiş gıdalar (Ross vd., 2002)

<b>Mikroorganizma</b>	<b>Fermente ürünler</b>	<b>Besin</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Oenococcus oeni</i>	Şarap, Bira	Üzüm, Tahıl, Şerbetçiotu
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ekmek,	Buğday, Çavdar
<i>Lactococcus (cremoris, lactis)</i> ,	İsviçre tipi peynir	Süt
<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Yoğurt	Süt
<i>Lactococci, Lactobacillus</i>	Kefir	Süt
<i>Pediococci, Lactobacillus sakei</i> <i>Lactobacillus curvatus</i>	Fermente etler	Sığır ve Tavuk eti
<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Lahana turşusu	Lahana
<i>Lactobacilli</i> , <i>Thiobacillus halophilus</i>	Soya sosu	Soya fasulyesi, Buğday
<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactococcus cremori</i>	Sebzeler	Sebzeler
<i>Carnobacterium piscicola</i>	Balık	Su ürünleri

### 1.3. Laktik Asit Bakterilerinin Fermantasyondaki Önemi

İnsan ve hayvanların beslenmesinde Laktik asit bakterileri ile fermente edilen gıdalar ve yemler önemli bir yer tutmaktadır. Beslenme, sağlık ve gıdaların korunmasında temel rol üstlenen LAB'ın dünya gıda üretimindeki önemi nedeniyle çok fazla araştırmaya konu olmuştur (Siezen vd., 2002).

Laktik asit bakterilerinin gelişimi ile birlikte oluşan asidifikasyon ve enzimatik işlemler çeşitli fermente gıdaların tat, koku, tekstür özelliklerine etki etmektedir. Tüketiciler tarafından çok kullanılan fermente gıdaların florasına da baskın halde olmaları, ekzopolisakkarit üretmeleri, starter kültür olarak kullanılmaları, probiyotik maddelere katılmaları, önemli bir kısmının bakteriyosin üretmeleri ve böylece gıdalara raf ömürlerini uzatacak etkenleri kazandırmaları, bu bakterilere olan ilgiyi çok artırmış ve bu konu ile ilgili yapılan çalışmalar yoğunlaşmıştır (Rebecchi vd., 1998).

Bu etkenlerden dolayı laktik asit bakterilerini tanımlamak gerek endüstriyel açıdan gerekse bilimsel açıdan oldukça önemli hale gelmiştir (Rademaker ve Brujin, 2000).

Gıdaların ve bazı alkollü içeceklerin üretiminde uzun süredir kullanılmasının yanında, son yıllarda çok çeşitli fermente ürünlerin üretiminde rol oynayan en önemli endüstriyel mikroorganizmalardır. Dünyada tüketilen fermente süt ve et ürünleri, farklı sebzelerden yapılan turşular laktik asit fermentasyonu ile hazırlanmakta ve korunmaktadır (Andersson, 1989; Mayra-Makinen ve Biret, 1993).

#### **1.4. Laktik Asit Bakterilerinin Sağlık Açısından Yararları**

Gıdalarda fermentasyon sonucu besin değerlerinde faydalı değişimler meydana gelmekte ve esansiyel aminoasit miktarında artış gözlemlenmektedir. Fermente süt ürünlerinin diğer bir faydası da laktoz intoleransı olan insanların süt ürünlerini tüketebilmesidir. Laktik asit bakterileri tarafından fermente edilen gıdalar inkoroner kalp damar hastalıklarının en büyük etkenlerinden biri olan kolesterole olumlu bazı farklılıklara neden olduğu varsayılmıştır. Yalnız bu konuyla ilgili ekstra veri bulunmadığı için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır. Buna ilaveten laktik asit bakterilerinin immün sisteminin sitümile ettiği imminoglobulin-A ve gama interferon üretimini destek olduğu belirtilmiştir. Bundan dolayı insan vücudunun patojenlere karşı direncini ve antitümör aktivitesini hızlandırdığı belirtilmektedir. Fermente gıdalarla birlikte sindirim sistemine alınan laktik asit bakterileri bağırsakta bulunan  $\beta$ -nitroredüktaz, glukuronidaz, azoredüktaz gibi enzimlerin aktivesini indirgendiği açıklanmıştır. Bu enzimler prokarsinojen maddeleri karsinojen yapıya döndüren enzimlerdir. Bu nedenle enzimlerin aktivitesindeki daralma antikarsinojenik etki meydana getirmektedir (Ünlütürk ve Turantaş, 1998).

Yoğurt bakterileri, doğal bir antibiyotik olarak bilinen nisin ile birlikte yine antimikrobiyel aktiviteye sahip olan laktik asiti üretirler ki bunlar; *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* ve *Candida*'ya karşı aktiftirler. Bu bakteriler, zararlı mikroorganizmalara karşı bağırsak sisteminde kolonize olmaktadır. Yoğurt bakterilerinin yarışçıl aktivitesi ve oluşan antimikrobiyel maddeler nedeniyle, ürogenital ve gastrointestinal hastalıklara sebep olan enfeksiyonlara karşı koruyucu etkisi vardır. (Petti vd., 2001).

İnsan sağlığı açısından gıdalarla birlikte alınması gereken probiyotik hücre sayısı 108 hücre/gün'dür. Bu probiyotiklerin sindirim sisteminden tüm vücuda dağılması söz konusudur. Düşük pH ve yüksek tuza olan toleranslarından dolayı önemli seçici kriterlere sahiptirler. Probiyotik kültürler, bağırsaktaki epitel hücrelere yerleşir, zararlı bakterilerle



şavaşarak immün sistemi desteklerler (Klinberg vd., 2005). Yoğurt bakterileri B12 vitaminini de sentezlediği, doku hasarı yapan, kanser başlamasına sebep olan bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır (Tamime ve Robinson, 1985).

Fermentasyon sonucunda oluşan laktik asit, midenin asit seviyesini dengelemesinin dışında, protein ve demirin özümlemesinde etkili rol oynamaktadır. Kanser tedavisine yardımcı olması nedeniyle düzenli bir şekilde fermente ürünlerin tüketimi bazı araştırmacılar tarafından tavsiye edilir (Schoneck ve Kaufmann, 1998; Fallon ve Enig, 1999).

### **1.5. Endüstriyel Starter Kültürlerin İşlevi**

Fermente süt ürünlerinin yüksek kalite ve standartlarda üretilebilmesi starter kültürlerinin kullanımına bağlıdır. Starterler kültürler oluşan ürüne istenen aroma, tat, ve koku gibi özellikleri kazandırmak, kaliteli ürün yapmak amacıyla kullanılan ve bilinen özelliklere sahip mikroorganizmalardır. Ülkemizde yüksek teknolojiye sahip işletmeler yoğurt üretiminde starter kültürleri yurt dışından temin etmekte, aile işletmeleri ve küçük işletmelerde starter olarak modern işletmelerin ürettikleri yoğurtları kullanmaktadır. Yurt dışı kökenli ticari kültürler, farklı özellikleri olan suşlardan oluşmakta ve bu suş farklılıkları yoğurt kalitesine önemli ölçüde etkilemektedir (Ayad vd., 2000).

Endüstride üretilmiş starter kültürler süt ürünlerinde ortalama 100 yıldır kullanılmaktadır. Fermente gıdalar genelde süt, et, meyve ve sebze gibi farklı çiğ tarımsal ürünlerden elde edilmektedir. Bugün gıda üretim endüstrisinde başta laktik asit üretimi, aroma oluşturma gücü, proteolitik aktivite, faj dirençliliği gibi özelliklerine göre seçilmiş starter kültürler kullanılmaktadır (Wouters vd., 2002). Starter kültürlerin kullanımı proteolizisi ve karbonhidrat fermentasyonunu geliştirirken patojen mikroorganizmalara karşı da ürünü korumaktadır (Dinsmore ve Klaenhammer, 1995; Garvey vd., 1995).

İnsanların doğal ürünlere olan ilgisinden dolayı, kimyasal korumada kullanılan nitrit, sülfat ve nitratların yerine laktik asit bakterileri veya fonksiyonel starter kültürlerin kullanımı gibi bazı yeni alternatif korunma yöntemlerinden gıdaların raf ömürlerinin uzatmak için çok fazla tercih edilmektedirler. Yoğurt, peynir, kefir gibi süt ürünlerinde ve bazı salam, sosis ve ekmek gibi fermente ürünlerin oluşumunda starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterileri önemli bir grubu oluşturmaktadır. Bu

grupta bulunan bakteriler proteoliz, asidifikasyon ve aroma oluşumunda çok fazla sayıda fonksiyonel ve teknolojik özelliklere sahiptirler. Laktobasillerden, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. reuteri*, *L. casei subsp. casei*, *L. gasseri* ve *L. rhamnosus* ile Bifidobakterilerden, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* *B. adolescentis*, gibi gelişmiş birçok ülkede probiyotik karakteristikleri bilinen laktik asit bakterilerinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır (Gürsoy ve Kınık, 2006). Fermantatif özelliklerinin iyi bilinen laktik asit bakterileri fermente ürün oluşumunda starter kültür olarak kullanılmakta ve fermente gıda üretiminde önemli bir işlev üstlenmektedirler (Wouters vd., 2002).

Stater kültürde bakteri oranlarının dengelenmesi gerekir. Çünkü insanlarda D-Laktat-DH enzimine sahip değildirler. Bunun için D (-) laktik asidin günlük alımı sınırlandırılmıştır. İnsanda fazla miktarda D (-) laktik asit kanda pH düşüşüne yol açan asetoza sebep olur. Bu genellikle süt çocukları için tehlike yaratır. Bu nedenle dünya sağlık örgütü L (+) laktatın günlük alımında hiçbir sınırlama getirmezken, süt çocukları için de 20 mg/kg vücut ağırlığı ve erişkinlerde D-izomeri için 100 mg/kg vücut ağırlığı limitlerini önermektedir. Stater kültürlerin metabolik aktivitelerine veya oranına bağlı olarak az asitli (% 0,8 laktik asit), yumuşak lezzetli veya yüksek asitli (% 1,3 laktik asit), kuvvetli tat ve aromaya sahip yoğurtlar üretilebilir. Yoğurdun lezzeti kültüre bağlı olarak ayarlanabilir. Düşük sıcaklık ve kısa süreli inkübasyonda ortama streptokoklar hâkim olup az asitli ürünler elde edilirken; yüksek inokülasyon miktarı, yüksek inkübasyon sıcaklığı, uzun inkübasyon süresiyle laktobasiller ortama hâkim olur ve buna bağlı olarak da laktik asit miktarı artar (Riemelt, 1996; Robinson, 1999).

### **1.6. *Lactobacillus plantarum***

*L. plantarum*, ilk izole edildiğinde *Streptobacterium plantarum* olarak tanımlanmıştır. Genellikle çubuk şeklinde, uç kısımları yuvarlak; 3–8 µm uzunlukta ve 0,9– 1,2 µm enindedir. Mikroskopik görünümü tekli, ikili veya kısa zincir halindedir. Gelişme sıcaklığı genellikle 45°C’de olmakla birlikte, 15°C’de gelişebilmektedir. Gelişim gösterdiği optimum sıcaklığı 30–35°C’dir. *L. plantarum* suşları, genellikle glikoz azlığında kalataz aktivitesi görülmektedir. Hücre duvarları gliserol veya ribitol taykoik asit içermektedir. *L. plantarum* suşları fakültatif heterofermantatif olup; früktoz, galaktoz, amigdalin, selibiyoz, eskülin, glikoz, glukonat, laktoz, maltoz, rafinoz, riboz, salisin, mannitol, mannoz, melibiyoz, sorbitol, sakkaroz ve trehalozu fermentasyona uğratar. Karbonhidratlar dışında suşların büyük bir kısmı arabinoz, melezitoz ve ksilozu

da fermente ettiği gör÷lmektedir. Anaerobik koşullarda, karbonhidratlardan DL laktik asit üretmektedir. Flagella ve hareketlilik yoktur. Kolonileri 2–5 mm çapta, yuvarlak, beyaz, mat, bazende açık veya koyu sarı olarak gör÷lmektedir. Suşlar fr÷ktoz 1,6-difosfat aldolaz enzimine sahiptir. Glukonatlı besiyerinde CO<sub>2</sub> oluşturarak gelişmektedir. Ribozu 1 mol asetik asit ve 1 mol laktik aside çevirmekte, diğer pentozları da fermente etmektedir. Gelişim için niasine ve Ca pantotenat dışında; B12 vitamini, folik asit, Tiyamin, piridoksal-piridoksamin, tiyamidin ve deoksiriboza ihtiyaç duymamaktadır. Riboflavine ise genellikle gereksinimi yoktur (Kandler ve Weiss, 1986; Kılıç, 2008; Todorov ve Franco, 2010).

*L. plantarum*, doğada s÷t ve s÷t ürünleri, et ve et ürünleri, turşu, silaj ile insan dudağı ve sindirim sisteminden, fermente olmuş bitkilerden izole edilebilmektedir (Yeğin vd., 2008; Gheytauchi vd., 2010). Ayrıca ekşi hamurda *P. pentosaceus*, *L. plantarum*, *W. cibaria* ve *L. brevis*, türlerinin baskın olarak gör÷len LAB türleridir. Genetik çalışmaların yoğunlaştığı son yıllarda *L. plantarum* suşları gıda fermentasyonunda kullanılmaktadır (Duckworth vd., 1993). Aynı zamanda ürettikleri birleşikler antimikrobiyal etki göstererek Gram (+) ve Gram (–) bakterilerin gelişmelerini engellemektedirler (Lash vd., 2005).

Glikoz, fruktoz, laktoz ve s÷kroz'un laktik aside dönüşümünde en çok kullanılan bakterilerin başında gelir. Yalnızca yüksek dönüşüm oranlarında karbonhidratları değil ayrıca pektin gibi bileşikleri içeren bitkisel ür÷nlerde de kullanılmaktadır (Demir vd., 2006). Yüksek asit toleransına sahip olduğu için *L. plantarum* diğer laktik asit bakterilerine nazaran meyve ve sebze fermentasyonunu tamamlayan bakteridir. Lahana ve salatalık fermantasyonunda mikrobiyal dengenin sağlanmasında ve son ürünün kalitesinde önemli bir etkiye sahiptir (Lu vd., 2003).

Probiyotik aktivite gösteren türler içerisinde *L. plantarum* da bulunmaktadır. Probiyotikler kommensal ve patojen kolonilerin konak dokulara bağlanması sırasında önemli bir rol almaktadır. Konak seçiminde bu bakteriler büyük bir öneme sahip olduğu belirtilmiştir. Bazı *L. plantarum* suşları pirüvat dehidrojenaz kompleks birleşeni olan pirüvat dehidrojenaz el beta alt biriminin bağlanmasında yardımcı olduğunu tespit edilmiştir (Vastanoa vd., 2014).

İnsan tükürüğünden izolasyonu yapılan *L. Plantarum*'un suşlarının kromozomal DNA'sı incelenmiştir. Araştırmalar sonucunda dizi analizi kromozomal DNA'nın 3308

274 bç uzunlukta olduğu ve bu bazların yaklaşık 3,052 adet protein kodlayan gen oluşturduğu varsayılmaktadır. Genlerin taşıyıcı ve düzenleyici işlevleri nedeniyle *L. plantarum* bakterileri doğada yaygın olduğu bildirilmiştir. Genlerin faaliyetleri üzerine yapılan bu çalışmada, *L. plantarum*'un çevre ile etkileşimi üzerinde de durulmuştur. Araştırmalarda elde edilen bulgular, *L. plantarum*'un farklı stres koşullarına adaptasyonunu sağlayan proteinleri ürettiğini ve böylece alkali, asidik, sıcak, soğuk, hiperozmotik ortam koşullarında canlılığını sürdürdüğü varsayılmaktadır. Aynı zamanda, kümeleşmeyi teşvik, mukozaya bağlanma, yüzeylere tutunma, gibi birçok özelliğinin de proteinlerden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (Sağlam, 2013).

