

**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GAZİANTEP İLİNİN KÖYLERİNDEN TOPLANAN
GELENEKSEL YOĞURTLARDAN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
DOKTORA TEZİ**

**AYŞE KARADUMAN
TEMMUZ 2017**

TEMMUZ 2017

Doktora - Biyoloji

AYŞE KARADUMAN

**Gaziantep İlinin Köylerinden Toplanan Geleneksel
Yoğurtlardan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu Ve
Karakterizasyonu**

**Gaziantep Üniversitesi
Biyoloji Bölümü
Doktora Tezi**

**Danışman
Prof.Dr.Mehmet ÖZASLAN**

**Ayşe KARADUMAN
Temmuz 2017**



© 2017 [Ayşe KARADUMAN]

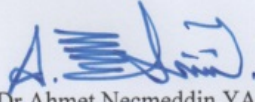
T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tezin Adı: Gaziantep İlinin Köylerinden Toplanan Geleneksel Yoğurtlardan Laktik
Asit Bakterilerinin İzolasyonu Ve Karakterizasyonu

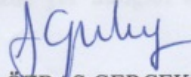
Öğrencinin Adı Soyadı: Ayşe KARADUMAN

Tez Savunma Tarihi: 10.07.2017

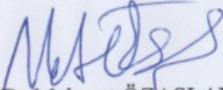
Fen Bilimleri Enstitüsü onayı


Prof. Dr. Ahmet Necmeddin YAZICI
FBE Müdürü

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.


Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER
Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Doktora tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Prof. Dr. Bektaş TEPE

Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

Doç. Dr. Muhittin DOĞAN

Yrd. Doç. Dr. Önder YUMRUTAŞ

İmzası



ABSTRACT
IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID
BACTERIA ISOLATED FROM TRADITIONAL YOGHURTS COLLECTED
FROM GAZİANTEP PROVINCE'S VILLAGES

KARADUMAN, Ayşe

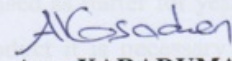
Ph.D. in Biology

Supervisor: Prof.Dr. Mehmet ÖZANLAN

July 2017

86 Pages

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


Ayşe KARADUMAN

are produced using standard starters while, in the production of traditional yogurt, the microbiota is quite different since yoghurts are used as starter cultures. To determine the final characteristics of the fermented product, it is necessary to know the biochemical properties of the starter cultures, such as acidity, aroma and flavor. This can only be achieved by identifying and characterizing the bacteria in every instance. In our study, 208 traditional yogurt samples were collected from 9 different locations in Gaziantep. Their pH and lactic acid bacteria profiles were assessed. Isolated bacteria were identified by MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) mass spectrometry, which is a fast and reliable method for identification of bacterial isolates compared to classical laboratory methods. In this study, 41% of the isolates were identified by using this method, ranging 80.0% and 34.0% confidence. The isolates contained two genera (*Streptococcus* and *Lactobacillus*) and four species. Afterwards, the four lactic acid bacteria were characterized physiologically and biochemically and we found that they differed from lactic acid bacteria used in commercial yogurt production.

Key words: Yogurt, starters, lactic acid bacteria

ABSTRACT
**IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID
BACTERIA ISOLATED FROM TRADITIONAL YOGHURTS COLLECTED
FROM GAZIANTEP PROVINCE' S VILLAGES**

KARADUMAN, Ayse

Ph.D. in Biology

Supervisor: Prof.Dr.Mehmet ÖZASLAN

July 2017

86 Pages

Yoghurt is a dairy product obtained by bacterial fermentation of milk. Commercial yoghurts are produced using standard starters while, in the production of traditional yoghurt, the microbiota is quite different since yoghurts are used as starter for years. To determine the final characteristics of the fermented product it is necessary to know the biochemical properties of the starter cultures, such as acidity, aroma and flavor. This can only be achieved by identifying and characterizing the bacteria in starter cultures. In our study, 208 traditional yoghurt samples were collected from 9 different locations in Gaziantep. Their pH and lactic acid bacteria profiles were analyzed. Isolated bacteria were identified by MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption-ionization time-of-flight) mass spectrometry, which is a fast and reliable method for identification of bacterial isolates compared to classical laboratory methods. In this study, 41% of the isolates were identified by using this method, which is 99.9% and 34.0% confidence. The isolates contained two genera (*Enterococcus* and *Lactobacillus*) and four species. Afterwards, the four lactic acid bacteria were characterized physiologically and biochemically and we found that they differed from lactic acid bacteria used in commercial yoghurt production.

Key words: Yoghurt, starters, lactic acid bacteria

ÖNSÖZ

Laktik asit bakterileri; probiyotik bakteriler olup, yoğurt gibi çeşitli fermente ürünlerde bulunurlar. Hayvanlarda ve insanlarda oral yolla alındığında kolesterolü düşürürler. Gastrik kanser etkeni olan *Helicobacter pylori*, çocuklarda diyare etkeni olan rotavirus, insanlarda diş çürümesine neden olan *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus* patojenlerini inhibe edici etkilere sahiptir. Sistemik ya da lokal bağışıklık sisteminin düzenleyicileri olarak da sağlığa yararlı etkileri bulunur. Bu etkileri nedeniyle laktik asit bakterilerini fermente ürünlerin yapımında kullanmak ve düzenli olarak tüketmek bazı sağlık sorunlarını daha az maliyetle çözecektir. Ayrıca laktik asitin düzenli olarak tüketilmesinin ortalama insan ömrünün uzamasına yardımcı olduğu öne sürülmektedir.

Yoğurt yapımında kullanılan ve laktik asit üreten probiyotik bakterilerin güvenilir starter kültür olarak adlandırılması için şu çalışmalara ihtiyaç duyulur: Laktik asit bakterilerinin geleneksel yoğurtlardan izole edilmesi, bakteri tanımlanması ve karakterizasyonu. Bu araştırma Gaziantep köylerinden toplanan geleneksel yoğurtlardan laktik asit bakterilerini izole etmek, tanımlamak (identifikasyon), karakterizasyonunu belirlemek amacıyla yapılmıştır. Ayrıca yerli yoğurt starter kültürünün daha az maliyetle endüstriyel üretimini gerçekleştirmek amacıyla bu çalışmada izole edilen laktik asit bakterileri ön veri oluşturmaktadır.

Doktora eğitimim süresince TÜBİTAK 2211 (2211/A Genel) Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında sağladığı destekten dolayı TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı Birimine ve bu çalışmada FEF.14.14 kodlu proje kapsamında maddi destek sağlayan Gaziantep Üniversitesi BAP Yönetim Birimine' ne teşekkür ederiz.



Çok kıymetli aileme.....

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince tüm bilgilerini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen ve tezimde büyük emeği olan, aynı zamanda kişilik olarak da bana çok şey katan Gaziantep Üniversitesi öğretim üyelerinden tez danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN' a

Çalışmanın tasarlanması, laboratuvar aşamaları ve özellikle de makalemde yüksek desteğini benden esirgemeyen, değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ' a, Yrd. Doç. Dr. Sibel BAYIL-OĞUZKAN' a

Tez çalışmamda malzeme sağlama konusunda yardımını esirgemeyen Sayın hocam Doç. Dr Işık Didem KARAGÖZ' e

Doktora eğitimim süresince TÜBİTAK 2211 (2211/A Genel) Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında sağladığı destekten dolayı TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı Birimine

Bu çalışmada FEF.14.14 kodlu proje kapsamında maddi destek sağlayan Gaziantep Üniversitesi BAP Yönetim Birimine

Çok değerli ve gerekli yardımlarını esirgemeyen doktora arkadaşlarım İzzettin GÜLER' e, Yüksek Biyolog Emaduldeen ABED' e, Yüksek Biyolog Anfal Izaldeen ALKATEEB' e, Biyolog Neşe ERDOĞAN' a, Fen ve Teknoloji Öğretmeni Haki ALTUNOVA' ya; sevgili arkadaşlarım Öğr. Gör. Mehmet ERDEM' e, Yüksek Lisans öğrencisi Mesut ÇAY' a, Bekir Sıddık KURT' a ve Öğretmen (Orman Mühendisi) Mehmet Sait KASKA' ya

Başarı telkinlerini hiç eksik etmeyen kardeşim Esra KARADUMAN' a ve bütün öğrenim hayatım boyunca olduğu gibi her zaman yanımda bulunan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli AİLEME çok teşekkür ederim.

ÖNSÖZ

Laktik asit bakterileri; probiyotik bakteriler olup, yoğurt gibi çeşitli fermente ürünlerde bulunurlar. Hayvanlarda ve insanlarda oral yolla alındığında kolesterolü düşürürler. Gastrik kanser etkeni olan *Helicobacter pylori*, çocuklarda diyare etkeni olan rotavirus, insanlarda diş çürümesine neden olan *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus* patojenlerini inhibe edici etkilere sahiptir. Sistemik ya da lokal bağışıklık sisteminin düzenleyicileri olarak da sağlığa yararlı etkileri bulunur. Bu etkileri nedeniyle laktik asit bakterilerini fermente ürünlerin yapımında kullanmak ve düzenli olarak tüketmek bazı sağlık sorunlarını daha az maliyetle çözecektir. Ayrıca laktik asitin düzenli olarak tüketilmesinin ortalama insan ömrünün uzamasına yardımcı olduğu öne sürülmektedir.

Yoğurt yapımında kullanılan ve laktik asit üreten probiyotik bakterilerin güvenilir starter kültür olarak adlandırılması için şu çalışmalara ihtiyaç duyulur: Laktik asit bakterilerinin geleneksel yoğurtlardan izole edilmesi, bakteri tanımlanması ve karakterizasyonu. Bu araştırma Gaziantep köylerinden toplanan geleneksel yoğurtlardan laktik asit bakterilerini izole etmek, tanımlamak (identifikasyon), karakterizasyonunu belirlemek amacıyla yapılmıştır. Ayrıca yerli yoğurt starter kültürünün daha az maliyetle endüstriyel üretimini gerçekleştirmek amacıyla bu çalışmada izole edilen laktik asit bakterileri ön veri oluşturmaktadır.

Doktora eğitimim süresince TÜBİTAK 2211 (2211/A Genel) Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında sağladığı destekten dolayı TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı Birimine ve bu çalışmada FEF.14.14 kodlu proje kapsamında maddi destek sağlayan Gaziantep Üniversitesi BAP Yönetim Birimine' ne teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ABSTRACT.....	v
ÖZET.....	vi
İTHAF SAYFASI.....	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
ÖNSÖZ.....	ix
İÇİNDEKİLER.....	x
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xv
SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ.....	xvi
BÖLÜM 1 GİRİŞ.....	1
1.1 Amaç ve Kapsam.....	1
1.2. Laktik Asit Bakterileri (LAB).....	3
1.2.1. LAB' ın Taksonomisi.....	6
1.2.2. Probiyotik LAB.....	9
1.2.3. LAB' ın Sağlığa Yararlı Etkileri.....	11
1.2.4. Yoğurt.....	16
1.2.5. Fermentasyon.....	18
1.2.6. LAB' ın Karakterizasyon Özellikleri.....	21
1.2.6.1. LAB' ın Sıcaklık Toleransı.....	21
1.2.6.2. LAB' ın Tuz Toleransı.....	22
1.2.6.3. LAB' ın Asit Toleransı.....	23
1.3. LAB' ın Tanımlanması	24
1.3.1. Fenotipik Yöntemler.....	24
1.3.2. Moleküler Yöntemler.....	27
1.3.2.1 Spesifik 16S rDNA Amplifikasyonu.....	27
1.3.2.2 Spesifik DNA Probu Oluşturma.....	27
1.3.2.3. RAPD Parmak İzi Metodu.....	28
1.3.2.4. RFLP (Kesilen Parça Uzunluğu Polimorfizmi)	28

1.3.2.5. 16S rRNA Değişken Bölgelerinin Sekansı.....	28
1.3.2.6. MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption- Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry).....	32
BÖLÜM 2 KAYNAK ÖZETLERİ.....	34
BÖLÜM 3 MATERYAL VE METODLAR.....	38
3.1.Örneklerin Toplanması.....	38
3.2.Malzeme Sterilizasyon İşlemi.....	40
3.3.Besiyerleri ve Kimyasallar.....	41
3.4.LAB İzolasyon İşlemi.....	44
3.5.Stok Kültür Hazırlama.....	45
3.6.Fenotipik İdentifikasyon.....	45
3.6.1. LAB Tanımlaması.....	45
3.6.2. Gram Boyama.....	46
3.6.3. Katalaz Testi.....	47
3.6.4. Koloni Morfolojisi.....	47
3.6.5. MALDI-TOF-MS ile Tanımlama.....	47
3.6.5.1 MALDI-TOF Ölçümü.....	48
3.6.5.1.1 Tekrarlanabilirlik.....	48
3.6.5.1.2 BioTyper Yazılımı.....	49
3.6.5.1.3 Uygulamalar.....	50
3.7.Karakterizasyon.....	50
3.8.Verilerin Değerlendirilmesi.....	51
BÖLÜM 4 BULGULAR.....	52
4.1. Şehitkamil İlçesi' nin İzolatları.....	53
4.2. Şahinbey İlçesi' nin İzolatları.....	54
4.3. Oğuzeli İlçesi' nin İzolatları.....	55
4.4. Yavuzeli İlçesi' nin İzolatları.....	56
4.5. Nizip İlçesi' nin İzolatları.....	57
4.6. Araban İlçesi' nin İzolatları.....	59
4.7. Karkamış İlçesi' nin İzolatları.....	60
4.8. İslahiye İlçesi' nin İzolatları.....	61
4.9. Nurdağı İlçesi' nin İzolatları.....	62
4.10. Yoğurtların pH Değerleri.....	64

4.11. LAB' ın Tanımlaması	64
4.12 Karakterizasyon	68
BÖLÜM 5 TARTIŞMA VE SONUÇ.....	70
KAYNAKLAR.....	77
EKLER.....	84
ÖZGEÇMİŞ.....	85



TABLolar LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1.1. LAB' ın ayırt edici anahtarı	8
Tablo 1.2. Probiyotik olarak kabul edilen LAB	9
Tablo 3.1. Yoğurt örneklerinin alındığı ilçe, köy, rakımları (metre) ve yoğurt örneği (n) sayısı	40
Tablo 3.2. M17 Agar bileşimi (g/L).....	41
Tablo 3.3. M17 Broth bileşimi (g/L)	42
Tablo 3.4. MRS Agar bileşimi (g/L).....	43
Tablo 3.5. MRS Broth bileşimi (g/L)	44
Tablo 4.1. Şehitkamil İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin mikroorganizma sayısı, pH' sı, izolat sayısı	53
Tablo 4.2. Şehitkamil İlçe izolatların morfoloji çeşidi ve sayısı	54
Tablo 4.3. Şahinbey İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin mikroorganizma sayısı, pH' sı, izolat sayısı	54
Tablo 4.4. Şahinbey İlçe izolatların morfoloji çeşidi ve sayısı	55
Tablo 4.5. Oğuzeli İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin mikroorganizma sayısı, pH' sı, izolat sayısı	55
Tablo 4.6. Oğuzeli İlçe izolatların morfoloji çeşidi ve sayısı	56
Tablo 4.7. Yavuzeli İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin mikroorganizma sayısı, pH' sı, izolat sayısı	57
Tablo 4.8. Yavuzeli İlçe izolatların morfoloji çeşidi ve sayısı	57
Tablo 4.9. Nizip İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin mikroorganizma sayısı, pH' sı, izolat sayısı	58
Tablo 4.10. Nizip İlçe izolatların morfoloji çeşidi ve sayısı	58
Tablo 4.11. Araban İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin mikroorganizma sayısı, pH' sı, izolat sayısı	59

Tablo 4.12. Araban İlçe izolatların morfoloji çeşidi ve sayısı	59
Tablo 4.13. Karkamış İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin mikroorganizma sayısı, pH' sı, izolat sayısı	60
Tablo 4.14. Karkamış İlçe izolatların morfoloji çeşidi ve sayısı	60
Tablo 4.15. İslahiye İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin mikroorganizma sayısı, pH' sı, izolat sayısı	61
Tablo 4.16. İslahiye İlçe izolatların morfoloji çeşidi ve sayısı	62
Tablo 4.17. Nurdağı İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin mikroorganizma sayısı, pH' sı, izolat sayısı	62
Tablo 4.18. Nurdağı İlçe izolatların morfoloji çeşidi ve sayısı	63
Tablo 4.19. Gaziantep' te İlçelerden toplanan yoğurtların pH değerleri.....	64
Tablo 4.20. Farklı LAB türlerinin dağılımı.....	65
Tablo 4.21. Gaziantep' in geleneksel yoğurtlarından izole edilen LAB türlerinin karakteristikleri.....	69

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. LAB grubu bakterilerin 16S rRNA dizisine ve düşük G+C oranı dikkate alınarak oluşturulmuş dallanmış ağaç.....	7
Şekil 1.2. Enterosit benzeri Caco-2 hücrelere yapışmış olan <i>L. acidophilus</i> La1 suşunun elektron mikroskop görüntüsü	11
Şekil 1.3. Probiyotiklerin ağız sağlığını geliştirmesine dair mekanizma.....	14
Şekil 1.4. <i>L</i> (+) laktik asit ve <i>D</i> (-) laktik asitin kimyasal yapı formülü.....	19
Şekil 1.5. KoTa2 suşu (<i>Lactosphaera pasteurii</i>)' nin dallanmış ağaçtaki taksonomik yeri	25
Şekil 1.6. 16S rRNA molekülünün sekonder yapısı.....	29
Şekil 1.7 LAB' ların tanımlanmasında yararlanılan yöntemler ve taksonomik tanımlama düzeyi.....	31
Şekil 1.8. Bakterilerdeki rRNA gen modeli.....	32
Şekil 3.1. pH metre (Martini, Instruments, Romanya).....	38
Şekil 3.2. M17 agar besiyerinde üreyen olası LAB kolonilerinin görünümü.....	46
Şekil 3.3. Gram boyayla boyanmış preparatlar.....	47
Şekil 4.1. Örneklerin Alındığı Lokasyonlar	52
Şekil 4.2. Gaziantep İli' nin 9 ilçesine ait izolatların kok ve basil olası % LAB oranları.....	63
Şekil 4.3. MALDI-TOF-MS ile elde edilen dört türün spektrumu	66
Şekil 4.4. <i>Enterococcus hirae</i> koloni görüntüsü.....	67
Şekil 4.5. <i>Lactobacillus casei</i> ya da <i>L. paracasei</i> koloni görüntüsü	67
Şekil 4.6. <i>Enterococcus durans</i> koloni görüntüsü	68
Şekil 4.7. <i>Enterococcus faecium</i> koloni görüntüsü.....	68
Ek Şekil 1. İzolatların mikroskop görüntüleri.....	84

SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ

α	Alfa
β -	Beta-
$\text{CH}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Laktoz
CH_4	Metan
CO_2	Karbondioksit
dk	Dakika
γ	Gama
g	Gram
g/L	Gram/litre
H_2	Hidrojen gazı
H_2O	Su molekülü
H_2O_2	Hidrojen peroksit
log CFU/g	Logaritma koloni oluşum ünitesi/gram
m	Metre
MDa	Megadalton
ml	Mililitre
mmol/L	Milimol/Litre
Mn	Manganez
NaCl	Sodyum Klorür
pH	Hidrojen iyon konsantrasyonu
ppm	Milyonda bir kısım
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
A	Adenin
AFM1	Bir çeşit aflatoksin
AFB1	Bir çeşit aflatoksin
API 50 CHL	Fenotipik İdentifikasyon Kiti
ATCC	American Type Culture Collection
AU	Astronomik Birim

BV	Bakteriyal Vajinosis
C	Sitozin
CFU	Koloni Oluşum Ünitesi
CRC	Kolon barsak kanseri
DAP	mezo-diaminopimelik asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EPS	Ekzopolisakkarit
G	Guanin
IgA	İmmunglobulin A
IFN- γ	İnterferon-gama
LAB	Laktik Asit Bakterileri
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	Sınırlandırılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
rDNA	Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SOD	Süperoksit dismutaz
T	Timin
tRNA	Transfer Ribonükleik Asit
μ l	Mikrolitre

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1. Amaç ve Kapsam

Kontrollü koşullarda standart kalitede ürün elde etmek için gıda teknolojisinde kullanılan mikroorganizmalara starter kültür denir. Endüstriyel üretimde süt pastörize edildikten sonra starter kültür ilave edilir. Çünkü çiğ sütün pastörizasyonu sonunda yararlı bakteriler yok olmakta ve yerine geçecek bakterilere gereksinim duyulmaktadır (Polat, 2009).

Lezzetli ve sağlıklı özellikleri nedeniyle fermente süt ürünlerinin üretim ve tüketiminde bariz bir artış gözlenmektedir. Süte homofermentatif starter bakterilerin eklenmesi ve sütün laktik asit fermentasyon ürünü olarak elde edilen yoğurt, dünyada en çok bilinen fermente süt ürünüdür. Yoğurtun kökeni tam olarak bilinmemekle birlikte tarihi kayıtlara göre Orta Doğu olabileceği düşünülmektedir (Iranmanesh vd., 2012). Yoğurt kalsiyum, fosfor, magnezyum, A vitamini ve riboflavince zengindir (Erkaya ve Şengül, 2012). Yoğurdun beslenmedeki öneminden başka, soğukta muhafaza edildiğinde (3-10 °C) uzun süre bozulmaması ve pH değerinin az olmasından ötürü de içerisinde patojen mikroorganizmaların canlılıklarını uzun süre muhafaza edememeleri, Türkiye’ de yoğurdun en tanınan ve kullanılan süt ürünü olmasının başlıca nedenleridir (Tekinşen vd., 2008). Geleneksel yiyeceğimiz yoğurt; laktik asit bakterilerini (LAB) ve onların sağlığa yararlı metabolitlerini yüksek miktarda içerir. Sağlığı geliştiren etkilere sahip mannitol üreten bazı LAB suşları bulunur (Khedid vd., 2006). Böylece istenmeyen birçok mikroorganizma yoğurtta gelişemez. Yoğurt güvenilir bir ürün olarak kabul edilir. Ülkemizde sütün fermentasyonu ile yoğurt elde etme işlemi yurt dışından temin edilen starter kültürlerle yapılmaktadır (Güven, 2008).

Probiyotikler belirli miktarlarda alındığında konağa yararlı etkileri bulunan ve konağın sindirim kanalında kolonize olabilen mikroorganizmalardır (Schiffrin vd., 1997; Campo vd., 2005; Iqbal vd., 2014). Sütün fermente edilmesinde

probiyotik özellikteki bakteriler etkili olmakta ve fermente ürün olan yoğurtu tüketen kişilerin uzun ömürlü ve sağlıklı yaşamlarının büyük oranda LAB ile ilgili olduğu düşünülmektedir. XX. yy.' da yaşayan Bulgar Mikrobiyolog Stamen Grigoroff yoğurt starter kültüründe laktik asit bakterisinin olduğunu tespit etmiş ve izole ettiği laktik asit bakterisine *Lactobacillus bulgaricus* Grigoroff adını vermiştir. İmmunolojinin babası olarak kabul edilen Metchnikoff laktik asit bakterilerinin bağırsaktaki patojen bakterileri öldürerek veya midedeki pütrifikasyon süreçlerini engelleyerek yaşlanmayı geciktirdiğini ve düzenli yoğurt yenmesinin insan ömrünün uzamasına yardımcı olduğunu bildirmiştir (Yurdakök, 2013).

Laktik asit bakterilerini kapsayan probiyotiklerin hayvan ve insanlarda barsak patojenlerinin önemli bir kısmının büyümesini inhibe ettiği bilinmektedir. Laktik asit bakterilerinin inhibitör aktiviteleri farklı asit ve metabolitleri üretme yeteneğiyle ilgilidir. Bunlar: Laktik asit ve asetik asit benzeri organik asitler, H₂O₂, reuterin, bakteriosin ve bakteriosin benzeri maddeler, diasetil ve CO₂' dir (Lewus vd., 1991; Aslım vd., 2011). Bu metabolitler insan bağırsağında ishal ve diğer hastalıklara neden olan patojenleri inhibe eder. Çeşitli LAB türlerinin antifungal aktiviteleri laktik ya da asetik asit üretimiyle değil hatta antifungal siklik dipeptitlerle ilgilidir (Magnusson vd., 2003).

Yoğurt gibi sütün fermentasyon ürünleri insanoğlu tarafından çok eski çağlara dayansa da fermentasyonu gerçekleştiren LAB' ın identifikasyonu yakın zamanlarda yapılmaktadır. Bu bakterilerin bazıları disakkarit olan laktozu laktik asite fermente edip asidik final ürünün oluşmasına yardımcı olurken, diğerleri de sütteki lipid ve proteinleri çeşitli maddelere parçalayarak fermente ürünün kendine has lezzet, aroma, görünüş ve yapısının meydana gelmesine yardım eder (Milci ve Yaygın, 2005).

LAB gram pozitif, *Sporolactobacillus inulinus* BCRC 14647 dışında (Huang vd., 2007) spor oluşturmayan, anaerobik şartlar altında gelişen, sitokromlardan yoksun (Yazdi vd., 2012), düşük G+C miktarına sahip (Hassanzadazar ve Ehsani, 2013) bakterilerdir.

LAB konvansiyonel olarak; morfoloji, gram boyama, oksidaz ve katalaz testi (Janssen vd., 1995; Chen vd., 2010; Omemu ve Faniran, 2011), farklı sıcaklık ve tuz

konsantrasyonlarında gelişme (Salama vd., 1995; Seifu vd., 2012), karbonhidrat fermentasyonu (Seifu vd., 2012; Yazdi vd., 2012) hücre duvarı bileşimi gibi kategorilere göre sınıflandırılmaktadır.

LAB' in hücre duvar yapısı aynı genusun farklı türlerinde değişiklik gösterebilir. Phalakornkule ve Tanasupawat (2006) *Lactobacillus plantarum*' un hücre duvarında mezo-diaminopimelik asitin (DAP) bulunduğunu, buna karşın *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. farciminis* ve *L. sakei* türlerinde DAP' ın bulunmadığını bildirmişlerdir.

Karbonhidratları fermente etme yeteneğine bağlı olarak LAB identifiye edilebilir (Seifu vd., 2012). Oligosakkaritler gibi karbonhidratlar Bifidobakteriler ve Laktobasillerin sadece bazı ırklarınca fermente edilir (Kaplan ve Hutkins, 2000).

LAB; peynir, et ürünleri, şarap ve sebze gibi süt ürünlerini de içeren fermente ürünlerin üretiminde starter kültür olarak kullanılırlar (Abdullah ve Osman, 2010). Sağlık, teknoloji ve öncelikle bilimsel alandaki güncel çalışmalar, farklı damak tadları, yoğurt ürün modellerindeki çeşitlilik halkımızda yoğurda karşı güven ve yeni taleplerin varlığını ortaya koymuş, bu da yerli yoğurt starter kültürlerine ihtiyacı ortaya çıkarmıştır.

1.2. Laktik Asit Bakterileri (LAB)

LAB gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmayan, sitokromlar ve nonaerobik alışkanlığından yoksun organizmalardır ama aerotolerant, titiz, asittolerant olup, kesinlikle fermentasyon yaparlar. Bu bakterilerde laktik asit şeker fermentasyonun başlıca son ürünüdür. Ancak bu genel açıklamaların dışında bazı türler hematin ve benzeri bileşikler içeren ortamda katalaz ve sitokrom oluşturabilir (Holzapfel vd., 2001).

Doğada yayılış göstermekle birlikte, LAB daha çok süt ve süt ürünlerinde, bitki materyallerinde, tahıllarda (Yazdi vd., 2012), insan ve hayvan sindirim kanalında yaygındır. Ayrıca anne sütünün de iyi bir LAB kaynağı olduğu bildirilmektedir (Martin vd., 2003). Çoğunun sitoplazmasında genomik DNA dışında bir ya da daha fazla sayıda plazmit (çift sarmal DNA) molekülleri bulunur. Plazmitlerin laktik asit fermentasyonu enzim ve proteinlerini, antibakteriyal özellikteki bakteriyosin maddesinin genlerini kodladığına dair bilgiler olduğu bildirilmiştir. En önemlisi de LAB' da kodlanan bu genlerin plazmitlerin konjugatif özelliğinden dolayı bir

bakteriden diğere aktarılabilmek özelliğidir (Yüksekdağ ve Beyatlı, 2009). Güçlü antilisteriyal etki gösteren *Lactobacillus bavaricus* MN nin 22,6 MDa ve 15,5 MDa ağırlığında iki plazmidi bulunurken; gıda patojenlerine karşı düşük antimikrobiyal aktivite gösteren *L. plantarum* BN' nin plazmid DNA' sına rastlanmamıştır (Lewus vd., 1991).

