

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ŞALGAM SUYUNDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
16S rRNA İLE TANIMLANMASI VE BAZI GELİŞME PARAMETRELERİNİN
BELİRLENMESİ**

Nurhan SAMANTIR

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2014**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Nurhan SAMANTIR tarafından hazırlanan “ **Şalgam Suyundan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin 16S rRNA ile Tanımlanması ve Bazı Gelişme Parametrelerinin Belirlenmesi**” adlı tez çalışması 07/01/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Kamuran AYHAN
Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri:

Başkan : Prof. Dr. Kamuran AYHAN
Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Ertan ANLI
Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. İbrahim DEMİR
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

21.01.2014

Nurhan SAMANTIR

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ŞALGAM SUYUNDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN 16S rRNA İLE TANIMLANMASI VE BAZI GELİŞME PARAMETRELERİNİN BELİRLENMESİ

Nurhan SAMANTIR

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kamuran AYHAN

Tezde, şalgam suyundan izole edilen ve fenolik dekarboksilaz enzimine sahip olduğu saptanan 6 adet izolat (GK1, GK3, GK5, GK11, GK12, GK13) 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi ile moleküler olarak tanımlanmıştır. Suşların farklı NaCl konsantrasyonlarındaki, farklı pH ve sıcaklıklardaki gelişmeleri incelenmiş ve optimum koşullardaki gelişme eğrileri saptanmış olup, herbirinin antimikrobiyel aktivite özellikleri araştırılmıştır. API 50CHL ve 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi ile tanımlama sonuçlarına göre GK12 ve GK13 izolatları *Lactobacillus plantarum*'dur. GK1 izolatu API 50CHL ile tanımlanamazken, 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi sonucuna göre *Lactobacillus plantarum* olduğu saptanmıştır. GK3 izolatının API 50CHL ile *Leuconostoc mesenteroides/dextranicum 2* olduğu, buna karşın 16S rRNA gen bölgesi dizi analizinde ise *Lactobacillus plantarum* suşu olduğu anlaşılmıştır. Denemelerde, GK5; API 50CHL testinde *Leuconostoc mesenteroides/dextranicum 2*, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde yapılan moleküler tanımlama sonucunda *Pediococcus acidilactici*, ODTÜ Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Ar-Ge Merkezi'nde yapılan moleküler testinde ise *Pediococcus pentosaceus* olarak tanımlanmıştır. GK11, API 50CHL ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde tanımlanamazken ODTÜ'de yapılan testte, izolatın *Lactobacillus plantarum* olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada moleküler tanımlama sonuçlarına göre; GK1, GK3, GK12 ve GK13 suşlarının birbiri ile tür bazında benzer olduğu anlaşılmıştır. GK12 ve GK13 30 °C' de, diğerleri ise 37,5°C'de optimum gelişme göstermiştir. Suşların 2; 3; 3,5; 4; 5 pH'lardaki gelişmeleri incelendiğinde, aralarında benzerlik olduğu, pH yükseldikçe gelişmenin arttığı anlaşılmıştır. Hepsinde maksimum gelişme pH 5'de görülmüştür. Suşların, %1; 1,5; 2; 2,5 NaCl konsantrasyonlarındaki gelişmeleri farklılık göstermiştir. *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. aureus* ATCC 10832 ve *Lb. plantarum* ATCC 14917'e karşı suşların antimikrobiyel aktivite göstermediği anlaşılmıştır.

Ocak 2014, 85 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterileri, 16S rRNA, gelişme parametreleri, şalgam suyu

ABSTRACT

Master Thesis

IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM TURNIP JUICE WITH 16S rRNA AND DETERMINATION OF SOME OF THE GROWTH PARAMETERS

Nurhan SAMANTIR

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Kamuran AYHAN

In this thesis, 6 isolates (GK1, GK3, GK5, GK11, GK12, GK13) isolated from turnip juice and determined to have phenolic dicarboxylate were identified by 16S rRNA gene sequencing. Growth of the strains in different NaCl concentrations, pH and temperature values were researched and growth curves in optimum conditions were determined, antimicrobial activities of each strain were also investigated. According to the identification by API 50CHL and 16S rRNA gene sequencing analysis, GK12 and GK13 isolates are *Lactobacillus plantarum*. GK1 isolate was found to be *Lactobacillus plantarum* by 16S rRNA gene sequencing analysis whereas it could not be identified by API 50 CHL. GK3 isolate was concluded to be *Leuconostoc mesenteroides/dextranicum 2* by API 50CHL while it was identified as *Lactobacillus plantarum* by 16S rRNA gene sequencing analysis. GK5 was identified as *Leuconostoc mesenteroides/dextranicum 2* by API 50CHL test, *Pediococcus acidilactici* by molecular identification performed in Ankara University Biotechnology Institute and *Pediococcus pentosaceus* by molecular test carried out in METU Molecular Biology and Biotechnology R&D Center. GK11 could not be identified by API 50 CHL and by tests in Biotechnology Institute whereas it was found to be *Lactobacillus plantarum* in METU. According to the molecular identification results in this study GK1, GK3, GK12 and GK13 strains are proved to be similar at species level. Optimum growth was observed at 30 °C for GK12 and GK13, and at 37 °C for the other isolates. When the growth of strains at 2; 3; 3,5; 4; 5 pH values are researched, it was seen that all strains resemble each other; growth increases with pH. Maximum growth was observed at pH 5 for all of them. The growth of strains in 1; 1,5; 2; 2,5 % NaCl concentrations differentiated. Strains did not show any antimicrobial activity against *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. aureus* ATCC 10832 and *Lb. plantarum* ATCC 14917.

Ocak 2014, 85 Pages

Key Words: Lactic acid bacteria, 16S rRNA, growth parameters, turnip juice

TEŞEKKÜR

Her konuda değerli görüşlerini ve bilgisini benden hiçbir zaman esirgemeyen, sadece akademik anlamda değil, birçok açıdan bana her türlü destek olan, beni yönlendiren ve destekleyen, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, her konuda yakın ilgisini gördüğüm ve örnek aldığım sevgili ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Kamuran AYHAN' a; denemelerim sırasında her türlü yardımlarını ve desteğini gördüğüm değerli hocam Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsünden Dr. Evrim GÜNEŞ ALTUNTAŞ'a; tez çalışmam sırasında verdiği derslerle bana büyük katkısı olan Prof. Dr. Lütfü ÇAKMAKÇI (Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı) ' ya; laboratuvar imkanlarından yararlanmama olanak tanıyan Sayın Prof. Dr. Ertan ANLI' ya (Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü); tezimin önemli bölümünde yaptığı çalışmalarla bana yardımcı olan ODTU Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Ar-Ge Merkezinden Doç. Dr. Remziye YILMAZ' a ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsünden Prof. Dr. Ali Ergül' e; bana her türlü yardımı ile destek olan Abant İzzet Baysal Üniversitesinden Uzman Şebnem KURHAN'a ve manevi desteğini hiç esirgemeyen bütün sorunlarıma çözüm bulan arkadaşım Gözde OKÇU' ya; ayrıca çalışmalarım esnasında her zaman yanımda olan, varlığı ile bana güven veren, bana sabırla destek olan, bugünlere gelmemde büyük emek sahibi sevgili eşim Osman Nuri SAMANTIR' a; ve bana manevi destek olan motivasyon kaynağım kızım Sare SAMANTIR' a teşekkürlerimi borç bilirim.