Gen haritası tümüyle açıklanmış ve genlerin işlevleri büyük ölçüde aydınlatılmış olan *L. plantarum*'un diğer laktobasil türlerinden ayrılmasında laktik asit konfigürasyonu, besin elementi gereksinimi, arjinin hidrolizi, belirli sıcaklıklarda gelişme ve karbonhidrat fermentasyon özelliklerinden yararlanılmaktadır. Bunların dışında (DNA) nın yapısı, peptidoglikan yapısı, L-laktat dehidrogenazdaki değişkenlik, türe dayalı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi (AFLP), rastgele arttırılmış polimorfik DNA-PCR (RAPD-PCR), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ve restriksiyon enzimi analizleri de tanıda büyük öneme sahiptir. Bakterilerin sınıflandırılmasında ve türlerin tanısı amacıyla genotipik ve fenotipik yöntemler birlikte kullanılmalıdır. Bunun nedeni, genotipe dayanan tanının ,fenotipik yöntemlerin göre daha kesin sonuç vermesidir (Karahan vd., 2010; Todorov ve Franco, 2010). Fermente ürünlerinin çoğunun oluşumunda doğal olarak yer alan *L. plantarum* suşlarına bu özelliği nedeniyle başlatıcı kültür olarak kullanılmaktadır (Karahan vd., 2010).

Fermente ürünlerin üretiminde genellikle probiyotik özellik taşıyan ve bağırsak kökenli *L. plantarum*'un kullanılması gelişen bir yaklaşımdır. Yalnız bu amaçla kullanılacak bakterilerin oksijene tolerans ve tuza direnç, farklı sıcaklıklarda gelişme gibi özelliklerinin araştırılması gerekmektedir, çünkü bu koşullar probiyotik suşların gelişmesini engellediği saptanmıştır. Ayrıca başlatıcı kültür olarak kullanılacak *L. plantarum* suşlarının çeşitli karbonhidratları fermente etme özelliği, antibiyotiklere direnç, asitli ortamlarda gelişebilme, laktik asit, ekzopolisakkarit ve bakteriyosin üretimi, ve patojenlerin engellenmesi gibi endüstriyel açıdan önemli olan özellikleri de

araştırılmaktadır. Bunun yanında ürün kalitesine etkileri ve depolama sürecinde kültürlerin canlılık düzeyi de incelenmektedir (Sağlam, 2013).

### **1.7. Laktik Asit Bakterilerinin Plazmit Özellikleri**

Plazmit tabiri, ilk olarak Joshua Lederberg tarafından 1952 yılında kromozom dışı genetik parçalar için kullanılmıştır. Yalnız plazmitleri Chassy ve arkadaşları ilk defa 1976'da gözlemlemiştir. Plazmitler; kromozom DNA'dan bağımsız, sitoplazma içinde, farklı sayılarda, bakteri kromozomal DNA'sına oranla çok daha küçük boyutta olan halka şekilli çift polinükleotit ipliğinden oluşmuş DNA molekülleridir. Aynı zamanda doğrusal plazmitlere de rastlanmaktadır (Pouwels ve Leer, 1993; Wright vd., 2004; Tunail, 2009; Yüksekdağ ve Beyatlı, 2009).

Bazı maya ve mantarlara, bakterilerde, özgü kromozomlardan ayrı olarak bulunan bir başka kalıtsal yapıya plazmit denilmektedir. Temelde plazmitler genomik DNA'dan ayrılarak oluşan sirküler kalıtsal yapılardır. Hücre bölüneceği zaman kromozomlarda ki DNA gibi plazmitler de replike olur. Sarmal ve sirküler yapıya sahip bir plazmit bakteri kromozomunun % 0,2- 4,0'ü kadar büyüklüktedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bazı plazmitlerin lineer bir yapı gösterdiği gözlenmiştir (Brown, 2000).

Bakterilerin ve mayaların fermentasyon özellikleri sadece kromozom üzerindeki genlerden ibaret değildir. Bakteriler, diğer mikroorganizmalardan zamanla genetik materyal olan plazmitleri kazanabilmektedirler. Bu türden plazmitler lezzet sebebi olarak tarif ettiğimiz metabolitleride üretebilecekleri gibi bakterilere olumsuz şartlarda dayanıklılık sağladıkları genleri de bulundurmaktadırlar. Plazmitler aminoasit metabolizması, glikoliz, yağ asidi sentezide gerçekleştirirler. Aynı zamanda plazmitler kültürlerde bakteriyosin sentezi disakkaritlerin yıkılması, gibi özellikleri kazandırabilmektedir. Plazmitler bulunduğu mikroorganizmayı enfeksiyon bloklama, adsorbsiyon, kesme değişimi ve abortif enfeksiyon gibi işlevlerle fajlardan koruyabilmektedir (Aslım ve Beyatlı, 2004).

Plazmitlerde, replikasyonuna izin veren, bağımsız ve yarı-bağımsız olarak adlandırılan replikasyon orijini özel DNA bölgeleri mevcuttur. Hücre ikiye bölüneceği zaman plazmit replikasyonunda, kromozomal DNA replikasyonu ile aynı zamanda gerçekleşmektedir. Ayrıca plazmit kaynaklı replikasyon enzimlerini de içermektedir, bundan dolayı plazmitler de kendi replikasyonlarını yapabildikleri açıklanmıştır. Başka

bir kopyası oluşan plazmitler, kromozomal DNA'da olduğu gibi iki yavru hücreye aktarılmıştır. Hücrenin büyümesi, gelişmesi ve üremesi için plazmitler yaşamsal öneme sahip moleküllerin kodlandığı kalıtsal yapılar değildir, çünkü plazmiti çıkarılan bakteri mutantlarının hiçbir sıkıntı yaşamadan aynı ortam koşullarında ve besi ortamında çok iyi bir şekilde üredikleri görülmektedir (Tunail, 2009; Yüksekdağ ve Beyatlı, 2009).

Plazmitler sitoplazmada dağılmış halde değil de kromozomlar üzerinde bulunursa epizom adı verilir. Genelde plazmitlerin taşıdıkları kalıtsal bilgi bakteriler için büyük bir öneme sahip değildir. Başka bir ifade bu plazmitler bakteriden giderilse bile, hücre yaşamını sürdürür. Yalnız; plazmitlerin genelinde genetik bilgi, bakterilerin kötü şartlara karşı direnç kazanmasını sağlar. Bakteri plazmitinde bulunan bazı gen ürünleriyle naftalin, civa, toluen toksik maddeleri zararsız hale getirilir (Dilsiz, 1998).

Plazmitleri başka bir bakteriye kendini aktarabilmesine görede sınıflandırılırlar. Tra-genleri konjüгатif plazmitleri taşırlar, bunlar bir plazmitin başka bir mikroorganizmaya transferi olan konjüгasyonun oluşmasını sağlarlar. Nonkonjüгатif plazmitler konjüгasyonu başlatıcı etkiye sahip değildir. Sadece konjüгатif plazmitlerin desteğiyle, aktarılabilirler. Başka bir deyimle seferber plazmitler denilebilir, bu kalıtsal bilgiyi aktarmak için gereken genlere sahip olduğundan dolayı konjüгатif plazmitlerin paraziti gibi görünürler, ancak onların bulunduğu ortamda yüksek frekansta transfer edilirler (Lederbeg, 1952).

Lactobacilluslarda plazmitlerin varlığı, bu cinslerin ilk tanımlanmasından bu güne bilinmektedir. Laktobasil cinslerin bir kaçında laktöz metabolizması, antibiyotik dirençliliği ve bakteriyosin üretimi, bağışıklık, gibi koşulların kromozomal DNA'ya bağlı olduğu bilinmesine rağmen plazmitlerin varlığıda tam anlamıyla belirtilmemiştir. *L. plantarum*'da plazmit boyutları 2-68 kb olmakla birlikte genellikle 5-16 tane plazmit olduğu varsayılmaktadır (Ruiz-Barba vd., 1991).

Bir hücrede farklı tiplerde plazmitler bulunmaktadır. Örneğin *E. coli*'de yedi farklı plazmit yer almaktadır. Ancak birbiriyle bağlantılı plazmitler bağışiksızdır, ancak temel plazmit işlevlerinin denetiminin ürünü olarak bu plazmitlerden yalnızca bir tipi varlığını devam ettirir. Dolayısıyla plazmitler işlevlerine ve uyumluluk gruplarına göre de sınıflandırılırlar Bu nedenle; tra-genleri Fertilitte (F) plasmidleri taşırlar. Bakteriyel konjüгasyon yapabilirler, zehirlere ve antibiyotik karşı direnç sağlayan genleri rezistans (R) plazmitleri, içerirler ayrıca kolisinleride, Col-plazmitleri kodlayan genler içerirler.

Kolisinler başka mikroorganizmaları öldürebilen proteinlerdir. Yıkıcı plazmitler, toluen veya salisilik asit gibi ender bileşiklerin yıkımına destek olurlar. Bakterinin patojenlik kazanmasına virülans plazmitler sebep olurlar. Bakteride farklı sayılarda bulunan plazmitler, hücre bölünmesinin sonra oluşan yeni bakterilerden birine aktarılmama riskini taşırlar. Bu tip tek kopyalı plazmitler bütün yavru hücrelere plazmitin bir kopyasının dağıtılmasını sağlayan sistemler bulunmaktadır (Lederbeg, 1952).

### **1.8. Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Direnç Özellikleri**

Antibiyotiklerin tıp, veterinerlik, su ürünleri teknolojisi gibi geniş bir kullanım alanına sahip olması, bazı bakterilerinde direnç kazanmasını sağlamıştır. Direnç geninin varlığı antibiyotiğe dirençli bakterilerin gelişmesinde ve seçici antibiyotiklerin kullanılması önemli bir yer tutmaktadır (Mathur ve Singh, 2005).

Canlıların doğal yapısında antibiyotik dirençlilik bulunmakta birlikte sonradan da kazanılmış olabilmektedir. Laktik asit bakterileri bazı antibiyotiklere doğal olarak direnç kazanmıştır. Probiyotik suşların güvenliği ve seçilmesi, sindirim sisteminin sağlığı için antibiyotik direnç geni taşımayan ve patojenik olmayan bakterilerden seçilmelidir. *Lactobacilli*, *Leuconostoc*, *Pediococci* ve diğer gram pozitif bakterilerden bazıları doğal olarak fusidik asit, gentamisin, basitrasin, sefoksitin, siproflaksasin, kanamisin, sülfadiazin, metronidazol, nitrofuratoin, norflaksasin, streptomisin, teikoplanin, trimetoprim ve vankomisin gibi antibiyotiklere direnç göstermektedir (Hamilton Miller ve Shah, 1998; Danielsen ve Wind, 2003).

Laktobasiller, hücre duvarı sentezini engelleyen  $\beta$ -laktamlara duyarlıdır, ama sefalosporin ve okzasilinlere karşı çok dirençlidir. *Lactobacillus* cinslerinin geneli üst düzeyde vankomisine direnç göstermektedir. Laktobasiller aminoglikozidaz türleri streptomisin, neomisin, kanamisin, gentamisine karşı dirençliyen protein sentezini önleyen kloramfenikol, klindamisin, eritromisin ve tetrasiklin gibi antibiyotiklere duyarlıdır (Mathur ve Singh, 2005; Ammor vd., 2007).

Bakterilerin antibiyotiklere gösterdiği direnç sorununu çözmek için geliştirilmesinin önemli miktarda ekonomik kaynak gerektirmesi konunun ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Son yapılan araştırmalara çocukluk çağı infeksiyonlarının etkeni olan *Streptococcus pneumoniae*'nin direnç geliştirmesi büyük sorunlara yol açmaktadır. Aynı zamanda stafilokoklar ve enterokoklar gibi bazı

bakterilerin etkeni olduğu enfeksiyonları bu günün şartlarında hiçbir antibiyotiğin tedavi edememeside potansiyel bir tehlikedir (Favret ve Yousten, 1989).

*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, ve *Leuconostoc* cinslerine ait 45 LAB suşunun kloramfenikol, tetrasiklin, eritromisin ve  $\beta$ -laktam (%7)'ye, karşılık siprofloksasine, gentamisin ve streptomisin karşı %70'den daha çok direnç gösterdikleri bildirilmiştir (Hummel vd., 2007).

Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra kazanılmıştır. Antibiyotikler geliştikçe bakterilerde yeni direnç mekanizmaları geliştirmiştir. Ayrıca; kullanılan her bilinçsiz antibiyotiğin dirençli bakteri suşlarının hızla yayılmasını sağlayan en önemli etkidir (Alan, 2014).

### **1.9. Laktik Asit Bakterilerinin Diğer Bakteriler Üzerindeki Etkileri**

Bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen protein veya peptid yapısındaki maddelere bakteriyosin adı verilir. Bakteriyosinler, protein doğasındaki antagonistik, üretici hücreler üzerinde öldürücü etki yapmayan ve genellikle dar etki spektrumuna sahip olarak tanımlanan maddelerdir. Birçok kaynakta bakteriyosinler ve antibiyotikler eşdeğer özelliklerinden dolayı, birbiriyle karıştırılmaktadır. Bunları birbirinden ayıran çok fark olmasına rağmen temel koşul, bakteriyosinler antibiyotiklere göre dar bir etki spektrumuna sahip olmasıdır. Ayrıca bakteriyosin sentezleyen suşa yakın akraba türlere karşı da antimikrobiyal etki göstermektedirler (Kurt ve Zorba, 2005; Riley ve Wertz, 2002).

Bakteri kökenli bir bileşiğin bakteriyosin olarak tanımlanabilmesi için bakterisit etki göstermesi, biyolojik yönden aktif bir proteine sahip olması, spesifik hücre reseptörlerine tutunması, dar bir inhibisyon spektrumuna sahip olması, üretimin lethal biyosentez yoluyla gerçekleşmesi, üretimin ve konakçı hücre bağışıklılığının plazmit kökenli genetik etkenlere bağlı olması gerekir. Bakteriyosinlerin pozitif yüklü aminoasitler ve aksiyon modu oluşumu, antibakteriyal etkinlik, karbonhidrat kısımların varlığı, oligomerler, protein boyutu, post-translasyonel modifikasyonların oluşmasına göre tanımlanmıştır (Klaenhammer, 1993).

Bakteriler içerisinde en başta *Lactobacillus* olmak üzere *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Pediococcus* ve *Staphylococcus* cinslerinin pek çok türü bakteriyosin üretmektedir. Bakteriyosinleri üreten bakteri suşlarına akraba türler de



dahil olmak üzere birçok gıda patojeni ve bozulma nedeni olan bakteri türü üzerinde olumsuz etkileri olmasına rağmen bu maddelerin üretici bakteriye karşı hasar veya öldürücü hiçbir etkileri bulunmamaktadır. Ayrıca, bakteriyosini kodlayan genler, aynı zamanda üretici suşu öldürmeyi önlemek için, birden çok bağışıklık proteinleri oluştururlar. Bağışıklık proteinleri bakteriyosinin hücre membranına geçmesini engelleyebilir. Bakteriyosini hücre içine alarak sindirebilir veya membrana adsorbe olan bakteriyosini hücre dışına tekrar yollayabilir (Bizani vd., 2008).



## 2. MATERYAL ve METOT

### 2.1. Kimyasallar

Tez çalışması Muş Alparslan Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarları Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarında yapılmıştır. Bu çalışmanın temel kimyasalları farklı firma belirtilmedikçe, Sigma (Almanya) ve Merck (Almanya) grubundan; moleküler biyoloji sarf malzemeleri Thermo Scientific (USA) Fermentas (USA), ve Favorgen'den (Tayvan) temin edilmiştir.