Fermente süt ürünlerinin yapımında asidite, aroma, proteolitik aktivite, lipolitik aktivite, antimikrobiyal aktivite gibi probiyotik özelliklerle birlikte LAB' ın; ekzopolisakkarit (EPS) denilen glikoprotein yapısında molekül üretmeleri de önemli bir özelliktir. LAB' ın sentezlediği EPS' ler karbonhidratlarca zengin glikoprotein yapısındadır. EPS' lerin viskoziteyi artırıcı, yapıyı kalınlaştırıcı, stabilize edici ve su bağlayıcı özellikleri bulunur (Cerning, 1995; Lavanya vd., 2011). Teknolojik özelliklerinin yanı sıra laktik asit bakterileri tarafından sentezlenen EPS' lerin insan sağlığı üzerine de yararlı etkileri bulunmaktadır (Milci ve Yaygın, 2005). EPS aynı zamanda mikrobiyal hücrelere, faj saldırılarına, antibiyotiklere, toksik bileşiklere, osmotik strese ve bakteriyosinlere karşı mikrobiyal hücreleri korumada etkilidir (Gürsoy vd., 2010). Korman vd. (2001) İran geleneksel fermente soya keki olan *tempeh*' ten izole ettikleri *Lactobacillus plantarum* BS2' nin 10 saatlik inkübasyondan sonra 200 AU/ml bakteriyosin ürettiğini ve bakteriyosinin *Enterococcus faecalis* N-I-103' e karşı inhibisyon zonu oluşturduğunu bildirmişlerdir.

LAB' ın görünüşe göre basit bir metabolizması olmakla birlikte; evrimsel süreçte gen kaybı/kazancı vardır. LAB' da 1.700-2.800 protein kodlayan gen vardır ve değişen miktarlarda pseudogen içerirler. Genom dejenerasyonun bir göstergesi olarak pseudogen büyüklüğü *Pediococcus pentosaceus*' ta 20' den küçük iken, *S. thermophilus* ile *L. delbrueckii*' de 200' e yakındır. Güçlü evrim kinetiğinin özelliklerinden biri de çok yakın iki LAB türünün (*Lactobacillus gasseri* ve *L. johnsonii*) aynı ata genden türetilmiş genler olan ortolog genleri farklı oranlarda (aralarında %38.5 farklılık var) taşımalarıdır. rRNA operonlarının sayısı da farklıdır. *Oenococcus oeni*' de 2 iken, *L. delbrueckii*' de 9 tanedir. Değişen miktarlarda tRNA geni bulunur. Bu; ekolojik rekabet yeteneğindeki farklılıkları ifade edebilen (hızlı büyüme ve laktik asit üretimi gibi) bir değişikliktir. Ayrıca transpozon içerirler. Bu yolla horizontal gen transferi yaparlar. *Lactobacillales* filogenetik ağacında yer alan

Leuconostoc grubu, *Lactobacillus casei-Pediococcus* grubu, *L. delbrueckii* grubu, *Streptococci* grubu, *Lactococci* grubu bakterileri mikroaerofil ya da anaeroptur. Çünkü aerobik bakterilerin karakteristik enzimleri olan katalaz ve sitokrom ile ilgili genleri horizontal gen transferi ile kaybetmiştir (Makarova vd., 2006).

LAB'ın antagonistik özelliği, bunların düşük pH, çözünmeyen asitler, birincil ve ikincil antimikrobiyal metabolitleri üretmeleriyle ilişkilidir. Fermentasyon süresince üretilen metabolitler -uçucu olanlar hariç- gıdalarda muhafaza edilir ve bu maddeler gıda bozulmasının, bakteri zehirlenmesinin önlenmesi ve bitki kaynaklı zararlı bileşiklerin detoksifikasyonunda etkili olurlar. LAB tarafından oluşturulan birincil antimikrobiyal etki laktik asit üretimi ve pH'nın düşürülmesi ile ilişkilendirilir. Laktik asit ve pH'nın yanı sıra LAB; hidrojen peroksit (H₂O₂), karbondioksit (CO₂), diasetil (2,3-butandion), amino asitlerin -o- izomerleri gibi düşük moleküler ağırlıkta bileşikler ve bakteriyosin gibi yüksek moleküler ağırlıklı bileşikler olan çeşitli antimikrobiyal bileşikler içerirler. Bunların tümü gıda bozulmasını ve gıdalardaki patojenik bakterilerin gelişimini antagonize edebilirler (Piard ve Desmazeaud, 1991; Gänzle vd., 2000; Soomro vd., 2002; Erdoğan ve Erbilir, 2006; Patil vd., 2010).

LAB'ın patojenlerin büyümesini inhibe etmesi besiyerine eklenen şeker konsantrasyonu, fermentasyon süresi ve patojenin tipine göre de değişmektedir. *W. confusa*'nın 60 g/L şeker konsantrasyonunun bulunduğu ortamda fermentasyondan 2 saat sonra meme iltihabına neden olan patojenlerden *Streptococcus agalactiae*'ye karşı 36 mm inhibisyon zonu gösterirken, aynı şeker miktarında ancak fermentasyondan 4 saat sonra *Staphylococcus aureus*'a karşı 31 mm inhibisyon zonu gösterdiği bildirilmiştir (Liliana vd., 2011).

LAB tarafından üretilen asitlerin % 90' dan fazlası laktik asit ve asetik asittir. Küçük miktarda üretilen diğer asitler sitrik, hippurik, orotik ve ürik asittir (Aslım vd., 2011).

Lactococcus diacetylactis ve *Leuconostoc* türleri sütteki sitratı kullanabilirler ve bu metabolizma süresince oluşan ürünler arasında diasetil; süt ürününün aromatik bileşeni olarak önemli bir yer tutar. Diasetil; antibakteriyal özelliklerinden dolayı gram negatif bakteriler için letal, gram pozitif bakteriler için sadece bakteriyostatik etkilidir (Piard ve Desmazeaud, 1991).

Bazı LAB üyelerinin manganez, süperoksit dismutaz (SOD) ve oksijene duyarlılıkları bulunmaktadır. *L. plantarum* hücre içi Mn (II) taşır. Aerotoleranttır. Çünkü oksijen toksisitesine karşı savunma sistemi oluşturur. Belli başlı aerotolerant LAB türleri *Streptococcus faecalis*>*Aerococcus viridans*>*Streptococcus lactis*>*Pediococcus pentocaseus*>*Lactobacillus fermentum*>*L. plantarum*>*L. mesenteroides*>*L. casei* şeklinde en yüksek aerotolerant olandan en az olana doğru sıralanır. Buna karşılık süperoksit dismutaz ve yüksek miktarda hücre içi Mn bulundurmayan *L. bulgaricus* ve *L. acidophilus* çok az oksijen tolerant bakteriler iken, yüksek miktarda hücre içi Mn bulundurduğu halde serbest radikalleri temizleyecek enzim olan SOD' u içermeyen *L. ruminis* zorunlu anaerobtur (Archibald ve Fridovich, 1981).

1.2.1. LAB' ın Taksonomisi

LAB genetik olarak bir grup bakteriye farklılaşmış olup genel olarak şu genusları kapsamaktadır:

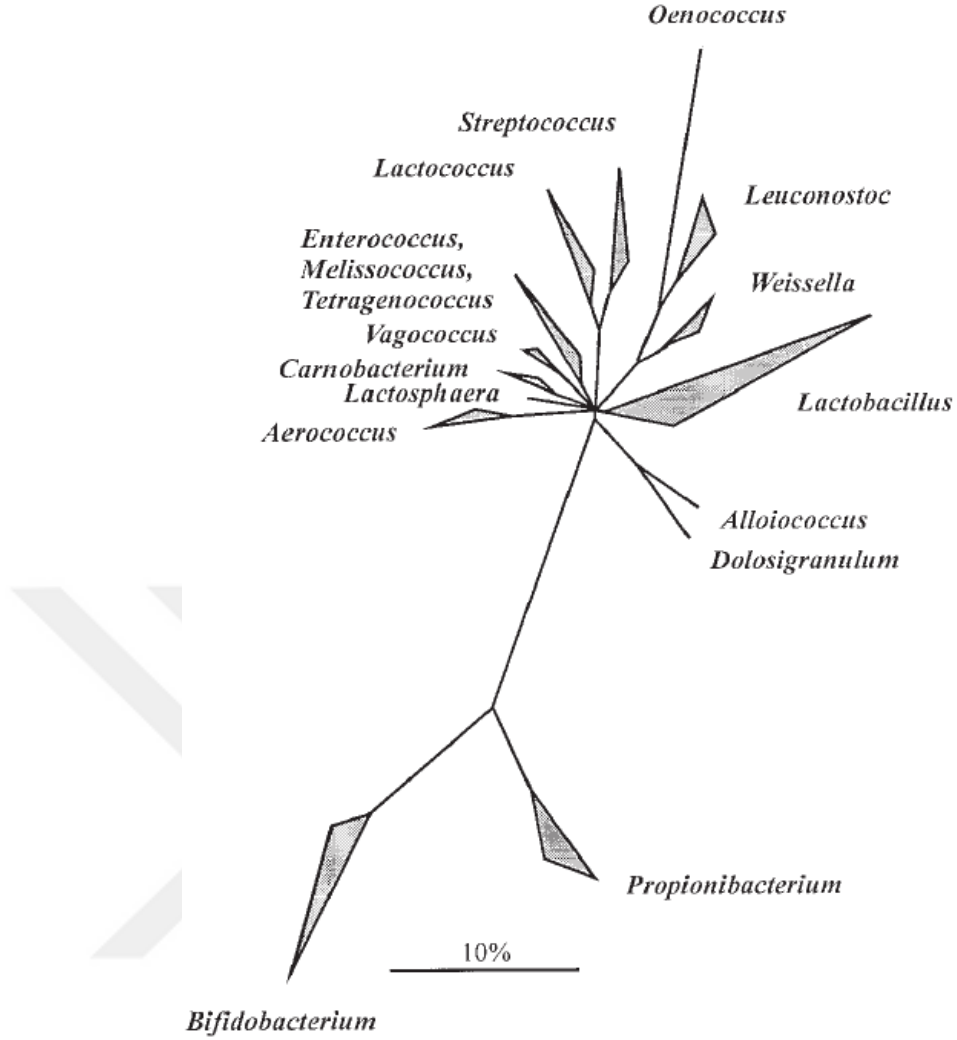
Carnobacterium, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* (Lavanya vd., 2011).

Bazı yazarlar farklı bir filogenetik gruba ait olmasına rağmen *Bifidobacterium* genusunu probiyotik rolünden dolayı LAB' a dahil ederler (Emerenini vd., 2013).

Endüstriyel önemi olanlar *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* türleridir (Makarova vd., 2006).

Bakteri filogenisinin temeli şu ana kadar tüm mikroorganizmalarda yüksekçe korunmuş moleküllerin kıyaslanmasına dayanır. Hem korunmuş hem de değişkenlik gösteren alanları olan ribozomal RNA' yı kodlayan genler filogenetik çalışmalar için seçilir. rRNA dizi mukayesesinin mikroorganizmaların filogenetik ilişkilerinin derecesini belirleme konusunda en güçlü teknik olduğu kabul edilir (Holzapfel vd., 2001).

LAB üyelerinin genotipik sınıflandırmada birbirine olan yakınlığı ve uzaklığı Şekil 1.1' de gösterilmiştir (Holzapfel vd., 2001).



Şekil 1.1. LAB grubu bakterilerin 16S rRNA dizisi ve düşük G+C oranı dikkate alınarak oluşturulmuş dallanmış ağaç. LAB ile doğrudan ilişkili olmayan *Bifidobacterium* ve *Propionibacterium* genusu (Holzapfel vd., 2001).

Bugün *Streptococcus* hala aynı isimle geçerlidir, *Enterococcus*, *Lactococcus* ve *Vagococcus* cinsleri *Streptococcus*' tan köken alıp ayrılmışlardır. *Enterococcus* türlerinin bazı ırkları fırsatçı enfeksiyonlara dahil olabilir, yine bazı ırklarının gıda fermentasyonunda roller oynadığı ve bazı ırklarının da mide bağırsak kanalında kommensal aktivite gösterdiği kabul edilir. Probiyotik olarak ya da besin fermentasyonunda kullanılacak yeni bir ırkın seçiminde önemli bilgiler verecek düzeyde taksonomik bilgi gereklidir. Üstelik taksonomik bilgi ırkın orijini, habitatı ve fizyolojisi hakkında bilgi vermelidir.

Orla-Jensen farklı bir yaklaşımla LAB' ı fenotipik ve morfolojik özelliklerini temel olarak

- *Betabacterium*,
- *Thermobacterium*,
- *Streptobacterium*,
- *Streptococcus*,
- *Betacoccus*,
- *Microbacterium*
- *Tetracoccus*

cinsleri olmak üzere alt gruplara ayırmıştır (Holzapfel vd., 2001). LAB' ın ayrıldığı gruplar ve çeşitli fenotipik özellikleri Tablo 1.1' de gösterilmiştir (Holzapfel vd., 2001).

Tablo 1.1. LAB' ın ayırt edici anahtarı (Holzapfel vd., 2001).

Cins	Katalaz	Nitrit Redüksiyonu	Fermentasyon	Genus
<i>Betabacterium</i>	-	-	Hetero-	<i>Lactobacillus</i> <i>Weisella</i>
<i>Thermobacterium</i>	-	-	Homo-	<i>Lactobacillus</i>
<i>Streptobacterium</i>	-	-	Homo- ve Hetero-	<i>Lactobacillus</i> <i>Carnobacterium</i>
<i>Streptococcus</i>	-	-	Homo-	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i>
<i>Betacoccus</i>	-	-	Hetero-	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weisella</i>
<i>Microbacterium</i>	+	+	Homo-	<i>Brochothrix</i>
<i>Tetracoccus</i>	+	+	Homo-	<i>Pediococcus</i> <i>Tetragenococcus</i>

1.2.2. Probiyotik LAB

Obezite ve diyabet benzeri metabolik hastalıklarda dahi probiyotik kullanımı gereklidir. Diyabetik hastaların sindirim kanalı mikrobiyal florasının geliştirilmesi ve dengelenmesi yoluyla tedavi edilebileceği, bunun için de probiyotik kullanımının önerilebileceği bildirilmektedir (Iqbal vd., 2014). Probiyotik LAB Tablo 1.2' de gösterilmiştir.

Tablo 1.2. Probiyotik olarak kabul edilen LAB (Holzapfel vd., 2001).

<i>Lactobacillus</i> türleri	<i>Bifidobacterium</i> türleri	Diğer laktik asit bakterileri
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>E. faecium</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>L. mesenteroides</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>P. acidilactici</i>
subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>S. inulinus</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. longum</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>L. gasseri</i>		
<i>L. johnsonii</i>		
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		

Probiyotikler canlı bakteri hücre preparatlarıdır ya da konağın sağlığına yararlı etkileri bulunan bakteri hücre bileşimidir. Probiyotiklerin çoğu bozulmuş barsak mikroflorası, anormal barsak geçirgenliği, barsak fonksiyon bozukluğu tedavisinde kullanılır. Başarılı probiyotik bir bakteri:

1-Genelde sindirim kanalında kolonize olmalı.

2-En az geçici flora olmalı.

3-Patojenleri önlemek için yapışma yeteneği olmalı (Lee vd., 2000)

4- Nonpatojen olmalı,

5- Sindirim sürecine katkıda bulunmalıdır (Talpur vd., 2011).

İnsanlardaki probiyotik bakterilerin özellikleri sıralandığında;

- 1-İnsan orijinli,
- 2-Güvenli bir tarihi,
- 3-Bebekler tarafından uzun süreli besin olarak girişi,
- 4-Süt substratlarına adaptasyonu olmalıdır (Martin vd., 2003).

Bir mikroorganizmanın probiyotik üyesi olabilmesi için seçilen LAB' ın asit ve safra toleransı, zararlı maddelerle rekabet ve antimikrobiyal maddeleri salgılayabilme yeteneği gibi kriterleri de karşılaması gerekir. LAB' ın spor oluşturan formlarının gastrik asit ve safra tuzları gibi olumsuz bağırsak koşullarına dirençli olması gerekir (Huang vd., 2007; Iranmanesh vd., 2012).

P. acidilactici pH: 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 ve 6.0 da 1 saatten 24 saate kadar asite tolerans gösterirken; *L. brevis* %1' lik safra konsantrasyonunda 4 saate kadar safraya tolerans gösterebilmektedir (Iranmanesh vd., 2012).

Probiyotik ırkın sahip olması gereken özellikler düşünüldüğünde; bir çalışma bulgusuna göre *Sporolactobacillus inulinus*' un spor ve vejetatif formlarının asit ve safra tuzuna direncinin ve bağırsak hücrelerine yapışma özelliğinin bulunmasından dolayı bu türün probiyotik olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Huang vd., 2007).

LAB' ın barsak kanalında hücre yüzey reseptörlerine yapışma miktarı ve yapıştığı bölge ırka özgü olarak değişir. *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) Caco-2' ye yüksek yapışma yeteneğine sahipken, barsak mukus ve barsak glikoproteinlerine daha az yapışır (Lee vd., 2000).

L. acidophilus La1 ırkının *in vitro* tripsinle muamele edilmiş ortamda enterositlere tutunması azaldığı için ırkın enterosit apikal membranına tutunmasında bakteriyel tarafından üretilen ekstrasellüler proteinlerin bu tutunmada kritik rol oynadığını gösterir. Farelere oral verilen LAB ürünleri endojen tümör nekroz faktör α üretimini sağlar, makrofaj ve nötrofil fonksiyonunu artırır. Çok sayıda *Lactobacillus acidophilus* La1 basiliinin enterosit benzeri Caco-2 hücrelere yapışması ve kolonizasyonu Şekil 1.2' de görülmektedir (Schiffirin vd., 1997).



Şekil 1.2. *L. acidophilus* La1 suşunun elektron mikroskop görüntüsü (Schiffrin vd., 1997).

Çoğu LAB antibiyotiklere dirençlidir. Üstelik antibiyotik dirence sahip probiyotik suşlar antimikrobiyal ajanların uygulanması nedeniyle normal barsak mikrobiyotik dengesi bozulmuş ya da sayısı azalmış konağa yararlı etkiler sunabilir (Lavanya vd., 2011). Patil vd. (2010) çeşitli *Pediococcus*, *Weisella* ve *Lactobacillus* türlerinin geniş spektrumlu antibiyotiklere (amfisillin, amoksisillin, penisillin) duyarlı olmasına karşın, gram (-) bakterilere karşı etkili olan antibiyotiklere (ko-trimaksazol, kanamisin) dirençli olduğunu rapor etmişlerdir.

1.2.3. LAB' ın Sağlığa Yararlı Etkileri

Literatürlerde bazı LAB ırklarının (*Lactobacillus casei* subsp. *casei* GG) çocukların rotavirüs tedavisinde lokal ve sistemik immun cevabı başlatmada etkili olduğu (Majamaa vd., 1995); oral yolla alınan *L. rhamnosus* GR-1 ve *L. fermentum* RC-14 suşlarının kadınlarda asemptomatik ve orta düzey vajinitisi tedavi ettiği (Reid vd., 2001); yoğurttaki LAB' ın laktaz noksanlığı olan ve dolayısıyla laktoz emilimi görülmeyen bireylerin laktozu sindirmesine yardımcı olduğu (Savaiano vd., 1984; Jiang ve Savaiano, 1997), yoğurttaki LAB' ın sütteki *Aspergillus* cinsi bazı mayalar tarafından üretilen ve insanda karaciğer toksisitesine neden olan aflatoksinleri (AFM1) önemli oranda azalttığı (El-Nezami vd., 1998; Şanlı vd., 2012), *L.*

rhamnosus Lc 1/3, *L. amylovorus* CSCC 5197 ve *L. amylovorus* CSCC 5160 ırklarının mutajenik ve karsinojenik AFB1' i bağlayarak bu mikotoksinin zararlı etkisini azalttığı (Peltonen vd., 2001) bildirilmiştir.

Probiyotik LAB' ın sağlığa yararlı etkileri şöyle sıralanabilir: Laktoz intolerans semptomlarını azaltır, serum kolesterolünü azaltır. Kolon barsak kanserinin epidemiyolojisinde diyetin önemli bir rolü olduğundan dolayı antikanser etkisi gösterir. Barsak mikroflorasının metabolik aktivitesini değiştirir (β -glukuronidaz salınımı artar, karsinojenleri detoksifike eder). Kolonda fiziko kimyasal şartları değiştirir (safra asitlerinin artışı ve pH' nın azalması). Karsinojenleri bağlarlar ve yıkarlar (bakteri hücre duvarı mutajenik bileşikleri bağlar, mutajenleri absorblar). Karsinojenleri üreten ve safra asitini metabolize eden zararlı barsak mikroflorasının sayısını değiştirir (barsakta *L. acidophilus* sayısı artınca fekal çürülçül olan Koliformlar azalır), antitumorijenik ve antimutajenik bileşikleri üretir (*L. paracasei* MCF7 göğüs kanseri hücre hattının büyümesini önleyen antiproliferatif etkilere sahip). Konağın immun cevabını artırır (interferon- γ , interlökin-1 β , tümör nekroz faktör- α üreterek). Konağın fizyolojisini etkiler (karsinojenlerin metabolize edilmesini katalizleyen kolonik sitokrom redüktaz ve glutasyon transferaz enzim düzeylerini artırır). Finlandiya' da yüksek yağlı diyetle beslenmeye rağmen çok miktarda süt, yoğurt ve diğer süt ürünlerinin tüketilmesi nedeniyle kolon kanseri daha az sıklıkta görülür (Rafter, 2002).

Yoğurt tüketimi laktaz yetersizliğinin bulunduğu bölgelerde oldukça yaygındır. Araştırmalar laktaz noksan bireylerin sütteki laktoza kıyasla yoğurttaki laktozu daha etkili sindirdiklerini göstermektedir. Yoğurttaki laktoz sindiriminin artışı yoğurttaki inherent (kalıtıma bağlı olmayan) β -galaktozidaz aktivitesinin bir sonucudur. Yoğurt bakterileri β -galaktozidaz ve fosfo- β -galaktozidaz içerir (Savaiano vd., 1984; Martini vd., 1991).

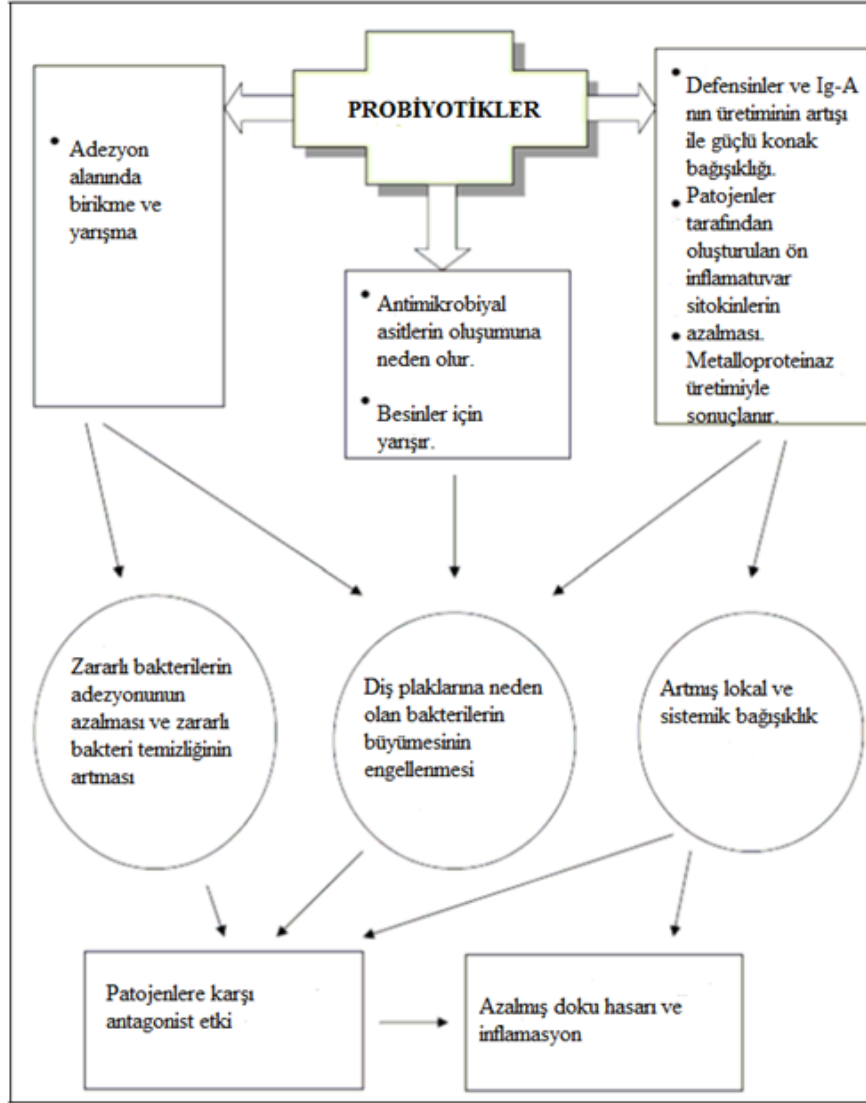
Laktaz yetersizliğinin dünyada görülme sıklığı yaygın olmasına karşın laktaz yetersizlik semptomlarının görülme sıklığı daha azdır. Çünkü çoğu laktaz yetersizliği bulunan insan günlük bir bardak sütü tolere edebilir. Mekanizma kolondaki bakterilerin karbonhidrat emiliminde rol almalarıyla ilişkilidir. Laktaz yetersiz bireylerde sindirilmeyen laktoz kalın barsağa geçer ve buradaki yerleşik mikroflora

tarafından H₂, CH₄, CO₂ ve kısa zincirli yağ asitleri gibi kolayca emilebilen metabolitlere fermente edilir (Jiang ve Savaiano, 1997).

Martini vd. (1991) gerçekleştirdikleri *in vivo* çalışmada 18-26 yaşlarında sağlıklı ancak laktaz yetersizliği bulunan 12 bireyin süt, yoğurt (*S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* ile fermente edilmiş) ve dört farklı LAB suşu (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *B. bifidus*, *L. acidophilus*) ile ayrı ayrı fermente edilmiş fermente sütleri tükettikten sonra 8 saatlik periyot sürecinde her saatte göğüs H₂ gazlarını analiz etmişler ve yoğurtla beslenen kişilerin 2-6 saatler arasında H₂ gazı üretim düzeyinin süt ve fermente süt ile beslenen kişilere kıyasla istatistiki olarak azaldığını (p<0.001), dolayısıyla yoğurt tüketiminin laktozu sindirmede etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Mehrabian vd. (2012) geleneksel İran yiyeceği Tarkhineh' ten izole ettikleri 25 adet *Lactobacillus*' un antikanser ve antimutajenik etkisine dair bir çalışma yapmışlardır. Ames Test metoduna göre *Lactobacillus*' ların 4 ırkının antimutajenik etki (%39.37-60.38 inhibitör etkisi), rat karaciğerindeki mikrozomlar üzerinde antikanser etki gösterdiklerini ve sonuç olarak bu ırkların probiyotik ırk olarak kullanılabileceğini bildirilmişlerdir.

Probiyotiklerin sağlığa yararlı etkilerini ne yolla gerçekleştirdikleri Şekil 1.3' te gösterilmiştir (Iqbal vd., 2014).



Şekil 1.3. Probiyotiklerin ağız sağlığını geliştirmesine dair mekanizma (Iqbal vd., 2014).