Bu tez çalışmasında 12B4343005 numaralı projenin olanaklarından yararlanılmış olduğundan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Nurhan SAMANTIR
Ankara, Ocak 2014

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-------------|
| TEZ ONAY SAYFASI | |
| ETİK | i |
| ÖZET | ii |
| ABSTRACT | iii |
| TEŞEKKÜR | iv |
| KISALTMALAR DİZİNİ | vii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | viii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | x |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ | 4 |
| 2.1 Laktik Asit Bakterileri ve Fermantasyonu..... | 4 |
| 2.2 Tanımlanmış Kültürler ve Önemi..... | 6 |
| 2.3 Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyel Özellikleri..... | 7 |
| 2.4 Laktik Asit Bakterilerinin Biyokimyasal ve Moleküler Yöntemlerle Tanımlamaları..... | 12 |
| 2.4.1 Laktik asit bakterilerinin biyokimyasal yöntemlerle tanımlamaları..... | 12 |
| 2.4.2 Laktik asit bakterilerinin moleküler yöntemlerle tanımlamaları..... | 13 |
| 2.5 Laktik Asit Bakterilerinin Gelişmesine Sıcaklık, pH ve Tuzun Etkisi..... | 15 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM | 18 |
| 3.1 Materyal..... | 18 |
| 3.2 Yöntem..... | 18 |
| 3.2.1 Laktik asit bakterinin 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi yöntemi ile moleküler tanımlanması..... | 18 |
| 3.2.2 Laktik asit bakterileri ile antimikrobiyel aktivite denemeleri..... | 22 |
| 3.2.3 Laktik asit bakterilerinin farklı sıcaklıktaki gelişmesi..... | 23 |
| 3.2.4 Laktik asit bakterilerinin farklı tuz konsantrasyonlarındaki gelişmesi..... | 23 |
| 3.2.5 Laktik asit bakterilerinin farklı pH konsantrasyonlarındaki gelişmesi..... | 23 |
| 3.2.6 Laktik asit bakterilerinin optimum koşullardaki gelişmesi..... | 24 |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA | 25 |
| 4.1 Laktik Asit Bakterilerinin 16S rRNA Gen Bölgesi Dizi Analizi Yöntemi ile Moleküler Tanımlanması..... | 25 |
| 4.2 Laktik Asit Bakterileri ile Antimikrobiyel Aktivite Denemeleri..... | 30 |
| 4.3 Laktik Asit Bakterilerinin Optimum Gelişme Sıcaklığının Belirlenmesi..... | 33 |
| 4.4 Laktik Asit Bakterilerinin Farklı pH Konsantrasyonlarındaki Gelişmesi..... | 37 |
| 4.5 Laktik Asit Bakterilerinin Farklı Tuz Konsantrasyonlarındaki Gelişmesi... | 42 |
| 4.6 Laktik Asit Bakterinin Optimum Koşullardaki Gelişmesi..... | 47 |
| 5. SONUÇ | 51 |
| KAYNAKLAR | 54 |
| EKLER | 64 |
| EK 1 Araştırmada Kullanılan Besiyerleri..... | 65 |
| EK 2 Gram Pozitif Bakterilerden Genomik DNA İzolasyonu | 66 |
| EK 3 DNA İzolasyonu Aşamasında Kullanılan Malzemeler..... | 67 |
| EK 4 Agaroz Jel Elektroforezi..... | 68 |

| | |
|---|-----------|
| EK 5 PCR Saflaştırma Protokolü..... | 69 |
| EK 6 PCR Protokolü (Dizi analizi)..... | 70 |
| EK 7 Agencourt CleanSEQ ile Sekans Ürünlerinin Temizlenmesi..... | 72 |
| EK 8 Suşların Dizi Analizleri ve NCBI Gen Bankasındaki Referans Genomlar ile Eşleştirilmesi..... | 73 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 85 |

KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|--------------|-------------------------------|
| GRAS | Generally Recognized As Safe |
| LAB | Laktik Asit Bakterisi |
| <i>L.</i> | <i>Lactococcus</i> |
| <i>Lb.</i> | <i>Lactobacillus</i> |
| <i>Leuc.</i> | <i>Leuconostoc</i> |
| MRS | de Man Rogosa Sharpe Besiyeri |
| <i>O.</i> | <i>Oenococcus</i> |
| OD | Optik Yoğunluk |
| <i>P.</i> | <i>Pediococcus</i> |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| <i>S.</i> | <i>Streptococcus</i> |
| TSA | Tryptic Soy Agar |
| TSB | Tryptic Soy Broth |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 3.1 İzolatların moleküler tanımlanmasında izlenen aşamalar..... | 19 |
| Şekil 3.2 PCR sonrası agaroz jelden DNA'nın kesilerek saflaştırılması..... | 21 |
| Şekil 3.3 İzolatların PCR ile tanımlanması aşamaları..... | 22 |
| Şekil 4.1 İzolasyon sonucu elde edilen DNA'ların %1'lik agaroz jel elektroforez görünümü..... | 26 |
| Şekil 4.2 PCR sonrası agaroz jel görüntüsü..... | 28 |
| Şekil 4.3 Agar Spot testine göre GK1, GK3, GK5, GK11, GK12 ve GK13 suşlarının <i>S. aureus</i> ATCC 10832'e karşı antimikrobiyel aktivite sonuçları..... | 31 |
| Şekil 4.4 Agar Spot testine göre GK1, GK3, GK5, GK11, GK12 ve GK13 suşlarının <i>L.monocytogenes</i> ATCC 7644'e karşı antimikrobiyel aktivite sonuçları..... | 31 |
| Şekil 4.5 Agar Spot testine göre GK1, GK3, GK5, GK11, GK12 ve GK13 suşlarının <i>Lb. plantarum</i> ATCC 14917'e karşı antimikrobiyel aktivite sonuçları..... | 31 |
| Şekil 4.6 GK 1'in farklı sıcaklık derecelerindeki gelişmesi..... | 34 |
| Şekil 4.7 GK3' ün farklı sıcaklık derecelerindeki gelişmesi..... | 34 |
| Şekil 4.8 GK5' in farklı sıcaklık derecelerindeki gelişmesi..... | 35 |
| Şekil 4.9 GK11' in farklı sıcaklık derecelerindeki gelişmesi..... | 35 |
| Şekil 4.10 GK12' nin farklı sıcaklık derecelerindeki gelişmesi..... | 36 |
| Şekil 4.11 GK13' ün farklı sıcaklık derecelerindeki gelişmesi..... | 36 |
| Şekil 4.12 GK1' in farklı pH konsantrasyonlarındaki gelişmesi..... | 38 |
| Şekil 4.13 GK3' ün farklı pH konsantrasyonlarındaki gelişmesi..... | 39 |
| Şekil 4.14 GK5' in farklı pH konsantrasyonlarındaki gelişmesi..... | 39 |
| Şekil 4.15 GK11' in farklı pH konsantrasyonlarındaki gelişmesi..... | 40 |
| Şekil 4.16 GK12' nin farklı pH konsantrasyonlarındaki gelişme durumu..... | 40 |
| Şekil 4.17 GK13' ün farklı pH konsantrasyonlarındaki gelişmesi..... | 41 |
| Şekil 4.18 GK1' in farklı NaCl konsantrasyonlarındaki gelişmesi..... | 43 |
| Şekil 4.19 GK3' ün farklı NaCl konsantrasyonlarındaki gelişmesi..... | 43 |
| Şekil 4.20 GK5' in farklı NaCl konsantrasyonlarındaki gelişmesi..... | 44 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4.21 GK11' in farklı NaCl konsantrasyonlarındaki gelişmesi..... | 44 |
| Şekil 4.22 GK12' nin farklı NaCl konsantrasyonlarındaki gelişmesi..... | 45 |
| Şekil 4.23 GK13' ün farklı NaCl konsantrasyonlarındaki gelişmesi..... | 45 |
| Şekil 4.24 GK1' in optimum koşullardaki gelişme eğrisi..... | 47 |
| Şekil 4.25 GK3' ün optimum koşullardaki gelişme eğrisi..... | 48 |
| Şekil 4.26 GK5' in optimum koşullardaki gelişme eğrisi..... | 48 |
| Şekil 4.27 GK11' in optimum koşullardaki gelişme eğrisi..... | 49 |
| Şekil 4.28 GK12' nin optimum koşullardaki gelişme eğrisi..... | 49 |
| Şekil 4.29 GK13' nin optimum koşullardaki gelişme eğrisi..... | 50 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Çizelge 3.1 İzolatların optimum gelişme koşulları..... | 24 |
| Çizelge 4.1 API 50CHL kitleri ile tanımlama sonuçları..... | 26 |
| Çizelge 4.2 DNA' ların saflık ve miktar değerlerinin belirlenmesi..... | 27 |
| Çizelge 4.3 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi yöntemi ile moleküler tanımlama sonuçları..... | 28 |
| Çizelge 4.4 İzolatların gelişme sıcaklıkları..... | 33 |
| Çizelge 4.5 İzolatların geliştiği optimum tuz konsantrasyonu..... | 42 |