### 2.2. Yoğurt Örnekleri

Bu çalışmada *L. plantarum* izolasyonu için kullanılan yoğurt örnekleri Muş yöresinin farklı köylerinden geleneksel olarak yoğurt yapan ailelerden rastgele toplanmıştır. Toplanan yoğurt örnekleri steril kaplara alınmış ve mümkün olan en kısa sürede ve soğuk şartlarda laboratuvara getirilip hemen izolasyona tabi tutulmuştur. Bakteri izolasyonu ve moleküler tanımlamadan sonra yoğurt örneklerinin nerden temin edildiği ve izolasyon numaraları içerecek şekilde adlandırılmış ve -20 °C'de saklanmıştır. Toplanan örneklerin detaylı bilgileri Çizelge 2.1'de verilmiştir,

**Çizelge 2.1.** Muş yöresinin farklı köylerinden toplanan yoğurt örneklerinden izole edilen ve tanımlanan bakteri listesi

İzolat adı	Yoğurt Çeşidi	Alınan Yer
KMK1 ( <i>L. plantarum</i> 1)	Manda	Karaağaçlı Beldesi
KMK2	Manda	Karaağaçlı Beldesi
KMK3	Manda	Karaağaçlı Beldesi
KMK4	Manda	Karaağaçlı Beldesi
KMK5	Manda	Karaağaçlı Beldesi
KMK6 ( <i>L. plantarum</i> 2)	Manda – İnek	Karaağaçlı Beldesi
KMK7	Manda	Karaağaçlı Beldesi
KMK8	Manda	Karaağaçlı Beldesi
KMK9 ( <i>L. plantarum</i> 3)	Manda	Karaağaçlı Beldesi
KMK10 ( <i>L. plantarum</i> 4)	Manda	Karaağaçlı Beldesi
KMK11	Manda	Karaağaçlı Beldesi
KMK12	Koyun	Karaağaçlı Beldesi
KMK13	Manda	Karaağaçlı Beldesi
KMK14	Manda	Karaağaçlı Beldesi
KMK15 ( <i>L. plantarum</i> 5)	Keçi	Karaağaçlı Beldesi
KMK16	Keçi	Karaağaçlı Beldesi
KMK17	İnek	Karaağaçlı Beldesi
KMK18 ( <i>L. plantarum</i> 6)	İnek	Karaağaçlı Beldesi
KMK19	Koyun	Karaağaçlı Beldesi
KMK20 ( <i>L. plantarum</i> 7)	Manda – İnek	Karaağaçlı Beldesi
KMK21	Manda – İnek	Karaağaçlı Beldesi

Çizelge 2.1.'in devamı

İzolot adı	Yoğurt Çeşidi	Alınan Yer
KMK22 ( <i>L. plantarum</i> 8)	Manda – İnek	Karaağaçlı Beldesi
KMK23	Manda	Karaağaçlı Beldesi
KMSB1 ( <i>L. plantarum</i> 9)	Manda – İnek	Sungu Beldesi
KMSB2	Manda – İnek	Sungu Beldesi
KMSB3 ( <i>L. plantarum</i> 10)	Manda	Sungu Beldesi
KMSB4	Manda	Sungu Beldesi
KMSB5	Manda	Sungu Beldesi
KMSB6	Manda	Sungu Beldesi
KMSB7	Manda	Sungu Beldesi
KMSB8 ( <i>L. plantarum</i> 11)	Manda	Sungu Beldesi
KMSB9	İnek	Sungu Beldesi
KMSB10	İnek	Sungu Beldesi
KMSB11	İnek	Sungu Beldesi
KMSB12 ( <i>L. plantarum</i> 12)	Manda – İnek	Sungu Beldesi
KMSB13 ( <i>L. plantarum</i> 13)	Manda – İnek	Sungu Beldesi
KMT1	Manda	Tandoğan Köyü
KMT2	İnek	Tandoğan Köyü
KMT3	İnek	Tandoğan Köyü
KMT4 ( <i>L. plantarum</i> 14)	İnek	Tandoğan Köyü
KMT5	İnek	Tandoğan Köyü
KMT6	İnek	Tandoğan Köyü
KMT7	İnek	Tandoğan Köyü
KMT8 ( <i>L. plantarum</i> 15)	İnek	Tandoğan Köyü
KMT9	İnek	Tandoğan Köyü
KMT10	İnek	Tandoğan Köyü
KMT11	Manda	Tandoğan Köyü
KMY1 ( <i>L. plantarum</i> 16)	Manda	Yarpuzlu Köyü
KMY2	Manda – İnek	Yarpuzlu Köyü
KMY3 ( <i>L. plantarum</i> 17)	Manda – İnek	Yarpuzlu Köyü
KMY4	Manda	Yarpuzlu Köyü
KMY5 ( <i>L. plantarum</i> 18)	Manda	Yarpuzlu Köyü
KMY6 ( <i>L. plantarum</i> 19)	Manda	Yarpuzlu Köyü
KMY7	Manda	Yarpuzlu Köyü
KMY8	Manda	Yarpuzlu Köyü
KMY9 ( <i>L. plantarum</i> 20)	Manda	Yarpuzlu Köyü
KMY10 ( <i>L. plantarum</i> 21)	Manda	Yarpuzlu Köyü
KMY11 ( <i>L. plantarum</i> 22)	Manda	Yarpuzlu Köyü
KMY12	Manda	Yarpuzlu Köyü
KMG1 ( <i>L. plantarum</i> 23)	Manda	Güzeltepe Köyü
KMG2	Manda – İnek	Güzeltepe Köyü
KMG3	Manda	Güzeltepe Köyü
KMG4 ( <i>L. plantarum</i> 24)	İnek	Güzeltepe Köyü
KMG5 ( <i>L. plantarum</i> 25)	Manda	Güzeltepe Köyü
KMG6	Manda	Güzeltepe Köyü
KMG7	Keçi	Güzeltepe Köyü
KMG8 ( <i>L. plantarum</i> 26)	Keçi	Güzeltepe Köyü
KMG9	Manda	Güzeltepe Köyü
KMG10	Manda	Güzeltepe Köyü
KMG11 ( <i>L. plantarum</i> 27)	Koyun	Güzeltepe Köyü

Çizelge 2.1.' in devamı

İzolot adı	Yoğurt Çeşidi	Alınan Yer
KMG12	Manda	Güzeltepe Köyü
KMSU1	İnek	Suvaran Köyü
KMSU2	İnek	Suvaran Köyü
KMSU3	İnek	Suvaran Köyü
KMSU4	İnek	Suvaran Köyü
KMSU5	Manda	Suvaran Köyü
KMSU6	İnek	Suvaran Köyü
KMSU7 ( <i>L. plantarum</i> 28)	İnek	Suvaran Köyü
KMSU8	İnek	Suvaran Köyü
KMSU9	İnek	Suvaran Köyü
KMSU10	İnek	Suvaran Köyü
KMSU11 ( <i>L. plantarum</i> 29)	İnek	Suvaran Köyü
KMSU12	İnek	Suvaran Köyü
KMSU13	İnek	Suvaran Köyü
KMSU14	İnek	Suvaran Köyü
KMSA1	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA2	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA3 ( <i>L. plantarum</i> 30)	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA4	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA5	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA6	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA7 ( <i>L. plantarum</i> 31)	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA8	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA9	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA10 ( <i>L. plantarum</i> 32)	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA11 ( <i>L. plantarum</i> 33)	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA12	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA13	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA14 ( <i>L. plantarum</i> 34)	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA15	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA16	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA17	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA18 ( <i>L. plantarum</i> 35)	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA19	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA20 ( <i>L. plantarum</i> 36)	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA21	Manda – İnek	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA22	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA23 ( <i>L. plantarum</i> 37)	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA24	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA25	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA26	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA27	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA28 ( <i>L. plantarum</i> 38)	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA29	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA30	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA31	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA32	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA33	Manda – İnek	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA34 ( <i>L. plantarum</i> 39)	Manda – İnek	Sazlıkbaşı Köyü

Çizelge 2.1.'in devamı

İzolot Adı	Yoğurt Çeşidi	Alınan Yer
KMSA35	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA36	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA37	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA38	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA39 ( <i>L. plantarum</i> 40)	Manda	Sazlıkbaşı Köyü
KMSA40	Manda	Sazlıkbaşı Köyü

### 2.3. Besiyeri ve Hazırlanması

Çizelge 2.2. Laktik asit bakteri kültürleri için kullanılan M17 ve MRS besi ortamlarının kompozisyonu

#### M17 Broth (Merck)

#### Kimyasallar Miktar (gr/1)

Bacto tripton	5
Bacto soyton	5
Et özütü	5
Maya özütü	2.50
Askorbik asit	0.50
Magnezyum sülfat	0.25
Disodyum-β-gliserol-fosfat	19

#### MRS Broth (Merck)

#### Kimyasallar Miktar (gr/1)

Pepton	10
Et özütü	8
Maya özütü	4
Glikoz	20
Potasyum hidrojen fosfat	2
Diamonyum hidrojen fosfat	2
Sodyum asetat	5
Magnezyum sülfat	0.2
Mangan sülfat	0.04

Laktik asit bakterileri MRS ve M17 besi ortamında geliştirilmiştir. İzolasyon sonucu tespit edilen şüpheli suşları M17 besi ortamında 42 °C’de, MRS besi ortamında 37 °C’de inkübe edilmiştir. M17 broth besiyerinde litreye 42.5 gr ve MRS broth besiyerinde litreye 52.2 gr olacak şekilde tartılarak 121 °C de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. MRS broth ve M17 broth’a 15 gr/lit agar ilave edilerek 121 °C de 15 dakika otoklavda sterilize edilerek MRS Agar ile M17 Agar hazırlandı.

**Çizelge 2.3.** Laktik asit bakteri kültürleri için kullanılan Nutrient Agar besiyerlerinin kompozisyonu

<b><u>Nutrient Agar (Merck)</u></b>	<b><u>Kimyasallar Miktar (gr/l)</u></b>
-------------------------------------	---

Pepton	5
Et ekstraktı	3
Agar-agar	12

20 g dehidre besiyeri 1 litre su ile çözülür ve otoklavda 121 °C de 15 dakika süre ile sterilize edilir.

#### **2.4. Çözeltiler ve Hazırlanması**

RNaz A çözeltisi: 0.05 M sodyum asetat 5 ml steril saf su içerisinde karıştırılıp üzerine 5 mg RNaz A ilave edilmiştir. Kaynayan su ortamında 5 dak. bekletikten sonra - 20 derece saklanmıştır.

%3 NaCl ile doyurulmuş fenol çözeltisinin hazırlanışı: 20 ml saf steril su içerisine 3 g NaCl ve 100 g fenol ilave ederek 45 C'deki su banyosunda çözülerek oda sıcaklığında bırakılmıştı.

#### **Kristal Violet stok solüsyonu**

Kristal violet	:1.0 gr
Etanol	:% 95
dH2O	:100ml

#### **Bazik Fuksin stok solüsyonu**

Bazik fuksin	:3.0 gr
Etanol	:%95
dH2O	:100ml

**Lügol**

İyot	:1.0 gr
Potasyum iyodür	:2.0 gr
Sodyum karbonat	:%5 60.0 ml
dH2O	:140.0 ml

**Metilen Mavisi**

Metilen mavisi	: 0.3 gr
Etil alkol	: 30.0 ml
dH2O	: 100 ml'ye tamamlanır.

**Sakkaroz çözeltisi**

Tris	: 0.7 g
EDTA	: 0.05 g
Sakkaroz	: 6.5 g
Destile su	: 100 ml
pH 8.0± 0.02	

**SDS çözeltisi**

Tris	: 0.6 g
EDTA	: 0.8 g
SDS	: 20 g
Destile su	: 100 ml
pH 8.0± 0.02	

**Lizozim çözeltisi**

Tris	: 0.3 g
Lizozim	: 0.1 g
Destile su	: 10 ml
pH 8.0± 0.02	

**Tris-EDTA-1**

Tris	: 0.6 g
EDTA	: 9.5 g
Destile su	: 100 ml
pH 8.0± 0.02	

**Tris-EDTA-2**

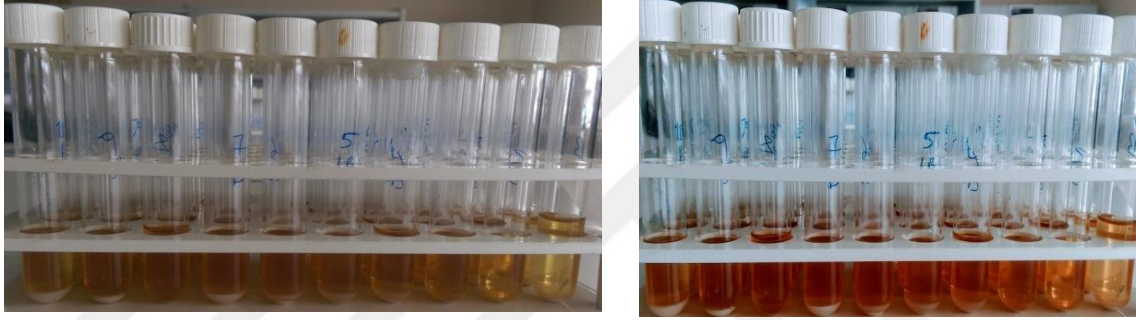
Tris	: 0.15 g
EDTA	: 0.4 g
Destile su	: 100 ml
pH 7.5± 0.02	

**Tris-HCl**

Tris-HCl	: 31 g
Destile su	: 100 ml
pH 7.0± 0.02	

## 2.5. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Laboratuvara getirilen yoğurt örneklerinden 5'er gr tartılarak 5 ml fizyolojik su içerisinde 3500 devir/dak. 2 dak. süre ile santrifüjlenmiştir. Oluşan süpernatant kısmından 1 ml alınarak 10000 devir/dak. 30 sn santrifüjlenerek oluşan süpernatant kısmından 1ml alınmış ve 10000 devir/dak. 15 dak. santrifüjlenmiştir. Süre sonunda tüp içerisinde kalan çökelti 1 ml fizyolojik su ile çözülerek  $10^{-5}$ e kadar seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan Laktik asit bakterilerinin izolasyonu için MRS ve M17 agara ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan plaklar 42°C ve 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan ve laktik asit bakteri kolonisi olduğu düşünülen koloniler alınıp stoklanmak üzere besi ortamında aktifleştirilmiştir (Mandel vd., 1970).



Şekil 2.1. Yoğurttan izole edilen LAB'ların MRS besi ortamında aktifleştirilmesi

## 2.6. Laktik asit bakterilerinin ön tanımlanması

Yoğurt örneklerinden izole edilen LAB'ların tanımlanmasında izolatların morfolojik (kok, çubuk gibi), katalaz ve kültürel özelliklerine (gram boyama, koloni morfolojisi) bakılarak ön tanımlama yapılmıştır.

### 2.6.1. Koloni morfolojisi

İnkübasyondan sonra petrilerdeki koloniler görünüşlerine, şekline, rengine ve kokusuna bakılarak değerlendirme yapılmıştır.

### 2.6.2. Gram boyama

İzole edilen potansiyel LAB'lar gram boyama tekniği ile boyanmıştır. Boyama yapılacak preparatlar petrilerdeki koloniler steril özelerle lamlara alınıp kurutulup sabitlenmiştir. Kristal violet solüsyonu ile 2-3 dak. boyanmış, boya yıkanmış ve preparat üzerine lügol solüsyonu damlatılarak 1-2 dak. bekletilmiştir. Lügol solüsyonu önce saf alkol ile sonra saf su ile yıkanmış ve safranin ile de 5-10 saniye



boyanıp, su ile yıkanarak boya giderilmiştir (Collins vd., 1989; Gücin ve Dülger, 1995). Kurutma kâğıdı ile kurutulduktan sonra sedir yağı konarak immersiyon objektifi ile bakılıp görüntüler değerlendirilmiştir.