Dünyada yaygın olarak kullanılan güvenilir probiyotik ürünler bulunmaktadır. *L. rhamnosus* GR-1 ve *L. fermentum* RC-14 oral alımı takiben vajina girişinde kolonize olabilir, ürogenital patojenlerin büyüme ve adezyonunu önleyebilir, ürogenital yol enfeksiyonlarını azaltabilir, Enterokokları içeren gram pozitif kokların, Stafilokokların, Grup B Streptokokların, koliform ve Gardnerella' yı içeren Gram negatif basillerin adezyonunu önleyen biyosümfaktanlarla ürogenital patojenlere karşı çeşitli antagonistik faktörler üretirler (Reid vd., 2001).

Laktobasiller kadınların vajinal sağlığında önemli rol oynar. Sağlıklı kadınların vajinal mikrobiyotasında baskın türler olarak Laktobasiller bulunur. Laktobasiller antibiyotikle ya da gram negatif anaerobik patojen organizmalarla azalırsa bakteriyel

vajinosis (BV) olarak bilinen sağlık problemi ortaya çıkar. BV sorunu probiyotik Laktobasilleri tüketen kadınlarca çözülebilir. Dolayısıyla probiyotik içeren gıda maddelerinin kullanımı çeşitli sağlık sorunlarında biyoterapotik bir yöntem olabilir (Anukam vd., 2005).

Probiyotik ve LAB grubunda yer alan *E. faecium* ve *E. faecalis* insan ve hayvanların mide barsak kanalında yerleşik olarak bulunur ve tümör hücre hattının büyümesini inhibe eden, domuzlarda barsak immun sistemi geliştiren ve diareyi tedavi eden, yüksek kolesterolü düşüren özelliklere sahiptir (Kang ve Lee, 2005).

Heterosiklik aminler, N-nitroz bileşikler ve aflatoksinler gibi gıda mutajenlerine karşı LAB' ın koruyucu etkisi rapor edilmiştir. Çoğu *Lactobacillus* ırkının mutajenleri ortamdaki azaltma mekanizmasından birinin *fiziksel bağlanma* olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (Haskard vd., 2001).

Sütteki AFM1 (aflatoksin=potansiyel mikotoksin) miktarının yoğurt üretiminden sonra azaldığını ve laktik asit bakterilerinin varlığında pH' nın düşmesi, organik asit miktarının artması ve oluşan diğer fermentasyon ürünlerinin AFM1 miktarının azalmasından sorumlu olabileceği rapor edilmiştir (Şanlı vd., 2012).

Yaş dönemine göre barsak mikrobiotası değişen miktarlarda LAB içerir. Yenidoğan feesinde *Lactobacillus* hücrelerinin miktarı 10^5 CFU/g iken, 1 ay ve üzeri bebeklerde 10^6 - 10^8 CFU/g olarak artış göstermektedir. Mukoz membranda 10^{14} bakteri, 200 tür, 40-50 genus yaşar. Tüm bakteri popülasyonunun %99' u ince barsağın son bölümünde ve kolonun ilk bölümünde yer alır. Floranın % 90' ını *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* bakterileri oluştururken; %1 inden daha azını *Enterococcus* türleri oluşturur. Mikrobiotanın rolleri; patojenlere karşı koruma, immun sistemin gelişimi, konağın sağlığı ve beslenmesinde olumlu etkiler olarak sıralanabilir (Herich ve Levkut, 2002).

Yerleşik barsak bakterilerinin bir tipi olan *Lactobacillus*lar barsak mukoza tabakasını geçebilir ve dalak ya da diğer organlarda günlerce canlı kalabilir ve fagositik aktiviteyi uyarırlar. Bu yolla immun sisitemi uyarırlar. LAB olası iki yolla sitokin üretebilir. Sitokin salınımı T-lenfositlere antijen sunumundan sonra serbestlenebilir. Ya da sitokin üretimi LAB ve immun sistem hücreleri arasındaki doğrudan etkileşim

sonucu olur. LAB; IgA ve IFN- γ üretimini artırarak spesifik olan ve spesifik olmayan immün hücreleri ve konağın bağışıklık sistemini geliştirir (Herich ve Levkut, 2002).

Clifton vd. (2004) yoğurdun kan serumundaki lipidler üzerine etkilerini inceledikleri araştırmada 3 hafta süreyle günlük 1.6 g fitosterol içeren yoğurdu tüketen sağlıklı 40 kadın veya erkeğin total kolestrol değerini (6.04 mmol/L) yoğurt tüketmeyen kontrol grubunun serum total kolesterol değerine (6.43 mmol/L) kıyasla; serum LDL kolesterol değerini (3.85 mmol/L) kontrol grubunun LDL kolesterol değerine (4.27 mmol/L) kıyasla istatistiki olarak anlamlı şekilde düştüğünü bildirmişlerdir.

1.2.4. Yoğurt

Yoğurt sütün bakteriyal fermentasyonu sonucu üretilen bir süt ürünüdür. Süt şekeri laktozun fermentasyonu ile laktik asit üretilir. Laktik asit yoğurda yapısal ve duyuşsal özelliklerini veren süt proteininde aktivite gösteren bir maddedir. Yoğurdun Orta Doğu' dan köken aldığına inanılır. Yoğurdun gelişimi Dünya' da göçebe yaşayan insanların mutfaktaki yetenekleriyle ilişkilendirilmektedir. Yoğurt kelimesi Türkçe' den türetilmiştir. Yoğurt en önemli süt ürünlerinden biridir ve Türkiye' de yılda yaklaşık 2.293.431 ton tüketilir (Arıcan ve Andıç, 2011).

LAB ticari potansiyelleri, gıdaların muhafazası ve sağlığa yararları nedeniyle kapsamlı olarak çalışılmıştır. Fermente süt ürünleri ve peynir üretimi için süt endüstrisinde dünyada yaygınca kullanılan endüstriyel önemi olan mikroorganizmalardır. LAB' ın endüstriyel önemi şekerleri farklı metabolitlere kolaylıkla fermente edebilme yeteneğine ve fermente gıda ürünlerinin muhafaza edilmesinde etkili bir metod sağlaması temeline dayanır (Emerenini vd., 2013). Yoğurt da bu fermente ürünlerden biridir. *L. delbrueckii* ve *L. acidophilus* yoğurta bulunan LAB türleridir (Heilig vd., 2002).

1960' lardan beri yoğurt giderek dünyada yaygınlaşmaktadır. Başarılı bir yoğurt üretimi için çeşitli faktörler sayılabilir: Doğal görünümü, organoleptik karakteristikleri (taze ya da asitli kokusu, katarakteristik tadı), besleyici, tedavi edici özellikleri. Yoğurt yüksek konsantrasyonlarda LAB içerir ve tüketicinin sağlığı için faydalı özellikler gösterir: Yüksek laktoz toleransı, barsak mikroflorasının dengelenmesi, antimikrobiyal aktivite, immün sistemin uyarılması, anti-tumoral etki, anti-kolesterolemik etki bu özelliklerin başlıcalarıdır (Birolo vd., 2000).

Yoğurdun raf ömrüne de bağlı olarak yoğurttaki LAB sayısı çeşitli ülkelerde minimum 10^6 CFU/ml- 5×10^8 CFU/ml arasında bulunur (Biorollo vd., 2000).

Yoğurdun fiziksel özelliklerini geliştirmek için de EPS üreten starterler kullanılır. Gürsoy vd. (2010) EPS üreten yerli *S. thermophilus* (W22) ve *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (B3) ırkları ile ürettikleri ve 21 gün süreyle depoladıkları set tip yoğurtların EPS konsantrasyonlarını incelediklerinde en yüksek EPS konsantrasyonunu 11. günde ticari kültür+ *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 yerel ırkıyla üretilen yoğurtta (265.30 ± 17.6) tespit etmişlerdir. En düşük EPS konsantrasyonunu 11. günde *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3+ *S. thermophilus* W22 yerel ırklarıyla üretilen yoğurtta (174.7 ± 30.80) tespit etmişlerdir. Bu bulgulara göre yoğurt üretiminde ticari kültürle kombine olan yerli LAB ırkı kullanımının alternatif olarak tercih edilebileceği düşünülmektedir.

Yeni probiyotik ürünlerin çoğunluğu Bifidobakterileri, *L. acidophilus* ve *L. acidophilus* grubu ile yakından ilişkili türleri içerir. *L. casei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. paracasei* subsp. *tolerans* ve *L. rhamnosus*' u içeren *L. casei* grubu suşlar da yeni tip yoğurtlarda kullanılmaktadır. *L. bulgaricus* yoğurt ve fermente süt üretimi için gereklidir ve bu gıdaların organoleptik, hijyenik ve belki de probiyotik kalitesinin gelişiminde temel rolü bulunur (Erdoğan ve Erbilir, 2006).

Yoğurt güvenilir bir ürün olarak kabul edilir. İstenmeyen birçok mikroorganizma yoğurtta gelişemez. Yoğurt üretimi için kullanılan sütün kalite özellikleri yapılacak yoğurdun tadı, dokusal ve kompozisyon özellikleri açısından önemlidir. Türkiye' nin farklı bölgelerinde inek, manda, keçi ve koyun sütü ya da bunların karışımından elde edilen süttten evlerde yapılan yoğurt kullanılmaktadır (Erkaya ve Şengül, 2012).

LAB' ın proteolitik aktivitesi fermente süt ürünlerinde lezzet bileşenlerinin gelişiminde önemlidir. İyi kalitede bir fermente süt ürününün üretimi starter bakterilerin proteolitik özelliklerine bağlıdır. Fermentasyon süresince oluşan peptidaz ve amino asitler doğrudan lezzet geliştirme etkisi veya süt ürünlerinde lezzet öncüleri olarak hizmet ederler (Seifu vd., 2012).

Yoğurt oluşumunda proteoliziste (proteinleri dipeptit ve amino asitlere hidroliz etme) *Lactobacilluslar* etkiliyken (Gezginç ve Akyol, 2010), serbest yağ asiti açığa çıkaran

lipoliziste hem *Streptococcus* hem de *Lactobasillus*' lar etkilidir (Özdemir ve Bodur, 1994).

Özellikle yoğurttta asetaldehit aromatik bir bileşen olarak üretilir ve *L. bulgaricus* ile ilişkilendirilir. Bu LAB türü treonini asetaldehit ve glisine parçalayan treonin aldolaz içerir. Yoğurt florası olan *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* asetaldehiti metabolize edemez ve böylece yoğurttta 25 ppm yoğunlukta birikir. Süt ürünlerindeki istenmeyen bakteriler olan *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thyphimurium* ve *E. coli* büyümesi 10-100 ppm asetaldehit yoğunluğunda azalmıştır (Piard ve Desmazeaud, 1991).

1.2.5. Fermentasyon

Sütten yoğurt yapımında mikrobiyolojik birçok olay gerçekleşir. Bunlardan en bilineni laktoz fermentasyonudur. Bunun için önce laktoz fosfotransferaz ile LAB hücre içine taşınır. Hücre içinde laktoz b-D-galaktozidaz enzimi ile glukoz ve galaktoza hidroliz olur. Oluşan glukoz önce glikolizise uğrayarak pirüvata sonra pirüvat laktat dehidrogenazla laktik asit fermentasyonuna uğrayarak laktik asite dönüşür. Laktik asit yoğurda hem aroma kazandırır hem de istenmeyen patojenlerin gelişimi asit ortamda önlenmiş olur (Özdemir ve Bodur, 1994).

Mikrobiyal fermentasyon gıda ürünlerini koruma, besin değerini arttırma, istenmeyen faktörleri yok etme, ürün güvenliğini sağlama, gıda ürünlerinin tadını ve görünümünü değiştirmede önemli rol oynar. Ayrıca gıda ürünlerinde aroma ve tat bileşenlerinin gelişimi gibi istenen biyokimyasal değişiklikleri gerçekleştirir (Seifu vd., 2012).

Laktik asit ilk kez 1780' lerde tanımlanmıştır ve hem kimyasal sentezi hem de karbonhidrat fermentasyon ürünü olarak üretimi mümkündür. Ticari amaçlı kimyasal sentezi için laktonitrile gereksinim vardır. Asetaldehit ile hidrojen siyanid reaksiyona girerek laktonitril sentezlenir. Bu kataliz yüksek basınç altında gerçekleşir. Laktonitril de iki hidroliz, bir esterleşme reaksiyonuyla laktik asite dönüşür. Oluşan laktik asit rasemik karışım olan *L(+)* laktik asit ve *D(-)* laktik asit stereoizomerlerinden bir ya da ikisine (*DL(±)*) dönüşebilir (Narayanan vd., 2004). Örnek olarak *L. acidophilus* saf kültürlerinin temel fermentasyon ürünü *DL(±)* laktat

iken, *B. bifidum* kültürlerinininki *L*(+) laktattır (Hove vd., 1994). Şekil 1.4' te laktik asitin kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1.4. *L* (+) laktik asit ve *D* (-) laktik asitin kimyasal yapı formülü (Narayanan vd., 2004).

Mikrobiyolojik yolla gerçekleşen fermentasyonda yoğurt bakterileri olan *L. bulgaricus* *D* (-) ve *DL* (\pm) laktik asit üretirken, *S. thermophilus* *L* (+) laktik asit üretir. Yoğurt pH' sının mikrobiyolojik laktik asit üretimi ve depolama sonunda 4.0-4.6 arasında olması beklenir (Özdemir ve Bodur, 1994).

Farklı LAB üyelerinin 24 saatlik saf sıvı kültürde biriktirdikleri laktik asit miktarlarının *L. acidophilus* için 24.1 g/L, *L. brevis* için 13.1 g/L, *L. fermentum* için 12.5 g/L, *W. confusa* için 12.7 g/L olduğu bildirilmiştir (Liliana vd., 2011).

LAB gıda teknolojisinde önemli bir rol oynar. Gıda üretimi ve gıdaların muhafazasında uzun bir tarihe sahiptir. LAB glukozun fermentasyonundan üretilen ürünlere bağlı olarak iki gruba ayrılırlar: Homofermentatif laktik asit bakterileri ve heterofermentatif organizmalar (Hassanzadazar ve Ehsani, 2013). *L. iners*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. crispatus* homofermentatif LAB' dır; yani glukozu sadece laktik asite metabolize ederler. Oysa *L. fermentum* *L. vaginalis*, *L. rhamnosus* heterofermentatif tir; glukozu laktik asitin yanı sıra asetik asit, etanol ve karbondioksite metabolize ederler (Piard ve Desmazeaud, 1991; Anukam vd., 2005).

Ennahar vd. (2003) *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* cinslerinin homofermentatif (glukozdan gaz üretmeyen koklar), *Leuconostoc* cinslerinin heterofermentatif (glukozdan gaz üreten kok), *Lactobacillus brevis* türü heterofermentatif (basil), *L. pentosus*, *L. plantarum* (Kormin vd., 2001), *L. paraplantarum* türü homofermentatif (basil), *W. kimchii* heterofermentatif (basil) olduğunu bildirmişlerdir.

Fermentasyon süresince laktik asit gibi organik asitleri üretmek hem ürünün raf ömrünü artırır hem de duyuşsal özellikleri düzenler (Peltonen vd., 2001).

Sütün yoğurda dönüşümünde organoleptik ve reolojik özelliklerin oluşumunda temel rolleri bulunan asitler LAB tarafından üretilirler ve aynı zamanda asitler istenmeyen bakterileri yok ederek yoğurdun raf ömrünü uzatırlar. Yoğurdun raf ömrü pH' ya bağılıdır. pH azaldıkça yani organik asitlerin miktarı artıkça yoğurdun güvenliği artar (Piard ve Desmazeaud, 1991).

Yoğurt starter kültüründe yer alan başlıca laktik asit bakterileri *S.thermophilus* ve *L. bulgaricus'* tur (Campo vd., 2005; Gezinç ve Akyol, 2010; Gürsoy vd., 2010; Omafuvbe ve Enyioha, 2011).

Sütün fermente ürün olan yoğurda dönüşümünde kimyasal ve fiziksel değişiklikler oluşur. Bu değişikliklerin kimyasal olanları yoğurt bakterileri olan *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus'* un laktoz, protein ve yağ gibi besin maddelerini fermente etmeleri ile meydana gelir. Fermentasyonun başında *L. bulgaricus* miktarı yüksek iken, sonrasında *S. thermophilus* miktarı artar (Masud vd., 1991). *L. bulgaricus'* un temel biyokimyasal etkisi proteinler üzerinde proteolitik aktivite göstermek iken, yoğurt starterinde bulunan *L. bulgaricus'* un etkisi daha çok lipolitik aktivite göstermektedir. Yoğurtun depolanma sürecinde yağ miktarının azalması ve serbest yağ asitleri miktarının artması lipolizis olarak bilinir. Yoğurttaki mikroorganizmalardan *L. bulgaricus'* un laktik asitle birlikte *S. thermophilus* 'tan daha fazla miktarda serbest yağ asidi ürettiği tespit edilmiştir (Özdemir ve Bodur, 1994). Çeşitli LAB türlerinin lipolitik aktivitesine dair yapılan bir araştırmada *S. thermophilus'* un lipolitik aktivitesi bulunmamıştır (Omafuvbe ve Enyioha, 2011).

Fermentasyon aerobik solunumla başlar. Bu aşama oksijen tükenene kadar devam eder. Fermentasyonun anaerobik aşaması heterofermentatif LAB' ın büyümesiyle başlar, bu aşama tamamlandığında sütte besinler korunur. pH 5' in altına düştüğünde heterofermentatif LAB' ın büyümesi geriler, homofermentatif LAB popülasyonunda artış olur. Fermentasyonun temel amacı homofermentatif bakterilerin ve asitliğin artmasıdır. Böylece şekerler laktik asite dönüşür ve laktik asit zararlı mikroorganizmaların ortamda yok edilmesini sağlar. Sonuçta kaliteli ve güvenli gıda oluşumu sağlanır (Ennahar vd., 2003).

Fermentasyonu birçok faktör etkiler:

1-Fermentasyon sürecine hakim mikroorganizmanın tipi yoğurdun final kalitesini belirler. Örneğin LAB' ın homolaktik fermentasyonu, diğer tip fermentasyonlara göre daha çok tercih edilir. Çünkü teorik olarak homolaktik fermentasyonda kuru maddenin ve enerjinin kazanımı daha yüksektir.

2-Homolaktik fermentasyon sürecinde LAB laktik asit üretmek için suda çözünen karbonhidratları kullanır (Ennahar vd., 2003).

3-Starter kültürün biyokimyasal özelliklerinin bilinmesi üretilecek fermente gıdanın nihai asitliği, aroma ve tat oluşumu gibi özelliklerini belirlemek için gereklidir.

Bu gereklilikler için de izolatin tanımlamasının yapılması ve karakterizasyonunun belirlenmesi birinci dereceden önem taşır.

Bu nedenle biz bu tez çalışmamızda aday starter kültür belirleme ve potansiyel probiyotik ırk seçimine dair ön bilgiler elde etmeyi planlamaktayız.

1.2.6. LAB' ın Karakterizasyon Özellikleri

Çeşitli LAB türlerinin sıcaklık, tuz ve asit toleransını belirlemek izole edilen türün aday starter kültür ve aday probiyotik ırk olma niteliğini belirlemek açısından önemlidir.

1.2.6.1. LAB' ın Sıcaklık Toleransı

LAB' ın tanımlanmasında kullanılan parametrelerden biri de gelişme sıcaklığıdır. Bazen aynı genusun farklı türlerinin gelişebildikleri sıcaklıklar farklı olabilmektedir. Patil vd. (2010) *L. fermentum* ve *L. plantarum*' un optimum gelişme sıcaklığının 37 °C olduğunu; ancak *L. fermentum*' un 45 °C' de gelişirken (Omafuvbe ve Enyioha, 2011), *L. plantarum*' un aynı sıcaklıkta gelişmediğini bildirmişlerdir. Kormin vd. (2001) ise *L. plantarum*' un 10 °C, 15 °C ve 45 °C' de (Omafuvbe ve Enyioha, 2011; Seifu vd., 2012) asetat agarda gelişebildiğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda Talpur vd. (2011) *L. plantarum*' un 50 °C' de gelişmediğini bildirmişlerdir. *L. camptosi*' nin de 15 °C ve 37 °C' de iyi geliştiği, 10 °C' de az geliştiği ancak 45 °C' de gelişmediği tespit edilmiştir (Endo ve Okada, 2007).

Salama vd. (1995) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris*' in 10 °C ve 40 °C sıcaklıklarda gelişebildiğini fakat 45 °C' de gelişemediğini rapor etmişlerdir.

Yüksekdağ ve Beyatlı (2009) *S. thermophilus*' un optimum gelişme sıcaklığını 42 °C, *Streptococcus durans*' ın optimum gelişme sıcaklığını 30 °C; *Pediococcus destrinicus*' un ise optimum gelişme sıcaklığını 35 °C olarak rapor etmişlerdir.

Messens vd. (2002) ekmek mayalamada kullanılan *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 starterinin SSM (Sourdough Simulation Medium) besiyerinde hücre büyümesi ve bakteriyosin üretimi üzerine 28-44 °C sıcaklık ve 4.2-6.4 pH aralığının etkilerini araştırmışlar, biomass ve bakteriyosin üretim kinetiklerine göre kompleks enerji ve nitrojen kaynaklarını 34 °C' ye kıyasla 37-44 °C' de daha iyi kullandığını bildirmişlerdir.

1.2.6.2. LAB' ın Tuz Toleransı

LAB' ın farklı suşlarının fermente gıdaların NaCl konsantrasyonlarını tolere etmesi fermentasyon işleminin sürmesini sağlar. LAB izolasyon çalışmalarında gıda materyallerinin tuz yoğunluğunun belirlendiği çalışmalar mevcuttur (Miyashita vd., 2012). Buna göre *L. fermentum* % 6' dan daha az tuz içeren fermente bitki materyallerinden izole edilirken, *E. faecalis*, *E. faecium*, *L. acidipiscis*, *L. farciminis*, *L. fitsaii*, *L. acidilactici*, *L. pentosaceus*, *T. halophilus*, *W. thailandensis* sıklıkla %10' dan daha yüksek tuz içeren örneklerden izole edilmiştir (Miyashita vd., 2012).

W. paramesenteroides ve *W. cibaria*' nın % 6.5 NaCl içeren ortamda gelişebildikleri buna karşın % 10 NaCl ve % 15 NaCl içeren ortamlarda gelişemedikleri rapor edilmiştir (Patil vd., 2010). Ayrıca *W. cibaria* ve *W. confusa*' nın % 7 tuzlu ortamda dahi gelişebildikleri bildirilmiştir (Talpur vd., 2011).

Kormin vd. (2001) *L. plantarum* BS2' nin % 6.5 NaCl içeren ortamda ve pH 9.6' da gelişebildiğini rapor etmişlerdir.

Lactobacillus türlerinin tuza toleransı düşükken (en fazla % 2' lik NaCl' li besiyerinde gelişim bulunuyor), *Enterococcus* ve *Lactococcus* türlerinin tuza toleransı yüksektir (% 6.5' lik NaCl' li besiyerinde gelişim bulunuyor) (Seifu vd., 2012).

Salama vd. (1995) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris*' in % 4' lük NaCl konsantrasyonuna sahip besiyerinde gelişebildiğini rapor etmişlerdir.

Lactobacillus brevis, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. cellobiosus*, *Lactococcus cremoris* % 4.5' lik NaCl' de büyüme gösterirken, % 6.5' lik NaCl' de gelişmemektedir (Omafuvbe ve Enyioha, 2011).

1.2.6.3. LAB' ın Asit Toleransı

LAB' ın gelişimini belirleyen parametrelerden biri de izole edildiği ortamın asitliğidir. *Lactobacillus farciminis*, *L. plantarum*, *Enterococcus* suşlarının pH: 4.51' de, *T. halophilus*' un pH: 5-5.5' te (tuz oranı % 24-44) izole edildiği bildirilmiştir. Buna karşılık *T. halophilus* % 0.5 ve % 15 tuz içeren ve pH 10' a ayarlanmış besiyerinde izole edilir. Bu sonuç bize fermente gıdalardan birbirinden farklı LAB' ın izole edilmesi için çeşitli tuz konsantrasyonu ve pH' nın kullanılabileceğini göstermektedir (Miyashita vd., 2012).

Asitlik ölçümünün yapıldığı bir başka çalışmada çeşitli *Lactobacillus* türlerinin 2.87 ile 4.10 arasındaki pH değerlerine sahip fermente ürünlerden izole edildiği bildirilmiştir (Omemu ve Faniran, 2011). Diğer yandan *L. fermentum* ve *L. plantarum*' un pH: 8.6 ve pH: 9.6' da geliştiğini ancak asidik pH değerleri olan 3.9 ile 4.4' te gelişmediğini bildiren bir çalışma bulunmaktadır (Patil vd., 2010).

L. amylovorus DCE 471' in ekmek mayası fermentasyonunda başlangıç pH' sı 5.4-5.8 iken fermentasyon sonunda 3.8 olur. Bu pH' da yavaş da olsa *L. amylovorus* DCE 471' nin büyüdüğü görülür. pH değerleri 5.0' dan yukarı oldukça bakteriyosin üretimi artar. Daha yüksek pH değerlerinde ise bakteriyosin moleküllerinin hücreye yapışma miktarı arttığı için pH arttıkça bu moleküllerin inaktivasyonu da artmaktadır (Messens vd., 2002).

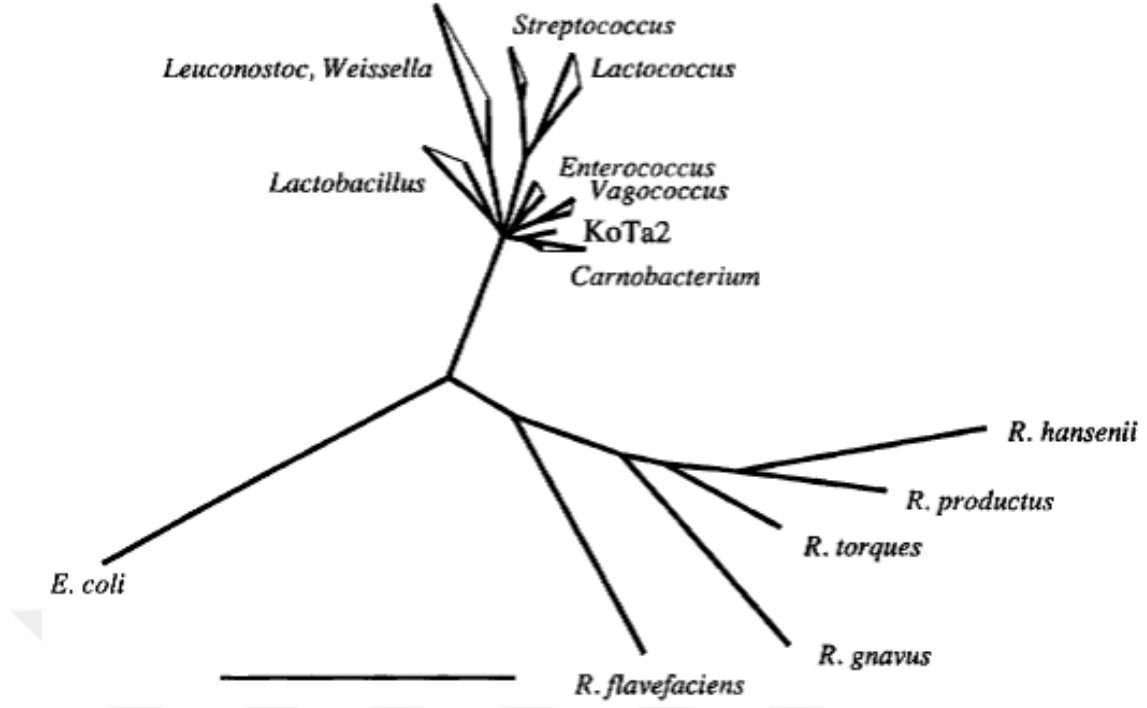
Farklı bir çalışmada asidik ortamlarda (pH: 2.0, pH: 2.5, pH: 3.0) çeşitli LAB türlerinin canlılık değerleri araştırılmış ve en yüksek canlılığı *L. rhamnosus* (5.140 log cfu m/L) 1. saatte pH:3.0' da, en düşük canlılığı *L. salivarius* ve *W. confusa* (2.477 lof cfu m/L) 3. saatte pH: 2.0' da göstermiştir. Probiyotik LAB' ların hiçbirisi pH: 1.0' da gelişme göstermemiştir (Talpur vd., 2011).