1. GİRİŞ

Laktik asit bakterilerinin (LAB) insan sağlığı üzerine pek çok yararları olduğu ve yıllardır fermente ürünlerin üretiminde güvenli kabul edilerek (GRAS-generally recognized as safe) kullanıldığı bilinmektedir (Tunail 2009, Altuntaş vd. 2010).

Son 20 yıldır LAB'ın ve fermente süt ürünlerinin antikanserojen etkisi olduğu çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir (Ayhan ve Akçelik 1992, Wollowski vd. 2001, You vd. 2004, Nikoloeva vd. 2004, Altuntaş vd. 2010). LAB, gıdaların hızlı asidifikasyonuna yol açarak, bozulma yapan ve patojen bakterilerin gelişmelerini inhibe etmektedir. Buna ek olarak fermente gıdalarda proses sırasında kimyasal ve biyolojik olarak meydana gelen hatta zehirlenmelere yol açabilen biyojen aminlerin oluşumunun engellenmesinde biyojen amin oluşturmeyen starter kullanımının yararlı olduğu pek çok araştırmada deneysel olarak gösterilmiştir. Buna göre, hem hijyen hem de güvenlik noktalarına bakış açısından starter kültür olarak LAB'ın veya bakteriyosinlerin kullanımı önerilmektedir (O'Keeffe ve Hill 1999, Okçu 2011).

Carr vd. (2002), laktik asit bakterilerinin, besin değeri açısından zengin birçok ortamda bulunduğunun, süt ve et ürünleri ile sebzeler gibi gıdalarda doğal yollarla ortaya çıktığının altını çizmişlerdir. Bu bakterilerin karbonhidratların yanı sıra aminoasitler, peptitler, tuzlar, vitaminler ve diğer maddeler ile de desteklenmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Lindgreen ve Dobrogosz (1990) ile Caplice ve Fitzgerald (1999) çalışmalarında, fermantasyon sırasında laktik asitle beraber; hidrojen peroksit, formik asit, propiyonik asit, aseton, diasetil, reuterin ve bakteriyosin de üretildiğini ve tüm bu maddelerin gıdaları koruma yeteneklerinde büyük rol oynadığını belirtmişlerdir.

Fermantasyon proseslerinde, starter kültür veya yardımcı kültür olarak dikkatli bir şekilde seçilmiş suşların kullanımı; istenen özelliklerde, tamamen doğal ve sağlıklı ürünlerin elde edilmesine yardımcı olacaktır. Ayrıca, antimikrobiyel maddeler, şeker polimerleri, aromatik bileşenler, yararlı enzimler veya nutrasotikler üreten ya da probiyotik suşlar olarak bilinen ve insan sağlığına olumlu etkileri olan laktik asit bakterileri verilebilir. Bu sayede, kimyasal katkı maddeleri kullanımına gerek

kalmayacak, aynı zamanda tüketiciye yeni, ilgi çekici ürünler sunulabilecektir (Leroy ve De Vuyst 2004).

Şalgam Suyu Standardı'nda (11149) şalgam suyu; "bulgur unu (setik), ekşi hamur, içilebilir su ve yemeklik tuzun karıştırılıp laktik asit fermantasyonuna tabi tutulduktan sonra elde edilen özüte, şalgam (*Brassica rapa*), mor havuç (*Daucus carota*) ve istenirse acı toz biber ilave edilerek hazırlanan karışımın tekrar laktik asit fermantasyonuna tabi tutulması ile elde edilen ve istendiğinde ısıl işlem ile dayanıklı hale getirilen ürün" şeklinde tanımlanmaktadır (Anonim 2003). Laktik asit fermantasyonu ürünü olan şalgam suyu; kırmızı renkli, ekşi lezzetli bir içecektir (Canbaş ve Fenercioğlu 1984, Türker vd. 2004, Okçu 2011). Şalgam suyunun kendine özgü bu rengi, siyah havuçtan geçen renk maddelerinden kaynaklanmaktadır (Canbaş ve Deryaoğlu 1993, Erten ve Tangüler 2010). Şalgam suyu acılı ve acısız olmak üzere iki çeşittir (İyiçınar 2007). Şalgam suyu özellikle Adana ve ilçeleri ile Mersin, Hatay, Kahramanmaraş ve Osmaniye illeri ve bu illere bağlı ilçelerde tüketilmekle beraber, son yıllarda İstanbul, Ankara ve İzmir gibi büyük kentlerde de tüketilmektedir (Tangüler 2010). Şalgam suyunun hoşça giden ekşi tadını fermantasyon sonucu oluşan laktik asit vermektedir (Canbaş ve Fenercioğlu 1984, Canbaş ve Deryaoğlu 1993). Laktik asit, fermantasyon proseslerinde ürünlerin dayanıklılığı ve tadı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Canbaş ve Deryaoğlu 1993, Tangüler 2010). Laktik asit üreten kültürler starter olarak isimlendirilmekte olup, fermente ürünlerde arzu edilen özelliklerin ortaya çıkarılmasına yardımcı olmakta (De Vuyst ve Leroy 2004) ve gıda üretimlerinde güvenli olarak starter ya da koruyucu kültür olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır (Ayhan ve Coşansu 1998, Ayhan vd. 2005, Altuntaş vd. 2009, Tunail 2009).