### 2.6.3. Katalaz testi

İzolasyonu yapılan LAB'ların petrilerindeki kolonileri alınıp üzerine % 3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) damlatılarak gaz kabarcıklarının oluşumuna göre gözlemlenmiştir. Gaz kabarcığı oluşturan örnekler katalaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Hammes ve Vogel, 1995).

## 2.7. Moleküler Biyoloji Metotları

*L. plantarum*'ların moleküler olarak tanımlanması, için kullanılacak primerlerin belirlenmesi, polimeraz reaksiyonu (PCR) işlemi, kromozomal (Genomik) DNA izolasyonu ve plazmit DNA izolasyonunu kapsamaktadır.

### 2.7.1. Oligonükleotit primerler

İzole edilen potansiyel *L. plantarum* suşlarının tanımlanmasında kullanılan *recA* gen primerlerinin dizilimleri (5'→3') ve bant uzunlukları Çizelge 2.4'de verilmiştir.

Çizelge 2.4. *L. plantarum*'ların *recA* genlerinin tanımlanması için kullanılan primerlerin nükleotid dizilimi

Gen	Primer Adı	Dizilim (5'→3')	Uzunluk (bç)
<i>RecA</i>	planF planR	CCGTTTCTGCGGAACACCTA TCGGGATTACCAAACATCAC	318

### 2.7.2. Kromozomal DNA izolasyonu

Çalışma boyunca kullanılan 51 LAB suşu MRS broth besi yerinde 37°C'de 48 saat aktive edilmiştir. Daha sonra ependorf tüplerine her örnekten 1.5 ml bırakılmıştır ve 5 dak. 13.000 rpm'de santrifüjlenip süpernatant kısmı başka bir yere alınmıştır. Elde edilen pelletlerin genomik DNA izolasyonlarını Vivantis Genomik DNA izolasyon Kiti ile yapılmıştır. İzolasyonu yapılan DNA daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

### **2.7.3. Polimeraz zincir reaksiyonu**

#### **2.7.3.1. Koloni PCR (*rec A* gen PCR)**

PCR işlemi toplam 30 µl içerisinde gerçekleştirilmiştir. 18.25 µl dH<sub>2</sub>O, 1'er µl ileri ve geri primerlerden, 3 µl PCR buffer (10X), 1 µl dNTP (10 mM), 2.5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 0.25 µl Taq DNA polimeraz (5 U/ml) karıştırılarak hazırlanmıştır. DNA olarak 10 µl dH<sub>2</sub>O'da çözdürülen koloniden 3 µl kullanılmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız primerler ticari firmalardan sipariş edilmiştir (İontek, İstanbul). PCR işlemi 94 °C'de 3 dak. ilk ayrıştırma ile başlatılmış daha sonra 30 döngü olmak üzere 94 °C'de 1 dak. denatürasyon, primerler için uygun yapışma sıcaklığı 55°C'de 1 dak. ve 72 °C'de uygun sentez zamanı boyunca gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri % 1'lik jel hazırlanarak, elektroforeze yüklenmiş PCR ile çoğaltılan bölgeler UV ışığında gözlenmiş ve fotoğraflanmıştır.

#### **2.7.4. Plazmit DNA izolasyonu**

Çalışmada toplanan yoğurt örneklerinden izole edilen, kimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanan suşların plazmit DNA izolasyonları yapılmıştır. Bu amaçla, hazır kit ile izolasyonu ve manuel plazmit DNA izolasyon metotları uygulanmıştır.

##### **2.7.4.1. Hazır kit kullanılarak yapılan plazmit DNA izolasyonu**

Plazmit DNA izolasyonu; Favorgen Plasmid DNA Extraction Mini Kiti kullanarak firmanın (FAVORGEN) verdiği prosedüre lizozim eklenerek modifiye edilmiş ve gerçekleştirilmiştir. Bunun için MRS besi ortamında bir gece inkübasyona bırakılmış bakteri kültürü kullanılmıştır. Gelişmiş olan bakteri kültüründen 1 ml tüplere alınarak, 3500 devir/dak. 15 dak. Santrifüj edilmiş ve bakteri hücreleri çöktürülüp supernatant dökülür, pelette 1ml steril distile su eklenip vorteksenerek 2 dk da 10000 rpm'de santrifüjlenir ve üstte kalan sıvı kısmı uzaklaştırılır, 2 kez bu işlem yapılır. Oluşan peletin üzerine 200 µl lizozim (8 mg/ml) konsantrasyonu eklenerek karıştırılır ve 37°C 30 dak. su banyosunda lizozim inkübasyonu yapılmıştır. Daha sonraki aşamalar üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen potansiyel plazmit DNA' ları jelde görüntülenir, fazla kalan kısımda sonraki çalışmalarda kullanılmak için -20°C'de saklanmıştır.

#### 2.7.4.2. Geleneksel plazmit DNA izolasyonu

*L. plantarum* suşunun kültürleri MRS broth besi ortamında 37 °C’de 24 saat geliştirilip, 5 ml’lik MRS broth ortamlarına birer ml inokülasyonlar yapılmış ve alınan tüpler 30°C’de 3 saat inkübe edilmiştir. Bakteriler kültürleri sonra santrifüj tüplerine alınıp, 6000 devirde 15 dak. santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Tüplerdeki hücre çökeltisi kurutulduktan sonra 380 µl sükroz tamponunda çözülmüştür. 37°C’ye kadar ısıtılan bu ortama 96 µl lizozim ilave edilmiş ve su banyosunda 37°C’de 5 dak. bekletilmiştir 48 µl Tris-EDTA-1 uygulamasından sonra, tüplere 28 µl % 20 SDS çözeltisinden eklenerek karıştırılmıştır. Son aşamada santrifüj tüpleri 37°C su banyosunda 10 dak. süre ile bırakılmış lizozin tamamlanması sağlanmıştır.

Elde edilen kültürlerle yeni hazırlanmış 28 µl 3 N NaOH çözeltisinden ilave edilmiş ve düz bir zemin üzerinde tüpler 10 dak. Süre ile yavaşça çevrilerek kromozomal DNA’nın alkali denatürasyon koşulları sağlanmıştır. Denatürasyon aşamasının sonunda santrifüj tüplerine 50 µl Tris-HCl çözeltisi eklenerek, 3 dak. süre ile yine düz bir zeminde hafifçe karıştırılmıştır. Tüplere, %3 NaCl ile doyurulmuş fenol çözeltisinden 0.7 ml ve 4°C’de tutulan 5 M NaCl çözeltisinden 72 µl aktararak, 4°C’de 15 dak. 15000 devirde santrifüj işlemi yapılmıştır. Mikropipetlerle tüplerde oluşan üst faz alınıp yeni tüplere aktarılmış ve 0.7 ml kloroform/izoamilalkol (24:1) çözeltisi eklenmiştir. Oluşan bu karışıma 4°C’de 15000 devirde 15 dak. santrifüj işlemi uygulanmış, tekrar elde edilen üst faz yeni tüplere alınmış ve aynı hacimde soğuk etanol ilave edilmiştir. Etanol aktarılan tüpler -20°C’de bir gece bırakıldıktan sonra, 15 dak. 15000 devirde santrifüjlenerek plazmit DNA çöktürülmüş ve sıvı faz uzaklaştırılarak çökeltiler kurutulmuştur. Kurutulan çökeltiler 20 µl Tris-EDTA-2 içerisinde çözülmüş ve RNaz A stok çözeltisinden 2 µl ilave edilerek su banyosunda 37°C’de 45-50 dak. inkübe edilmiştir (Anderson ve McKay, 1983).

#### 2.7.5. DNA’nın jel elektroforezi

Koloni PCR ürünleri için agaroz jel hazırlamak üzere; %1 oranında agaroz, 1X TBE tamponu içerisinde homojen olarak karıştırılıp eritilmiş ve elektroforez tabağına dökülmüştür. Analiz edilecek örnekler uygun dilüsyonlarından genellikle 4 µl alınarak, 1 µl yükleme tamponu (%0.25 bromfenol mavisi; %40 sukroz; 100 mM EDTA; pH 8.0) ile karıştırılmıştır. Bu şekilde örnekler jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. DNA kontrolü olarak uygun boyutlardaki DNA referansı; λ DNA 1000 baz çiftlik veya 100 baz çiftlik

DNA markörleri (Favorgen) kullanılmıştır. Elektroforez tankında 500 mA (NYXTechnik; V37) ve (Cleaver), jel 80 V altında koşturulmuştur. DNA örnekleri UV ışığı (312 nm) altında görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

Plazmit DNA ürünleri için agaroz jel hazırlamak üzere; % 1 oranında agaroz, 1X TBE tamponu içerisinde eritilmiş ve elektroforez tabağına aktarılmıştır. Örneklerin analiz için uygun dölüsyonlarından genellikle 4 µl alınarak, 1 µl yükleme tamponu ile karıştırılmıştır. Bu şekilde örnekler jele yüklenmiştir. DNA kontrolü olarak uygun boyutlardaki DNA referansı; λ DNA 1000 baz çiftlik DNA markörleri (Favorgen) kullanılmıştır. Elektroforez tankında, jel 20-40 V ve 500 mA altında koşturulmuştur. DNA örnekleri UV ışığı (312 nm) altında görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

## 2.8. İzolatların Stoklanması

Bakteri suşları kısa süreli stoklamalar için %15'lik gliserol içerisinde alınarak -20°C'de saklanmıştır. Uzun süreli saklama için ise, besiyerinde 16 saat geliştirilen bakterilerden 200 µl alınarak 3 dak. 12.000 rpm'de santrifüjlenerek süpernatant kısmının uzaklaştırılması ve peletlerin %30 gliserol içeren MRS besi ortamında çözdürüp, şok soğutma ile -80°C'de gerçekleştirilmiştir.

## 2.9. İzolatların Antibiyotiklere Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan antibiyotikler Oxoid'den alınmıştır. Kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları Çizelge 2.5'de verilmiştir

Çizelge 2.5. Antibiyotikler ve konsantrasyonları

Antibiyotik	Konsantrasyon (µg)
Eritromisin	10
Kanamisin	30
Penisillin	10
Kloramfenikol	30
Gentamisin	10
Trimetoprim	25

### 2.9.1. Disk difüzyon metodu

Yoğurtan izole edilen *L. plantarum* izolatlarının antibiyotik direnç özellikleri disk difüzyon metoduna ile belirlenmiştir. Bu amaçla eritromisin, kanamisin, penisillin, kloramfenikol, gentamisin ve trimetoprim antibiyotiklerine karşı direnç veya duyarlılık özellikleri incelenmiştir.

Bu çalışmada kullanılan ve 4°C'de muhafaza edilen *L. plantarum* suşları sıvı MRS besiyerine aşıl原因arak 37°C de 24 saat süre ile aktivasyonu sağlamak için inkübasyona bırakılmıştır. Deney tüplerinde sterilize edilen ve 45-50°C ye kadar soğutulan MRS agarda aktiveleştirilmiş *L. plantarum* izolatlarıyla hazırlanan 24 saatlik (0.1 ml de 108 adet/ml) kültür ile aşıl原因mıştır (Anonymous, 1999). Deney tüplerine ekim yapıldıktan sonra iyice karıştırılıp 9.0 cm çapındaki steril petri kutularına 15'er ml aktarılmış ve besiyerinin homojen bir şekilde petri kutusu içinde dağılması sağlanmıştır (Collins vd., 1989). Katılaşılan besi yerleri üzerine antibiyotik diskler uygun mesafelerle yerleştirilmiştir. Ekimi yapılan plaklar ön inkübasyon için 4°C'de 2 saat bırakılmıştır. Sonrasında 37°C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Son aşamada oluşan inhibisyon zonları mm olarak ölçülmüştür.

### 2.10. İzolatlarının Diğer Mikroorganizmalar Üzerindeki Etkileri

Yoğurtan izole edilen *L. plantarum* izolatlarının antibakteriyel etkileri uyuk agar difüzyon metodu ile belirlenmiştir. Bu amaçla *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Bacillus megaterium* DSM 32, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 ve *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883 gibi bakterilere karşı direnç-duyarlılık özellikleri incelenmiştir. Çalışmada kullanılan *L. plantarum* suşları sıvı MRS besiyerine, indikatör bakteriler ise Nütrient sıvı besiyerine aşıl原因arak 37°C de 24 saat süre aktivasyonu sağlamak için inkübasyona bırakılmıştır (Anonymous, 1999). Çalışmada kullanılan indikatör bakteriler agar ortamında 24 saatlik kültürlerinden distile suda 0,5 McFarland bulanıklığına eşdeğer süspansiyonlar hazırlanmıştır. Bakteri süspansiyonları, her bir indikatör bakteri suşu için uygun olan agar ortamlara, steril eküvyon çubuğu ile inkübe edilmiştir. Plaklara steril agar delici ile kuyucuklar açılmıştır. Hazırlanan kuyucuklara izolatlardan 100 µl konularak indikatör bakteriler için uygun sıcaklıklarda 24 saat'lik inkübasyona bırakılmıştır (Pringsulaka vd., 2012). Son aşamada oluşan inhibisyon zonları mm olarak ölçülmüştür.

### 3. BULGULAR ve TARTIŞMA

#### 3.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması

Yoğurt önemli bir fermente süt ürünü olup dengeli beslenmeyi sağlayan ve dünyada hızla yayılan bir besindir. Vücut için gerekli olan kalsiyumun büyük bir kısmını karşıladığını, aynı zamanda yoğurdun sağlığa faydaları arasında; temel besin ihtiyaçlarından bir kısmını oluşturur, vücut ağırlığını dengelediğini, laktoz toleransını geliştirdiğini ve probiyotik bakteriler ile sağlığa çeşitli katkılarının bulunduğunu açıklanmıştır (McKinley, 2005). Gıda endüstrisinde kullanılan starter kültürlerin istenilen tat, koku, aromatik özellikler, üretim kapasiteleri ve hedeflenen fermente ürünlere olumlu özellikler kazandıran suşlardan seçilmesi önemli olmuştur (Tamime ve Robinson, 1999).

Çalışmanın bu kısmında Muş'un farklı köylerinden geleneksel metotlarla yapılan 117 yoğurt örneklerinden 125 laktik asit bakteri izolasyonu yapılmıştır. Toplanan yoğurt örneklerinden toplam 51 adet *Lactobacillus* izole edilmiş ve daha sonraki yapılacak olan çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de stoklanmıştır. Çizelge 3.1'de yoğurt örneklerinin toplandığı yerler ve izole edilen suşlar ile ilgili bilgiler verilmiştir.