1.3. LAB' ın Tanımlanması

1.3.1. Fenotipik Yöntemler

LAB geleneksel olarak hücre morfolojisi, fermentasyon ürünlerinin analizi, bağlantılı enzim aktiviteleri, çeşitli karbonhidrat substratlarından faydalanma yeteneğine dayalı olarak tiplendirilmektedir. Seçici besiyerleri ve fenotipik testler LAB üyelerini morfolojik olarak benzer bakterilerden ayırmaya olanak sağlar. Ancak LAB' ın kesin identifikasyonu için 16S rRNA gen dizileri ve diğer moleküler yöntemler başarıyla kullanılır. Çünkü nükleik asit baz dizileri LAB' ın kültür şartlarından etkilenmez. Genotipik yaklaşımlar hızlı ve kesin identifikasyon sonuçları verir (Tannock, 1999).

Fenotipik yöntemler moleküler yöntemlerle desteklendiğinde anlamlı belirteçler haline gelir. Sadece fenotipik özelliklerine bakılarak yapılan bir bakteri sınıflaması güvenli sonuç vermeyebilir ancak LAB' ı; bu gruba girmeyen diğer bakterilerden ayırmada güçlü bir ön sınıflama basamağı olarak kullanılır. Janssen vd. (1995) tarafından daha önceleri *Ruminococcus pasteurii* olarak sınıflandırılan ve *Carnobacterium* genusuna yakın olduğu rapor edilen bir suşun hem fenotipik yöntemler (laktik asit sentezleme, aerotolerant olması) hem de 16S rDNA sekans analizine göre yeni bir LAB üyesi (KoTa2 suşu= *Lactosphaera pasteurii*) olduğu literatürde bildirilmiştir. *Lactosphaera pasteurii*' nin DNA' sındaki G+C oranı % 45 mol iken, daha önce yakın ilişkili iddia edilen *Carnobacterium* genusu türlerinin G+C oranı % 33-37 mol' dür. Spor oluşturmeyen kok morfolojisine sahip olması, 16S rRNA primer yapısının *Ruminococcus* türleri ile % 75-83 gibi düşük oranda ve *Carnobacterium* türleri ile de % 97' nin altında (% 94-95) benzerlik göstermesi sonucu bu suşun daha farklı bir LAB üyesi olarak *Lactosphaera pasteurii* adıyla farklı bir şekilde sınıflandırılması yapılmıştır. Şekil 1.5' te KoTa2 suşunun aslında LAB üyeleri olan *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Enterococcus* gibi LAB üyeleriyle olan yakınlığının aksine daha önce üyesi olarak sınıflandırıldığı *Ruminococcus* türlerine gerçekte ne kadar da uzak olduğu ve yine *E. coli* türüne olan uzaklığı da görülmektedir.



Şekil 1.5. KoTa2 suşu (*Lactosphaera pasteurii*)' nun taksonomik yeri.

API CHL50 gibi ticari amaçlı hazırlanmış ve türlerin karbonhidrat fermentasyon profillerindeki farklılık ve benzerliklere bağlı olarak tür düzeyinde ayırım yapan biyokimyasal özellik tayini de bir fenotipik identifikasyon yöntemidir.

Yazdi vd. (2012) aynı genusun farklı türlerinin fermente ettiği ve edemediği karbonhidratları belirlerken *L. fructosus*' un çoğu şekeri fermente etmezken, glukozu fermente ettiğini; buna karşın *L. fermentum*' un glukozun yanı sıra rafinoz, glukonat, melibioz, laktoz, sukroz, fruktoz, galaktoz, maltoz, glukozu fermente ettiğini rapor etmişlerdir.

Seifu vd. (2012) tür teşhisi için LAB izolatlarının karbonhidratları fermente etme profillerine bakmışlar ve *L. lactis subsp. lactis*' in maltoz, mannitol, laktoz, arabinoz salisin, glukoz, mannoz, fruktozu fermente ettiğini; *L. lactis subsp. cremoris*' in maltoz, laktoz, sukroz, salisin, glukoz, fruktoz ve maltozu fermente ettiğini; ancak rafinoz, sorbitol ve arabinozu fermente etmediğini; arabinoz ve dolsitolü fermente edemeyen, sorbitol ve rafinozu zayıf fermente eden türün *E. faecalis* olduğunu bildirmişlerdir.

İdentifikasyon yöntemlerinde fenotipik özelliklerin kullanılması çok ayırıcı olmamakla birlikte başlangıç aşamasında belli başlı LAB özelliklerine sahip

izolatların gram pozitif, katalaz negatif, oksidaz negatif olmalarıyla diğer ilişkili olmadıkları izolatlardan ayrılmaları birinci derecede önemlidir. Ayrıca biyokimyasal tanımlama ile istenmeyen ancak potansiyel bazı LAB izolatlarının saf dışı bırakılması ve moleküler yöntemde kullanılacak PCR primerlerinin istenmeyen bölgeye bağlanma ihtimali ortadan kaldırılacaktır. Çünkü biyokimyasal tarama yapılmayan izolatlar bazen moleküler tanımlama esnasında primerlerin yanlış tasarlanması hatta yanlış yere bağlanmasından dolayı hatalı tanımlamaya neden olabilir. Bu nedenlerle fenotipik ve moleküler tanımlama yönteminin birlikte kullanılması daha doğru bir identifikasyon için gereklidir.

Mükemmel bir identifikasyon yöntemi için:

- Türler arası ayırım gücü yüksek olmalı
- Sonuçlar farklı laboratuvarlarda farklı zamanlarda değerlendirildiğinde aynı olmalı
- Hızlı olmalı
- Gen Bankası veri tabanlarına uygun olmalı
- İdentifikasyon düzeneği basit ve ucuz olmalı

Bu özelliklere sahip moleküler tanımlama yöntemleri kolay yorumlama özelliğinin eklenmesiyle de tercih edilmektedir (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011).

Yüksekdağ ve Beyatlı (2009) aralarında yoğurdun bulunmadığı çeşitli süt ürünlerinden izole ettikleri LAB türlerinin API 50 CH kiti ile protein profillerinin dizilişini (SDS-polakrilamit jel elektroforezi uygulaması ile) kıyaslamışlardır. *L. brevis* Hy20L izolatu hem API hem de SDS-PAGE ile aynı oranda benzerlik gösterirken (% 79.9); ilginç olarak *L. cremoris* Zm21S izolatu API ile % 99.1 benzerlik gösterirken aynı suş SDS-PAGE ile sadece % 57 benzerlik göstermekteydi. Bu farklılıkları giderebilmek için moleküler çalışmalar olan 16S rRNA ve 16S rDNA sekans analizlerinin yapılması tanımlamanın doğruluğunu daha kesin hale getirir.

1.3.2. Moleküler Yöntemler

1.3.2.1. Spesifik 16S rDNA Amplifikasyonu

Mide barsak mikrobiotasını kültüre almakla sayımı mümkün olmadığından LAB grubuna özgü rRNA genlerini hedefleyen hibridizasyon yaklaşımları gereklidir. Polimeraz zincir reaksiyonuyla çoğaltılan rRNA genlerinin filogenetik analizi hızlı ve etkili bir yöntemle barsak bakterilerinin tanımlanmasını ve yeni türlerin belirlenmesini kolaylaştırır. Ayrıca PZR' nin ardından denatüre gradiyent jel elektroforezi uygulamasıyla yürütülen bantlar barsakta kompleks halde bulunan bakterinin görüntülenmesine kolayca izin verir. 16S rDNA tür düzeyinde ayırıcı bir gen olup, aynı türün farklı suşlarını belirlemek için yetersiz olmaktadır (Heilig vd., 2002).

16S rDNA' ya dayalı dizileme metoduna göre genus ve tür düzeyinde tanımlama yapılabilirken, tür içi ve alttür düzeyindeki tanımlamalar yapılamamaktadır. 16S rDNA' ya dayalı filogenetik ağaçlar organizmalar arasındaki ilişkileri yüksek bir tutarlılıkla gösterir (Ennahar vd., 2003).

İdentifikasyon çalışmalarında mikroorganizma kültürü ve PCR tekniklerinin LAB türü bakımından negatif sonuç verdiği çalışma örneklerinde (feçes) DNA hibridizasyon tekniğiyle LAB' in esasen pozitif olduğu görülmüştür (Campo vd., 2005).

1.3.2.2. Spesifik DNA Probu Oluşturma

Besin ve büyüme gereksinimlerinin benzer olması nedeniyle klasik yöntemlere göre belirlemek zordur. Konvansiyonel yöntemlere göre daha üstün bir yaklaşım moleküler prob kullanımıdır. Bunun için tüm bakterilerde günümüzde korunmuş olarak bulunan rRNA dizisinin yüksekçe değişiklik gösteren bölgelerine dayalı DNA problemleri oluşturulur. Bunun için önce bakteri genomundaki 16S rRNA' nın değişiklik gösteren bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılır, sonra bu bölgeye özel DNA problemleri oluşturulur. Bu yöntemin klasik identifikasyon yöntemine göre iki avantajı vardır: Birincisi 1 ya da 2 günde güvenilir bir identifikasyon elde etmek; ikincisi agarda büyütülen kolonilerden eş zamanlı olarak ırkların çoğunun identifikasyonunu yapmak (Klijn vd., 1991).

1.3.2.3. RAPD Parmak İzi Metodu

LAB suşu eğer 16S rRNA sekans analizi sonucu diğer LAB suşlarıyla % 93' ün altında bir benzerlik bulunuyorsa filogenetik ağaçta muhtemelen farklı yeni bir suş olduğu düşünülür ve birden fazla LAB suşunun filogenetik yeri bilinmediği durumlarda suşların arasındaki filogenetik ilişkinin yakınlığını belirlemek için genomdaki G+C miktarına ve RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA=Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) - PCR ile genomda rastgele çoğaltılan polimorfizme sahip DNA parmak izi bölgeleri çoğaltılır ve iki farklı primer ile suşların genom yakınlığı iki kez tespit edilir (Endo ve Okada, 2007).

1.3.2.4. RFLP (Sınırlanmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)

LAB izolatlarının gruplandırılması ve sınıflandırılması için RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analizi ve 16S rDNA dizileme analizi birlikte kullanılır. Bunun için bakteri DNA' sı izole edilir. PCR ile amplifikasyondan sonra bakterileri gruplamak için AccII (CG/CG), HaeIII (GG/CC), AluI (AG/CT) gibi kesim enzimleri kullanılır. 16S rDNA' nın RFLP analizi için PCR ürünleri saflaştırılır ve primer kullanılarak DNA dizilemesi yapılır. Sekans kıyaslamasında marker olan suş ile % 99-100 homoloji benzerliğinin bulunması yeterli ve gerekli bir parametredir (Chen vd., 2010).

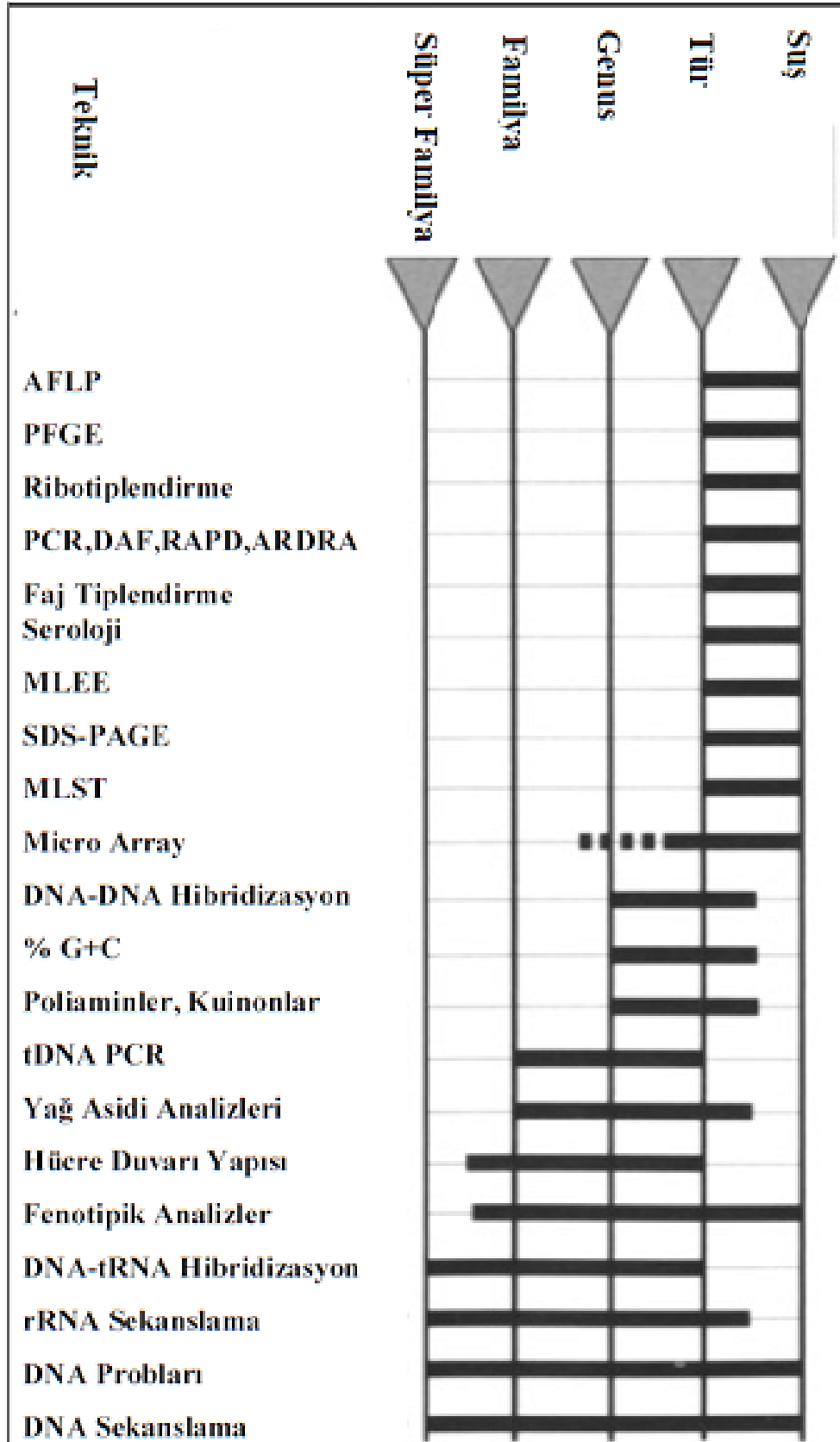
1.3.2.5. 16S rRNA Değişken Bölgelerinin Sekansı

Bakterilerde rRNA' yı kodlayan genlerden biri olan 16S rRNA gen bölgesi yüksek derecede korunmuş dizileri içerir (Kıran ve Osmanoğlu, 2011) ve 3 adet değişken bölgeye sahiptir. Bunlar V1, V2, V3 değişken bölgeleridir (Klijn vd., 1991; Anukam vd., 2005). Bunlar dışında V4-V9 olmak üzere 6 değişken bölge daha vardır (Tannock, 1999).

Şekil 1.6' da 16S rRNA molekülünün sekonder yapısında yer alan değişken bölgeler (V1-V9) gösterilmiştir (Klijn vd., 1991; Tannock, 1999).

Şekil 1.7' de LAB' ların tanımlanmasında yararlanılan genotipik ya da fenotipik yöntemler ile bu yöntemlerin organizmayı hangi taksonomik düzeye kadar tanımlayabileceği gösterilmiştir (Kıran ve Osmanoğlu, 2011).

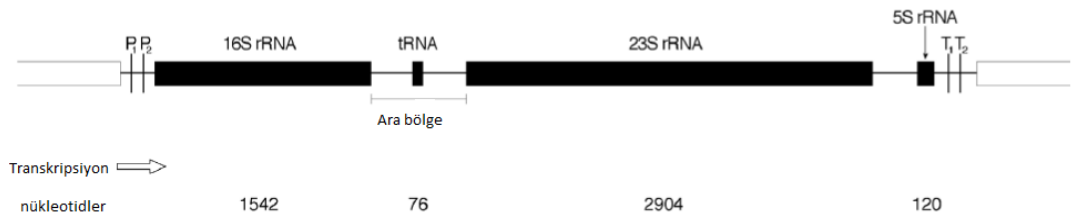




Şekil 1.7. LAB' ların tanımlanmasında yararlanılan yöntemler ve taksonomik tanımlama düzeyi (Kıran ve Osmanoğlu, 2011).

Bunun dışında bakteri kromozomunda 23S ve 5S rRNA genleri bulunur ve 16S, 23S, 5S rRNA genleri bakteri kromozomunda bir operon halinde düzenlenmiştir. Çoğu bakteri her genomda rRNA genlerinin alellerine (çoklu kopyalarına sahiptir). Farklı operonlarda ise değişik baz uzunluğunda ara bölgeler bulunur. tRNA^{glu}, tRNA^{ile}, tRNA^{ala} genleri de bazı ara bölgelerde yerleşir. Bu ara bölgeler de bakteriler arasında oldukça yüksek değişkenlik gösteren bölgeler olup, ara bölgeye özgü primerler kullanılarak yapılacak PZR sonucu gıda endüstrisinde kullanılan LAB ayırımı yapılabilir.

Şekil 1.8' de bakterilerin tümünde bulunan 5S, 16S ve 23S rRNA gen bölgeleri ile bunlar arasında yer alan ve her bakteri türünde değişik uzunlukta ve o türe özgü olan tRNA ara bölgeleri görülmektedir. (Tannock, 1999).



Şekil 1.8. Bakterilerdeki rRNA gen modeli (Tannock, 1999).

Bazı bakteriler 2 adet tRNA genine sahipken, diğerleri birine sahiptir ya da hiçbirine sahip değildir. P₁P₂: Promotor, T₁T₂: Terminatör (Tannock, 1999).

1.3.2.6. MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)

Mikrobiyolojik tanımlama konusundaki gelişmelerden biri de; mikroorganizmaların tür düzeyinde teşhisine hızlıca imkan veren matriks destekli lazerin desorpsiyon/iyonizasyon zamanlı uçuş kütle spektrometrisi yöntemidir. Klasik yöntemler biyokimyasal kriterlere, gerekli ön testlere ve uzun inkübasyon süreçlerine dayanır. Buna kıyasla MALDI-TOF MS (Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi) yöntemi kültür plaklarında büyüyen kolonilerden bakteri ve mayaları doğrudan birkaç dakika içinde tanımlayabilir. Bu kökten yeni ve metodik olarak basit bir yaklaşım, sarf malzemelerinin maliyetini ve teşhis için harcanan zamanı büyük ölçüde azaltır. Yöntemin güvenilirliği ve doğruluğu çok sayıda çalışmada gösterilmiştir. Mikrobiyal

tür seviyesinin belirlenmesinin yanı sıra sistemin yeni uygulamaları da araştırılmaktadır (Wieser vd., 2012).

Bu yöntemde mikroorganizmalara ait biyomeküller (protein, peptid, şeker) ve büyük organik moleküller (polimer, dendrimer, makromolekül) iyonize edildikten sonra elektrik ve/veya manyetik alandan geçirilerek protein profilleri çıkarılmaktadır. Bu profil spektralarına ait grafiksel görüntülerin sistemin veri tabanındaki referans organizmaya uyumuna göre mikroorganizmalar cins ve tür bazında tanımlanabilmektedir (Yılmaz vd., 2014).

Mikroorganizma profillemesinin genel iş akışı basit bir yaklaşımdır. Tek bir koloni veya diğer biyolojik materyalden başlayarak, numuneler birkaç dakika içinde analiz edilebilir. Otomatik spektrum edinimi, numune başına birkaç saniye içinde tamamlanır ve özel tanımlama yazılımına kesintisiz bir veri aktarımı mümkündür. Bu nedenle bu teknoloji klasik mikrobiyolojik tanımlama ve sınıflandırma tekniklerine mükemmel bir alternatiftir ve yalnızca minimum numune hazırlama çabaları ve yaşam döngüsü maliyetleri gerektirir.

MALDI-TOF MS günümüzde mikroorganizma tanımlanmasında kullanılan yeni bir yöntemdir. Bu yöntem, mikroorganizmaların protein yapılarını iyonize ettikten sonra elektrik alandan geçirilerek protein profillerinin çıkarılması esasına dayanır. Elde edilen profiller sistemin kütüphanesindeki verilerle karşılaştırılarak tanımlama yapılır. Tanımlama için temel alınan mikroorganizma proteinleri ise esasen çevresel koşullardan az etkilenen ribozomal proteinlerden oluşmaktadır. MALDI-TOF MS ile yapılacak tanımlama çalışmaları tercihen taze kültürlerden yapılmalıdır. Eski kültürlerde ribozomal proteinlerde bozulmalar meydana gelmektedir. Rutin bakteri izolatlarında % 84,1 ile % 95,2 arasında değişen oranda doğru tanımlama yapmaktadır. Maya tanımlamasında da başarı oranı % 85 ile % 100 arasında değişmektedir. Pozitif kan kültür şişelerinden, subkültüre gerek olmadan tanımlama yapılabilmektedir. İdrar örneklerinde mikrolitrede 105 ve üzeri bakteri olduğunda da direkt örnekten tanımlama yapılabilmektedir. Konvansiyonel ve moleküler tanımlama yöntemleri ile kıyaslanacak olursa MALDI-TOF MS örnek başı maliyeti ve tanımlama için geçen süre yönünden çok daha etkin görülmektedir (Yılmaz vd., 2014).

BÖLÜM 2

KAYNAK ÖZETLERİ

Yoğurt ya da fermente süt ürünleriyle ilgili literatürler aşağıda özetlenmiştir:

Pakistan’ da yoğurt benzeri bir ürün olan *dahi* ve *dahi*’ den *lassi* adlı içecek yapılmaktadır. *Dahi* yapımında termofilik ve mezofilik bakteriler rol oynamaktadır. Masud vd. (1991) Pakistan’ ın İslamabad şehrinden topladıkları 50 adet *dahi* örneğinden başlıca *L. bulgaricus* (% 86) olmak üzere, sırasıyla *S. thermophilus* (% 80), *S. lactis* (% 74), *L. helveticus* (% 34), *S. cremoris* (% 30), *L. casei* (% 20), *L. acidophilus* (%14) LAB türlerini izole etmişlerdir.

Salama vd. (1995) LAB üzerine yaptıkları ekolojik bir çalışmada *L. lactis* subspecies *lactis* ve *L. lactis* subspecies *cremoris* LAB ırklarının izolasyonu için türe özgü 212RLa ve 68RCa probalarını sırasıyla kullanmışlardır. 16S rRNA genotiplemesine dayalı koloni hibridizasyon metoduna göre çalışmanın sonunda yeşil bitkiler olan *Lamium purpureum* (Eflatun çiçekli ballıbabası), *Sonchus oleraceus* (Eşek marulu), *Rubus discolor* (Frenk üzümü), *Solanum nigrum*’ dan (Köpek üzümü) ve patates, kabak, bezelye, fasulye, kavun, mısır, brokoliden; peynir, krema, inek sütünden *L. lactis* ssp. *lactis*’ i; buna karşılık peynir ve inek sütünden *L. lactis* ssp. *cremoris*’ i izole ettiklerini bildirmişlerdir. İlginç olarak yoğurt örneğinden bu iki LAB ırkını izole etmemişlerdir.

Marteu vd. (1997) 2.2×10^7 cfu/g *B. bifidum*, 3.6×10^6 cfu/g *L. acidophilus*, yoğurtta yer alan 7.8×10^7 cfu/g *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suş LB9, 2.1×10^8 cfu/g *S. thermophilus* suş ST20’ nin mide-barsaka benzetilen dinamik bir model üzerinde gastrik ve barsak sıvısına gösterdikleri duyarlılıkları araştırmışlardır. *S. thermophilus* ST20 midede 70. dk’ dan sonra, *L. bulgaricus* LB9 mideden 110. dk’ dan sonra tamamen yok olurken; *L. acidophilus* ve *B. bifidum* 120 dk’ da sadece %40’ ın üzerinde bir azalma göstermektedir. Bu sonuç *L. acidophilus* ve *B. bifidum*’ un diğer LAB suşlarına kıyasla asite daha dirençli olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar Pereira ve Gibson’ un (2002) çalışma bulgularıyla korelasyon göstermektedir. Onlara göre de $6.42 \log$ CFU/ml sayıda *S. thermophilus* DSM 20617 pH 2’ de gastrik asitte 15. dk’ dan itibaren yok olmuşken, $8.30 \log$ CFU/ml sayıda *L. acidophilus* 120. dk’

da 7.8 log CFU/ml ile hala canlılığını korumakta idi. Marteu vd. (1997)' a göre mideden duodenuma, ileuma ve ordan kolona geçen bakterileri suşlarını sıralayacak olursak % 50' nin üzerinde *B. bifidum*, % 30' a yakın *L. acidophilus*, % 10' un altında *S. thermophilus* ve % 0' ın üzerinde *L. bulgaricus* şeklinde sıralanabilir.

Pereira ve Gibson (2002) LAB' ın asit toleransı özelliklerini araştırmışlardır. Buna göre pH: 2' de gastrik asite en yüksek toleransı (canlı hücre sayısı 0. dk' da 8.30 log CFU/ml den 120 dk' da 8.12 log CFU/ml' ye düşmüştür) alan *L. fermentum* KC5B' yi probiyotik adayı olarak göstermişlerdir.

Campo vd. (2005) ortalama yaşı 23 olan 114 gönüllü gencin (49 erkek, 65 kadın; 18 kişi yoğurt tüketmeyen kontrol grubu) taze ve pastörize yoğurt (375 g, $1,3 \times 10^7$ CFU (*L. delbrueckii*), 2×10^8 CFU' un (*S. thermophilus*) içerir) iki haftalık tüketiminden sonra feçeslerindeki yoğurt starter kültürleri olan *L. delbrueckii* ve *S. thermophilus*' un varlığını araştırmışlardır. DNA hibridizasyon yöntemine göre; taze yoğurt tüketen 48 kişiden 7' sinin (% 8,4) feçesinde *L. bulgaricus*, 3' ünde (%3.15) *S. thermophilus*; pastörize yoğurt tüketen 48 kişiden 1' inde (% 1,05) *L. bulgaricus*, 1' inde (% 1,05) *S. thermophilus* izole edilmiştir. Taze yoğurt tüketen iki gönüllüden her iki LAB izole edildi. Sonuçların pastörizasyon işlemiyle hazırlanan yoğurtlardaki starter kültürlerin canlılığını kaybettiğini ve DNA' larının oldukça yüksek oranda yıkıma uğradığını gösterdiğini bildirilmişlerdir.

L. lactis ssp. *lactis*' in sütte baskın olarak bulunan Laktokok türleri olduğu ve EPS üretme yeteneğiyle özellikle yoğurtta viskoziteyi yani akışkanlığa karşı direnci arttırdığı bildirilmektedir (Khedid vd., 2006).

Erdoğrul ve Erbilir (2006) 3 farklı yoğurttan MRS besiyeri kullanarak *L. bulgaricus*' u izole etmişlerdir.

Khedid vd. (2006) Fas' tan topladıkları 30 adet bir hörgüçlü deve sütünden en yüksek oranda *Lactobacillus* (% 37.50) türlerini (en fazla % 10 oranında *L. helveticus*), *Lactococcus* (25.80) türlerini (en fazla % 17.50 oranında *L. lactis* subsp. *lactis*), *Leuconostoc* (% 11.70) türlerini (en fazla % 4.20 oranında *L. lactis*), *Enterococcus* (% 10.80) türlerini (en fazla % 7.50 oranında *E. casseliflavus*), *S. salivarius* subsp. *thermophilus* (% 9.20) ve *Pediococcus* (% 5.00) türlerini (en fazla % 2.50 *P. acidilactici*) izole etmişlerdir.