Bilindiği gibi laktik asit bakterileri gıdalarda koruyucu olabildiği gibi bozulma etmeni olarak da doğal florayı baskılayabilmekte ve ortamda baskın duruma gelebilmektedir. Son yıllarda karışık starter kültürlerin gelişmesiyle beraber, gıda sistemlerinde kullanılan laktik asit bakteri türlerinin tanımlanması önemli hale gelmiştir (Stiles ve Holzapfel 1997, Altuntaş 2011).

Laktik asit bakterilerinin endüstriyel uygulamaları düşünüldüğünde, araştırmaların en temel amacının kullanılabilecek olan uygun LAB suşlarının olduğu açıktır. Suş bazında

güvenilir tiplendirme yöntemleri hem LAB starter kültürlerin performanslarının incelenmesi hem de fonksiyonel gıda ürünlerinde kullanılacak olan kültürlerin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu nedenle, herhangi bir suşun spesifik ve belirgin olarak ayrımını sağlayan güvenilir yöntemlerin uygulanması oldukça önemlidir (Dicks vd. 1990, Dykes ve Holy 1994). Günümüzde, LAB tanımlama/tiplendirme çalışmalarının ilgi odağı fenotipik yöntemlerden çok, daha kesin ve hassas sonuçlar veren moleküler yöntemlere (genotipik) doğru kaymıştır (Altuntaş 2011, Osmanağaoğlu 2011). Özellikle diğer yöntemlere göre daha kesin ve kısa sürede tanımlama olanağı sunan moleküler tanımlama tekniklerinden en sık kullanılanı 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi yöntemidir. Bu yöntemin diğer tanımlama teknikleri ile birlikte kullanımı, daha güvenilir sonuçların alınmasını sağlamaktadır (Dimitonova vd. 2008, Altuntaş 2011).

Bu tez çalışmasında “Şalgam suyundan laktik asit bakterilerinin izolasyonu, tanımlanması ve fenolik dekarboksilaz enzimi üreten suşların seçimi” isimli projenin ön çalışmaları (Ayhan vd. 2011) ve diğer bir yüksek lisans tez çalışması sonucunda izole edilen ve fenolik dekarboksilaz enzimine sahip olduğu saptanan 6 adet laktik asit bakteri suşu kullanılmıştır. Bu suşların gelişme parametreleri (farklı NaCl konsantrasyonlarında, farklı pH’larda ve farklı sıcaklık derecelerindeki gelişme parametreleri) ve gelişme eğrileri belirlenmiştir. Ayrıca suşların moleküler tanımlaması 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi yöntemi (Sanger vd. 1977) ile Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü ve ODTÜ Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji AR-GE Merkezi’nde gerçekleştirildikten sonra, antimikrobiyel aktivite özellikleri incelenmiştir. Çalışmadaki denemeler 2 paralel olarak yapılmış, verilerin ortalaması alınmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Laktik Asit Bakterileri ve Fermantasyonu

Laktik asit bakterileri (LAB), metabolizmaları sırasında laktozu parçalayarak laktik asit üreten mikroorganizmalar olarak tanımlanmakta olup çok eski zamanlardan beri geleneksel olarak gıdaların hazırlanmasında, depolanmasında ve silaj oluşumunda kullanılmaktadır (Tekinşen ve Atasever 1994, Yüksekdağ ve Beyatlı 2003, Altuntaş 2011, Akpınar ve Kılıç 2011).

İlk kez 19. yüzyıl sonlarında sütte fermantasyona ve koagulasyona yol açan bakteriler olarak isimlendirilen laktik asit bakterileri daha sonraki yıllarda *Lactobacillaceae* familyası içinde sınıflandırılmışlardır. Laktik asit bakterileri morfolojik, metabolik ve fizyolojik karakteristiklerine göre Gram pozitif bakteri grubunda yer alırlar. Bu gruptaki bakteriler *Sporolactobacillus inulinus* hariç spor oluşturmeyen, katalaz negatif, sitokroma sahip olmayan, aerobik olmayan ama aerotolerant bakterilerdir. Ayrıca bunlar *Pediococcus* cinsi hariç, yalnız tek düzlemde bölünen, asidi tolere edebilen, kuvvetli fermentatif olup, şeker fermantasyonu sırasında başlıca son ürün olarak laktik asit üreten, bazı istisnalar hariç, hareketsiz, kok veya çubuk şeklinde bakterilerdir. Besi içeriği zengin olan; süt, et ve sebzelerde bulunurlar (Tunail ve Köşker 1989, Çon ve Gökalp 2000, Altuntaş 2011, Kleerebezem ve de Vos 2011).

Laktik asit bakterileri fizyolojik özelliklerine göre morfolojisi, ekolojisi ve özellikle de optimal üreme sıcaklıkları göz önüne alındığında *Thermobacterium*, *Streptobacterium* ve *Betabacterium* şeklinde üç alt gruba ayrılmaktadır (Ehrmann ve Vogel 2005, Yörük ve Güner 2011).

Günümüzde gelişen moleküler biyoloji teknikleri, özellikle 16S rDNA dizi analizleri sonuçlarının daha doğru olduğunu, dolayısıyla fenotip temelli sınıflandırmanın uygun olmadığını gözler önüne sermektedir (Dinçer vd. 2010).

Fermantasyon, mikroorganizmaların keşfinden çok daha önce kullanılmaya başlanmış ve bu yüzden proses gizemini uzun zaman korumuştur. Mikroorganizmaların keşfiyle izole edilmiş ve doğru tanımlanmış kültürlerin kullanımı, ürünlerin ve fermantasyon proseslerinin geliştirilmesine de imkân sağlamıştır (Hansen 2002).

Fermantasyon ile gıda üretimi ilk zamanlar, hammadde içerisinde doğal olarak bulunan mikrofloranın gelişmesine bağlı olarak kendiliğinden meydana gelen fermantasyona dayanmaktaydı. Son ürün kalitesi ise, hammaddenin mikrobiyel yüküne bağlıydı. Seçilmiş starter kültürlerin doğrudan hammaddeye eklenmesi, fermantasyon prosesi ve son ürün standardize edilmesi üzerinde yüksek kontrol sağlayarak, fermente gıda prosesinde bir dönüm noktası olmuştur (Leroy ve De Vuyst 2004).

Kontrollü fermantasyonlar, fermantasyonu hemen başlatabilmek, fermantasyonun süresini kısaltmak ve daha fazla asit üretmek için saf laktik asit bakteri kültürleri ilavesiyle gerçekleştirilmektedir. Kontrollü fermantasyonda en önemli faktör starter olarak kullanılacak mikroorganizmanın çeşididir (Özçelik ve İç 1996, Harris 1998).