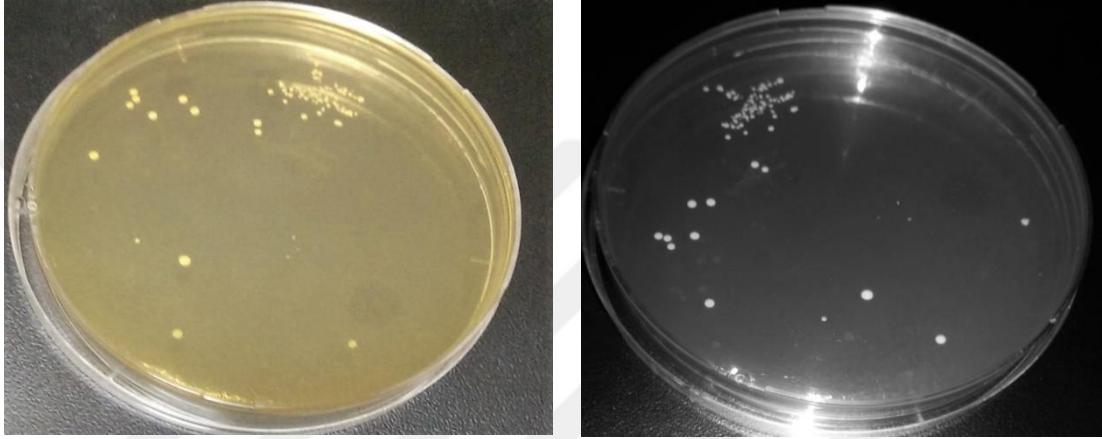
**Çizelge 3.1.** Farklı bölgelerden toplanan yoğurt örneklerinden elde edilen *Lactobacillus plantarum* İzolat sayıları

Alındığı yer	Toplam yoğurt sayısı	Toplam izolat sayısı	<i>L. plantarum</i> sayısı
Karaağaçlı Beldesi	25	23	8
Sungu Beldesi	16	13	5
Tandoğan Köyü	11	11	2
Yarpuzlu Köyü	10	12	7
Güzeltepe Köyü	13	12	5
Suvaran Köyü	9	14	2
Sazlıkbaşı Köyü	33	40	11
Toplam	117	125	40

Aynı yoğurt örneğinden birden fazla mikroorganizma elde edilmiş. Bunlardan sadece bir koloni alınarak saklanmıştır

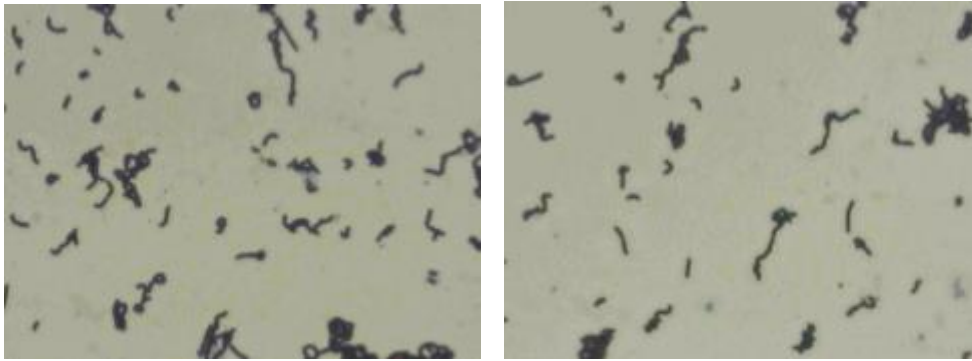
### 3.1.1. İzolatların morfolojik ve biyokimyasal olarak tanımlanması

Saf kültür olarak elde edilen Laktik asit bakteri izolatlarının, biyokimyasal yöntemlerle tanımlanmasında, gram boyama reaksiyonu, mikroskopik morfoloji, ve katalaz aktivitesine bakılmıştır. *L. plantarum*'ların izolasyonu yapıldıktan sonra, petrilerde koloni görünüşleri beyaz-krem renkli ile ayırt edilebilmektedir. İnoküle edilen MRS agar petrilerine ve 48 saat inkübe edildikten sonra oluşan koloni görüntüleri şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1 MRS agar petrilerine aşılana Laktobasillus'a ait koloni görüntüsü

Yoğurt örneklerinden İzole edilen 125 izolatın gram boyama sonucunda gram pozitif olduğu belirlenmiştir. İzolasyonu yapılan *L. plantarum*'ın suşlardan gram boyama da elde edilen mikroskopik görüntüsü şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Yoğurtan izole edilen *L. plantarum* (31 ve 20 nolu izolat) suşunun gram boyama görüntüsü

LAB oksidatif stres sonucu oluşan oksijen türevlerinden hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) oluşturmakta fakat katalaz enzimi eksikliğinden dolayı hidrojen peroksiti oksijen ve  $H_2O$ 'ya parçalayamamaktadır. LAB tayininde basit bir yöntem olarak katalaz özelliği kullanılmaktadır. Çalışmada kullanılan izolatlara morfolojik incelemelerden sonra

katalaz testi yapılmıştır ve 125 izolatın tamamının katalaz negatif olduğu tespit edilmiştir.

Laktik asit bakterilerinin tanımlanmalarında geleneksel sınıflandırmanın temeli, morfolojik, fizyolojik ve farklı sıcaklıklarda, pH değerlerinde, arjinin degradesyonu, tuz konsantrasyonlarında gelişimi ve karbonhidrat katabolizması gibi metabolik/biyokimyasal özelliklerin araştırılmasını içeren fenotipik yöntemlere dayanmaktadır (Gobbetti vd., 2005).

Bu çalışmada, suşların mikroskopik özellikleri incelendiğinde, 51 bakterinin basil geriye kalan 74 suşunda kok şeklinde olduğu görülmektedir. Suşların biyokimyasal özellikleri araştırıldığında, LAB'a ait özellikleri gösterdiği yani Gram pozitif olduğu ve katalaz aktivitesinin bulunmadığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Laktik asit bakterilerinin morfolojik ve biyokimyasal sonuçları

İzolatlar	Gram reaksiyonu	Katalaz testi	Mikroskopik morfolojisi	
			Basil	Kok
KMK1	+	-	+	
KMK2	+	-		+
KMK3	+	-		+
KMK4	+	-	+	
KMK5	+	-		+
KMK6	+	-	+	
KMK7	+	-		+
KMK8	+	-		+
KMK9	+	-	+	
KMK10	+	-	+	
KMK11	+	-		+
KMK12	+	-		+
KMK13	+	-		+
KMK14	+	-		+
KMK15	+	-	+	
KMK16	+	-		+
KMK17	+	-		+
KMK18	+	-	+	
KMK19	+	-		+
KMK20	+	-	+	
KMK21	+	-		+
KMK22	+	-	+	
KMK23	+	-		+
KMSB1	+	-	+	
KMSB2	+	-		+
KMSB3	+	-	+	
KMSB4	+	-		+



Çizelge 3.2.'nin devamı

İzolatlar	Gram reaksiyonu	Katalaz testi	Mikroskopik morfolojisi	
			Basil	Kok
KMSB5	+	-		+
KMSB6	+	-		+
KMSB7	+	-		+
KMSB8	+	-	+	
KMSB9	+	-		+
KMSB10	+	-		+
KMSB11	+	-	+	
KMSB12	+	-	+	
KMSB13	+	-	+	
KMT1	+	-		+
KMT2	+	-		+
KMT3	+	-	+	
KMT4	+	-	+	
KMT5	+	-		+
KMT6	+	-	+	
KMT7	+	-		+
KMT8	+	-	+	
KMT9	+	-		+
KMT10	+	-		+
KMT11	+	-		+
KMY1	+	-	+	
KMY2	+	-		+
KMY3	+	-	+	
KMY4	+	-		+
KMY5	+	-	+	
KMY6	+	-	+	
KMY7	+	-		
KMY8	+	-		+
KMY9	+	-	+	
KMY10	+	-	+	
KMY11	+	-	+	
KMY12	+	-		+
KMG1	+	-	+	
KMG2	+	-		+
KMG3	+	-		+
KMG4	+	-	+	
KMG5	+	-	+	
KMG6	+	-		+
KMG7	+	-		+
KMG8	+	-	+	
KMG9	+	-		+
KMG10	+	-		+
KMG11	+	-	+	
KMG12	+	-		+
KMSU1	+	-		+
KMSU2	+	-	+	
KMSU3	+	-		+
KMSU4	+	-		+

Çizelge 3.2.'nin devamı

İzolatlar	Gram reaksiyonu	Katalaz testi	Mikroskopik	
			Basil	Morfolojisi Kok
KMSU5	+	-	+	
KMSU6	+	-		+
KMSU7	+	-	+	
KMSU8	+	-		+
KMSU9	+	-		+
KMS10	+	-		+
KMS11	+	-	+	
KMSU12	+	-		+
KMSU13	+	-		+
KMSU14	+	-	+	
KMSA1	+	-		+
KMSA2	+	-		+
KMSA3	+	-	+	
KMSA4	+	-		+
KMSA5	+	-		+
KMSA6	+	-		+
KMSA7	+	-	+	
KMSA8	+	-		+
KMSA9	+	-		+
KMSA10	+	-	+	
KMSA11	+	-	+	
KMSA12	+	-		+
KMSA13	+	-		+
KMSA14	+	-	+	
KMSA15	+	-		+
KMSA16	+	-		+
KMSA17	+	-		+
KMSA18	+	-	+	
KMSA19	+	-		+
KMSA20	+	-	+	
KMSA21	+	-		+
KMSA22	+	-		+
KMSA23	+	-	+	
KMSA24	+	-		+
KMSA25	+	-	+	
KMSA26	+	-		+
KMSA27	+	-		+
KMSA28	+	-	+	
KMSA29	+	-		+
KMSA30	+	-		+
KMSA31	+	-		+
KMSA32	+	-	+	
KMSA33	+	-		+
KMSA34	+	-	+	
KMSA35	+	-	+	
KMSA36	+	-		+
KMSA37	+	-	+	
KMSA38	+	-		+

Çizelge 3.2.'nin devamı

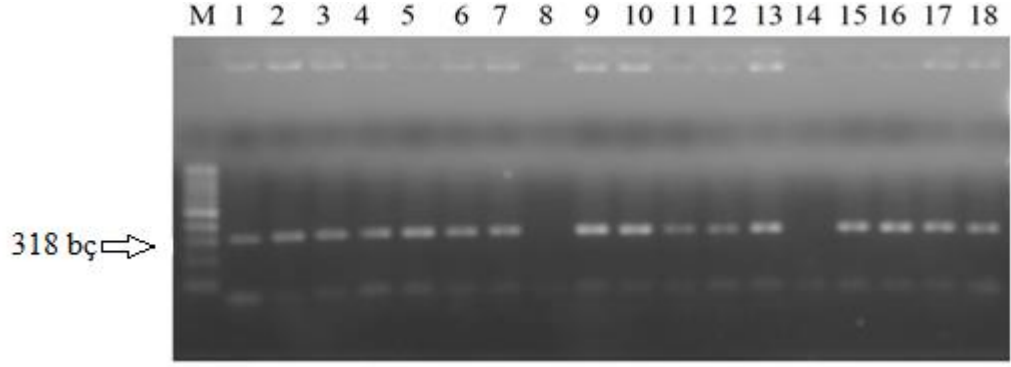
İzolatlar	Gram reaksiyon	Katalaz testi	Mikroskopik	morfolojisi
			Basil	Kok
KMSA39	+	-	+	
KMSA40	+	-		+

### 3.1.2. İzolatların *rec A* gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılması

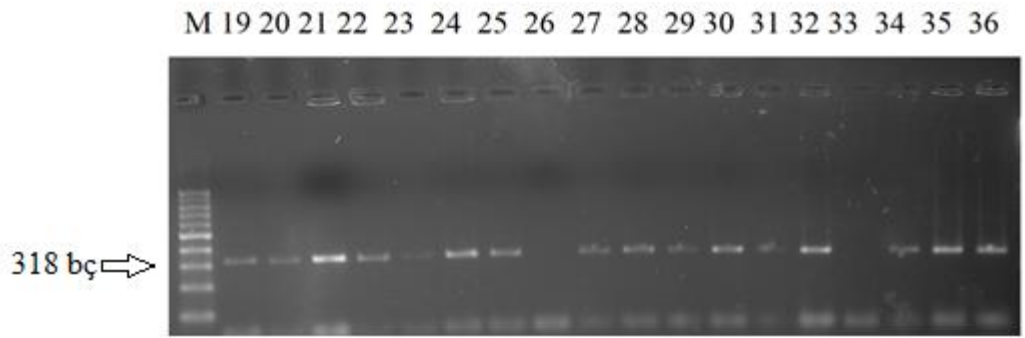
Laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve karakterizasyonu bilimsel ve endüstriyel açıdan önem kazanmaktadır. *L. plantarum*'ların tanımlanabilmesi için bunların fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri ile faj tiplerinin ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesini ve serolojik olarak tiplendirilmelerini kapsayan klasik yöntemlerin yanında son yıllarda önem kazanan Polimeraz Zincir Reaksiyonu, DNA dizilim analizi, Pulsed Field Jel Elektforezi, Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi, Çoğaltılmış rDNA'nın Restriksiyon Analizi, Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektforezi gibi moleküler biyoloji tekniklerinden de yararlanıldığı bildirilmiştir (Busch ve Nitschko, 1999).

Çalışmada izolatların; morfolojilerine, gram boyama reaksiyon özellikleri ve katalaz testleri yapılan ve *Lactobasillus* olduğu tespit edilen 51 izolatın MRS Agar petrilere ekimi yapılmıştır. Moleküler olarak tanımlama yapılması için petrilere alınan tek *Lactobacillus* kolonilerinin *recA* genin planF-planR primer kullanıldı. Kullanılan primerler Çizelge 2.4'de verilmiştir.

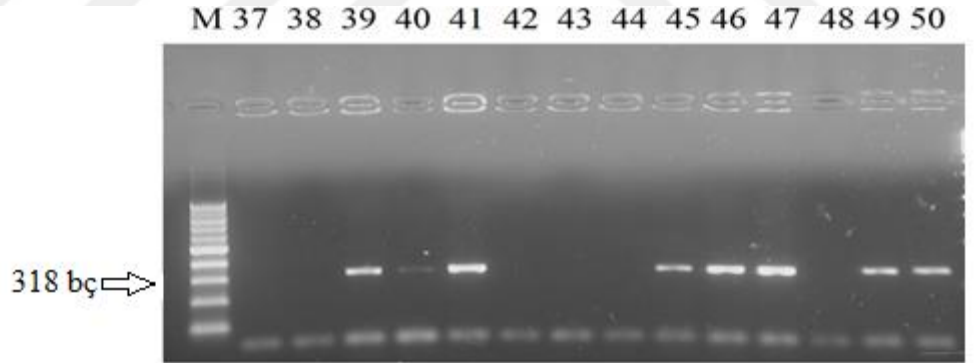
*L. plantarum* için *recA* gen bölgesi PCR ile çoğaltacak şekilde Primer çiftleri (planF-planR ) sentezletirilmiştir. *L. plantarum* türlerinde PCR reaksiyonunda 318 bp uzunluğundaki bölgenin çoğaltılması hedeflenmiştir. PCR çalışma şartlarında çoğaltılan PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.



**Şekil 3.3.** Doğal yoğurtlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin (1-18. izolatlar) PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı



**Şekil 3.4.** Doğal yoğurtlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin (19-36. izolatlar) PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı



**Şekil 3.5.** Doğal yoğurtlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin (37-50. izolatlar) PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı

Farklı *Lactobacillus* türlerinin *L. plantarum*, *L. pentosus* ve *L. paraplantarum* moleküler olarak tanımlanmasında *recA* gen bölgesi primerleri kullanılmıştır. PCR sonuçlarına göre *recA* gen bölgesi primerleri *L. plantarum* için 318 bç uzunluğundaki bölgeyi kopyalarken, *L. paraplantarum* da ise bu gen 107 bç, *L. pentosus* için 218 bç'lik bir bölgeyi kopyaladığı bildirilmiştir (Torriani vd., 2001).

İzolasyonu yapılan laktik asit bakterilerinin moleküler yöntemle *recA* gen bölgesi primeri kullanılarak tanımlamaları yapılmıştır. Elde edilen izolatların PCR ile

tanımlanması sonucunda 318 bç'de DNA bandı veren toplam 40 adet şüpheli *L. plantarum* izolatu elde edilmiştir.

Bu tarz çalışmalarda biyokimyasal tanımlama yapılamadan planlanan moleküler tanımlamalar için kullanılacak primerler genelde kolonilerden bazılarında yanlış tanımlamalara neden olabilmektedir. Bu nedenle moleküler tanımlama ile biyokimyasal tanımlamalar beraber değerlendirildiğinde daha etkin bir tanımlama olmaktadır (Tabasco vd., 2007).

Çalışmada *L. plantarum* suşu olabilecek izolatların biyokimyasal ve moleküler yöntem ile tanımlanarak doğrulanmıştır. Elde edilen bulgularımız literetür bilgileriyle eşdeğer olduğu belirlenmiştir.