Abdullah ve Osman (2010); Sudan’ da pastörize süte az miktar yoğurt eklenerek yapılan geleneksel fermente süt olarak bilinen *rod*’ dan LAB izolasyon ve identifikasyonu ile ilgili olarak yaptıkları araştırmada 4 tane *rod* materyalinden, 4 adet *L. fermentum* (heterofermentatif), 8 adet *L. delbrueckii* (homofermentatif), 10 adet *L. lactis* subsp. *cremoris* (homofermentatif) ve fenotipik identifikasyonla tür düzeyinde tanımlaması mümkün olmayan 3 adet *Lactobacillus* türlerinin (homofermentatif) bulunduğunu bildirmişlerdir. İlginç olarak bu türlerin tümü oda sıcaklığında gelişip, altındaki sıcaklıkta (15 °C) gelişmediğinden dolayı Sudan geleneksel fermente sütü *rod*’ un oda sıcaklığında saklandığında kolayca bozulmaya uğramadığını ve üstelik *L. lactis* subsp. *cremoris*’ in orijinal ekolojik nişi bitkiler olmasına rağmen endüstriyel süt ürünü olan *rod*’ dan izole edildiğini rapor etmişlerdir.

Gezginç ve Akyol (2010) Türkiye’ nin 19 farklı ilinden rastgele topladıkları 120 adet yoğurttan *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* izolasyonu ve hem fenotipik (gram boyama, katalaz testi, koloni morfolojisi) hem de moleküler (16S rRNA’ yı kodlayan DNA bölgesinin primerler sayesinde PCR ile çoğaltılması) tanımlaması üzerine yaptıkları çalışmada Gaziantep ilinden toplanan yoğurtlardan 9 (toplam 80 izolat) tane *S. thermophilus* (toplam 20 izolat) ve 3 tane *L. bulgaricus* suşu yoğurt yapımında aday starter kültürler olarak izole edilmiştir.

Lavanya vd. (2011) probiyotik karakterlerini belirlemek üzere fermente süttten *Lactobacillus pentosum*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. brevis* LAB türlerini izole etmişlerdir.

Aslım vd. (2011) 12 adet yoğurttan 16S rDNA dizisine göre *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve 15 adet yoğurttan *S. thermophilus* suşlarını izole etmişlerdir.

Omafuvbe ve Enyioha (2011) Nijerya’ da kasabadan temin ettikleri yoğurtlardan *L. brevis* (1 izolat), *L. casei* (4 izolat), *L. fermentum* (4 izolat), *L. acidophilus* (2 izolat), *L. plantarum* (1 izolat), *L. cellobiosus* (2 izolat), *Leuconostoc mesenteroides* (3 izolat), *E. faecalis* (2 izolat), *Lactococcus cremoris* (2 izolat), *S.thermophilus* (1 izolat) olmak üzere 22 adet LAB türü izole etmişlerdir.

Yazdi vd. (2012) yoğurt benzeri, geleneksel İran fermente ürünü olan *tarkhineh*’ in mikroflorasını belirlemek üzere yaptıkları çalışmada 3 günlük fermentasyon

sürecinde pH değerini 4.43' ten 4.19' a düştüğünü ve tümü homofermentatif olan 400 adet LAB izolatının % 67' sinin *Lactobacillus nagelii*, % 21.3' ünün *L. bifermantas*, % 6' sının *Leuconostoc cermoris*, % 1.45' inin *L. fructosus*, % 1' inin *L. fermentum*, % 0.9' unun *L. intestinalis*, % 0.9' unun *L. agilis*, % 0.9' unun *L. acidipiscis* olduğunu bildirmişlerdir.

Bitki örneklerinin yanı sıra Seifu vd. (2012) *Ititu* süt ürününden de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (% 18) ve *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (% 7)' i izole etmişlerdir.

Erkaya ve Şengül (2012) inek, manda, keçi ve koyun sütlerinden elde ettikleri yoğurtların +4 °C' de 28 günlük depolama sürecinin sonunda en yüksek *L. bulgaricus* sayısını keçi sütünden yapılan yoğurtta (8.19 log cfu/g), en yüksek *S. thermophilus* sayısını manda sütünden yapılan yoğurtta (8.49 log cfu/g) tespit etmişlerdir.

Iranmanesh vd. (2012) İran' ın Azerbaycan bölgesinden topladıkları geleneksel yoğurt örneklerinden 2 adet kok ve 16 adet basil şeklinde LAB izole etmişlerdir. Ancak identifikasyonunu yapmamışlardır.

Bizim bu çalışmamızdaki amacımız Gaziantep İlinin köylerinden toplanacak geleneksel yoğurtlardan izole edilecek laktik asit bakteri izolatlarının tanımlamasını yapmak, farklı sıcaklık, tuz ve pH ortamlarındaki karakterizasyonlarını belirlemek ve bu bakterilerin ticari yoğurt üretiminde kullanılan laktik asit bakterilerinden farklı olup olmadığını araştırmaktır.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METODLAR

3.1. Örneklerin Toplanması

Mart-Mayıs 2015 tarihleri arasında Gaziantep ilinin 9 ilçesine ait 3' er köy olmak üzere toplam 27 adet köy istasyon olarak seçilmiştir.

Yoğurt örnekleri ile ilgili olarak köylüden sütün kaynağı olan hayvanın tipi, veteriner kontrolü bilgisi, hayvanların sağlık bilgisi, antibiyotik kullanımı bilgisi sorulmuştur. Alınan yoğurt örneklerinin tümü sağlıklı hayvanlardan sağlanmış, veteriner kontrolünden geçmiş, antibiyotik kullanmayan inek, koyun, keçi veya bunların karışımından elde edilmiştir.

Soğuk zincirle muhafaza edilen örnekler en geç 72 saat içerisinde laboratuvara getirilerek çalışılmıştır. Çalışma Gaziantep Üniversitesi Fekn Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Yoğurt örneklerinin pH değeri; pH metre (Martini, Instruments, Romanya) ile ölçülmüştür. Şekil 3.1' de yoğurtların asitlik düzeyini ölçen pH metre gösterilmiştir.



Şekil 3.1. pH metre

Şehitkamil (Övündük, Güngürge, Karacaören)' den 30, Şahinbey (Yaylacık, Narlıca, Beşkuyu)' den 30, Oğuzeli (Yeniköy, Tınazdere, Dokuzyol)' nden 30, Yavuzeli (Büyükkarakuyu, Süleymanobası, Karabey)' nden 30, Nizip (Yeniyazı, Çanakçı, Mihrap)' ten 28, Araban (Eskialtıntaş, Fakılı, Dopanköy)' dan 15, Karkamış (Yaşar, Yurtbağı, Yolağzı)' tan 15, İslahiye (İdilli, Kozcağız, Kabaklar)' den 15, Nurdağı (Kozoluk, İkizkuyu, Terken)' ndan 15 adet geleneksel yoğurt örneği toplanmıştır. Örnekler bakterilerin izolasyon işlemleri tamamlanıncaya kadar + 4 °C' de 24 ile 72 saat arasında buzdolabında muhafaza edilmiştir. Köylerden alınan yoğurt örneklerinin alındığı ilçeler ve köyleri; köylerin rakımları, her köyden ve toplamda ilçelerden alınan yoğurt örneği sayısı Tablo 3.1' de detaylı olarak verilmiştir.



Tablo 3.1. Yoğurt örneklerinin alındığı ilçe, köy, rakımları (metre) ve yoğurt örneği (n) sayısı

<u>İlçe</u> <u>Köy (n=örnek sayısı)</u> <u>Rakım (metre)</u>	ŞEHİTKAMİL (n=30)		
	Övündük (n=10) 881 m	Güngürge (n=10) 895 m	Karacaören (n=10) 925 m
ŞAHİNBEY (n=30)			
Yaylacık (n=10) 1068 m	Narlıca (n=10) 975 m	Beşkuyu (n=10) 1035 m	
OĞUZELİ (n=30)			
Yeniköy (n=10) 605 m	Tınazdere (n=10) 670 m	Dokuzyol (n=10) 620 m	
YAVUZELİ (n=30)			
Büyükkarakuyu (n=10) 780 m	Süleymanobası (n=10) 794 m	Karabey (n=10) 630 m	
NİZİP (n=28)			
Yeniyazı (n=10) 580 m	Çanakçı (n=10) 615 m	Mihrap (n=8) 460 m	
ARABAN (n=15)			
Eskialtıntaş (n=5) 510 m	Fakılı (n=5) 520 m	Doğanköy (n=5) 550 m	
KARKAMIŞ (n=15)			
Yaşar (n=5) 405 m	Yurtbağı (n=5) 365 m	Yolağzı (n=5) 460 m	
İSLAHİYE (n=15)			
İdilli (n=5) 885 m	Kozcağız (n=5) 910 m	Kabaklar (n=5) 805 m	
NURDAĞI (n=15)			
Kozoluk (n=5) 1127 m	İkizkuyu (n=5) 1055 m	Terken (n=5) 1015 m	

3.2. Malzeme Sterilizasyon İşlemi

Bu amaçla cam malzemeler pastör fırınında (Nüve) 160 °C' de 2 saat; besiyerleri ve solusyonlar otoklav (Hirayama HV-50L, Japonya)da 121 °C' de 15 dk sterilize edilip, 45 °C' ye kadar soğutulup, 15-20 ml steril petri kaplarına dökülerek, hazırlanan dilüsyonlardan direkt ekim yapılmıştır.

3.3. Besiyerleri ve Kimyasallar

Yoğurt örneklerinin dilüe edilmesi amacıyla % 0.9' luk izotonik sodyum klorür (NaCl) çözeltisi (MDC, Medicol Distributing Center, Kayseri) kullanılmıştır.

Tez çalışmasında kullanılan besiyerleri;

M17 Agar (Oxoid, İngiltere)' in bileşenleri:

Tripton,

Soya pepton,

Et dijeste,

Maya ekstraktı,

Askorbik asit,

Magnezyum sülfat,

Di-sodyum- β -gliserofosfat,

Agarın bileşim miktarları Tablo 3.2' de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. M17 Agar bileşimi (g/L)

Bileşen	Bileşim (g/L)	Miktarı
Tripton	5.0	
Soya pepton	5.0	
Et dijeste	5.0	
Maya ekstraktı	2.5	
Askorbik asit	0.5	
Magnezyum sülfat	0.25	
Di-sodyum- β -gliserofosfat	19.0	
Agar	10.0	

M17 Agar besiyerinin hazırlanışı:

48.25 g besiyeri 950 ml distile suda çözünür ve 121 °C' de 15 dk otoklavla steril edilmiştir. 50 °C' ye kadar soğutulup, 50 ml % 10' luk laktoz çözeltisi eklenmiştir.

Laktoz çözeltisinin hazırlanışı:

10 g laktoz monohidrat (Molar: 360.32 g/mol, formülü: CH₁₂H₂₂O₁₁) tartılır, üzerine 100 ml distile su eklenmiştir. Hazırlanan bu besiyeri 9.0 cm çaplı steril petri kutularına dökülmüştür.

M17 Broth (Oxoid, İngiltere)' ın bileşenleri:

Tripton,

Soya pepton,

Et dijesti,

Maya ekstraktı,

Askorbik asit,

Magnezyum sülfatın,

Di-sodyum-β-gliserofosfatın bileşim miktarları Tablo 3.3' te gösterilmiştir.

Tablo 3.3. M17 Broth bileşimi (g/L)

Bileşen	Bileşim (g/L)	Miktarı
Tripton	5.0	
Soya pepton	5.0	
Et dijesti	5.0	
Maya ekstraktı	2.5	
Askorbik asit	0.5	
Magnezyum sülfat	0.25	
Di-sodyum-β-gliserofosfat	19.0	

M17 Broth besiyerinin hazırlanışı:

37.25 g besiyeri 950 ml distile suda çözünür ve 121 °C' de 15 dk otoklavla steril edilmiştir. 50 °C' ye kadar soğutulup, 50 ml % 10' luk laktoz çözeltisi eklenmiştir.

MRS Agar (Oxoid, İngiltere)' ın bileşenleri:

Pepton,

Lab-Lemco' Powder,

Maya ekstraktı,

Glukoz,

Sorbiton mono-oleat,

Di-potasyum hidrojen fosfat,

Sodyum asetat 3H₂O,

Tri-amonyum sitrat,

Magnezyum sülfat 7H₂O,

Manganez sülfat 4H₂O,

Agarın bileşim miktarları Tablo 3.4' te gösterilmiştir.

Tablo 3.4. MRS Agar bileşimi (g/L)

Bileşen	Bileşim (g/L)	Miktarı
Pepton	10.0	
Lab-Lemco' Powder	8.0	
Maya ekstraktı	4.0	
Glukoz	20	
Sorbiton mono-oleat	1 ml	
Di-potasyum hidrojen fosfat	2.0	
Sodyum asetat 3H ₂ O	5.0	
Tri-amonyum sitrat	2.0	
Magnezyum sülfat 7H ₂ O	0.2	
Manganez sülfat 4H ₂ O	0.05	
Agar	10.0	

MRS Agar besiyerinin hazırlanışı:

62 g besiyeri 1000 ml distile suda çözünüp, 121 °C' de 15 dk otoklavla steril edilmiştir. Hazırlanan bu besiyeri 9.0 cm çaplı steril petri kutularına dökülmüştür.

MRS Broth (Oxoid, İngiltere)' in bileşenleri:

Pepton,

Lab-Lemco' Powder,

Maya ekstraktı,

Glukoz,

Sorbiton mono-oleat,

Di-potasyum hidrojen fosfat,

Sodyum asetat 3H₂O,

Tri-amonyum sitrat,

Magnezyum sülfat 7H₂O,

Manganez sülfat 4H₂O' ın bileşim miktarları Tablo 3.5' te gösterilmiştir.

Tablo 3.5. MRS Broth bileşimi (g/L)

Bileşen	Bileşim (g/L)	Miktarı
Pepton	10.0	
Lab-Lemco' Powder	8.0	
Maya ekstraktı	4.0	
Glukoz	20	
Sorbiton mono-oleat	1 ml	
Di-potasyum hidrojen fosfat	2.0	
Sodyum asetat 3H ₂ O	5.0	
Tri-amonyum sitrat	2.0	
Magnezyum sülfat 7H ₂ O	0.2	
Manganez sülfat 4H ₂ O	0.05	

MRS Broth besiyerinin hazırlanışı:

52 g besiyeri 1000 ml distile suda çözünür ve 121 °C' de 15 dk otoklavla steril edilmiştir.

İzolatların katalaz testi için % 35' lik stok hidrojen peroksit (H₂O₂) (Merck, Almanya) kullanılmıştır.

İzolatlarla hazırlanan preparatların Gram boyaması amacıyla Kristal viyole (Merck, Almanya), Lugol (Merck, Almanya), Safranin (Merck, Almanya), % 96' lık etanol (Sigma, Aldrich, Almanya) kullanılmıştır.

3.4. LAB İzolasyon İşlemi

Dilüsyon için 1 g yoğurt hassas terazide (Denver Instrument) tartılarak 9 ml steril Serum fizyolojik bulunan steril tüpe aktarılmıştır. Vorteksle karıştırılarak 10⁻¹ lik dilüsyon hazırlanmış, bu solusyondan 1 ml alınmış, üzerine 9 ml Serum Fizyolojik

içeren tüplere aktarılmış; sırasıyla 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} lik dilüsyonlar hazırlanmıştır. 10^{-1} den 10^{-5} e kadar dilüsyonlar bu şekilde oluşturulmuştur. Dilüe edilen örneklerden bakterilerin izolasyonu için M17 Agar ve MRS Agar besiyerlerine ekim yapılmıştır. M17 besiyerine ekim yapılan petripler 37°C ' de, MRS besiyerine ekim yapılan petripler 30°C ' de 2-3 gece aerob ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Petripler toplandığı köyün adı ve stok numarası ile numaralandırılmıştır (Gezginç ve Akyol, 2010). Petriplerde üreyen tüm şüpheli koloniler test edilmiştir.

3.5. Stok Kültür Hazırlama

Oranlar değişmeyecek şekilde Yalanca (2009)' nın yöntemi modifiye edilerek farklı tüm izolatların stok kültürleri oluşturulmuştur. Kolonilerden öze yardımıyla alınarak 1 ml M17 Broth ve MRS (de man, Rogosa, Sharpe) Broth içeren eppendorf tüplere inoküle edilmiştir. M17 broth besiyerine inoküle edilen bakteri kültürleri 37°C ' de, MRS broth besiyerine inoküle edilen bakteri kültürleri 30°C ' de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda pellet veya tortu oluşumu gözlemlendikten sonra 5000 rpm' de 10 dk santrifüj (Selecta, İspanya) edilerek süpernatant dökülmüştür. 1 ml lik eppendorf tüp içerisine 500 µl MRS broth ya da 500 µl M17 broth, 500 µl laktik asit bakteri kültürü, 500 µl steril sıvı gliserin ilave edilmiş ve -20°C ' de stoklanmıştır.

3.6. Fenotipik İdentifikasyon

Geleneksel yoğurt örneklerinden izole edilecek kolonilerin fenotipik tanımlanması kültürel (gram boyama), ışık mikroskobu altında koloni morfolojisi (kok, basil, zincir), biyokimyasal (katalaz testi) özelliklerine göre belirlenmiştir.

3.6.1. LAB Tanımlaması

Şüpheli koloniler ilk aşamada gram boyamaya tabi tutulmuştur. Şekil 4.2' de Karkamış İlçesi, Yolağzı köyünden alınan yoğurt örneğinin M17 besiyerine ekimi yapıldıktan 48 saat sonra en büyük koloni çeşidinin tek tek birbirinden bağımsız görüntüsünün yanı sıra hemen hemen aynı büyüklükte olan diğer iki çeşit küçük koloni de açık ve koyu renge sahip olmalarıyla birbirlerinden ayrılmaktadırlar (Şekil 3.2).

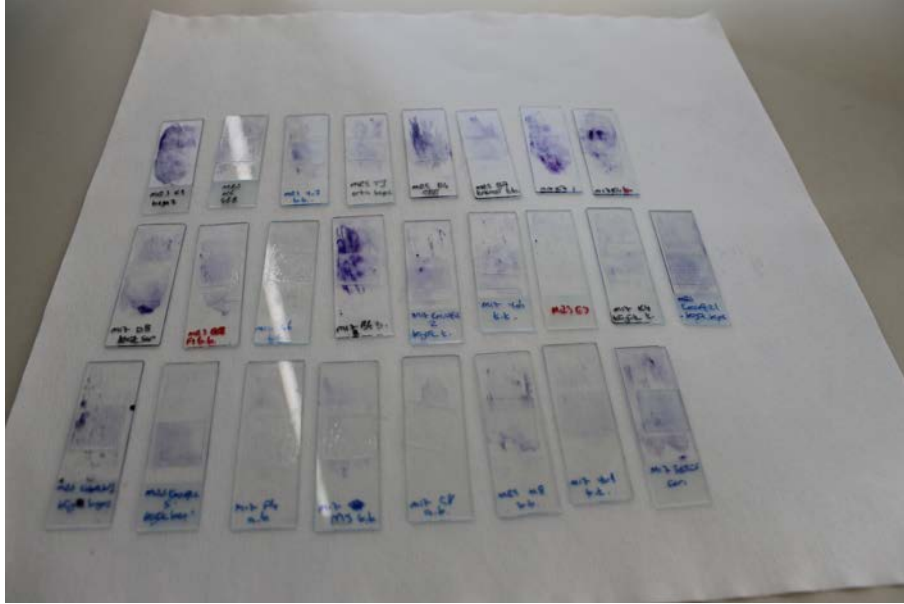


Şekil 3.2. M17 agar besiyerinde üreyen olası LAB kolonilerinin görünümü

3.6.2. Gram Boyama

Gram boyama testi; Bölükbaşı (2007)' na göre gerçekleştirilmiştir. Bunun için temiz lam üzerine distile su aktarılmıştır. Gram boyama yapılacak olan bakteri kolonisi steril öze ucu ile lam üzerine alınıp, lamdaki su yardımı ile dağıtılmış ve ince bir tabaka haline gelmesi sağlanmıştır. Lam, üzerine sürülen tabaka kuruyuncaya kadar kendi açık havada bırakılmıştır. Kuruma gerçekleşikten sonra lam, hızla iki üç kez alev üzerinden geçirilmiştir. Çalışma konusu olan LAB grubu gram pozitif bakteriler olduğundan önce 1- Kristal Viyole (1 dk süreyle) sonra 2- Yıkama adımları takip edilerek Gram Boyama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Kurutma ile kontrole hazırlanan preparata immersiyon yağı damlatılarak 100' lük objektif ile ışık mikroskobu (CE) nda koloninin aldığı renge bakılmıştır. Mavi renkli hücreler Gram (+) olarak tanımlanmıştır ve çalışmaya gram (+) olan preparatlarla devam edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Gram boyayla boyanmış preparatlar

3.6.3. Katalaz Testi

Katalaz testi; Bölükbaşı (2007)' na göre gerçekleştirilmiştir. Besiyerinde gelişmiş koloni öze yardımı ile alınıp lamel üzerine aktarılmıştır. % 30' luk H_2O_2 çözeltisinden bir iki damla koloni üzerine damlatılarak gaz çıkışı olup olmadığı gözlemlenmiştir.

Hidrojen Peroksit Çözeltisi Hazırlama:

%35' lik stok hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisinden % 30' luk çözelti hazırlama için $M1.V1=M2.V2$ formülünden hesaplama yapılarak stok çözeltiden 6 ml alınıp, son hacim 7 ml' ye ayarlanacak şekilde distile su eklenmiştir.

Gaz çıkışı olan koloniler katalaz (+) ve gaz çıkışı olmayan koloniler katalaz (-) olarak tanımlanmıştır ve çalışmaya katalaz (-) olan izolatlarla devam edilmiştir.

3.6.4. Koloni Morfolojisi

Işık mikroskopunda gram (+) olan bakteriler hareketli, hareketsiz, kok, basil ya da zincir olarak not edilmiştir.

3.6.5. MALDI-TOF MS ile Tanımlama

Her ilçeyi temsil eden stok izolatlardan birer tane alınıp MRS agar veya M17 agar besiyerlerine ekim yapıldı. MRS' de üreyenler $30^{\circ}C$ ' de, M17' de üreyenler $37^{\circ}C$ ' de bir gece inkübasyona bırakıldı. Tek koloni düşürmek ve izolatın saflığından emin

olmak amacıyla sırasıyla 30 °C' de ve 37 °C' de yine bir gece pasaj yapıldı. Sonunda gram boyama ve katalaz testi ikişer kez tekrar edildi ve gram (+) ve katalaz (-) olan izolatların tür düzeyinde tanımlanmasına geçildi.

Broker MS (Becton-Dickinson, USA) üreyen mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanıldı.

Broker cihazı MALDI-TOF olarak ifade edilen, matriks diye isimlendirilen örnekleri iyonize eden kimyasal bir yüzeye 24 saati geçmemiş taze kültürden yapılan ince yayma üzerinden, laser ışığı ile vuruşlar yapıldıktan sonra, matriks ışığı emerek ilgilenilen molekül (ör; DNA veya proteinler) haline dönüştürür. Mikroorganizmaların protein profillerinin çıkarılmasında kullanılan bu yöntemle bu profillerin referans bir spektra ile karşılaştırılması sonucu mikroorganizmalar kolaylıkla tanınabilmektedir.

Broker tanımlamada matriksin üzerine 1 damla serum fizyolojik damlatıp, kültürlerde üreyen taze (24 saatlik) örneklerden alıp ve matriksteki serum fizyolojik ile karıştırıp yayılıp havada kuruduktan sonra MS cihazında tanımlama yapıldı.

3.6.5.1. MALDI Ölçümü

Bir numunenin en basit analizi, doğrudan MALDI hedef plakasına az miktarda biyolojik materyal uygulayarak başlar. Başlangıç materyali, bir sıvı kültürün tek bir koloni veya santrifüjlü bir parçası olabilir. İnce mikrobiyal film, matriks (alfa-siyano-4-hidroksisinnamik asit; HCCA) ile örtülür. Maksimum frekansta lineer pozitif modda (cihaza bağlı olarak 20-200 Hz) bir MALDI-TOF kütle spektrometresi kullanılarak kütle spektrumu elde edilir. Ölçülen kütle spektrum aralığı 2.000 ila 20.000 Da arasındadır. Otomatik spektrum edinimi, Bruker' in lazer yoğunluğunun bulanık kontrolü ile birlikte 'autoExecute' yazılımı kullanılarak gerçekleştirilebilir (Maier vd., 2006).

3.6.5.1.1. Tekrarlanabilirlik

Yöntemin sağlamlığı, geniş bir koşullar aralığı için gösterilmiştir. Büyüme ortamının farklı kompozisyonları zirve paterni dağılımında çok az etkiye sahiptir; 4000 ila 12000 Da aralığında, kültür ortamının hemen hemen hiç etkisi gözlenmemektedir. Kolonilere yapışan kültür ortamının varlığı zirve paterni etkilemez. Ayrıca,

hücrelerin büyüme durumunun pik desen üzerinde çok az etkisi vardır. Büyümenin gecikme evresindeki hücreler, günlük, durağan veya erken ölüm evrelerindeki hücreler kadar benzer bir model sergiler.

Dahası, numune hazırlama ve ölçümü standart koşullar altında yapıldığı için, edinilen profil spektrumları, farklı MALDI-TOF enstrümanları arasında yüksek oranda karşılaştırılabilir. Aynı örnek hedefin üç farklı enstrümanda ölçülen spektrumu hemen hemen aynıdır. Bu nedenle, farklı MALDI-TOF MS enstrümanlarının spektrumları önemli ve güvenilir bir veritabanı oluşturmak için kullanılabilir.

Metodolojinin olağanüstü tekrarlanabilirliği, sürekli olarak ifade edilen, ribozomal proteinler gibi bol miktarda proteinlerin ölçülmesine dayanmaktadır. Gözlenen kütle spektrumu aralığı, az sayıda metabolitin görüldüğü 2000 ve 20000 Da arasındadır. Bakteri sporları, yaşayan hücrelere göre belirgin olarak farklı bir tepe paternine neden olur, ancak bu spor spektrumları da tekrarlanabilir.

3.6.5.1.2 BioTyper Yazılımı

BioTyper analiz yazılımı, kütle spektrumlarının işlenmesinin yanı sıra tanımlama ve sınıflandırma için tüm işlevleri içerir. İşleme parametreleri, sonuç ve özel bir zirve listesi kullanıcı tarafından tanımlanabilir.

Bilinmeyen mikroorganizmaların tanımlanması için model eşleme, çeşitli türlerin karakteristik spektrum bilgisini içeren bir kütüphane ile oluşturulan tepe listelerinin karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilir. Kütüphane spektrumları, bilinen bakteri türlerinin ve suşların hafifçe farklı koşullardaki birkaç ölçümüyle üretilir ve daha sonra spesifik en yüksek bilgiyi çıkarır. 20 spektrumun ölçülmesi ile iyi bir ortalama elde edilir. Yazılım otomatik olarak tüm spektrum setinden zirve listeleri üretir ve bir türe ait belli sayıda spektrumda bulunan tipik zirveleri çıkarır.

Bilinmeyen mikroorganizmalar, kendi zirve listelerinin veri tabanına kıyasla tanımlanır. Tanımlanmış kütlelere dayanan eşleşen bir puan ve bunların yoğunluk korelasyonu üretilir ve sonuçların sıralanması için kullanılır. Veritabanı aramalarının güvenini arttırmak için, BioTyper sofistike bir yeniden kalibre algoritması yoluyla tepe kütle sapmalarını düzeltebilir. Doruk toplama işleminden sonra, başlangıçta kabul edilmiş bir hata penceresi ve arzu edilen bir ayar sonucu belirlemek

mümkündür. Yazılım, kalibrasyonu yeni bir tepe listesinden ayarlanabilir limitler içindeki bilinen tepe listesine uyarlayabilir. Böylece, 5.000 ppm' lik kütle sapması olan spektrumlar bile başarıyla tanımlanabilir. Bu işlevsellik, BioTyper tanımlamasını son derece sağlam ve doğru yapar.

3.6.5.1.3 Uygulamalar

Biotyper, çeşitli alanlarda (örneğin, çevresel araştırmalar, gıda, su kontrolü ve tıbbi teşhis) mikroorganizma için geleneksel laboratuvar tanımlama yöntemlerine mükemmel bir alternatif sunmaktadır. Bu yöntem hız, sağlamlık, minimum numune hazırlama maliyeti, rutin ve yüksek verimli kullanım için olağanüstü bir şekilde uygundur.