Laktik asit bakterileri gıdaların ve hafif alkollü içeceklerin üretiminde uzun yıllardır kullanılmakla birlikte, özellikle son yıllarda çok çeşitli fermente ürünlerin üretiminde rol oynayan en önemli endüstriyel mikroorganizmalar olarak bilinmekte (Batish 1997) ve starter kültür olarak kullanılabilirler. Starter kültür, fermente bir ürün elde etmek üzere, gıdanın fermantasyon prosesini hızlandırmak veya yönlendirmek amacıyla hammaddeye eklenen, en az bir mikroorganizmanın çok miktarda hücrelerini içeren mikrobiyal preparat olarak tanımlanabilir. Starter olarak laktik asit bakterileri, en başta laktik asit olmak üzere, organik asit üretimi yaparak hammaddenin hızlı bir şekilde asitleşmesini sağlarlar. Ayrıca laktik asit bakterilerinin ürettiği asetik asit, etanol, aroma bileşikleri, bakteriyosinler, ekzopolisakkaritler ve bazı enzimler de ortama salınır (Leroy ve De Vuyst 2004).

Durlu-Özkaya vd. (2005) laktik asit bakterilerinin gıda güvenliği ve reolojisi açısından da önemli olduğunu, üretilen antimikrobiyal bileşiklerin, bazı patojen ve bozulmaya neden olan mikroorganizmaları inhibe edebildiğini ve gıdaların korunmasında kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Süt ürünlerinde LAB starterlerinin büyük çoğunluğu rutin olarak kullanılırken, et ve bazı fermente gıdalar ile sebze fermantasyonlarında sadece birkaç kültür kullanılmaktadır. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus brevis* sebze sularının fermantasyonunda en sık kullanılan starter kültürlerdir.

Şarap üretiminde *Oenococcus oeni* en önemli türdür (Geredeli ve Anlı 2005) ve starter kültür olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak *Lb. plantarum*'dan salatalık, lahana ve zeytin gibi ürünlerinin fermantasyonunda da ticari starter olarak yararlanılmaktadır (Ruíz-Barba vd. 1994, Rodriguez vd. 2009). Zeytin fermantasyonunda zeytinin doğal florasında bulunan LAB'ın önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* veya *P. pentosaceus* gibi diğer LAB türlerinin de izole edilmesine rağmen, aslında *Lb. plantarum* ve *Lactobacillus pentosus* zeytin fermantasyonunda kullanılan asıl sorumlu starterlerdir (Ruíz-Barba vd. 1994).

2.2 Tanımlanmış Kültürler ve Önemi

Günümüzde starterleri, bileşenin suşları ve türleri belirli olan anlamında, “tanımlanmış starterler” ve “tanımlanmamış starterler” olarak sınıflandırmak doğru olur (Mullan 2001).

Tanımlanmış kültürler; tek başına veya karışım olarak kullanılan, özellikleri fizyolojik, biyokimyasal ve genetik olarak belirlenmiş suşlar içerir. Tanımlanmış suşların birçoğu yabani kültürlerden izole edilmiştir (Hebert vd. 2000). Bu suşlar istenen özellikleri elde etmek üzere karakterize edilmiş ve ayrıştırılmışlardır. Bu sayede yüksek verimlilik, kalite ve güvenlik elde edilmesi için üretimde değişiklik yapılmasına imkân tanımaktadırlar.

Lb. plantarum; laktoz, sükroz, glikoz ve früktozun laktik aside dönüşümünde kullanılan en avantajlı ve en yaygın kullanılan bakteridir. Çünkü sadece yüksek dönüşüm oranlarındaki şekerleri değil aynı zamanda bitkisel ürünlerde bulunan pektin gibi diğer bileşikler de kullanır. *Lb. plantarum*; sucuk, sosis, salatalık turşuları ve silaj gibi fermente ürünlerin üretiminde starter kültür olarak sıklıkla kullanılır (Demir vd. 2006).

Fermente sebze sularının istenilen özelliklerinin elde edilmesinde, gerçekleştirilecek fermentasyonda kullanılacak uygun starter kültürün belirlenmesi önemlidir (Demir vd. 2004). Starter kültür olarak ortama iyi adapte olabilen ve yeterli düzeyde laktik asit oluşturabilen bir kültür seçilmelidir. Ortama kısa sürede hakim olup, iyi asitlik geliştirmesi, doğal fermentasyonlarda baskın hale geçebilmesi, heksozlardan karbondioksit oluşturmaması, havuç sularında iyi bir tat ve aroma gelişimini sağlaması gibi olumlu özelliklerinden dolayı *Lb. plantarum*, havuç ve hıyar fermentasyonları için önerilen bir laktik asit bakterisidir (Tangüler 2010).

Fermente bitkisel ürünlerin fermentasyonunda en başta *Lb. plantarum* olmak üzere *Lb. acidophilus*, *Lb. bavaricus*, *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus*, *Lb. salivarius*, *Lb. xylosus*, *Lb. lactis* ve *Leu. mesenteroides* gibi türler starter kültür olarak kullanılmaktadır (Özler ve Kılıç 1996).

Arslan vd. (2005) kontrollü şartlarda ürettikleri şalgam sularından; pH'nın düşüşü, laktik asit üretimi ve kabul edirliliği yüksek duyusal özellikleri sebebiyle en uygun olanının starter kültür (*Lb. plantarum*) kullanılarak üretilen şalgam suyu olduğunu bildirmişler ve bu şekilde kısa sürede, kaliteli şalgam suyu üretilebileceğini ileri sürmüşlerdir.

Süt ürünlerinde LAB starterlerinin büyük çoğunluğu rutin olarak kullanılsa da et ve bazı fermente gıdalar ile sebze fermentasyonlarında sadece birkaç kültür kullanılmaktadır. *Lb. plantarum* ve *L. brevis*, sebze sularının fermentasyonunda en sık kullanılan starter kültürlerken, şarap üretiminde *Oenococcus oeni* en önemli LAB'dır ve starter kültür olarak kullanılır. Bunlara ek olarak *Lb. plantarum* salatalık, lahana ve zeytin gibi bitki kökenli gıda ürünlerinin fermentasyonunda ticari starter olarak kullanılmaktadır (Ruíz-Barba vd. 1994, Rodriguez vd. 2009).

2.3 Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyel Özellikleri

LAB, bozulma etmeni ve patojenik mikroorganizmalar üzerinde bakteriyostatik veya bakterisit etki gösterirler. Fermente gıdalarda starter kültür olarak kullanılabildikleri gibi antimikrobiyel özelliğe sahip metabolitler üretmeleri nedeniyle koruyucu kültür olarak

kullanılabilirler (Frank vd. 1977, Daeschel 1989, Kılıç 1990, Ayhan ve Coşansu 1998, Altuntaş vd. 2009).