### **3.2. Plazmit İzolasyonu ve Antibiyotik Direnç Özellikleri**

#### **3.2.1. *L. plantarum* izolatlarından plazmit izolasyonu**

Bakterilerin fermentasyonu sadece kromozom üzerindeki genlerden sağlanmamıştır. Gelişim zarfında bakteriler genetik materyal olan plazmitleri zamanla diğer mikroorganizmalardan kazanabilmektedirler. Plazmitler bakterilere kötü şartlarda direnç sağladıkları gibi aroma oluşumuna sebep olan metabolitleride üretebilecek genleri de bulundurmaktadırlar. Bu plazmitler glikoliz, bakteriyosin sentezi, yağ asidi sentezi, aminoasit metabolizması, disakkaritlerin parçalanması gibi görevlerini de yerine getirmektedirler. Plazmitler mikroorganizmasını fajlara karşı korumanın yanında lezzet oluşumu görevi de üstlenmektedirler (Aslım ve Beyatlı, 2004).

Plazmit kökenli genlerin kodladıkları önemli metabolik fonksiyonlar başlangıç kültürlerinin gelişimini ve kapasitelerini artırmaktadır. Plazmitler antibiyotik direnç özelliklerinin ilave olarak bakteriyosin üretimi laktoz fermentasyonu ve ağır metallere dayanıklılık gibi önemli özellikler bulundurmaktar ve bu tür özellikler başlangıç kültürleri için kabul görmektedir. Bunun yanında plazmitlerin antibiyotik direnç göstermesi gıdalarda kullanımı açısından sorun oluşturmaktadır. Peynirden ve çiğ süttten izole edilen *L. lactis* ssp. *lactis* K214 izolatları antibiyotiklere karşı direnç göstermektedir (Perreten vd., 1997).

İzolasyonu yapılan 63 adet *L. plantarum*'dan izole edilen plazmitler büyüklük ve sayı bakımından araştırılmıştır. İzolatlardan büyük çoğunluğu 1 tane plazmit içerirken

7, 31 ve 33 nolu olanlarında 3 tane, 15 tanesinde ise plazmit varlığı tespit edilmemiştir (Alan, 2014).

Çalışmanın bu bölümünde izole edilen 40 adet *L. palantarum*'dan izole edilen plazmitler sayı, büyüklük ve direnç özellikleri açısından incelenmiştir. Plazmit DNA izolasyonu materyal ve metot bölümünde belirtildiği gibi hazır kit ve manuel geleneksel yöntemleri kullanılarak yapılmış ve plazmit varlığı tespit edilmediğinden en az 2 kez her iki yöntem kullanılarak ve plazmit yokluğu teyit edilmiştir.

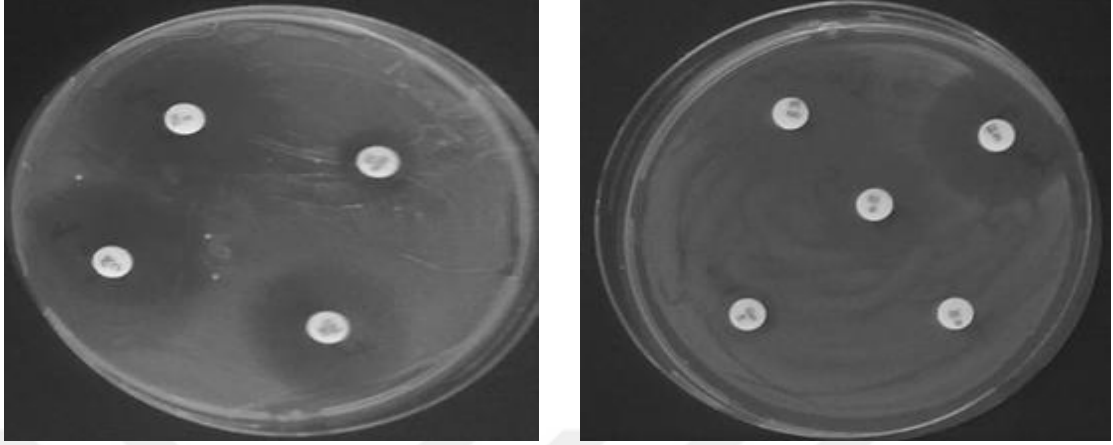
### **3.2.2. İzolatların antibiyotik direnç özellikleri**

Fermente gıdaların üretiminde, antibiyotik direnç geni bulunan laktik asit bakterileri kullanılmaktadır. Yapılan son çalışmalarda, bakteri türleri arasında antibiyotik dirençliliğin yayılması ve seçilmesi üzerine durulmakla birlikte, gıda üretiminde kullanılan bakterilerin antibiyotik direnç genlerinin üzerinde barındırdığı da bildirilmektedir. Bu nedenle insan vücuduna fermente gıdalar yoluyla alınan ve biyoteknolojik çalışmalarda kullanılan bakteriler çok önemlidir. Bu bakteriler antibiyotik dirençliliği patojen bakterilere veya konakçıya aktarabilmektedirler (Hummel vd., 2007). Bakteriler direnç sağlayan genleri kromozomları üzerinde de bulundurmaktadırlar. Kazanılmış özelliklerin yanında kazanılmamış (kromozoma ait) direnç özellikleri diğer bakterilere geçmesi patojen olmayan suşlara risk oluşturmamaktadır. Ayrıca antimikrobiyel maddelerin etkisin de kalan mikroorganizmalar bu maddelere karşı direnç kazandırmaktadırlar (Levy, 1997).

Günümüzde yaygın olarak antibiyotiklerin kullanılması probiyotik bakteriler, faydalı bakteriler ve fermente ürünlerde rol alan laktik asit bakterileri gibi, gıda zinciri içerisinde ki bakterilerin insan ve hayvanlarda tedavi için kullanılan antibiyotiklere karşı direnç kazanmasını sağlamaktadır. Laktik asit bakterilerinde en çok eritromisin ve tetrasiklin gibi antibiyotiklere karşı direnç göstermektedir. Aktarılan bu antibiyotik direnç genlerinin, çoğu dikey (hortizal) taşınma ile yayıldığı öngörülmektedir. Araştırmaların çoğunda, insan ve hayvan bağırsağındaki bakterilerin genelinde aynı antibiyotiklere karşı dirençli olmaları da organizmalar arasında direnç geninin transferini ve dağılmasını doğrulamıştır (Ammor vd., 2007).

Çalışmanın bu kısmında izole edilen bakterilerin Eritromisin (15µg), Kanamisin (30µg), Penisillin (10µg), Kloramfenikol (30µg), Gentamisin (10µg), Trimetoprim (5µg) gibi 6 farklı antibiyotiğe karşı göstermiş olduğu direnç-duyarlılık sonuçları

belirlenmiştir. Antibiyotiğe karşı direnç özelliği her bir izolat için 2.9.1’de anlatıldığı gibi belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar çizelge 3.3.’de verilmiştir.



**Şekil 3.6** İzolatların antibiyotik direnç özelliklerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi sonucu elde edilen zon görüntüleri.

Eritromisin’e karşı en duyarlı olan 35 nolu izolat 40 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiş olup, en az duyarlılığı ise 26 nolu izolat 20 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenmiştir. Eritromisin’e karşı oluşan inhibisyon zon çapları 20 mm ile 40 mm arasında değişim göstermektedir. Eritromisin toplamda izolatların %50’sine karşı direnç gösterirken %50’sine karşı da duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Kanamisin’e karşı doğal yoğurtlardan izole edilen *L. plantarum* suşlarının % 97.5 i (39 izolat) direnç gösterirken % 2.5 i (1 izolatın) duyarlı olduğu belirlenmiştir. Kanamisin’e karşı sadece 14 nolu izolat 7 mm inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir.

**Çizelge 3.3.**Doğal yoğurtlardan izole edilen *L. plantarum* suşların antibiyotik dirençlilikleri

<b>İzolatlar</b>	<b>Eritromisin</b>	<b>Kanamisin</b>	<b>Penisilin</b>	<b>Kloramfenikol</b>	<b>Gentamisin</b>	<b>Trimethoprim</b>
<i>L. plantarum</i> 1	32*	R	12	32	11	21
<i>L. plantarum</i> 2	25	R	R	18	8	30
<i>L. plantarum</i> 3	R	R	R	24	R	R
<i>L. plantarum</i> 4	R	R	R	R	11	R
<i>L. plantarum</i> 5	24	R	R	R	7	R
<i>L. plantarum</i> 6	28	R	18	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 7	28	R	16	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 8	R	R	R	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 9	24	R	R	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 10	R	R	R	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 11	R	R	R	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 12	R	R	R	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 13	R	R	R	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 14	28	7	R	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 15	R	R	R	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 16	R	R	R	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 17	R	R	R	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 18	28	R	R	16	R	R
<i>L. plantarum</i> 19	R	R	R	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 20	28	R	13	25	11	R
<i>L. plantarum</i> 21	R	R	R	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 22	R	R	R	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 23	R	R	R	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 24	24	R	R	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 25	30	R	16	28	25	23
<i>L. plantarum</i> 26	20	R	R	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 27	22	R	10	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 28	25	R	R	R	15	R
<i>L. plantarum</i> 29	R	R	R	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 30	26	R	R	27	12	R
<i>L. plantarum</i> 31	26	R	R	13	11	30
<i>L. plantarum</i> 32	R	R	R	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 33	R	R	R	16	12	R
<i>L. plantarum</i> 34	R	R	R	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 35	40	R	20	R	20	40
<i>L. plantarum</i> 36	28	R	18	22	10	9
<i>L. plantarum</i> 37	R	R	R	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 38	R	R	R	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 39	25	R	8	R	14	R
<i>L. plantarum</i> 40	29	R	8	R	14	R

(\*): İnhibisyon zonu, mm; (R): Dirençli



Penisillin'e karşı en az duyarlı olan 39 ve 40 nolu izolatlar 8 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu, en fazla duyarlı ise 35 nolu izolat 20 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir. Penisillin'e karşı oluşan inhibisyon zon çapları 8 mm ile 20 mm arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Penisillin antibiyotiğine karşı 10 izolat (% 25) duyarlıyken 30 izolat ise (%75) dirençli oldukları belirlenmiştir.

*L. plantarum* suşları Kloramfenikol'e karşı 13-32 mm aralığında inhibisyon zonu oluşturmuştur. Bu izolatlardan sadece 1 nolu izolat en duyarlı olup 32 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu ve 31. İzolatın da en az duyarlı olup 13 mm çapında zon oluşturduğu belirlenmiştir.

Gentamisin'e karşı en çok duyarlı 25 nolu izolat 25 mm çapında inhibisyon zonu oluştururken en az duyarlı 5 nolu izolat 7 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir. Gentamisin'e karşı oluşan inhibisyon zonları 7 mm ve 25 mm arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Toplamda 14 izolat gentamisine karşı duyarlı iken 26 izolat ise dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Trimetoprim antibiyotiğine karşı izolatların %75'i direnç gösterirken %15'i ise duyarlı olduğu belirlenmiştir. Trimetoprim'e karşı en çok duyarlı 35 nolu izolat 40 mm çapında İnibisyon zonu oluştururken 36 nolu izolat 9 mm çapında İnibisyon zonu oluşturduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmamızdaki *L. plantarum* suşların da plazmit tespit edilmediğinden suşların antibiyotiklere karşı gösterdiği direnç kromozomal DNA kodlu olduğunu düşünülmektedir. *L. plantarum* 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 21, 22, 23, 29, 32, 34, 38 nolu suşlar bütün antibiyotiklere dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bu suşlar toplam izolatların % 37.5' ine denk geldiği belirlenmiştir. *L. plantarum* 35 nolu izolat eritromisin ve trimethoprim'e karşı en duyarlı iken kanamisin ve kloramfenikol'e karşı ise direnç gösterdiği belirlenmiştir. İzolatlar içerisinde antibiyotiklere karşı en fazla duyarlılığı 25, 35 ve 36 nolu suşlar göstermiştir.

İzolatların antibiyotiklere karşı göstermiş oldukları dirençlilik, orta derece dirençlilik ve duyarlılık aralıkları Çizelge 3.4' de verilmiştir.

**Çizelge 3.4.** Standart antibiyotiklerin karşılaştırma değerleri (Han vd., 2015; Çelik vd., 2016)

ANTİBİYOTİK	Disk İçeriği	Zon Çapı, mm		
		Dirençli	Orta derecede duyarlı	Duyarlı
Eritromisin	10 µg	≤15	16-20	≥21
Kanamisin	30 µg	≤13	14-17	≥18
Penisillin	10 µg	≤14	15-17	≥18
Kloramfenikol	30 µg	≤12	13-17	≥18
Gentamisin	10 µg	≤12	13-14	≥15
Trimethoprim	25 µg	≤14	15-17	≥18

Kullanılan antibiyotiklere karşı *L. plantarum* izolatlarının göstermiş olduğu 3 (dirençlilik, orta derece dirençlilik ve duyarlılığı) parametrenin yüzde (%) hesaplamaları Çizelge 3.5’ te verilmiştir.

**Çizelge 3.5.** Doğal yoğurtlardan izole edilen *L. plantarum* suşlarının direnç-duyarlılık durumlarının standart antibiyotiklerle karşılaştırması (%) n=40

Antibiyotikler	Duyarlı (%)	Orta derecede duyarlı (%)	Dirençli (%)
Eritromisin	47.5	2.5	50
Kanamisin	0.0	0.0	100
Penisillin	7.5	5	87.5
Kloramfenikol	17.5	7.5	75
Gentamisin	7.5	5	87.5
Trimethoprim	12.5	0.0	87.5

Çizelgede görüldüğü gibi *L. plantarum* suşları en yüksek duyarlılığı eritromisin’e karşı (% 47.5) gösterirken, en düşük duyarlılık ise penisillin ve gentamisin’e (% 7.5) karşı gösterdiği tespit edilmiştir. İzolatlar en yüksek orta dereceli duyarlılığı kloramfenikol’e (% 7.5) karşı göstermiş olup, penisillin ve gentamisin’e karşı ise aynı oranda (% 5) orta dereceli duyarlılık gösterdikleri belirlenmiştir. Suşlar en yüksek direnci kanamisin antibiyotiğine karşı (%100) gösterirken, en düşük direnci ise eritromisin’e (% 50) karşı gösterdiği tespit edilmiştir. Penisillin, gentamisin ve trimethoprim antibiyotiklerine karşı aynı oranda direnç (%87.5) gösterdikleri belirlenmiştir.

Ammor ve ark. (2007), *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Bifidobacterium*’un antibiyotik direnç profilleri oldukça farklı olduğunu belirtmişlerdir. Bazı LAB’leri basitrasin, sefoksitin, siprofloksasin, fusidik asit, kanamisin, gentamisin, metronidazol, nitrofurantoin, norfloksasin, streptomisin ve vankomisin karşı yüksek doğal dirençlilik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, LAB genellikle peniciline (piperacilin

ve ampicilin) ve  $\beta$ -laktamaz inhibitörlerine karşı duyarlı olduğu, fakat oxacillin ve sefalosporinlere karşı çok dirençli olduğunu belirtmişlerdir (Daniels ve ark., 2003).

Araştırmalarda genelde Laktobasiller protein sentezini engelleyen eritromisin, klindamisin, kloramfenikol ve tetrasiklin gibi antibiyotiklere duyarlı, aminoglikozidazlara, gentamisin, streptomisin, neomisin ve kanamisin gibi dirençlidir (Charteris vd., 1998; Coppola vd., 2005; Zhou vd., 2005).