Bu yaklaşım, taksonomik ilişkilerin analizi için de yararlıdır. MALDI-TOF MS profil analizi, klasik yöntemlere kıyasla 16S ribozomal DNA dizilimine benzer aile ağaçlarıyla sonuç verir. Ribozomal proteinler oldukça bol ve çok kararlı özellikte olduğundan, gözlemlenen protein modeli, çevrilmiş DNA dizisine doğrudan bakış açısı sağlar. Dolayısıyla, molekül kütlelerinin belirlenmesini içeren yöntemin, kabaca çok lokuslu sıralama olarak bir değeri olduğu kabul edilebilir.

Karmaşık mikroorganizma topluluklarının yer aldığı çalışma alanlarında MALDI-TOF-MS' in kullanılabilir olması yeni bilimsel yeteneklere (örneğin, çevresel araştırmalarda ve biyolojik çeşitliliğin araştırmalarında) imkan sunar. Binlerce mikroorganizma BioTyper ile kolayca analiz edilebilir ve daha sonra analiz için temel oluşturur. Mikroorganizma referans spektrumlarının başlangıç seti bunları birbirleri ile karşılaştırmak için kullanılabilir ve fazlalıklar ortadan kaldırılabilir. Daha sonra izolatlar ilk referans veri kümesiyle karşılaştırılabilir, kütüphaneye atılır veya eklenir; böylece mikroorganizma çeşitliliğine genel bir bakış oluşturulur.

3.7. Karakterizasyon

Probiyotiklerin asit ortamına toleransı mide barsak sisteminde canlılıklarını koruyarak gelişimlerini devam ettirmeleri için gereklidir. Farklı sıcaklıklardaki gelişimleri de yoğurdun buzdolabında +4 °C' te, oda sıcaklığında 20-25 °C' de ya da aşırı sıcaklarda saklanması uygun olup olmadığı ve tuz dayanıklılığı izole LAB türlerinin ekolojisi hakkında fikir verecektir.

Yoğurt örneklerinden izole edilmiş olan LAB türlerinin +4 °C, +25 °C, +45 °C sıcaklıklarda; pH 2, pH 5, pH 7' deki ve % 3, % 6, % 10 tuz içeren besiyerindeki gelişimleri belirlenmiştir. Besiyerlerinin pH değerleri 1N sodyum hidroksit (NaOH) ve 1N hidroklorik asit (HCl) ile ayarlanmıştır.

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Veriler; tanımlanan laktik asit bakterileri arasından oranlama yapılmak suretiyle % olarak değerlendirilmeye tabi tutulmuştur (Azadnia ve Khan Nazer, 2009; Khedid vd., 2009; Omafuvbe ve Enyioha, 2011).



BÖLÜM 4

BULGULAR

Gaziantep İline bağlı ilçeler olan Şehitkamil (Övündük, Güngürge, Karacaören)' den 30, Şahinbey (Yaylacık, Narlıca, Beşkuyu)' den 30, Oğuzeli (Yeniköy, Tınazdere, Dokuzyol)' nden 30, Yavuzeli (Büyükkarakuyu, Süleymanobası, Karabey)' nden 30, Nizip (Yeniyazı, Çanakçı, Mihrap)' ten 28, Araban (Eskialtıntaş, Fakılı, Dopanköy)' dan 15, Karkamış (Yaşar, Yurtbağı, Yolağzı)' tan 15, İslahiye (İdilli, Kozcağız, Kabaklar)' den 15, Nurdağı (Kozoluk, İkizkuyu, Terken)' ndan 15 adet geleneksel yoğurt örneği olmak üzere toplam 208 yoğurt örneği toplanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Örneklerin Alındığı Lokasyonlar

Yoğurtların pH sı 3.9-6.0 arasında değişmekteydi.

Bakterilerin tümü hareket etmeyen bakteri grubundandı.

Yoğurtlardan LAB izolasyonu sonucu MRS besiyerindeki toplam bakteri sayısı $0-2.3 \times 10^{10}$ log CFU/g arasında, M17 besiyerindeki toplam bakteri sayısı $3.7 \times 10^8-3.1 \times 10^{10}$ log CFU/g arasında idi.

Tüm izolatların % 69' u kok iken, % 31' i basil idi. M17 ve MRS besiyerlerinin ikisinden de hem kok hem de basil şekili bakteriler izole edildi.

İzole edilen 731 çeşit izolatın 503' ü kok (M17 besiyerinden izole edilen 360 adet kok, MRS besiyerinden izole edilen 143 adet kok); 228' i basil (M17 besiyerinden izole edilen 100 adet basil, MRS besiyerinden izole edilen 128 adet basil) idi.

4.1. Şehitkamil İlçesi' nin İzolatları

Şehitkamil İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin pH aralığı 4.0-6.0; mikroorganizma sayı aralığı $3.5 \times 10^8-1.6 \times 10^{10}$ dır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Şehitkamil İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin mikroorganizma sayısı, pH' sı, izolat sayısı.

İzolatın Kaynağı	Ortalama log CFU/g		Yoğurtların pH aralığı, ortalama pH	İzolat sayısı	
	MRS	M17		MRS	M17
Ö1,Ö2,...., Ö10 (n=10)	3.5×10^8	3.7×10^8	(4.0-4.6), 4.34	350	377
G1,G2,...., G10 (n=10)	1.5×10^9	7.8×10^8	(4.1-4.8), 4.30	1554	781
K1, K2,...., K10 (n=10)	1.6×10^{10}	1.1×10^{10}	(4.0-6.0), 4.54	1590	1154

Ö: Övündük Köyü: MRS pleytlerin 6 tanesinde üreme yok.

G: Güngürge Köyü: M17 pleytlerin 1 tanesinde üreme yok.

K: Karacaören Köyü

Şehitkamil İlçesi' nden M17 besiyerinde **3** çeşit izolat (sarı, beyaz, küçük beyaz), MRS besiyerinde **7** çeşit izolat (büyük beyaz, orta beyaz, küçük beyaz, açık beyaz, beyaz, bembeyaz, sarı) elde edilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Şehitkamil İlçe izolatların morfoloji çeşidi ve sayısı. (M17: 69 izolat (69 kok), MRS: 25 izolat (4 basil, 21 kok)=94 izolat)

İzolatin Kaynağı	İzolot Çeşitleri	
	M17	MRS
Övündük Köyü (n=10)	179 sarı, 83 beyaz, 115 küçük beyaz	303 orta beyaz, 3 beyaz, 44 büyük beyaz
Güngürge Köyü (n=10)	523 sarı, 193 beyaz, 65 küçük beyaz	48 açık beyaz, 6 beyaz, 1500 küçük beyaz
Karacaören Köyü (n=10)	775 sarı, 183 beyaz, 196 küçük beyaz	2 sarı, 8 bembeyaz, 80 büyük beyaz, 600 küçük beyaz, 600 orta beyaz, 300 beyaz

Şehitkamil İlçesinden elde edilen izolatların % 96' sı kok iken, % 4' ü basil idi.

4.2. Şahinbey İlçesi' nin İzolatları

Şahinbey İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin pH aralığı 4.0-5.9; mikroorganizma sayı aralığı $0-2.2 \times 10^{10}$ dır (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Şahinbey İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin mikroorganizma sayısı, pH' sı, izolat sayısı.

İzolatin Kaynağı	Ortalama log CFU/g		Yoğurtların pH aralığı, ortalama pH	İzolot sayısı	
	MRS	M17		MRS	M17
Y1,Y2,...., Y10 (n=10)	1.3×10^8	1.1×10^{10}	(4.1-4.6), 4.39	13	1169
N1,N2,...., N10 (n=10)	2.3×10^9	1.9×10^{10}	(4.1-4.5), 4.30	238	1881
B1, B2,...., B10 (n=10)	< ¹⁰	2.2×10^{10}	(4.0-5.9), 4.91	9	2216

Y: Yaylacık Köyü: MRS pleytlerin 4 tanesinde üreme yok.

N: Narlıca Köyü: MRS pleytlerin 4 tanesinde üreme yok.

B: Beşkuyu Köyü: MRS pleytlerin 5 tanesinde üreme yok.

Şahinbey İlçesi' nden M17 besiyerinde 6 çeşit izolat (sarı, beyaz, küçük beyaz, orta beyaz, bembeyaz, büyük beyaz), MRS besiyerinde 8 çeşit izolat (en büyük beyaz, büyük beyaz, beyaz, küçük beyaz, çok büyük beyaz, orta beyaz, çok küçük beyaz, sarı) elde edilmiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Şahinbey İlçe izolatların morfoloji çeşidi ve sayısı görülmektedir. (M17: 79 izolat (79 kok), MRS: 16 izolat (3 basil, 13 kok)=95 izolat)

İzolatin Kaynağı	İzolot Çeşitleri	
	M17	MRS
Yaylacık Köyü (n=10)	407 sarı, 10 büyük beyaz, 32 beyaz, 428 küçük beyaz, 302 orta beyaz	6 büyük beyaz, 6 beyaz, 1 küçük beyaz
Narlıca Köyü (n=10)	1130 sarı, 408 beyaz, 319 küçük beyaz, 24 bembeyaz	2 çok büyük beyaz, 130 orta beyaz, 4 büyük beyaz, 2 küçük beyaz, 100 çok küçük beyaz
Beşkuyu Köyü (n=10)	969 sarı, 676 beyaz, 571 küçük beyaz	1 sarı, 1 en büyük beyaz, 3 büyük beyaz, 3 orta beyaz, 1 küçük beyaz

Şahinbey İlçesinden elde edilen izolatların % 97' si kok iken, % 3' ü basil idi.

4.3. Oğuzeli İlçesi' nin İzolatları

Oğuzeli İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin pH aralığı 4.1-4.9; mikroorganizma sayı aralığı 1.2×10^9 - 2.1×10^{10} dır (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Oğuzeli İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin mikroorganizma sayısı, pH' sı, izolat sayısı.

İzolatin Kaynağı	Ortalama log CFU/g		Yoğurtların pH aralığı, ortalama pH	İzolot sayısı	
	MRS	M17		MRS	M17
Y1,Y2,...., Y10 (n=10)	1.2×10^9	1.3×10^{10}	(4.1-4.9), 4.42	126	1371
T1,T2,...., T10 (n=10)	1.3×10^9	2.1×10^{10}	(4.1-4.5), 4.22	132	2169
D1, D2,...., D10 (n=10)	1.1×10^{10}	9.8×10^9	(4.3-4.8), 4.41	1112	983

Y: Yeniköy Köyü:

T: Tınazdere Köyü:

D: Dokuzyol Köyü: MRS pleytlerin 3 tanesinde üreme yok.

Oğuzeli İlçesi' nden M17 besiyerinde **10** çeşit izolat (sarı, çok büyük beyaz, bembeyaz, orta kremi, küçük beyaz, orta beyaz, kremi beyaz, orta beyaz kremi, küçük sarı, sarımsı), MRS besiyerinde **4** çeşit izolat (büyük beyaz, küçük beyaz, kremi beyaz, bembeyaz) elde edilmiştir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Oğuzeli İlçe izolatların morfoloji çeşidi ve sayısı. (M17: 76 izolat (26 basil, 50 kok), MRS: 39 izolat (21 basil, 18 kok)=115 izolat)

İzolatin Kaynağı	İzolot Çeşitleri	
	M17	MRS
Yeniköy Köyü (n=10)	156 çok büyük beyaz, 10 sarı, 9 bembeyaz, 1 orta beyaz, 1 orta kremi, 1194 küçük beyaz	120 büyük beyaz, 3 küçük beyaz, 3 bembeyaz
Tınazdere Köyü (n=10)	1409 çok büyük beyaz, 3 sarı, 5 orta beyaz, 752 küçük beyaz	121 büyük beyaz, 3 küçük beyaz, 3 bembeyaz, 5 kremi beyaz
Dokuzyol Köyü (n=10)	392 çok büyük beyaz, 507 küçük beyaz, 2 bembeyaz, 1 kremi beyaz, 1 orta beyaz kremi, 1 orta beyaz, 78 küçük sarı, 1 sarımsı	103 büyük beyaz, 8 bembeyaz, 1 kremi beyaz

Oğuzeli İlçesinden elde edilen izolatların % 60' ı kok iken, % 40' ı basil idi.

4.4. Yavuzeli İlçesi' nin İzolatları

Yavuzeli İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin pH aralığı 4.3-4.7; mikroorganizma sayı aralığı $0-3.1 \times 10^{10}$ dur (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Yavuzeli İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin mikroorganizma sayısı, pH' ısı, izolat sayısı.

İzolatin Kaynağı	Ortalama log CFU/g		Yoğurtların pH aralığı, ortalama pH	İzolasyon sayısı	
	MRS	M17		MRS	M17
B1,B2,..., B10 (n=10)	3.8x10 ⁸	3x10 ¹⁰	(4.3-4.7), 4.47	38	3000
S1,S2,..., S10 (n=10)	1.8x10 ⁸	3x10 ¹⁰	(4.3-4.7), 4.45	18	3000
K1, K2,..., K10 (n=10)	<10	3.1x10 ¹⁰	(4.3-4.6), 4.44	1	3118

B: Büyükkarakuyu Köyü: MRS pleytlerin 1 tanesinde üreme yok.

S: Süleymanobası Köyü: MRS pleytlerin 2 tanesinde üreme yok.

K: Karabey Köyü: MRS pleytlerin 9 tanesinde üreme yok.

Yavuzeli İlçesi' nden M17 besiyerinde **3** çeşit izolat (sarımsı küçük beyaz, büyük koloni, küçük koloni), MRS besiyerinde **2** çeşit izolat (çok büyük beyaz, kremi küçük beyaz) elde edilmiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Yavuzeli İlçe izolatların morfoloji çeşidi ve sayısı. (M17: 40 izolat (10 basil, 30 kok), MRS: 57 izolat (24 basil, 33 kok)=97 izolat)

İzolatin Kaynağı	İzolasyon Çeşitleri	
	M17	MRS
Büyükkarakuyu Köyü (n=10)	3000 sarımsı küçük beyaz	7 çok büyük beyaz, 31 kremi küçük beyaz
Süleymanobası Köyü (n=10)	3000 sarımsı küçük beyaz	17 çok büyük beyaz, 1 kremi küçük beyaz
Karabey Köyü (n=10)	118 büyük koloni, 3000 küçük koloni	1 kremi küçük beyaz

Yavuzeli İlçesinden elde edilen izolatların % 65' i kok iken, % 35' i basil idi.

4.5. Nizip İlçesi' nin İzolatları

Nizip İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin pH aralığı 4.3-5.2; mikroorganizma sayısı aralığı 0-6.8x10¹⁰, dur (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Nizip İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin mikroorganizma sayısı, pH' ısı, izolat sayısı.

İzolatuın Kaynağı	Ortalama log CFU/g		Yoğurtların pH aralığı, ortalama pH	İzolatu sayısı	
	MRS	M17		MRS	M17
Y1,Y2,..., Y10 (n=10)	3.9x10 ⁹	6.1x10 ¹⁰	(4.5-5.2), 4.65	396	6157
Ç1,Ç2,..., Ç10 (n=10)	<10	6.8x10 ¹⁰	(4.3-4.9), 4.52	4	6826
M1, M2,..., M8 (n=8)	2.4x10 ⁹	4.9x10 ¹⁰	(4.3-4.8), 4.45	249	4949

Y: Yeni yazı Köyü: MRS pleytlerin 3 tanesinde üreme yok.

Ç: Çanakçı Köyü: MRS pleytlerin 6 tanesinde üreme yok.

M: Mihrap Köyü

Nizip İlçesi' nden M17 besiyerinde 3 çeşit izolat (büyük beyaz, küçük beyaz, açık beyaz), MRS besiyerinde 4 çeşit izolat (çok büyük beyaz, büyük beyaz, küçük beyaz, orta beyaz) elde edilmiştir (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. Nizip İlçe izolatların morfoloji çeşidi ve sayısı. (M17: 58 izolat (28 basil, 30 kok), MRS: 23 izolat (17 basil, 6 kok)=81 izolat)

İzolatuın Kaynağı	İzolatu Çeşitleri	
	M17	MRS
Yeni yazı Köyü (n=10)	757 büyük beyaz, 3000 küçük beyaz, 2400 açık beyaz	253 büyük beyaz, 143 küçük beyaz
Çanakçı Köyü (n=10)	826 büyük beyaz, 3000 küçük beyaz, 3000 açık beyaz	4 büyük beyaz
Mihrap Köyü (n=8)	743 büyük beyaz, 2400 küçük beyaz, 1806 açık beyaz	1 çok büyük beyaz, 215 büyük beyaz, 3 orta beyaz, 30 küçük beyaz

Nizip İlçesinden elde edilen izolatların % 45' i kok iken, % 55' i basil idi.

4.6. Araban İlçesi' nin İzolatları:

Araban İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin pH aralığı 3.9-4.9; mikroorganizma sayı aralığı 3.1×10^8 - 3.1×10^{10} dur (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. Araban İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin mikroorganizma sayısı, pH' ısı, izolat sayısı.

İzolatin Kaynağı	Ortalama log CFU/g		Yoğurtların pH aralığı, ortalama pH	İzolot sayısı	
	MRS	M17		MRS	M17
E1,E2,...., E5(n=5)	4.0×10^8	3.1×10^{10}	(3.9-4.9), 4.24	40	3103
F1,F2,...., F5(n=5)	3.1×10^8	3.0×10^{10}	(4.2-4.8), 4.44	31	3094
D1, D2,...., D5(n=5)	3.1×10^8	3.0×10^{10}	(4.3-4.9), 4.60	31	3092

E: Eskialtıntaş Köyü

F: Fakılı Köyü

D: Doğanköy Köyü

Araban İlçesi' nden M17 besiyerinde 5 çeşit izolat (çok büyük beyaz, sarı, küçük beyaz, açık beyaz, küçük sarı), MRS besiyerinde 2 çeşit izolat (büyük beyaz, küçük beyaz) elde edilmiştir (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. Araban İlçe izolatların morfoloji çeşidi ve sayısı. (M17: 58 izolat (15 basil, 43 kok), MRS: 28 izolat (15 basil, 13 kok)=86 izolat)

İzolatin Kaynağı	İzolot Çeşitleri	
	M17	MRS
EskialtıntaşKöyü (n=5)	92 çok büyük beyaz, 1500 sarı, 1500 küçük beyaz, 11 açık beyaz	24b büyük beyaz, 16 küçük beyaz
Fakılı Köyü (n=5)	73 çok büyük beyaz, 1500 sarı, 1500 küçük beyaz, 21 açık beyaz, 3 küçük sarı	22 büyük beyaz, 9 küçük beyaz
DoğanköyKöyü (n=5)	82 çok büyük beyaz, 1500 sarı, 1500 küçük beyaz, 10 açık beyaz	17 büyük beyaz, 14 küçük beyaz

Araban İlçesinden elde edilen izolatların % 65' i kok iken, % 35' i basil idi.

4.7. Karkamış İlçesi' nin İzolatları

Karkamış İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin pH aralığı 4.3-5.0; mikroorganizma sayı aralığı 4.3×10^9 - 3.0×10^{10} dur (Tablo 4.13).

Tablo 4.13. Karkamış İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin mikroorganizma sayısı, pH' sı, izolat sayısı.

İzolatin Kaynağı	Ortalama log CFU/g		Yoğurtların pH aralığı, ortalama pH	İzolot sayısı	
	MRS	M17		MRS	M17
Ya1, Ya2, ..., Ya5(n=5)	1.0×10^{10}	2.3×10^{10}	(4.4-5.0), 4.74	1045	2310
Yu1, Yu2, ..., Yu5(n=5)	2.3×10^{10}	3.0×10^{10}	(4.3-4.4), 4.34	2303	3034
Yo1, Yo2, ..., Yo5(n=5)	4.3×10^9	1.9×10^{10}	(4.7-4.9), 4.78	436	1920

Ya: Yaşar Köyü:

Yu: Yurtbağı Köyü:

Yo: Yolağzı Köyü:

Karkamış İlçesi' nden M17 besiyerinde 3 çeşit izolat (büyük koloni, küçük koloni, açık koloni), MRS besiyerinde 3 çeşit izolat (büyük koloni, küçük koloni, açık beyaz) elde edilmiştir.

Tablo 4.14. Karkamış İlçe izolatların morfoloji çeşidi ve sayısı (M17: 43 izolat (15 basil, 28 kok), MRS: 31 izolat (15 basil, 16 kok)=74 izolat)

İzolatin Kaynağı	İzolot Çeşitleri	
	M17	MRS
Yaşar Köyü (n=5)	748 büyük koloni, 1500 küçük koloni, 62 açık koloni	933 büyük koloni, 112 küçük koloni
Yurtbağı Köyü (n=5)	1500 büyük koloni, 1500 küçük koloni, 34 açık koloni	1312 büyük koloni, 990 küçük koloni, 1 açık beyaz
Yolağzı Köyü (n=5)	398 büyük koloni, 1500 küçük koloni, 22 açık koloni	379 büyük koloni, 57 küçük koloni

Karkamış İlçesinden elde edilen izolatların % 60' ı kok iken, % 40' ı basil idi.

4.8. İslahiye İlçesi' nin İzolatları

İslahiye İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin pH aralığı 4.8-5.2; mikroorganizma sayısı aralığı 5.5×10^8 - 1.5×10^{10} dur (Tablo 4.15).

Tablo 4.15. İslahiye İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin mikroorganizma sayısı, pH' sı, izolat sayısı.

İzolattın Kaynağı	Ortalama log CFU/g		Yoğurtların pH aralığı, ortalama pH	İzolatt sayısı	
	MRS	M17		MRS	M17
İd1,İd2,..., İd5(n=5)	$5,5 \times 10^8$	$1,1 \times 10^{10}$	(5.0-5.2), 5.14	55	1178
Ko1,Ko2,..., Ko5(n=5)	$6,9 \times 10^8$	$1,3 \times 10^{10}$	(4.8-5.0), 4.90	69	1360
Ka1, Ka2,..., Ka5(n=5)	$1,4 \times 10^9$	$1,5 \times 10^{10}$	(4.8-5.0), 4.86	143	1500

İd: İdilli Köyü

Ko: Kozcağız Köyü

Ka: Kabaklar Köyü

İslahiye İlçesi' nden M17 besiyerinde **5** çeşit izolat (büyük koloni, küçük koloni, küçük beyaz koloni, bembeyaz koloni, sarı), MRS besiyerinde **3** çeşit izolat (büyük beyaz, kremsi beyaz (maya), açık beyaz) elde edilmiştir.

Tablo 4.16. İslahiye İlçe izolatların morfoloji çeşidi ve sayısı (M17: 22 izolat (6 basil, 16 kok), MRS: 24 izolat (15 basil, 9 kok)=46 izolat)

İzolatin Kaynağı	İzolot Çeşitleri	
	M17	MRS
İdilli Köyü (n=5)	42 büyük koloni, 600 küçük koloni, 535 küçük beyaz koloni, 1 sarı	50 büyük beyaz, 5 kremi beyaz
Kozcağız Köyü (n=5)	23 büyük koloni, 900 küçük koloni, 425 küçük beyaz koloni, 12 bembeyaz koloni	69 büyük beyaz
Kabaklar Köyü (n=5)	1500 küçük koloni	65 büyük beyaz, 9 kremi beyaz, 69 açık beyaz

İslahiye İlçesinden elde edilen izolatların % 55' i kok iken, % 45' i basil idi.

4.9. Nurdağı İlçesi' nin İzolatları:

İslahiye İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin pH aralığı 4.4-4.8; mikroorganizma sayı aralığı 5×10^8 - 15×10^{10} dur (Tablo 4.17).

Tablo 4.17. Nurdağı İlçesine bağlı köylerden alınan yoğurt örneklerinin mikroorganizma sayısı, pH' sı, izolat sayısı.

İzolatin Kaynağı	Ortalama log CFU/g		Yoğurtların pH aralığı, ortalama pH	İzolot sayısı	
	MRS	M17		MRS	M17
Ku1,Ku2,...., Ku5(n=5)	9.4×10^8	1.5×10^{10}	(4.7-4.8), 4.72	94	1500
İK1,İK2,...., İk5(n=5)	5×10^8	15×10^{10}	(4.5-4.8), 4.58	50	1500
Te1, Te2,...., Te5(n=5)	6.1×10^8	1.5×10^{10}	(4.4-4.8), 4.58	61	1500

Ku: Kozuluk Köyü

İK: İkizkuyu Köyü

Te: Terken Köyü

Nurdağı İlçesi' nden M17 besiyerinde 1 çeşit izolat (küçük koloni), MRS besiyerinde 3 çeşit izolat (büyük beyaz, kremi beyaz, küçük beyaz) elde edilmiştir (Tablo 4.18).

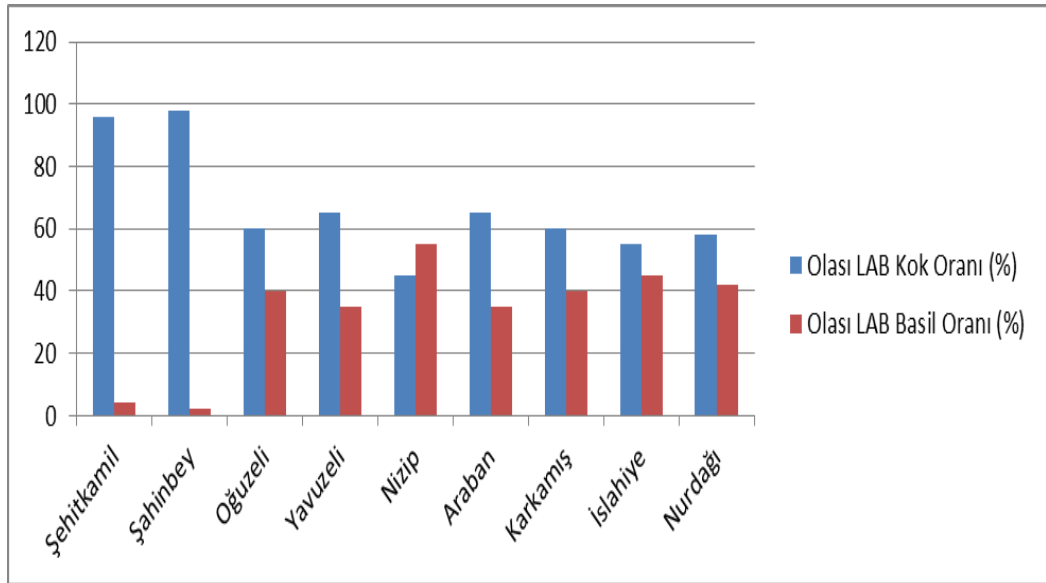
Tablo 4.18. Nurdağı İlçe izolatların morfoloji çeşidi ve sayısı (M17: 15 izolat (15 kok), MRS: 20 izolat (15 basil, 5 kok)=35 izolat)

İzolatin Kaynağı	İzolot Çeşitleri	
	M17	MRS
Kozoluk Köyü (n=5)	1500 küçük koloni	90 büyük beyaz, 3 küçük beyaz, 1 kremsi beyaz
İkizkuyu Köyü (n=5)	1500 küçük koloni	50 büyük beyaz
Terken Köyü (n=5)	1500 küçük koloni	54 büyük beyaz, 7 kremsi beyaz,

Nurdağı İlçesinden elde edilen izolatların % 58' i kok iken, % 42' si basil idi.

Mikroskop incelemesinde MRS besiyerinden izole edilen 35 adet kremsi beyaz kolonilerin maya olduğu tespit edilmiş (Şehitkamil (13 maya), Şahinbey (7 maya), İslahiye (5 maya), Nurdağı ve Oğuzeli (3 er maya), Nizip ve Araban (2 şer maya) ve tez çalışmasının kapsamı LAB grubu olduğundan mayalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

Nizip dışındaki tüm ilçelerin kok izolatlarının basil izolatlarından daha yüksek miktarda olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Şahinbey ve Şehitkamil ilçelerinde çok düşük oranda basil izolatlara rastlanmıştır. (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Gaziantep İli' nin 9 ilçesine ait izolatların kok ve basil olası % LAB oranları

4.10. Yoğurtların pH Değerleri

Çalışmanın sonuçlarına göre 208 yoğurt örneğinin pH değerleri 3.9-6.0 arasında değişmekteydi. Yoğurtların pH ortalaması 4.35-4.97 arasında idi. Şehitkamil ilçesi 6.00 ile en yüksek yoğurt pH değerine sahipken, Araban ilçesi 3.90 ile en düşük yoğurt pH değerine sahiptir. İslahiye ilçesi 4.97 ile en yüksek yoğurt ortalama pH değerine sahipken, Oğuzeli ilçesi 4.35 ile en düşük yoğurt ortalama pH değerine sahiptir (Tablo 4.19).