Mikrobiyel bozulmalara karşı ekonomik kayıpların önlenmesi, gıda kaynaklı hastalıkların azaltılması ve hızla artan dünya nüfusunun gıda gereksinimlerinin karşılanmasında, endüstride kullanılan muhafaza yöntemlerine duyulan ilgi artmaktadır (Galvez vd. 2008). Biyomuhafaza olarak ifade edilebilecek bu yöntem, uzun raf ömrü ve güvenli gıdayı, kontrollü mikroflora ve/veya antibakteriyel maddelerle sağlama olanağı sunmaktadır (O’Keeffe ve Hill 1999, Kuleaşan 2002).

İnsanların sağlıklı büyüme ve gelişmelerinde, tükettikleri gıdaların güvenilir olması oldukça önemlidir. Her geçen gün tüketici talebine bağlı olarak yeni gıdalar geliştirilmektedir. Bu gıdaların birçoğunda bildiğimiz temel mikrobiyolojik özelliklerin geliştirilmesi ve muhafaza sürelerinin uzatılması için çeşitli katkı maddeleri kullanılmaktadır (O’Keeffe ve Hill 1999). Gıdalarda çeşitli kimyasal maddelerin ilave edilmesi yoluyla dayanımlarının artırılması tekniği, mikroorganizmalarla gıdaların bozulması arasındaki ilişkinin kanıtlanmasından çok daha eski tarihlere dayanmaktadır. Gıda çeşitliliğinin artması ve buna paralel olarak gıda bozulmalarında farklı türlerin önem kazanması, koruma amacıyla gıda içerisine katılan kimyasal maddelerin de sayısında bir artışa yol açmıştır. Günümüzde kullanılan toplam 3000 civarındaki katkı maddesinin yaklaşık 600 adedi gıdaların mikrobiyolojik bozulmadan korunması amacıyla ilave edilmektedir (Anonymous 2006). Ancak bu katkıların bazılarının sağlıksız oluşu ve kullanım oranına bağlı olarak kanserojenik ve toksik etki gösterebilmeleri, doğal ve güvenilir katkıların elde edilmesini ve kullanımını önemli hale getirmiştir (O’Keeffe ve Hill 1999).

Biyokoruma, gıdaların raf ömrünü uzatmak ve güvenliğini artırmak amacıyla gıdalara doğal mikroflora ve antimikrobiyel ürünlerin katılması anlamına gelmektedir. Biyokoruma yönteminde, doğal veya kontrollü mikroflora, laktik asit bakterileri ve/veya onların antibakteriyel ürünleri kullanılarak süt ürünlerinin raf ömrü uzatılabilmekte ve ürün güvenli hale gelebilmektedir. Biyokoruma amacıyla ilave edilen kültürler patojenleri öldürmek ve ürünün raf ömrünü uzatmak amacıyla güder (Ayhan ve Coşansu 1998, Altuntaş vd. 2010). Bu kültürlere koruyucu kültürler de denir. Koruyucu kültürler

gıdalarda doğal olarak bulunabileceği gibi sonradan da katılabilir. Koruyucu kültürler, ürünün içindeki bir patojeni veya istenmeyen bir mikroorganizmayı önleme yeteneğine ve istenilen tekstür ve aromayı elde etme durumuna göre seçilirler. Koruyucu kültürler normal depolama koşullarında ürünün duyusal özelliklerini etkilememelidir. Koruyucu kültürler; organik asitler (laktik, asetik veya propiyonik asit gibi), alkoller, karbondioksit, diasetil, hidrojen peroksit, bakteriyosinler, reuterin ve reutersiklin gibi düşük moleküllü bileşikleri üreterek istenmeyen mikroorganizmaları önlemektedir (Kılıç 1990, Kesenkaş vd. 2006).

LAB tarafından oluşturulan organik asitler, antagonistik özellikleri nedeniyle bakterilerin sitoplazma zar geçirgenliğini değiştirerek gelişmelerini inhibe ederler (Özcan ve Aran 2003). LAB metabolitleri arasında yer alan karbondioksitin anaerobik bir ortam oluşturması, hücre içi ve dışı pH değerini ve hücre zarının elektriksel potansiyelini düşürmesi sonucu antimikrobiyel etki sağlamaktadır. LAB gıdaların biyokorumasında başlıca dört şekilde kullanılırlar:

- (i) Saf kültürlerinin ortama eklenmesi,
- (ii) Bakteriyosin karışımlarının, fermantasyon sıvılarının veya kültür ortamı üzerinde geliştirilen bazı LAB'dan elde edilen ekstraktların ortama katılması,
- (iii) Saf veya yarı saf "antagonistik" metabolitlerinin ortama ilavesi,
- (iv) Bakteriyosin üreten LAB'la üretilen fermente gıdaların kullanımı.

LAB'ın koruyucu kültür olarak kullanıldığı gıdalarda kontrollü bir proses yürütülmelidir. Çünkü bazı LAB, kontrol edilmedikleri takdirde gıdaların tat, koku, renk gibi duyusal özelliklerine zarar verebilmektedirler (Geredeli ve Anlı 2005, Seçkin vd. 2010).

Holzapfel vd. (1995), mikrobiyal kontaminasyona karşı, kimyasal gıda katkılarına bir alternatif olarak, laktik asit bakteri suşlarının ortaya koyduğu antimikrobiyel aktivitenin yardımcı olabileceğini belirtmişlerdir. Messens vd. (2002) ekşi hamurda üretilen asetik asidin aromaya ve küflerin sebep olduğu bozulmanın önlenmesine katkıda bulunduğunu ortaya koymuşlardır.

Laktik asit bakterilerinin, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Enterococcus*, *Listeria* ve *Pseudomonas* cinsi mikroorganizmalara karşı da antagonistik etki gösterdikleri saptanmıştır (Frank ve Marth 1977, Harris vd. 1989, Keppler 1994).

Thomas vd. (2000) tarafından yapılan çalışmada ise peynirde *Clostridium* ssp. bakterilerin neden olduğu bozulmayı önlemek amacıyla, potasyum nitrat yerine bakteriyosin üreten bakterilerin kullanımının bir alternatif olarak ele alınabileceği belirtilmiştir (Leroy ve De Vuyst 2004).

Ayhan vd. (1999) yaptıkları çalışmada, Türk sucuklarının üretimi ve olgunlaştırılması sırasında tüm fermantasyon süresince oluşan biyojen amin miktarları üzerine *Lactobacillus sake*, *Pediococcus pentosaceus*'u içeren starter kültürün etkilerini araştırmışlardır. Starter kullanımının biyojen aminlerden tiramin oluşumunu etkilemediği, buna karşın putresini inhibe ettiğini saptamışlardır.

Teixeira (1999), *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'un ürün üzerindeki koruyucu etkisinin yalnızca laktik asit ve hidrojen peroksit üretimine değil, ürettiği antimikrobiyel bileşiğe (bakteriyosin) de bağlı olduğunu belirtmiştir. Bulgarican adlı bu bileşik Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı inhibe edici etki göstermiştir. Ayrıca *Staphylococcus* ve *Clostridium*'u inhibe eden bazı bileşikler de bulunmuştur (Erkuş 2007).