Laktobasiller de karbonhidratları fermente etme özelliği hem kromozal hemde plazmitlerde kodlu olmasına rağmen, laktokoklar da yalnızca plazmit DNA kaynaklı olduğu belirtilmiştir. Ayrıca laktobasiller de laktoz metabolizması yapan plazmit kodlu türler bulunmaktadır. Bu türlere *L. plantarum*, *L. casei* ve *L. acidophilus* örnek verilebilir. *L. plantarum* bakterilerinin plazmitlerinde bulunan gal, FIILac ve phg genlerinin laktoz metabolizmasına neden olduğu belirtilmektedir. Aynı zamanda *L. plantarum* bakterilerinde  $\beta$ -galaktozidaz enzimini kodlayan genetik madde de plazmitlerde bulunmaktadır (Mayo vd., 1994).

Bunun yanında bazı *L. plantarum* suşlarında  $\beta$ -galaktozidaz geninin plazmit kodlu olduğu gibi kromozomal DNA kodlu olduğunu da, bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Fernandez vd., 1999).

*L. plantarum* bakterilerinin direnç sağlayan özelliklerinin sadece plazmit taşıyan izolatlarda olmadığı kromozom üzerindeki mutasyonlar ile oluşmuş özellikler olabilmektedir. Ayrıca starter kültür seçiminde sadece plazmit özelliğine bakılması yeterli olmayacağından antibiyotik direnç özellikleri ve antibakteriyal etkilerine bakılması gerekmektedir.

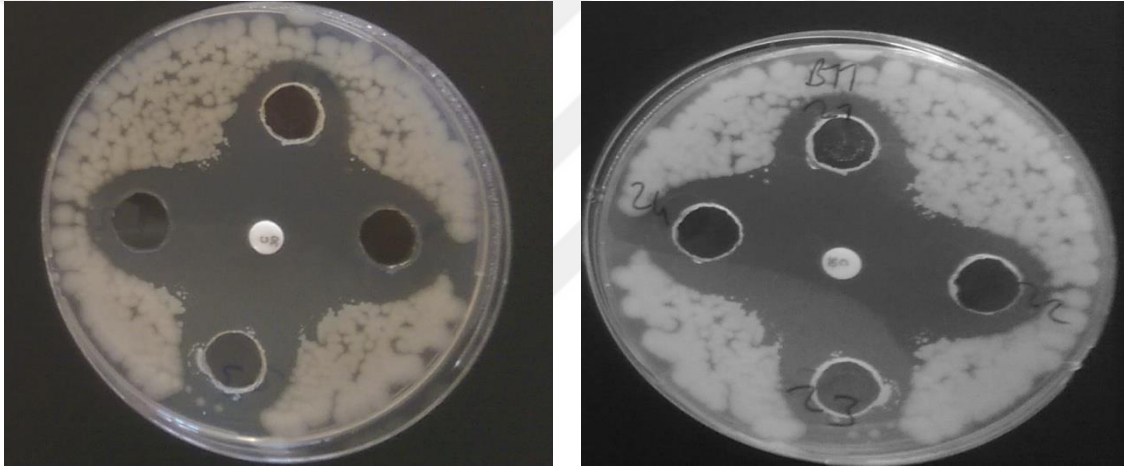
### **3.3. İzolatların Diğer Mikroorganizmalar Üzerindeki Etkileri**

Yoğurtan izole edilen *L. plantarum* izolatlarının antibakteriyel etkileri uyuk agar difüzyon testi ile belirlenmiştir. Bu amaçla *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Bacillus megaterium* DSM 32, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 ve *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883 kodlu bakterilere karşı direnç ve duyarlılık özellikleri incelenmiştir.

Laktik asit bakterilerinin en önemli inhibitör etkisi özellikle asidik ortamlarda oluşmaktadır. Ayrıca inoküle edilen starter kültür miktarı ve aktivitesi de, özellikle

fermantasyonun ilk aşamasında, patojen mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmektedir (Tekinşen vd., 1994).

*L. plantarum* bakterileri üzerine yapılan çalışmalar da bakteriyosinlerin plazmit kodlu olduğu belirtilmiştir. Ayrıca Karides sindirim sisteminden izolasyonu yapılan *L. plantarum* suşundan plazmit izole edilmiş ve elde edilen 5,5 kb'lık plazmitin bakteriyosin üretiminden etkeni olduğu bildirilmiştir (Karthikeyan ve Santosh, 2009). Bakteriyosin üretimi yapan ve dirençlilik özelliklerinin genellikle plazmit DNA'da kodlu olduğu belirtilmekle birlikte, bakteriyosin üretiminden sorumlu genlerin kromozomda kodlanmış olabilecekleri de açıklanmıştır. (Todorov ve Dick, 2005; vanReenen vd., 2006; Todorov, 2009). Elde edilen sonuçlar çizelge 3.6'da verilmiştir.



**Şekil 3.7** İzolatların diğer bakteriler üzerindeki direnç özelliklerinin oyuk agar metodu sonucu elde edilen zon görüntüleri

Laktik asit bakterilerinin üzerine yapılan çalışmalarda da Gr (+) bakteriler üzerine inhibisyon etkisinin Gr (-) bakterilerine göre daha güçlü olduğu belirtilmiştir (Sobrino vd., 1991; Makras ve De Vuyst, 2006). Ayrıca Gram (-) bakterilerin dış zarlarının bütünlüğü bozulduğunda bakteriyosinlere karşı çok hassas duruma geldikleri bildirilmiştir (Philipps ve Duggan, 2001).

Çizelge 3.6. Doğal yoğurtlardan izole edilen *L. plantarum* suşların diğer bakterilere karşı dirençlilikleri

İzolatlar	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B.megaterium</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>K.pneumoniae</i>
<i>L. plantarum</i> 1	20*	20	21	21	22	20	17
<i>L. plantarum</i> 2	19	20	22	21	19	18	17
<i>L. plantarum</i> 3	20	20	20	21	18	24	18
<i>L. plantarum</i> 4	19	21	22	24	17	20	19
<i>L. plantarum</i> 5	24	21	25	23	23	21	26
<i>L. plantarum</i> 6	22	25	21	20	18	20	23
<i>L. plantarum</i> 7	24	23	20	18	18	14	18
<i>L. plantarum</i> 8	18	23	18	13	19	14	22
<i>L. plantarum</i> 9	24	22	23	23	19	26	25
<i>L. plantarum</i> 10	24	20	21	21	17	24	25
<i>L. plantarum</i> 11	18	18	18	18	18	20	20
<i>L. plantarum</i> 12	24	21	22	20	20	20	25
<i>L. plantarum</i> 13	21	20	24	20	22	24	18
<i>L. plantarum</i> 14	19	17	21	20	20	22	16
<i>L. plantarum</i> 15	15	17	20	16	18	28	16
<i>L. plantarum</i> 16	17	17	17	15	20	21	17
<i>L. plantarum</i> 17	13	11	12	11	11	14	14
<i>L. plantarum</i> 18	16	14	23	20	28	20	19
<i>L. plantarum</i> 19	17	11	20	21	22	20	19
<i>L. plantarum</i> 20	19	13	22	20	34	20	18
<i>L. plantarum</i> 21	26	25	21	25	20	24	21
<i>L. plantarum</i> 22	24	23	22	22	20	24	23
<i>L. plantarum</i> 23	25	23	19	21	28	24	23
<i>L. plantarum</i> 24	23	23	25	24	20	23	24
<i>L. plantarum</i> 25	18	21	18	20	15	15	16
<i>L. plantarum</i> 26	17	23	17	18	16	14	17
<i>L. plantarum</i> 27	18	24	18	20	18	16	18
<i>L. plantarum</i> 28	17	20	17	20	17	18	20
<i>L. plantarum</i> 29	19	18	21	13	16	20	20
<i>L. plantarum</i> 30	19	20	19	16	19	19	19
<i>L. plantarum</i> 31	19	20	18	17	19	20	19
<i>L. plantarum</i> 32	18	19	19	16	19	21	14
<i>L. plantarum</i> 33	18	16	18	18	20	24	19
<i>L. plantarum</i> 34	11	11	11	11	11	11	11
<i>L. plantarum</i> 35	19	18	17	18	20	20	19
<i>L. plantarum</i> 36	20	19	17	21	20	21	21
<i>L. plantarum</i> 37	24	21	21	21	20	20	20
<i>L. plantarum</i> 38	22	20	17	18	20	20	18
<i>L. plantarum</i> 39	21	18	21	17	19	16	17
<i>L. plantarum</i> 40	24	18	23	18	20	18	17

(\*): İnhibisyon zonu, mm; (R): Dirençli

Çon ve Gökalp (2000), yaptıkları çalışmada 51 sucuk örneğinden izole edilen laktik asit bakterilerinden *L. plantarum*'un *Staphylococcus aureus* üzerinde çok güçlü antimikrobiyel etki görülmüştür, *Escherichia coli* üzerine etkili göstermediği, *Listeria monocytogenes* üzerine ise zayıf antimikrobiyel etki gösterdiğini bildirilmiştir. *Lactobacillus curvatus*' un ise *Staphylococcus aureus* üzerine güçlü antimikrobiyel etki gösterdiğini fakat *Escherichia coli* üzerine zayıf antimikrobiyel etkili olduğunu bulmuşlardır.

*S. aureus*'e karşı oluşan inhibisyon zonları 11-26 mm çapı arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. *S. aureus*'e karşı en fazla antibakteriyel etki gösteren 21 nolu suş 26 mm çapında inhibisyon zonu oluştururken en az etki gösteren ise 34 nolu izolat 11 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenmiştir.

*L. plantarum* bakterileri *E. coli* bakterisi üzerinde 11-25 mm arasında inhibisyon zonları oluşturmuştur. *E. coli* bakterisi üzerinde en fazla etkiyi 25 mm çapında zon oluşturan 6 ve 21 nolu izolatlar göstermiştir. *L. plantarum* 34 ve 17 ise en az antibakteriyel etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir.

*L. plantarum* suşları *P. aeruginosa* bakterisi üzerinde 11-25 mm çap arasında inhibisyon zonlar oluşturarak test bakterilerinin gelişimini büyük oranda engellediği tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* bakterisine karşı en çok duyarlı 5-24 nolu izolatlar 25 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu gözlemlenmiştir.

*B. subtilis* test bakterisi üzerinde *L. plantarum* suşları 11 - 25 mm çap arasında zonlar oluşturmuştur. 1, 2, 3, 10, 19, 23, 36, 37 nolu izolatlar *B. Subtilis* bakterisi üzerinde 21 mm çapında zon oluşturarak aynı etkiciyi göstermiştir. *L. plantarum* suşları içerisinde *B. Subtilis*'e karşı en fazla duyarlılığı 17 ve 34 nolu bakteriler 11 mm çap aralığında inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir.

*Bacillus megaterium*'a karşı en çok duyarlı 20 nolu izolat 34 mm çapında inhibisyon zonu oluştururken, en az duyarlı 17 ve 34 nolu izolatlar 11 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir. *B megaterium*'a karşı oluşan inhibisyon zonları 11-34 mm arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir.

Çalışmamızdaki izolatlar *Enterobacter aerogenes*'e karşı yüksek oranda (11-28 mm) antibakteriyel etkide bulunmuştur. Bu izolatlardan sadece 15 nolu suş en duyarlı

olup 28 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu ve 34. izolatin da en az duyarlı olup 11 mm çapında zon oluşturduğu belirlenmiştir.

*Klebsiella pneumoniae*'e karşı oluşan inhibisyon zonları 11-26 mm çapı arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. *Klebsiella pneumoniae*'e karşı en az antibakteriyal etki gösteren 34 nolu suş 11 mm çapında inhibisyon zonu oluştururken en fazla etki gösteren de 5 nolu izolat 26 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir.

*L. plantarum* suşlarının test bakteriler üzerinde yüksek genel inhibisyon etkileri sırası ile *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Bacillus subtilis*, bakterileri üzerinde görülmüştür. Bu çalışmada kullandığımız bütün patojen bakterileri üzerinde en az antibakteriyal etkiyi gösteren izolat 34 nolu izolat olmuştur. Aynı zamanda hepsinde 11 mm çapında inhibisyon zonu oluşturmuştur. *L. plantarum* bakterileri içerisinde en fazla antibakteriyal etkiyi 21 nolu suş göstermiştir. Ayrıca bazı alışmalar *L. plantarum* tarafından üretilen bakteriosinin inhibisyon etkisinin bazı gıda kaynaklı patojen bakteriler üzerinde antagonistik etkisinin laktik asit ve bakteriosinden ileri geldiği bildirilmiştir (Klaenhammer, 1988 ).

#### 4. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, fermente gıdalardan olan yoğurtlardan fermantasyona neden olan laktik asit bakterileri izole edildi. Yoğurtlardan izole edilen bakterilerinin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal tanımlanması yapılan 125 adet laktik asit bakterisi stoklara alınmıştır.

Doğal yoğurtlarından izole edilen *L. plantarum* suşlarının genetik elementleri, antimikrobiyal direçlilik gibi özelliklerinin belirlendiği bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir

Muş ilinin farklı bölgelerinden doğal olarak yapılmış yoğurt örnekleri toplanarak LAB'lar izole edilmiştir. Bu izolatların ön tanımlanması (koloni morfolojisi, katalaz, gram boyama) ve *recA* gen dizisi kullanılarak PCR ile tanımlanması yapılmış ve sonuç olarak toplam 40 adet şüpheli *L. plantarum* suşu elde edilmiştir. Tanımlanan *L. plantarum* izolatların plazmit DNA izolasyonu sonucunda plazmit içermediği saptanmıştır.

İzolatların antibiyotiklere karşı dirençliliğinin belirlenmesi için yapılan çalışmada 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 29, 32, 34, 38 nolu suşları bütün antibiyotiklere karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. *L. plantarum* izolatlarının eritromisin % 50, kanamisin % 100, penisilin % 87.5, kloramfenikol % 75, gentamisin % 87.5 ve trimethoprim % 87.5 yüksek oranda dirençli olduğu belirlenmiştir. *L. plantarum* suşların da plazmit tespit edilmediğinden suşların antibiyotiklere karşı gösterdiği direnç kromozomal DNA kodlu olduğunu düşünülmektedir.

İzolatların antibakteriyal aktivitelerine belirlenmesi için yapılan çalışmada izolatların tümü antibakteriyal etki gösterdiği tespit edilmiştir. İzolatlarda en fazla antibakteriyal etki gösteren 20 nolu suş *B. megaterium*'a karşı 34 mm çapında inhibisyon zonu oluştururken en az antibakteriyal etki gösteren 34 nolu suş tüm test bakterilerine karşı 11 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir.

Bu araştırmadan elde edilen sonuçlara göre izolatların incelenen bütün özellikleri ele alındığında; plazmit içermeyen, antibiyotiklere karşı dirençli ve patojen mikroorganizmalar üzerindeki etkilerin göre *L. plantarum* 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 29, 32, 34, 38 nolu izolatların gıda endüstrisinde kullanılabilir olduğu belirlenmiştir. Yoğurtta bulunan *L. plantarum* üretmiş oldukları antibakteriyal



maddelerden dolayı insan florasına zarar verici patojenlerin gelişmesi engelleyerek insan sağlığına katkıda bulunacağı düşünülmektedir.



## 5. KAYNAKLAR

- Alan, Y., 2014. Doğal *Lactobacillus plantarum* izolatlarının gıda güvenliği ve aromatik özelliklerinin araştırılması. Doktora Tezi, Sütçü İmam Üniversitesi, Kahramanmaraş, Türkiye
- Ammor, M. S., Florez, A .B., Mayo, B., 2007. Antibiotic resistance in nonenterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24 (6), 559-570.
- Ammor, M. S., Florez, A. B., Van Hoek, A. H. A. M., De Los Reyesgavilán, C. G., Aarts, H. J. M., Margolles, A., Mayo, B., 2008. Molecular chracterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Mol. Microbiology. Biotechnol.* 14 (1-3), 6- 15.
- Anderson, D.G., Mckay, L.L., 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from *lactic streptococci*. *Applied and Environmental Microbiology*, 46 (3), 549- 552.
- Anderson, R., 1989. Lactic acid bacteria in the production of food, SIK-Publication, food laboratory newsletter. *Food Processing*, 14-17.
- Anonymous, 1999. NCCLS (National committee for clinical laboratory standards). performance standards for antimicrobial susceptibility testing, The th International Supplement; Villanova, PA, M100-S9,
- Anonymous, 1999. Yoğurt standardı. TS 1330. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- Aslım, B., Beyatlı, Y., 2004. Antibiotic resistance and plasmid DNA contents of *Streptococcus thermophilus* Strains Isolated from Turkish Yogurts. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science*, 28 (2), 257-263.
- Ayad, E. H., Verheul, A., Wouters, J.T. and Smit, G., 2000. Application of wild starter cultures for flavour development in pilot plant cheese making. *International Dairy Journal*,10 (3), 169-179.
- Bizani, D., Morrissy, J. A. C., Dominguez, A. P. M., Brandelli, A., 2008. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. *Int J Food Microbiology*, 121 (2), 229-233.