Table 4.19. Gaziantep' in ilçelerinden toplanan yoğurtların pH değerleri

İlçeler	pH değerleri		Ortalama pH
	En küçük pH	En büyük pH	
Şahinbey (n=30)	4.00	5.90	4.40
Şehitkamil (n=30)	4.00	6.00	4.53
Oğuzeli (n=30)	4.10	4.90	4.35
Karkamış (n=15)	4.30	5.00	4.62
İslahiye (n=15)	4.90	5.00	4.97
Nurdağı (n=15)	4.40	4.80	4.63
Nizip (n=28)	4.30	5.20	4.55
Araban (n=15)	3.90	4.90	4.43
Yavuzeli (n=30)	4.30	4.70	4.43

(n= örnek sayısı)

4.11. LAB' ın Tanımlaması

Analiz edilen 731 çeşit izolatın 503 tanesi (M17' de tanımlanan 360 kok ve MRS' de tanımlanan 143 kok) kok idi. 228 tanesi (M17' de tanımlanan 100 basil ve MRS' de tanımlanan 128 basil) basil idi. İzolatların % 69' u kok ve % 31' i basil idi. Tümü hareketsizdi. 503 kok izolatından 86 (% 17) tanesi *Enterococcus* genusuna aitti: 45 (% 9) tanesi *Enterococcus hirae*, 36 (% 7) tanesi *Enterococcus faecium*, 5 (% 1) tanesi *Enterococcus durans*. 228 basil izolatından 54 (% 24) tanesi *Lactobacillus* genusuna aitti: *Lactobacillus casei* ya da *Lactobacillus paracasei*. Geriye kalan kok ve basiller tanımlanmaya çalışıldı ancak; güvenli veriler elde edilemedi. *E. faecium*' un Şahinbey, Şehitkamil ve Oğuzeli' nden izole edildiği; *E. hirae*' nin Nizip, Araban, Yavuzeli dışındaki ilçelerden izole edildiği, *E. durans*' ın sadece İslahiye' den izole edildiği; *L. casei* ya da *L. paracasei*' nin ise Nurdağı dışındaki tüm ilçelerden izole edildiği anlaşılmıştır (Tablo 4.20).

Table 4.20. Farklı LAB türlerinin dağılımı

İçeler	<i>E. faecium</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. durans</i>	<i>L. casei, L. paracasei</i> ?
Şahinbey	7 izolat	2 izolat	-	1 izolat
Şehitkamil	18 izolat	3 izolat	-	1 izolat
Oğuzeli	11 izolat	8 izolat	-	5 izolat
Karkamış	-	20 izolat	-	11 izolat
İslahiye	-	7 izolat	5 izolat	3 izolat
Nurdağı	-	5 izolat	-	-
Nizip	-	-	-	18 izolat
Araban	-	-	-	9 izolat
Yavuzeli	-	-	-	6 izolat
Toplam	36 izolat (% 7)	45 izolat (% 9)	5 izolat (% 1)	54 izolat (% 24)
	86 kok izolatı			54 basil izolatı

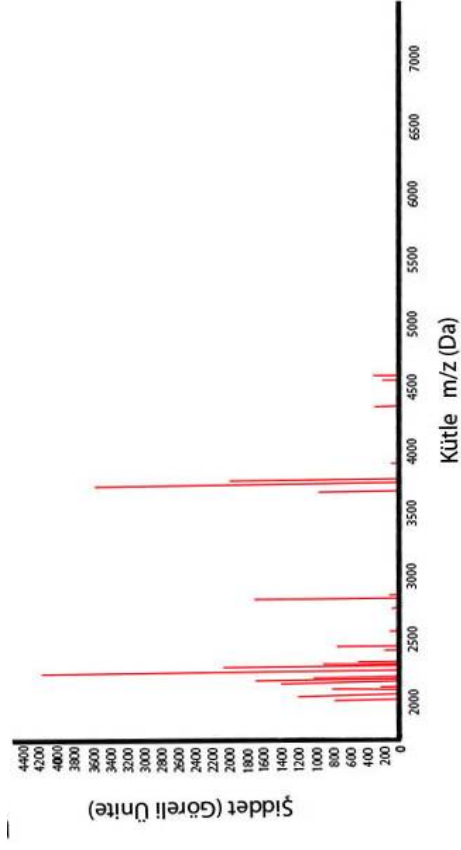
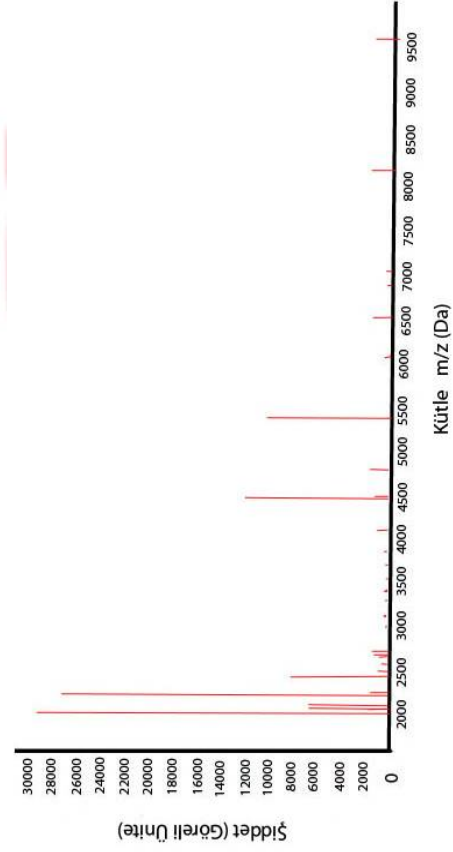
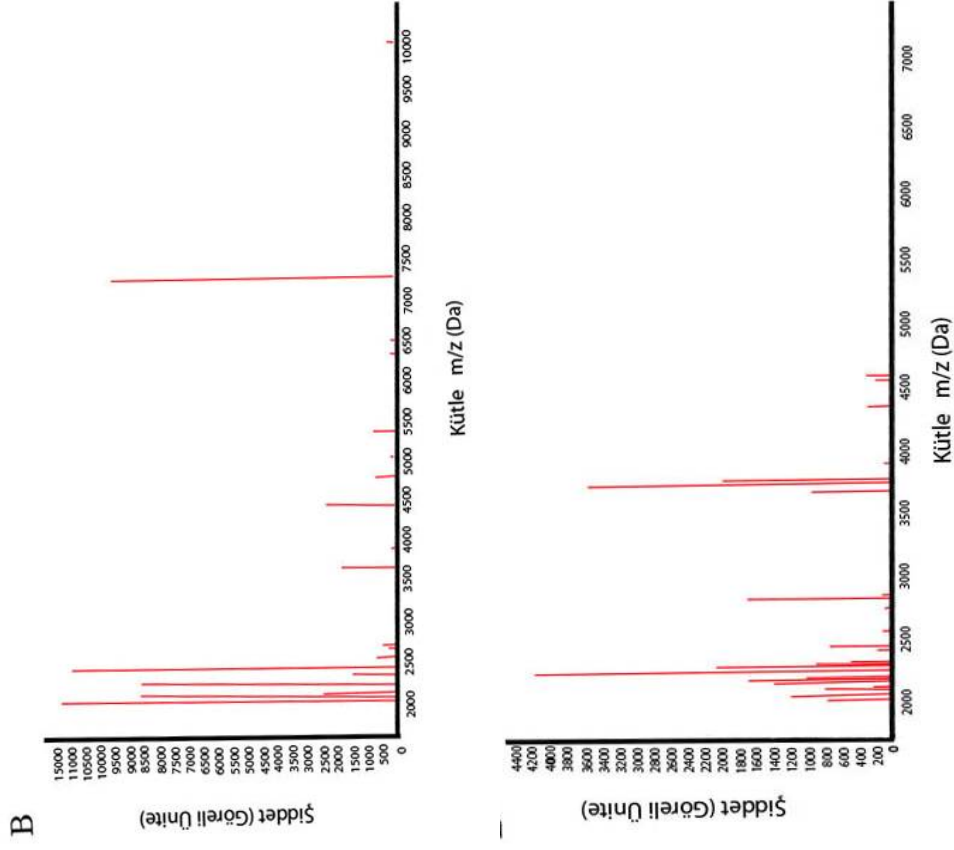
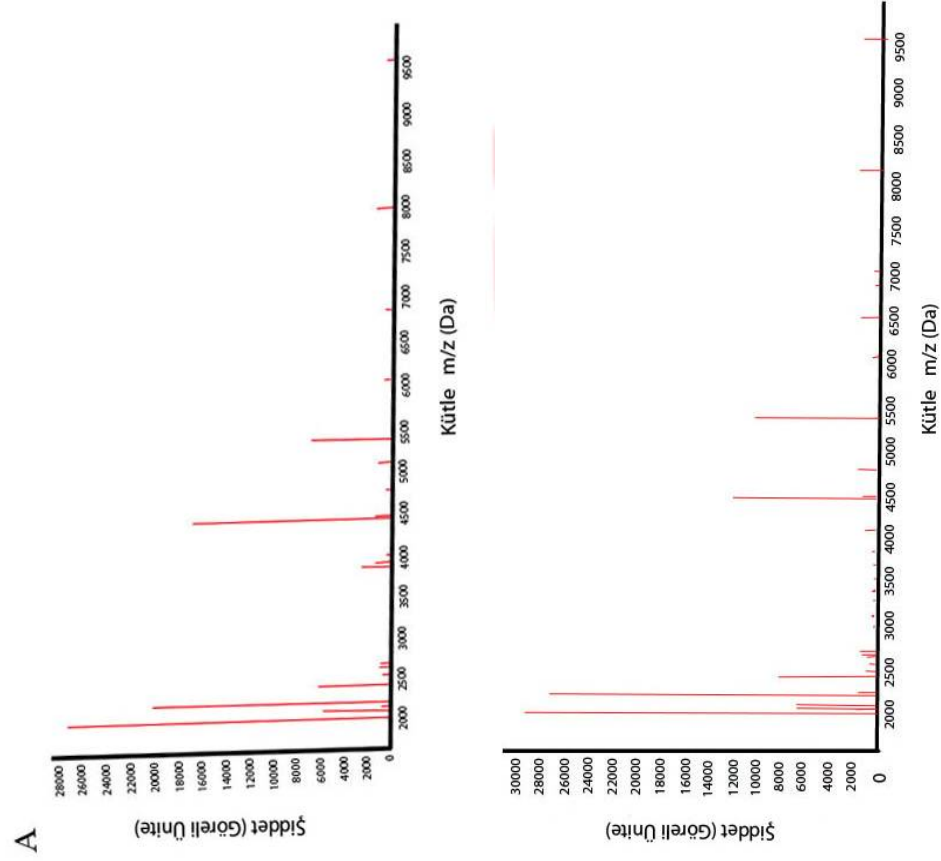
Sonuç olarak % 99,9 benzerlikle; % 7 *Enterococcus faecium*, % 9 *E. hirae*, % 1 *E. durans*; % 34,0 benzerlikle; % 24 *Lactobacillus casei* ya da *L. paracasei* (ikisinden biri % 34 benzerlikle tespit edildi) olarak MALDI-TOF kütle spektrumları belirlendi.

E. hirae' nin MALDI-TOF MS ile elde ribozomal protein kütle spektrum aralığı 2000 ila 9500 Da arasında olup, en yüksek pikleri 2000-4500 Da arasında, 18000-28000 şiddette göstermiştir (Şekil 4.3).

E. faecium' un MALDI-TOF MS ile elde ribozomal protein kütle spektrum aralığı 2000 ila 7500 Da arasında olup, en yüksek pikleri 2000-2500 ile 7500 Da arasında, 9000-15000 şiddette göstermiştir (Şekil 4.3).

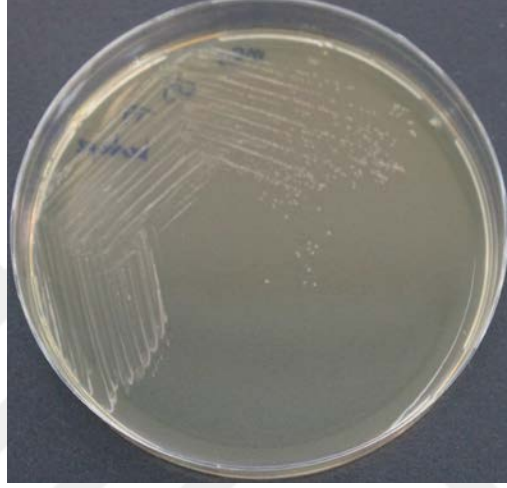
E. durans' ın MALDI-TOF MS ile elde ribozomal protein kütle spektrum aralığı 2000 ila 5500 Da arasında olup, en yüksek pikleri 2000-5500 Da arasında, 10000-30000 şiddette göstermiştir (Şekil 4.3).

L. casei ya da *L. paracasei*' nin MALDI-TOF MS ile elde ribozomal protein kütle spektrum aralığı 2000 ila 4000 Da arasında olup, en yüksek pikleri 2000-4000 Da arasında, 1600-4200 şiddette göstermiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 **A** *Enterococcus hirae* 'ya ait spektrum (% 99,9 benzerlik), **B** *Enterococcus faecium* 'a ait spektrum (% 99,9 benzerlik), **C** *Enterococcus durans* 'a ait spektrum (% 99,9 benzerlik), **D** *Lactobacillus casei* (% 34,0 benzerlik) veya *Lactobacillus paracasei* (% 34,0 benzerlik) 'ye ait spektrum

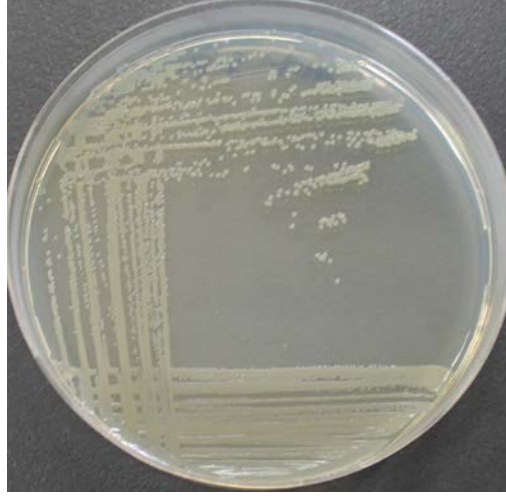
Tanımlaması yapılan LAB izolatlarından *E. hirae* petride sferik (küremsi) kok şekilli ve saydam olarak görülmektedir (Şekil 4.4). *L. casei* ya da *L. paracasei* petride beyaz renkli, birbirinden bağımsız, eliptik formda, özellikle de etrafında hale oluşturmuş olarak görülmektedir (Şekil 4.5). *E. durans* petride kremi renkte, genellikle iki veya daha çok sayıda koloni bir arada, küremsi şekilli olarak görülmektedir (Şekil 4.6). *E. faecium* açık beyaz, amorf, koloniler birbirinden bağımsız olarak görülmektedir (Şekil 4.7).



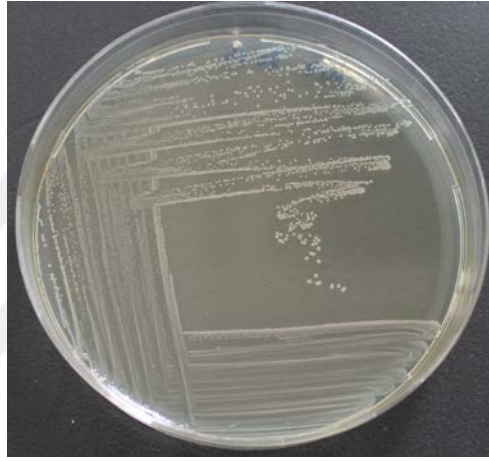
Şekil 4.4 *E. hirae* koloni görüntüsü



Şekil 4.5 *L. casei* ya da *L. paracasei* koloni görüntüsü



Şekil 4.6 *E. durans* koloni görüntüsü



Şekil 4.7 *E. faecium* koloni görüntüsü

Koloni görüntüsü verilen izolatların ışık mikroskopundaki görüntüleri EKLER bölümünde gösterilmiştir.

4.12. Karakterizasyon

LAB türlerinin farklı sıcaklık, tuz, pH' da gelişimleri bu izolatların karakteristik özelliklerinin belirleyici olması açısından önemlidir. Karakterizasyon özelliklerine göre en geniş gelişim gösteren izolatlar: *E. durans* ve *E. faecium* (pH: 2; % 3 NaCl, % 6 NaCl dışında gelişim gösteriyor), *E. hirae* (pH: 2, pH: 5; % 3 NaCl dışında gelişim gösteriyor) idi. Buna karşın en duyarlı gelişim gösteren izolatlar: *L.casei* veya *L. paracasei* (4 °C, 45 °C; pH: 2; % 6 NaCl, % 10 NaCl' de gelişim göstermiyor) idi. İzolatların tümü 25 °C güçlü gelişim ve pH: 7' de zayıf ya da güçlü gelişim gösterdi (Tablo 4.21).

Tablo 4.21. Gaziantep' in geleneksel yoğurtlarından izole edilen LAB türlerinin karakteristikleri

LAB türleri	Karakteristikler		
	Sıcaklıkta büyüme 4, 25, 45	NaCl' de büyüme (%) 3, 6, 10	pH da büyüme 2, 5, 7
<i>L. casei</i> () veya <i>L. paracasei</i> (B)	-, +, -	+, -, -	-, +, +
<i>E. durans</i> (K)	Z, +, Z	-, -, +	-, +, +
<i>E. hirae</i> (K)	+, +, Z	-, +, Z	-, -, Z
<i>E. faecium</i> (K)	Z, +, Z	-, -, +	-, Z, Z

K: kok, B: basil,+: Pozitif gelişim, -: Gelişim yok, w: zayıf gelişim.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇ

LAB' ın çoğu; insan, hayvan ve bitkinin bulunduğu doğal ortamlarda bulunan, bu ortamlardan izole edilebilen, biyoteknolojik çalışmalarda ve endüstriyel birçok alanda kullanılan, insan beslenmesinde ve sağlığında oldukça önemli mikrobiyal ajanlardır (Gezginç ve Akyol, 2010).

Doğada yaygın halde bulunan LAB (Huang vd., 2007) yoğurtta, yoğurt benzeri gıdalarda ve yoğurt dışındaki çalışmalarda çeşitli meyve ve sebze (Chen vd., 2010; Emerenini vd., 2013), süt ürünlerinden (Martin vd., 2003), farklı fermente ürünlerinden (Abdullah ve Osman, 2010; Seifu vd., 2012), insan ve hayvan ince barsak, kolon ve feçes (Jiang ve Savaiano, 1997; Heilig vd., 2002; Campo vd., 2005) vajinadan (Anukam vd., 2005) da izole edilmiş ve fenotipik ve/veya moleküler tanımlanması yapılmıştır.

Tez çalışmamızın konusu Türk Gıda Teknolojisinde kaliteli ve standart yoğurt üretimi için yurt içi kaynaklı starter kültürlerin izole edilmesi ve identifikasyonun yapılmasıydı. Çalışma; Gaziantep ilinin 9 ilçesine bağlı toplam 27 istasyon köyden toplanan geleneksel yoğurt örneklerinden izole edilen başlıca laktik asit bakterilerini kapsıyordu. Bu nedenle bu çalışma; Türkiye' de Gaziantep İli' ne özgü yoğurtlardan LAB izolasyonu ile ilgili olan kapsamlı ilk çalışmadır.

LAB gıda teknolojisinde önemli bir rol oynar. Yoğurt, ayran, tereyağı, peynir gibi çeşitli fermente gıdaların üretimi ve uzun süreli korunmasında narin mikroorganizmalardır. LAB' ın genelde güvenli olarak varsayılan (Generally Recognized as Safe=GRAS) organizmalar olduğu kabul edilir (Magnusson vd., 2003; Patil vd., 2010). Karbonhidrat fermentasyonun son ürünü olarak başlıca laktik asit üreten kok (yuvarlak) ya da basil (çubuk) şekilli bakterilerdir (Abdullah ve Osman, 2010; Patil vd., 2010; Aslım vd., 2011). Çalışmamızda da çoğunluğunu kok şekilli (% 69) ve daha az miktarını da basil (% 31) şekilli LAB' ın oluşturduğu tespit edilmiştir.

Tez çalışmamızın sonunda geleneksel yoğurt örneklerinden 1 çeşit rod ve 3 çeşit kok LAB izole edildi. Üstelik, çalışmamızda geleneksel yoğurtların pH değerleri LAB' ın laktik asit fermentasyonunun bir sonucu olarak 7' nin altında asidik olarak tespit edildi. Yoğurtların pH' sı 3.9 dan 6.0' a kadar değişmekteydi. Araştırma sonuçlarımızdan farklı olarak Erkaya ve Şengül (2012) de farklı süt tipinden ürettikleri yoğurtların pH değerlerini 4.26-4.02 olarak belirlemişler ve pH sonuçlarının yoğurdun saklanması sürecinde starter kültürlerin metabolik aktivitesiyle ilişkili olabileceğini rapor etmişlerdir. Yine elde ettiğimiz bulgulardan farklı olarak Omafuybe ve Enyioha (2011) Nijerya' da kasabadan temin ettikleri yoğurtların pH' sını 3.80-4.48 olarak tespit etmişlerdir. Bu değerlerin ticari yoğurtların pH aralığından daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bunlardan farklı olarak Doğrul ve Erbilir (2006) *Lactobacillus* genusuna ait LAB izolasyonunda örnek olarak kullandıkları 3 yoğurdun pH değerinin 5,52 olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmada kullandığımız yoğurtların kaynağının inek sütü, koyun sütü ve keçi sütü olarak değişkenlik göstermesinin de pH değişikliği ile ilişkisi olabilir. Bunun yanı sıra çalışmada standart bir inokula bulunmaması nedeniyle bazı sütlerin yüksek pH değerine sahip olmasının yoğurt mikrobiotasındaki bakteriler kadar mayalarla da ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Çünkü mikroskop altında 20 yoğurt örneğinden 35 tane izolatu maya olduğu tespit edildi. Henüz bu mayalar tanımlanmadı. İlginç olarak bu çalışmadaki en yüksek yoğurt pH değerlerine sahip olan Şehitkamil (en yüksek pH 6.00)' den 13 koloni mayanın ve Şahinbey (en yüksek pH 5.90)' den 7 koloni mayanın tespit edilmiş olmasıdır.

Biz bu çalışmada yoğurttaki olası en az LAB bakteri sayısını M17 ve MRS toplam 3.7×10^8 log CFU/g (MRS için en az hiç bakteri üremesi yok ve M17 için 3.7×10^8 log CFU/g) olarak tespit ettik. Çalışma bulgularımızla benzer olarak Birollo vd. (2000) yoğurttaki en düşük laktik asit bakteri miktarını 10^7 CFU/g olarak tespit etmişlerdir ve Yoğurtun raf ömrüne de bağlı olarak yoğurttaki LAB sayısının çeşitli ülkelerde minimum 10^6 CFU/ml- 5×10^8 CFU/ml arasında bulunduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Türk Gıda Kodeksi' ne göre de yoğurttaki toplam mikroorganizma sayısının ülkemizde legal olarak en az 10^6 kob/g olacağı bildirilmiştir (Resmi Gazete, Tebliğ No: 2009/25). Bu benzerlik çalışmada elde edilen verilerin kabul edilebilir olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda olası en çok LAB bakteri sayısını 3.1×10^{10} log CFU/g olarak tespit ettik. En düşük ve en yüksek olası LAB değerleri birlikte

değerlendirildiğinde topladığımız geleneksel yoğurtların Türkiye ve çeşitli ülkelerdeki yoğurtlarda bulunan LAB sayısı bakımından ortalama değerler arasında olduğu görülmüştür.

Şu ana kadar Türkiye’ de özellikle yoğurt mikroflorası ile ilgili ticari olmayan yoğurtlar üzerinde yapılan bir araştırma bulunmamaktadır. Yapılan araştırmalar ticari yoğurtlar üzerinde yapılan bazı mikrobiyolojik ve kimyasal özellik çalışması (Tekinşen vd., 2008), yoğurtla yapılan geleneksel Türk yiyeceği olan tarhanadaki LAB’ ın tanımlanması (Şengün vd., 2009) sadece *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* izolasyonu (Gezginç ve Akyol, 2010), yoğurtların mineral içerikleri ve bazı kalite özellikleri üzerine yaptıkları bir araştırmadan (Erkaya ve Şengül, 2012) ibarettir. Dolayısıyla çalışmamız Gaziantep İlinin yoğurt mikroflorası bakımından ilk ve tektir.

Klasik olarak, laktik asit bakterileri fenotipik özellikleri (morfoloji gibi) ne, glukozu fermente ediş şekline, farklı sıcaklıklardaki büyümesine, laktik asiti düzenleyişine ve çeşitli karbonhidratları fermente etmesine göre sınıflandırılmaktadır. Tez çalışmamızın odak noktası süttten yoğurt yapımını teşvik eden bakterilerin tür düzeyinde tanımlamasının moleküler yöntemlere yakın olan ve güçlü benzerlik gösteren MALDI-TOF MS ile yapılmasıydı.

MALDI-TOF kütle spektrometrisi son yıllarda başarıyla uygulanmaktadır. MALDI-TOF yöntemi izolatların % 99 benzerlikle tanımlamasını sağlayan elverişli ve rutin bir metoddur. Bir koloniyi 10-15 dakikada tanımlamak bu yöntemle mümkündür. MALDI gıda endüstrisinde kullanılabilen bir metod olarak görülmektedir. Bu nedenle hızlı tanımlama süreçlerine ihtiyaç duyulur. Bu yöntem klasik metodlara alternatif olarak pahalı olmayan bir metoddur. Tek bir izolatın tanımlama ücreti 1.2 dolardır. Bizim çalışmamızda MALDI-TOF ile iki farklı genus ve dört farklı tür tanımlandı. Benzer olarak Bodríguez-Sáchez vd. (2016) bu metodla 3 adet *L. casei* tanımlaması yaparken biz 54 adet *L. casei* ya da *L. paracasei* (% 34 benzerlikle) tanımlaması yaptık. Susakol Palakawong vd. (2016) MALDI-TOF metoduyla gram pozitif anaerobik bakteri grubundan ola *Actinomyces* genusuna ait iki yeni bakteri tanımlarken bizim de benzer olarak aynı yöntemle tanımladığımız bakterilerin tümü gram (+) idi.

Çalışmamız sonucunda ticari yoğurt yapımında kullanılan ve başlıca starter kültürler olan *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* izole edilmedi. Bunun nedeni her iki türün de izolasyon için mikroaerofilik ya da anaerobik şartlara ihtiyaç duymasıdır. Üstelik 30 °C' de MRS' de aerobik şartlarda inkubasyon nedeniyle *L. delbrueckii* gelişimi çalışma sonucunda izole edilen mezofilik bakterilerle (*Enterococcus* ve *Lactobacillus* genusuna ait türler) yarışmalı olarak inhibe olmuş olabilir. Bununla beraber M17 ortamında laktoz da eklenmiş olmasına rağmen *S. thermophilus* gelişimi aerobik şartlarda baskılanmış olabilir.

Tanımlama sonuçlarımıza benzer olarak *E. durans* Çin' de *yak* yoğurtlarından 4 adet izole edilmiş ve probiyotik özellikleri tanımlanmıştır (Huang vd., 2016). *E. faecium* PC4.1 Moğolstanda Moğolistan yoğurtlarından izole edilmiş ve biyokoruyucu olarak iyi bir üye olduğu bildirilmiştir (Hadji-Sfaxi vd., 2011). *E. hirae*' ye yoğurtta rastlanmamakla birlikte Brezilya' da ev yapımı peynirden izole edildiği ve bu türün bakteriyosin exprese edebileceği bildirilmiştir (Cavicchioli vd., 2017). Diğer türler olan *L. casei* ya da *L. paracasei* ise sık sık fermente ürünlerden izole edilen türlerdendir (Erdoğan ve Erbilir, 2006; Lavanya vd., 2011). Bu bulgular bize ticari yoğurtların tat ve özelliklerinin yöresel yoğurtlardan farklı olmasını sağlayan faktörlerden birinin de starter kültür çeşitliliği olabileceğini göstermektedir. Bu çalışmamızla İlimizde yaşayan insanların alışık olduğu, beğendiği yöresel yoğurt üretimini sağlayabilmek için oldukça önemli sonuçlar elde edilmiştir.