Abdel-Bar vd. (1987) *L. bulgaricus*'un laktik asitten farklı bir antimikrobiyel madde ürettiğini ve bu maddenin Gram pozitif bakterilerden *S. aureus*'a, Gram negatif bakterilerden de *Pseudomonas fragilis*'e etkili olduğunu tespit etmişlerdir.

İşleroğlu vd. (2008) yöresel peynirden antimikrobiyel aktiviteye sahip laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve tanımlanması için yaptığı çalışmada *Enterococcus faecalis* tarafından antimikrobiyel madde üretildiğini ve bu maddenin *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* ve *Listeria monocytogenes*'e karşı inhibitör aktiviteye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Ancak aynı maddenin *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus*'a karşı inhibitör etkisinin

olmadığı sonucuna varmışlardır. Antimikrobiyel aktivitenin asitlik ve hidrojen peroksitten kaynaklanmadığını; papainle muamele edildiğinde aktivitesini kaybetmesi sonucunda bileşiğin protein tabiatında olduğunu görmüşlerdir.

Özkalp vd. (2007) çiğ süt ve geleneksel süt ürünlerinden izole ettikleri 50 adet *L. lactis* suşlarından 24 tanesinin Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğunu ve 24 adet suştan 3 tanesinin (*L. lactis* subsp *lactis* MBLL1, MBLL9 ve MBLL57) bakteriyosin ürettiğini saptamışlardır. Bakteriyosin üreten suşların peynir yapımında starter olarak kullanılabileceğini hatta peynirin olgunlaşmasını hızlandığını açıklamışlardır.

Fonksiyonel starterlerin ideal laboratuvar şartlarında gösterdiği pozitif etkiler, gıdalarda aynı şekilde görülemeyebilir. Örneğin bazı laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosinler, in vitro kompleks ortamda gıdaların bozulmasına neden olan ve/veya patojen etkilere sahip bakterilere karşı etkinlik gösterirken, laktik asit bakterileri gıda ortamında geliştirildiğinde inhibe edici etki gösterememektedir. Bu durum bakteriyosin moleküllerinin, gıda matrisi içerisindeki yayılımının kısıtlı olmasına ve bazı belirli gıda öğeleri tarafından inhibe veya pasifize edilmesine dayandırılmaktadır (Leroy ve De Vuyst 2004).

Aslım ve Beyatlı (2000) yaptıkları çalışmada laktik asit bakterilerinin oluşturduğu bazı metabolik ürünlerin ayrı ayrı ve kombine halde patojen ve kontaminant mikroorganizmalar üzerinde etkilerini belirlemişlerdir. Çalışma için 5 adet *Lactobacillus bulgaricus* ve 5 adet de *Streptococcus thermophilus* suşu kullanılmıştır. Suşların oluşturduğu metabolik ürünlerin (laktik asit, hidrojen peroksit, asetaldehit, diasetil) *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* üzerine inhibisyon etkisi olduğu, yoğurt starter kültürleri tarafından oluşturulan metabolitler arasında sadece laktik asitin inhibisyon etkisi olduğu, asetaldehit, diasetil ve H₂O₂'in yine bu bakteriler tarafından üretilen hatta bunun çok üzerindeki miktarlarda bile inhibisyon etkilerinin olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Geredeli ve Anlı (2005) laktik asit bakterilerinin şarapta tat, koku ve renk değişikliklerine neden olmalarının yanı sıra, patojenlerin gelişmesini zorlaştırarak mikrobiyel kararlılığın sağlanmasında da önemli rol oynadığını; bu durumun da besin rekabeti ve antibakteriyel maddelerin sentezlenmesinden kaynaklandığını açıklamışlardır.

2.4 Laktik Asit Bakterilerinin Biyokimyasal ve Moleküler Yöntemlerle Tanımlamaları

2.4.1 Laktik asit bakterilerinin biyokimyasal yöntemlerle tanımlamaları

Biyokimyasal tanımlama, moleküler biyolojik tanımlamalardan önce potansiyel bazı izolatların sayısal olarak azaltılması ve tasarlanan primerin istenmeyen bölgeye bağlanabilme olasılığının ortadan kaldırılması açısından önemlidir (Huys vd. 2003).

Biyokimyasal tanımlama yapılmadan planlanan moleküler tanımlamalar için kullanılacak primerler, çok sayıdaki kolonilerden bazılarında yanlış tanımlamaya sebep olabilmektedir. Bu yanlış primerlerin spesifik olmamalarından ziyade PCR şartlarındaki farklılıktan kaynaklanabilir. Dolayısıyla, moleküler tanımlama ile biyokimyasal tanımlamalar birlikte değerlendirildiğinde daha etkin bir tanımlama yapılabilmektedir. Sonuç olarak araştırma materyalini oluşturan iki farklı tür, biyokimyasal ve doğrulaması moleküler yöntem ile tanımlanarak net bir şekilde belirlenmiştir. Moleküler tanımlama ile elde edilen bilgiler, literatür bilgileriyle uyumlu olduğu görülmektedir (Tabasco vd. 2007).

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

bölgeleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) metodunun birbirini tamamlayan çalışmalar olduğu sonucuna varmışlardır.

2.4.2 Laktik asit bakterilerinin moleküler yöntemlerle tanımlamaları

Biyokimyasal testler LAB tanımlamasının ilk aşamasında yararlı görülse de, çok daha kesin sonuca ulaşabilmek için moleküler yöntemler önerilmektedir. (Morishita ve Shiromizu 1986, Schillinger ve Lücke 1987, Iversen 2006, Osmanağaoğlu 2011).

Fenotipik tekniklerin yararlı olduğu kanıtlanmış olmasına rağmen, benzer fenotiplere sahip suşların her zaman birbiriyle yakından alakalı genotiplere sahip olmadığı bilinmektedir. Ayrıca fenotipik metotların tekrarlanabilirliği ve ayırt ediciliği zayıftır. Doğal habitatlardan izole edilen yabancı suşlar fenotipik değişkenlik gösterir ve “atipik” olarak sınıflandırılır (Miller vd. 1996). Fenotipik tanımlama yalnız başına laktobasillerin tanımlanması için yeterli bir yöntem değildir. Dolayısıyla 16S rRNA gen dizisindeki farklılıklar kullanılarak PCR ile daha güvenilir tanımlama yapılabilmektedir (Couret vd. 2003, Tabasco vd. 2007, Tokatlı 2013).

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

Moleküler tanımlama teknikleri; plazmid profil analizleri, kromozomal DNA'nın restriksiyon endonükleaz analizi, Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR), Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA-PCR; RAPD-PCR) ve Vurgulu Alan Jel Elektrofrezisi (Pulsed Field Gel Electrophoresis; PFGE) olarak sıralanabilir. Bu tekniklerin her birinin ayırım gücü, tekrarlanabilirlik ve tiplendirebilirliklerine göre avantajları ve dezavantajları vardır (Ünal ve İstanbulluoğlu 2009).