- Brown, T.A., 2000. Essential Molecular Biology, 2<sup>nd</sup> Edn., Vol. 1., A Practical Approach. Oxford Univ. Press, Oxford. UK.
- Busch, U., Nitschko, H., 1999. Methods for differentiation of microorganisms. Journal of Chromatography, 722 (1-2), 263- 278.
- Caplice, E., Fitzgerald, G.F., 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and food preservation. Int. J. of Food Microbiology, 50 (1-2), 131-139.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K., 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. Journal of Food Protection, 61(12), 1636–1643.
- Collins, CH., Lyne, PM., Grange, JM., 1989. Microbiological Methods. Sixth Edition, Butterworths and Co. Ltd. 410s, London.
- Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G., Sorrentino, E., 2005. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. Lait 85 (3), 193–204
- Çelik, H., Durak, Y., Uysal, A., 2016. Bazı ticari ve ev yapımı yoğurtlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik duyarlılıkları, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi, 42 (2), 149-160.
- Çon, A.H., Gökalp, H.Y., 2000. Production of bacteriocin-like metabolites by lactic acid cultures isolated from sucuk samples. Meat Science, 55 (1), 89-96.
- Daeshcel, M., 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. Lait, 75, 463-472.
- Danielsen, M., Wind, A., 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. International Journal of Food Microbiology, 82 (1), 1-11.
- Daniels, J.A.R., Krishnamurthi, S.S., Rizvi, H. 2003. A Review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food Quality. J. Food Prot, 48, 532-537.
- De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H.M., Weckx, S., 2014. Microbial ecology of sourdough fermentations. Diverse or uniform. Food Microbiology, 37, 11-29.

- Demir, N., Bahçeci, K.S., Acar, J., 2006. The effects of different initial concentrations on some properties of fermented carrot juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 30 (3), 352-363.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L. and Debevere, J., 2004. New preservation technologies: possibilities and limitations. *Inter. Dairy J*, 14 (4), 273-285.
- Dilsiz, N., 1998. Nuclear transfer and biotechnology. *Sendrom*, 10, 99-105.
- Dinsmore, P.K., Klaenhammer, T.R., 1995. Bacteriophage resistance in *Lactococcus*. *Molecular Biotechnology*, 4 (3), 297-314.
- Duckworth, A.W., Ruiz-Barba, J.L., Warner, P.J., 1993. Construction of integrating derivatives of pHV60 for Use in *Lactobacillus plantarum*. *Fems Microbiology Letters*, 114 (3), 267-272.
- Fallon, S., Emg, M. G., 1999. *Nourishing Traditions (2nd Edition)*, New Trends Publishing. 688p
- Favret, M.E., Yousten, A.A., 1989. Thuricin: the bacteriocin by a *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 53 (2), 206-216.
- Fernandez, M., Margolles, A., Suarez, J.E., Mayo, B., 1999. Duplication of the  $\beta$ galactosidase gene in some strains. *International Journal of Food Microbiology*, 48 (2), 113-123.
- Garvey, P., Fitzgerald, G.F. and Hill, C., 1995. Cloning and DNA sequence analysis of two abortive infection phage resistance determinants from the lactococcal plasmid pNP40. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12), 4321-4328.
- Gheytañchi, E., Heshmati, F., Shargh, B. K., Nowroozi, J., Movahedzadeh, F., 2010. Study on  $\beta$ -galactosidase enzyme produced by isolated lactobacilli from milk and cheese. *African Journal of Microbiology Research*, 4(6), 454-458.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A., Di Cagno, R., 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, 16 (1), 57-69.
- Gücin, F., Dülger, B., 1995. Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu. Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yayınları No: 3, Ders Kitabı No:1, Bursa, 155s.

- Gürsoy, O., Kınık, Ö., 2006. Fonksiyonel starter kültürlerin teknolojik uygulamalarına bir bakış. Türkiye 9. Gıda Kongresi 24-26 Mayıs Bolu, 173-174
- Hamilton-Miller, J.M.T., Shah, S., 1998. Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli. *lett. Appl. Microbiology*, 26, 153-154.
- Hammes, W.P., Vogel, R.F., 1995. The genus *Lactobacillus*. in the genera of lactic acid bacteria. Wood BJB and Holzapel WH (Eds), Chapman & Hall, London. 19-54.
- Hummel, A., Holzapel, W.H., Franz, C.M.A.P., 2007. Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (3), 730-739.
- Han, JH., Chen, DH., Li, SS., Li, XF., Zhou, WW., Zhang, BL., Jia, YM., 2015. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *Italian Journal of Food Science*. 27, 282–289.
- Karahan A.G., Başyigit Kılıç, G., Kart, A., Şanlıdere Aloğlu, H., Öner, Z., Aydemir, S., Erkuş, O., Harsa, Ş., 2010. Genotypic identification of some lactic acid bacteria by amplified fragment length polymorphism analysis and investigation of their potential usage as starter culture combinations in beyaz cheese manufacture. *Journal of Dairy Science*, 93 (1), 1–11.
- Kandler, O., Weiss, N., 1986. Genus *Lactobacillus* Beijerinck. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ed. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M. E. and Holt, J.G, 2, 1209-1234.
- Karthikeyan, V., Santosh, S.W., 2009. Isolation and partial characterization of bacteriocin produced from *Lactobacillus plantarum*. *African Journal of Microbiology Research*, 3 (5), 233–239.
- Kılıç, S., 2008. Süt endüstrisinde laktik asit bakterileri. Ege Üniversitesi, Ege Üniversitesi Yayınları, Ziraat Fakültesi Yayın No: 542, ISBN: 975–483–488–1,451s, Bornova-İzmir
- Klaenhammer, T. R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12 (1-3), 39-85
- Klaenhammer, T.R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.*, 1988; 70, 337-349.

- Klinberg, T. D., Axelsson, L., Naterstad, K., Elsser, D., Budde, B. B., 2005. Identification of potential probiotic starter cultures for scandinavian-type fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 105 (3), 419– 431.
- Kurt, Ş., Zorba, Ö., 2005. Bakteriyosinler ve gıdalarda kullanım olanakları. *YYÜ Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 16 (1), 77-83.
- Lash, B.W., Mysliwiec, T.H., Gourama, H., 2005. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by (ATCC 8014). *Food Microbiology*, 22 (2), 199-204.
- Lederberg, J., 1998. Personal Perspective, *Plasmid (1952–1997)*. *Plasmid*, 39, 1–9
- Levy, S. B., 1997. Antibiotic resistance: an ecological imbalance. In Chadwick, D.J., Good, J. (Eds.), *Antibiotic resistance. Origins, evolution, Selection and Spread*. John Wiley and Sons, Chichester, p, 1- 14.
- Lu, Z., Breidt, F., Fleming, H.P, Altermann, E., Klaenhammer, T.R., 2003. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, øJL-1, From a Cucumber Fermentation. *Int. J. Food Microbiol*, 84 (2), 225-235.
- Makras, E., De Vuyst, L., 2006. The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *International Dairy Journal*, 16 (9), 1049-1057.
- Mandel, M., Higa, A., 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol*, 53 (1), 159-162
- Mathur, S., Singh, R., 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria. *Int. J. of Food Microbiology*. 105 (3), 281- 295.
- Mayo, B., Gonzalez. B., Arca, P., Snarez, J.E., 1994. Cloning and expression of the plasmid encoded p-D-galactosidase gene from a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *FEMS Microbiology Letters*, 122 (1-2), 145–152.
- Mayra-Makinen, A. and Bigret, M., 1993. Industrial use and production of lactic acid bacteria. Salminen, S., von Wright, A. and Ouwehand, A. (Ed.), *Lactic Acid Bacteria*, Marcel Dekker Inc., 617, New York
- Mckinley, M., 2005. The nutrition and health benefits of yoghurt. *Int. Journal of Dairy Technology*, 58 (1), 1- 12.

- Perreten, V., Schwarz, F., Cresta, L., Boeglin, M., Dasen, G. And Teuber., 1997 . Antibiotic resistance spread in food. *Nature*, 389, 801-802.
- Petti, S., Tarsitani, G., D'Arca, A. S., 2001. A randomized clinical trial of the effect of yoghurt on the human salivary microflora. *Archives of Oral Bbiology*, 46 (8), 705-712.
- Philips, C.A., Duggan, J., 2001. The effect of EDTA and trisodium phosphate, alone and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri* in culture. *Food Microbiology*, 18 (5), 5547-554.
- Pourahmad, R., Assadi, M. M., 2007. Used of isolated autochthonous starter cultures in yogurt production. *Int. J. Dairy Technology*, 60 (4), 259- 262
- Pouwels, P.H., Leer, R.J., 1993. Genetics of *Lactobacillus* plasmids and gene expression. *Antoniev van Leeuwenhoek*, 64 (2), 85–107.
- Pringsulaka, O., Thongngam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivejkul, K., Rangsiruji, A., 2012. Partial characterisation of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from thai fermented meat and fish. *Food Control*, 23 (2), 547-55.
- Rademaker, J.L.W. and de Bruijn, F.J., 2000. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis, <http://www.msu.edu.edu/user/debruijn/dna1-4htm>.
- Rasic, J., Kurman, J., 1978. *Yoghurt*. Technical Dairy Publishing House, Denmark
- Rebecchi, A., Crivori, S., Sarra, P.G. and Cocconcelli, P.S., 1998. Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 84 (6), 1043-1049
- Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B.J., Venkateshwar, M., Kumar, E.V., 2008. Amylolytic Bacterial Lactic Acid Fermentation. *Biotechnology Advances*, 26 (1), 22-34.
- Riemelt, I., Bartel, B. and Malcran, M., 1996. *Milchwirtschaftliche Microbiology*. B. Behr' s Verlag Gmbh., 382 p., Hamburg
- Riley, M. A., Wertz J. E., 2002. Bacteriocins: Evolution, ecology and epplication. *Annual Reviews in Microbiology*, 56, 117-137.

- Robinson, R.K., 1999. Fermented milks/Yoghurt. In “ Encyclopedia of Food Microbiology. Eds. R.K. Robinson, C.A. Batt, P.D. Patel. pp. 784-791” Academic Press, London
- Ros, R.P., Morgan, S., Hill, C. 2002. Preservation and fermentation: past, Present and Future. *Int. J. Food Microbiol*, 79 (1-2):3-16.
- Ruiz-Barba, J.L., Piard, J.C., Jimenez-Diaz, R., 1991. Plasmid profiles and curing of plasmids in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 71 (5), 417-421.
- Sağlam, H., 2013. Tanımlanmış *Lactobacillus plantarum* suşlarının plazmit profilleri ve bunların bazı özelliklerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, Türkiye.
- Schoneck, A., Kaufmann, K., 1998. The Cultured Cabbage: Rediscovery the Art of Making Sauerkraut, Alive Books.80 p
- Siezen, R.J., Kok, L., Abee, T., Schaafsma, G., 2002. Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications. Proceeding of the Seventh Symposium on Lactic acid bacteria: Genetics, Metabolism and Applications Congress, 1-28. )
- Sobrinho, O., Rodriguez, J.M., Moreira, W.L., Fernandez, M.F., Sanz, B., Hernandez, P.E., 1991. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiology.* 13 (1), 1-10.
- Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Pelaez, C., Requena, T., 2007. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei subsp. paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *International Dairy Journal*, 17 (9), 1107-1114
- Tamime, A.Y. , Robinson, R. K., 1985. Yoghurt science and technology, Pergamon Press Ltd., Oxford
- Tamime, A. Y., Robinson, R. K., 1999. Yoghurt science and technology. Woodhead Publishing Limited. CRC press. Cambridge England. P, 619.



- Tekinşen, O.C. ve Atasever, M., 1994, Süt ürünleri üretiminde starter kültür, Selçuk Ü. Vet. Fak. Yayını, 150s, Konya.
- Todorov, S.D., Dicks, L.M.T., 2005. Effect of growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from boza. Food Technology and Biotechnology, 43 (2), 165-173.
- Todorov, S., 2009. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum*-production, Genetic organization and mode of action. Brizillian Journal of Microbiology, 40 (2), 209–221.
- Todorov, S.D., Franco, B.D.G.D.M., 2010. *Lactobacillus plantarum*, Characterization of the species and application in food production. Food Reviews International 26 (3), 205–229.
- Torriani, S., Felis, G.E., Dellaglio, F., 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene derived primers. Applied and Environmental Microbiology, 67 (8), 3450-3454.
- Tunail, N., 2009. Gıda Biyoteknolojisi. Nobel yayınları. 1. Baskı. ISBN978–605– 395–299–2.
- Työppönen, S., Petaja, E. and Mattila-Sandholm, T., 2003. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. Int. J. of Food Microbiol, 83 (3), 233– 244.
- Ünlütürk, A., Turantaş, F., 1998. Gıda Mikrobiyolojisi. Mengi Tan Basımevi. İzmir, s. 605.
- Van Reenen, C.A., Van Zyl, W.H., Dicks, L.M.T., 2006. Expression of the Immunity Protein of Plantaricin 423, Produced by *Lactobacillus plantarum* 423, and analysis of the plasmid encoding the Bacteriocin. Applied and Environmental Microbiology, 72 (12), 7644–7651
- Vastanoa, V., Salzilloa, M., Sicilianob, R.A., Muscarielloa, L., Saccoa, M., Marascoa, R., 2014. The E1 Beta-subunit of pyruvate dehydrogenase is surface-expressed in *Lactobacillus plantarum* and binds fibronectin. Microbiological Research, 169 (2), 121-127.
- Yaygın, H., 1999. Yoğurt Teknolojisi. Akdeniz Üniversitesi Basımevi, Antalya

- Yeğın, S., Üren, A., 2008. Biogenic amine content of boza. A Traditional Cerealbased Fermented Turkish Beverage. *Food Chemistry*, 111 (4), 983-987.
- Yüksekdağ, Z.N., Beyatlı, Y., 2009. Bazı laktik asit bakterilerinin fizyolojik, biyokimyasal, plazmit DNA ve protein profil özelliklerinin incelenmesi. *Gıda*, 34(2), 91–98.
- Zhou, J.S., Pillidge, C.J., Gopal, P.K., Gill, H.S., 2005. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 98(2), 211–21.
- Wright, A.V., Bruce, A., 2003. Genetically modified microorganisms and their potential effects on human health and nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 14, 264-276
- Wright, A.V., Morelli, L., Vogensen, F.K., 2004. Lactic acid bacteria. *Microbiological and Functional Aspects*. CRC Press. Third Edition, ISBN, 978-0-8247-5332-0
- Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J. and Smit, G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12 (2), 91–109.

## ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyadı : Kayhan MANĖ

Doğum Yeri : Muş

Doğum Tarihi : 17.05.1985

Medeni Durumu : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

### **Eğitim Durumu ( Kurum ve Yılı )**

Lise : Muş Şeker Lisesi 2000-2003

Lisans : Muş Alparslan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Bölümü 2010-2014

Yüksek Lisans : Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı 2014-2017