Tez çalışmamızın sonuçları bize ticari amaçla üretilen yoğurtların ötesinde geleneksel yoğurtların farklı LAB türünden oluştuğunu göstermektedir. LAB türleri arasında karakterizasyon bakımından en uygun türlerin; *Enterococcus* genusuna ait türler olduğu görülmektedir. Çalışmadan izole edilen *E. durans*, *E. faecium* ve *E. hirae* türlerinin (Düşük asite ve düşük tuzluluğa duyarlı) probiyotik ırk özelliklerini taşıyor olmaları oldukça umut vericidir. *Lactobacillus* genusu (düşük ve yüksek sıcaklık, yüksek tuzluluk ve düşük asite duyarlı) dahil olmak üzere diğer türlerin kayda değer probiyotik ırk olma özelliklerine sahip olduğu da düşünüldüğünde geleneksel yoğurtlarımızın oldukça sağlığa faydalı mikroorganizmalar barındırdığı ortaya çıkarılmıştır. Bu LAB türlerinin yoğurt yapımında fermentasyon sürecinde ve aday starter kültür olma yolunda kullanılabilecek LAB suşları olduğunu göstermektedir.

E. hirae ve *E. durans* suşlarının yoğurttan izole edildiğine dair az sayıda çalışmaya rastlanmış olması bu bakterilerin yoğurt oluşumundaki fonksiyonlarının araştırılması için öncül bir çalışma olmuştur.

Türkiye’ de yoğurt ile ilgili yapılan araştırmalarda sadece *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* türlerinin saptanmasına yönelik olması, ülkemizin farklı yörelerindeki yoğurt özelliklerinin ortaya konulmadığını açığa çıkarmıştır.

Sonuçlarımız yöresel yoğurt üretimi için starter kültür geliştirilmesi açısından temel oluşturan bir tez çalışmasıdır. Bu çalışmada izole edilen yoğurt bakterileri farklı kombinasyonlarda kullanılarak temel, özgün tad oluşturan bir starter kültür geliştirilebilmesine olanak sağlamaktadır.

Tez çalışmamız ile Gaziantep İlindeki geleneksel yoğurtlardan LAB’ ın izolasyonu ve fenotipik karakterizasyonunun belirlenmesi amaçlandığından Gaziantep’ teki geleneksel yoğurtlarda bulunan hakim LAB mikroflorası ortaya çıkarılmıştır. Seçilen izolatlardan kontrollü şartlarda yoğurt üretiminin yapılması ve suşların endüstriyel kullanıma sunulmaları için ön verilerin elde edilmesi bir sonraki basamağı oluşturmaktadır. Elde edilen veriler yöreye özgü damak tadına uygun yoğurt üretimine katkılar sağlayacak ve endüstriyel açıdan önemli kazanımlar sunacaktır.

Tez çalışmamızla ortaya çıkarılan önemli ve sağlığa katkı sağlayacak bir veri de izole edilen bakterilerin sıcaklık, asitlik ve tuz duyarlılığının belirlenmesine dair karakterizasyon bulguları idi. Bu bulgulara dayanarak olası bir probiyotik ırk seçimi mümkün olmakta, hatta safra tuzuna dayanıklılık ya da kolesterol asimilasyonu gibi diğer parametreleri de çalışmak üzere ön bilgi sağlanması mümkün olmaktadır. Probiyotik özellikteki LAB ırklarının seçimi ve starter kültür olarak yoğurt yapımında kullanımı ile barsak floramızın dengelenmesi sağlanacaktır. Probiyotik ırkların İlimiz geleneksel yoğurtlarından izole edilmesi yöremizin sağlığa yararlı aday starter ırkların orijini olarak elverişli bir bölge olduğunu da göstermektedir. Probiyotik özellikteki yoğurtların düzenli ve uzun süreli tüketimi ile yöremizin kan kolesterol sorunu bulunan bireylerden sindirim kanalı problemi bulunan bireylere kadar tümü için anlamlı sonuçlar elde edilebilir.

Gaziantep İli LAB mikroflorasının ortaya çıkarılması ile tez çalışmamızın sonucunda Ulusal Gen Bankası' na fermental ürünlerdeki mikroorganizmaların kazandırılması için ön veri sağlanmıştır.

Laktik asit bakterilerden oluşturulacak kombinasyonlarla yerli yoğurt starter kültürü geliştirilebilir. Yerli yoğurt starter kültürü süt sanayisinde, sütün yoğurda dönüştürülmesini sağlayan işletmelerde kullanıma sunulabilir.

Yerli yoğurt starter kültür geliştirilmesi ile tez çalışmasının sonunda geliştirilen yerli starter kültürler için patent almak üzere T.C. Türk Patent Enstitüsü' ne başvuruda bulunulabilir. Bu yolla yerli yoğurt starter kültür üretimi Türk süt sanayisine aktarılmış olur. Maliyetli olan ithal yoğurt starter (saf) kültürü yerine geleneksel yoğurtlardan elde edilen yerli starter (saf) kültür üretimi Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının da belirttiği üzere ülkemizi yoğurt yapımında kullanılan her yıl yaklaşık 20 milyon dolarlık ithal bakteri masrafından kurtarabilir (T.C. Türk Patent Enstitüsü, Gaziantep Sanayi Odası, starter kültür üreticileri, sanayiciler yararlanacaktır).

Üretilen yerli yoğurt starter kültürü ile sütün fermentasyon ürünü olan yerli yoğurt üretimi gerçekleştirilebilir.

Tez çalışmamızla giderilmesini planladığımız ihtiyaç yerli yoğurt starter kültürüdür. Türkiye' de saf kültür üretimi gerçekleşmediğinden ülkemiz, yoğurt starter (saf) kültürünü ithalatçı firmalar aracılığıyla yurt dışından temin etmektedir. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı (2012)' nin da bildirdiği üzere ülkemizde 30-40 senedir süt sanayi, yoğurdu ithal yoğurt starter kültürü ile elde etmektedir. Üstelik Türkiye' de süt sanayisi yılda yaklaşık 20 milyon doları yoğurt ve maya yapımında kullanılan ithal bakteri için harcamaktadır, bu da ülke ekonomisine zarar vermekte, üstelik halkımızın damak tadına uygun lezzette yoğurt üretilmemektedir. Bilimsel çalışmalarla yerli yoğurtlardan izole edilecek olan laktik asit bakterilerinden oluşturulacak yerli starter kültürün süt sanayisine aktarılması ile yoğurt ihtiyacımız daha az maliyetle giderilecektir (yoğurt tüketen vatandaşlar, köylüler ve çiftçiler için).

Türkiye' de yoğurt starter kültürü üretimi ile ilgili olarak Atatürk Orman Çiftliği (AOÇ) ile Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Mikrobiyoloji Laboratuvarının birlikte yürüttükleri çalışmayla yerli yoğurt mayası üretilmiş ve Gazi Üniversitesi,

Biyoteknoloji Merkezi ile ortak çalışmaları sonucunda izole edilmiş bakterilerin liyofilize edilerek toz formda saklandığı ve saklanan bakterilerle ürettikleri yoğurdu Atatürk Orman iftliği köy yoğurdu adı altında piyasaya sürdükleri bildirilmiştir (Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2012). AOÇ' nin çalışmasından sonra Güneydoğu Anadolu Bölgesi' nde de süt işletmelerinin yerli yoğurt üretimini hayata geçirmek adına tez çalışmamızın konusu önem teşkil etmektedir.



KAYNAKLAR

- Abdullah, S.A., Osman, M.M. (2010). Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw cow milk, white cheese and rob in Sudan. *Pakistan Journal of Nutrition*. **9**, 1203-1206.
- Anlı, R.E. (2002). Şaraplarda bazı biyojen aminlerin belirlenmesi. *Gıda*. **27**, 225-228.
- Anukam, K.C., Osazuwa, E.O., Ahonkhai, I., Reid, G. (2005). 16S rRNA gene sequence and phylogenetic tree of *Lactobacillus* species from the vagina of healthy Nigerian women. *African Journal of Biotechnology*. **4**, 1222-1227.
- Archibald, F.S. and Fridovich, I. (1981). Manganase, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*. **146**, 928-936.
- Arıcan, A., Andıç, S. (2011). Survival of *E. coli* O157:H7 in yogurt incubated until two different pH values and stored at 4°C. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. **17**, 537-542.
- Aslım, B., Onbasılı, D., Yüksekdağ, Z.N. (2011). Determination of lactic acid production and antagonistic activity against *Helicobacter pylori* of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *S. thermophilus* strains. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. **17**, 609-614.
- Birollo, G.A., Reinheimer, J.A., Vinderola, C.G. (2000). Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. *Food Research International*. **33**, 799-805.
- Bölükbaşı, B. (2007). Trakya bölgesinde farklı köylerden alınan yoğurtlardan laktik asit bakterilerinin izolasyonu, bunların EPS (ekzopolisakkarit) üretim kabiliyetlerinin belirlenmesi ve bu bakteriler kullanılarak ayran üretimine uygun kombinasyonlarının seçilmesi üzerine bir araştırma. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Tekirdağ.
- Campo, R.-del, Bravo, D., Canton, R., Ruiz-Garbajosa, P., Garcia-Albiach, R., Montesi-Libois, A., Yuste, F.-J., Abaira, V., Baquero, F. (2005). Scarce evidence of yoghurt lactic acid bacteria in human feces after daily yoghurt consumption by healthy volunteers. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**, 547-549.
- Cerning, J. (1995). Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait*. **75**, 463-472.
- Chavasirikunton, V., Vatanyoopaisarn, S. and Phalakornkule, C. (2006). Bacteriocin-like activity from *Weissella confusa* and *Pediococcus acidilactici* isolated from traditional Thai fermented sausages. *Journal of Culture Collections*. **5**, 64-72.
- Chen, Y.S., Wu, H.C., Yanagida, F. (2010). Isolation and characteristics of lactic acid bacteria isolated from ripe mulberries in Taiwan. *Brazilian Journal of Microbiology*. **41**, 916-921.
- Clifton, P.M., Noakes, M., Sullivan, D., Erichsen, N., Ross, D., Annison, G., Fassoulakis A., Cehun, M. And Nestel, P. (2004). Cholesterol-lowering effects of

plant sterol esters differ in milk, yoghurt, bread and cereal. *European Journal of Clinical Nutrition*. **58**, 503-509.

El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S. and Ahokas, J. (1998). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, Aflatoxin B₁. *Food and Chemical Toxicology*. **36**, 321-326.

Emerenini, E.C., Afolabi, O.R., Okolie, P.I., Akintokun, A.K. (2013). Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from fresh fruits and vegetables using Nested PCR Analysis. *British Microbiology Research Journal*. **3**, 368-377.

Erdoğan, E., Erbilir, F. (2006). Isolation and characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from various foods. *Turkish Journal Biology*. **30**, 39-44.

Erkaya, T., Şengül, M. (2012). A comparative study on some quality properties and mineral contents of yoghurts produced from different type of milks. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. **18**, 323-329.

Endo, A. and Okada, S. (2007). *Lactobacillus composti* sp. nov., lactic acid bacterium isolated from a compost of distilled shochu residue. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **57**, 870-872.

Ennahar, S., Cai, Y., Fujita, Y. (2003). Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**, 444-451.

Gezginç, Y., Akyol İ. (2010). Geleneksel yoğurtlardan izole edilen *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus*' ların tanımlanması. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi*. **13**, 23-29.

Gänzle, M.G., Höltzel, A., Walter, J., Jung, G. and Hammes, W.P. (2000). Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**, 4325-4333.

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

Gürsoy, A., Özkaya F.D., Yıldız, F., Aslım, B. (2010). Set type yoghurt production by exopolysaccharide producing Turkish origin domestic strains of *Streptococcus thermophilus* (W22) and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (B3). *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. **16**, S81-S86.

Haskard, C.A., El-Nezami, H.S., Kankaanpää, P.E., Salminen, S. and Ahokas, J.T. (2001). Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**, 3086-3091.

Hassanzadazar, H. and Ehsani, A. (2013). Phenotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional *Koopeh* cheese. *Global Veterinaria*. **10**, 148-152.

Heilig, H.G.H.J., Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., Marteau, P., Akkermans, A.D.L. and de Vos, W.M. (2002). Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**, 114-123.

Herich, R., Levkut, M. (2002). Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. *Veterinary Medicine –Czech*. **47**, 169-180.

- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. and Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **73**, 365-373.
- Hove, H., Nordgaard-Andersen, I. and Mortensen, P.B. (1994). Effect of lactic acid bacteria on the intestinal production of lactate and short-chain fatty acids, and the absorption of lactose.¹⁻³ *The American Journal of Clinical Nutrition*. **59**, 74-79.
- Huang, H.-Y., Huang, S.-Y., Chen, P.-Y., King, V.A.-E., Lin, Y.-P., Tsen J.-H. (2007). Basic characteristics of *Sporolactobacillus inulinus* BCRC 14647 for potential probiotic properties. *Current Microbiology*. **54**, 396-404.
- Iqbal, M.Z., Qadir, M.I., Hussain, T., Janbaz, K.H., Khan, Y.H., Ahmad, B. (2014). Probiotics and their beneficial effects against various diseases. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **27**, 405-415.
- Iranmanesh, M., Ezzatpanah, H., Mojgani, N., Torshizi, M.A.K., Aminafsshar M., Maohamadi M. (2012). Isolation of lactic acid bacteria from ewe milk, traditional yoghurt and sour buttermilk in Iran. *European Journal of Food Research & Review*. **2**, 79-92.
- Janssen, P.H., Evers, S., Rainey, F.A., Weiss, N., Ludwig, W., Harfoot, C.G., Schink, B. (1995). *Lactosphaera* gen. nov., a new genus of lactic acid bacteria, and transfer of *Ruminococcus pasteurii* Schink 1984 to *Lactosphaera pasteurii* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **45**, 565-571.
- Jiang, T., Savaiano, D.A. (1997). *In vitro* lactose fermentation by human colonic bacteria is modified by *Lactobacillus acidophilus* supplementation. *Journal of Nutrition*. **127**, 1489-1495.
- Kang, J.H., Lee, M.S. (2005). Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. *Journal of Applied Microbiology*. **98**, 1169-1176.
- Kaplan, H., Hutkins, R.W. (2000). Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and *Bifidobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**, 2682-2684.
- Khedid, K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A., Zinedine, A. (2006). Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiological Research*. **164**, 81-91.
- Klijjn, N., Weerkamp, A.H., Vos de, W.M. (1991). Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**, 3390-3393.
- Kormin, S., Rusul, G., Radu, S. and Ling, F.H. (2001). Bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from traditional fermented food. *Malaysian Journal of Medical Sciences*. **8**, 63-68.
- Khedid, K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A., Zinedine, A. (2006). Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiological Research*. **164**, 81-91.
- Kıran, F., Osmanağaoğlu, Ö. (2011). Laktik asit bakterilerinin identifikasyonunda/tiplendirilmesinde kullanılan moleküler yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. **27**, 62-74.

- Lavanya, B., Sowmiya, S., Balaji, S. and Muthuvelan, B., (2011). Screening and characterization of lactic acid bacteria from fermented milk. *British Journal of Dairy Sciences*. **2**, 5-10.
- Lee, Y.K., Lim, C.Y., Teng, W.L., Ouwehand, A.C., Tuomola, E.M. and Salminen, S. (2000). Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with Enterobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**, 3692-3697.
- Lewus, C.B., Kaiser, A. and Montville, J. (1991), Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**, 1683-1688.
- Liliana Serna, C., Leidy Johana Valencia, H., Rómulo Campos, G. (2011). Lactic acid bacteria with antimicrobial activity against pathogenic agent causing of bovine mastitis. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. **9**, 97-104.
- Lonvaud-Funel, A. (2001). Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. **199**, 9-13.
- Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J., Schnürer, J. (2003). Broad complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. **219**, 129-135.
- Majamaa, H., Isolauri, E., Saxelin, M., Vesikari, T. (1995). Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. **20**, 333-338.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlov, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.-H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B. and Mills, D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Microbiology*, **103**, 15611-15616.
- Mantovani, H.C., Hu, H., Worobo, R.W. and Russell, J.B. (2002). Boivicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. *Microbiology*. **148**, 3347-3352.
- Mardis, E. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. **9**, 387-402.
- Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R. and Huis In' t Veld, J.H.J. (1997). Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: Validation and the effects of bile. *Journal of Dairy Science*. **80**, 1031-1037.
- Martin, R., Langa, S., Reviriego, C., Jimenez, E., Marin, M.L., Xaus, J., Fernandez, L., Rodriguez, J.M. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics*. 754-758, December.
- Martini, M.C., Lerebours, E.C., Lin, W.-J., Harlander, S.K., Berrada, N.M., Antoine, J.M. and Savaiano, D.A. (1991). Strains and species of lactic acid bacteria in fermented milks (yogurts): effect on *in vivo* lactose digestion¹⁻⁴. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **54**, 1041-1046.

- Masud, T., Sultana, K., Shah, M.A. (1991). Incidence of lactic acid bacteria isolated from indigenous Dahi. *AJAS*. **4**, 329-331.
- Mehrabian, S., Tajabadi Ebrahimi, M., Abbas Ahmadi, M., Bahrami, H. (2012). Study of antimutagenic and anticancer effect of lactic acid bacteria isolated from Tarkhineh by Ames Test. *Arak Medical University Journal*. **15**, 72-79.
- Messens, W., Neysens, P., Vansielegheem, W., Vanderhoeven, J. and Vuyst, L.D. (2002). Modeling growth and bacteriosin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in response to temperature and pH values used for sourdough fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**, 1431-1435.
- Miettinen, M., Vuopio-Varkila, J. And Varkila, K. (1996). Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infection and Immunity*. **64**, 5403-5405.
- Milci, S., Yaygın, H. (2005). Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler ve süt ürünlerindeki fonksiyonları. *Gıda*, **30**, 123-129.
- Miyashita, M., Yukphan, P., Chaipitakchonlatarn, W., Malimas, T., Sugimoto, M., Yoshino, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Kirtikara, K., Tanticharoen, M., Suzuki, K. (2012). 16S rRNA gene sequence analysis of lactic acid bacteria isolated from fermented foods in Tayland. *Microbiologic Culturel Collection*. **28**, 1-9.
- Narayanan, N., Roychoudhury, P.K., Srivastava, A. (2004). L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*. **7**, 167-179.
- Omemu, A.M., Faniran, O.W. (2011). Assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from two fermented maize products -*ogi* and *kannu-zaki*. *Malaysian Journal of Microbiology*. **7**, 124-128.
- Omafuvbe, B.O. and Enyioha, L.C. (2011). Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from selected commercial Nigerian bottled yoghurt. *African Journal of Food Science*. **5**, 340-348.
- Özdemir, S., Bodur, A.E., (1994). Yoğurt üretimi sırasında oluşan fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal olaylar. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. **25**, 479-487.
- Patil, M.M., Pal, A., Anand, T. and Ramana, K.V. (2010). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from curd and cucumber. *Indian Journal of Biotechnology*. **9**, 166-172.
- Phalakornkule, C. and Tanasupawat, S. (2006). Characterization of lactic acid bacteria from traditional Thai fermented sausages. *Journal of Culture Collection*. **5**, 46-57.
- Polat, S. (2009). Farklı starter kültür kullanılarak üretilen ayranların kalite özellikleri, Çukurova Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Yüksek Lisans Tezi, Adana.
- Peltonen, K., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J., Salminen, S. (2001). Aflatoxin B₁ binding by dairy strains of lactic acid bacteria and Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*. **84**, 2152-2156.
- Piard, J.C., Desmazeaud, M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism and-products. *Lait*. **71**, 525-541.

- Rafter, J., (2002). Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. *British Journal of Nutrition*. **88**, S89-S94.
- Reid, G., Bruce, A.W., Fraser, N., Heinemann, C., Owen, J., Henning, B. (2001). Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. **30**, 49-52.
- Rodríguez-Sánchez, B., Alcalá, L., Marín M. Ruiz, A., Alonso, E., Bouza E. (2016) Evaluation of MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) for routine identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe*. **42**, 101-107.
- Salama, M.S., Musafija-Jeknic, T., Sandine, W.E. and Giovannoni, S.J. (1995). An ecological study of lactic acid bacteria: Isolation of new strains of *Lactococcus* including *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris*. *Journal of Dairy Science*. **78**, 1004-1017.
- Savaiano, D.A., Abouelanouar, A., Smith, D.E., Levitt, M.D. (1984). Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **40**, 1219-1223.
- Schiffrin, E. J., Brassart, D., Servin, A.L., Rochat, F., Hughes, A.D. (1997). Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection¹⁻³. *The American Journal of Clinical Nutrition* **66**, 515-20.
- Seifu, E., Abraham, A., Kurtu, M.Y. and Yilma Z. (2012). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from *Ititu*: Ethiopian traditional fermented camel milk. *Journal of Camelid Science*. **5**, 82-98.
- Soda, M.E., Ahmed, N., Omran, N., Osman, G. and Morsi, A. (2003). Isolation, identification and selection of lactic acid bacteria cultures for cheesemaking. *Emirate Journal of Agriculture Science*. **15**, 51-71.
- Soomro, A.H., Masud, T. and Anwaar, K. (2002). Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health-a review. *Pakistan Journal of Nutrition*. **1**, 20-24.
- Susakul Palakawong, N.A., Pristaš, P., Hrehová, L., Javorský Stams, A.J.M., Plugge, C.M (2016). *Actinomyces succiniciruminis* sp. nov. and *Actinomyces glycerinitolerans* sp. nov., two novel organic acid-producing bacteria isolated from rumen. *Systematic and Applied Microbiology*. **39**, 445-452.
- Şanlı, T., Deveci, O., Sezgin, E. (2012). Effects of pasteurization and storage on stability of aflatoxin M1 in yogurt. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. **18**, 987-990.
- Şengün, İ.Y., Nielsen, D.S., Karapınar, M., Jakobsen, M. (2009). Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. *International Journal of Food Microbiology*. **135**, 105-111.
- Talpur, A.D., Memon, A.J., Khan M.I., Ikhwanuddin, M., Danish Daniel, M.M. and A bol-Munafi, A.B. (2011). Isolation and screening of lactic acid bacteria from the gut of blue swimming crab, *P. pelagicus*, an in vitro inhibition assay and small scale in vivo model for validation of isolates as probiotics. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 1-28.

Tannock, G.W. (1999). Identification of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues Molecular Biology*. **1**, 53-64.

Tekinşen, K.K., Nizamlıoğlu, M., Bayar, N., Telli, N., Köseoğlu, İ.E. (2008). Konya’ da üretilen süzme (torba) yoğurtların bazı mikrobiyolojik ve kimyasal özellikleri. *Veteriner Bilimleri Dergisi*. **24**, 69-75.

Vuyst, L.D., Degeest B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. **23**, 153-177.

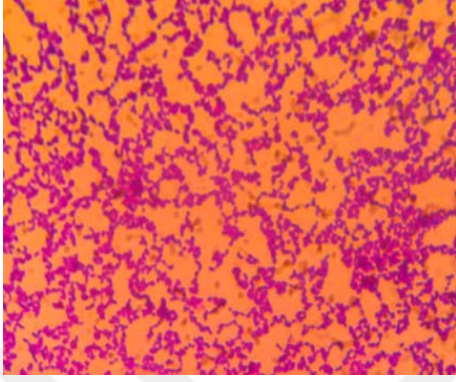
Yazdi, F.T., Behbahani, B.A., Mohebbi, M., Mortazavi, A., Ghaitaranpour, A. (2012). Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarkhineh, a traditional Iranian fermented food. *Scientific Journal of Microbiology*. **1**, 152-159.

Yılmaz, S., Duyan, S., Artık, C., Diktaş, H. (2014). Applications of MALDI-TOF MS in microbiological identification. *TAF Preventive Medicine Bulletin*. **13**, 421-426.

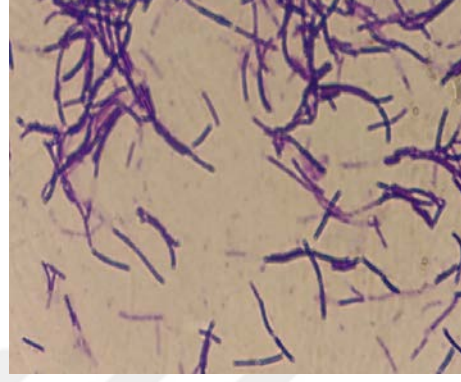
Yurdakök, M. (2013). Yoğurdun öyküsü, probiyotiklerin tarihi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*. **56**, 43-60.

Yüksekdağ, Z.N., Beyatlı, Y., (2009). Bazı laktik asit bakterilerinin fizyolojik, biyokimyasal, plazmit DNA ve protein profil özelliklerinin incelenmesi, *Gıda*. **34**, 91-98.

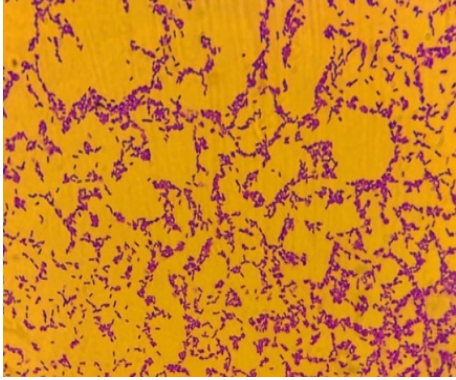
EKLER



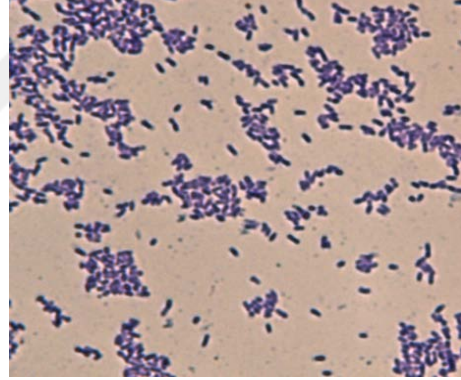
E. hirae
M17, Şa N3, kodlu köy



L. casei ya da *L. paracasei*
MRS, Kar Yo2 kodlu köy



E. durans
M17, İsl Ka2 kodlu köy



E. faecium
M17, Şe K4 kodlu köy

Ek Şekil 1. İzolatların mikroskop görüntüleri. Işık mikroskobu (100x).

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı: Ayşe KARADUMAN

Uyruğu: T.C.

Doğum yeri ve Tarihi:Kangal, 01.07.1983

Evlilik Durumu: Bekar

Telefon: 05073914644

Email: ayse.karaduman1@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

	Mezun olduğu okul	Mezuniyet yılı
Yüksek Lisans	Gaziantep Üniversitesi	13.07.2007
Lisans	Gaziantep Üniversitesi	02.07.2004
Lise	İmam Hatip Lisesi	2000

İŞ TECRÜBESİ

2015-Halen Yazı İşleri Müdürü

2011-2015 Şef

2007-2011 V.H.K.İ.

YAYINLAR

Abdulsamet KUBAT, Mehmet ÖZASLAN, Ayşe KARADUMAN, Işık Didem KARAGÖZ, İbrahim Halil KILIÇ, 2013. C Vitamini Bakımından Zengin Sebze ve Meyvelerin Beyaz Kan Hücreleri Artışı Üzerine Etkilerinin Araştırılması, AVKAE Derg., 3(1) 31-37.

Ayşe KARADUMAN; Mehmet OZASLAN; İbrahim Halil KILIC; Sibel GOKAY-OGUZKAN; Bekir Siddik KURT; Nese ERDOGAN; 2017. Identification of using MALDI-TOF mass spectrometry of lactic acid bacteria isolated from non-

commercial yogurts in Southern Anatolia, Turkey; International Microbiology; 20(1)
25-30.

YABANCI DİL BİLGİSİ

ÜDS: 55

HOBİLER

Yürüyüş, yüzme, kitap okuma