PCR ilk kez, Kaliforniya'da Berkeley yakınlarında Cetus firmasında çalışan Kary Mullis tarafından bulunmuştur. PCR, kalıp DNA üzerindeki belirli bir gen bölgesinin ısıya dayalı olarak tekrar eden reaksiyon döngüleriyle ve enzimler aracılığı ile in vitro koşullarda çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir (İzmirli 2010).

PCR'a dayalı metotlardaki gelişimler laktik asit bakterilerinin hızlı ve doğru şekilde tanımlanmasında yeni alternatifler oluşturmuştur. Moleküler biyoloji metotlarının kullanımı ile 16S rRNA'yı kodlayan sekansların karşılaştırılması (Stiles ve Holzaphel 1997) taksonomik düzenlemelerde önemli yer tutmuştur (Dykes ve Holy 1994, Giraffa ve Neviani 2000).

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

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

16S, 23S ve 5S rRNA genleri bakteriyel kromozom üzerinde bir operonla birlikte düzenlenmiştir ve 16S ile 23S rRNA arasındaki ayırıcı bölgenin baz dizi sırası türe özgü olup çok değişken bir yapıya sahiptir. 16S rRNA bölgesinin spesifik primerler kullanılarak PCR'da çoğaltılması ve baz dizisinin belirlenmesi ile (500-750 bp) ayırıcı bölgenin dizi sırası tespit edilmekte, dolayısı ile türlerin %97 oranında tanımlanması sağlanmaktadır (Stackebrandt ve Goebel 1994). 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi yöntemi ile bakterilerin tanımlanması; DNA izolasyonu, 16S ileri ve 16S geri primerleri kullanılarak izole edilen DNA'nın PCR'da çoğaltılması, çoğaltılan DNA'nın baz dizi

sirasının belirlenmesi ve bu sıranın, veri tabanında bulunan mikroorganizmalara ait baz dizi sıraları ile karşılaştırılarak isimlendirilmesi aşamalarından oluşmaktadır (Sanger vd. 1977, Brosius vd. 1978, Kullen vd. 2000, Çakır 2003, Balcazar vd. 2007).

2.5 Laktik Asit Bakterilerinin Gelişmesine Sıcaklık, pH ve Tuzun Etkisi

Toqeer vd. (2006) sıcaklığın laktik asit bakterilerinin gelişmeleri üzerine etkisi üzerine yaptığı bir araştırmada *S. cremoris*, *L. lactis* ve *L. acidophilus* ile çalışmıştır. Araştırmada her suşun farklı zaman aralıklarındaki asitlikleri ve pH değerleri arasında ters orantılı bir ilişki olduğunu ayrıca gelişme sıcaklığının pH ve asitlikle ilişkili olduğunu göstermiştir. Tüm suşlar, kendi optimum sıcaklıklarında (*L. lactis* ve *L. acidophilus* için 37 ila 40°C, *S. cremoris* için 37°C) hızla gelişmişlerdir.

Hofvendahl vd. (1999) sıcaklık ve pH'nın *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435'in gelişmesi ve ürün oluşumu üzerine etkilerini incelemek amacıyla maltozun 30 ve 37°C'de fermantasyonunu incelemişlerdir. pH 6,5'da sıcaklık 30°C'den 37°C'ye çıkarıldığında maltozun fermantasyonu sonucu oluşan laktik asit, formik asit, asetik asit ve etanol oluşumunun %23 arttığını görmüşlerdir. 30°C'de pH 6,5'dan 5'e düşürüldüğünde ise ürün oluşumunun %65 arttığını saptamışlardır. Optimum gelişmenin ise 35°C de 5,75 pH'da olduğu anlaşılmıştır. Optimum gelişme ve ürün oluşumu dikkate alındığında, pH değişiminin sıcaklık değişiminden daha etkili olduğu sonucuna varmışlardır.

Şarap fermantasyonu sırasında bakteriyel gelişmeyi etkileyen en önemli faktörler pH, sıcaklık ve etil alkol miktarı olarak sıralanabilir. Bakterilerin yüksek pH değerlerinde (pH>3,5), %13'den az etil alkol konsantrasyonunda ve 19-20°C sıcaklıkta gelişme oranı yüksekken; 3'ün altındaki pH değerlerinde, %14'den fazla etil alkol konsantrasyonunda ve 17°C'den düşük sıcaklıklarda gelişmeleri hemen hemen sıfıra yakındır (Lonvaud-Funel 1995, Geredeli ve Anlı 2005).

4 ila 5 arası pH değerlerinde genel olarak laktik asit bakterileri gıda kaynaklı bakterilerden daha rekabetçidir ve gıda fermantasyonlarında kullanımları büyük oranda bu özelliğe dayanır. Ancak farklı grup ve gruplarda yer alan türlerin asit toleransları farklılık gösterir. Örneğin sıvı kültürlerin son pH'sı *Carnobacterium* ve *Tetragenococcus* için her zaman 4,6'nın üzerindeyken *Lactobacillus* ve *Pediococcus* türleri için 4,5'un altındadır. Ayrıca asitlere gösterdikleri toleranslarda da farklılık vardır ve genel kabule göre laktobasiller; lökonostoklardan, streptokoklardan ve laktokoklardan daha dayanıklıdır (Lücke 1996).

Rao vd. (2004) yaptığı çalışmada pH ve tuz konsantrasyonu arasında önemli bir etkileşim olmadığını ve pH'ın test edilen tuz konsantrasyonu aralığında (% 0-30) glukoz fermantasyonu için en önemli etmen olduğunu saptamışlardır.

Lee (2010) soya fasulyesi ezmesi (doenjag) üzerinde laktik asit bakterilerinin farklı pH ve tuz konsantrasyonlarındaki gelişmelerini plate count yöntemi kullanarak incelemiştir. Gelişimin pH 1 ila 7 arasında artarken, pH 7 ila 14 arasında azaldığı belirlenmiştir. pH 14 de ise gelişme olmadığını görmüştür. Optimum gelişimin pH 7 iken olduğu sonucuna varmıştır.

Laktik asit bakterileri yüksek tuz konsantrasyonlarında da gelişmelerine sürdürebilmektedirler (Rao vd. 2004). Suyu bağlama özelliği ve iyonik özellikleri sayesinde tuz, starter kültürün metabolizmasını etkiler. Genellikle laktik asit bakterilerinin gelişmesinin %1-2 oranında NaCl varlığında, normal gelişime göre daha iyi olduğu bilinmekteyse de, %3 ve üzeri NaCl konsantrasyonlarında inhibitör etki gözlenmektedir (Leroy ve De Vuyst 1999). Cai vd. (1997) ise yaptıkları çalışmada, NaCl'nin silajlardaki aerobik bozulma üzerinde etkisinin olmadığını görmüşlerdir.

Laktik asit bakterileri arasında homofermantatif laktik asit bakterileri, heterofermantatif olanlara göre tuza daha dirençlidirler. Türler arasında tuza dirençlilik durumu çeşitlilik göstermektedir (Stiles ve Holzapfel 1997).

TS 11149 Şalgam Suyu Standardı'na göre satışı hazır şalgam suyunda %NaCl değerleri 2'den azdır (TSE 2003). Canbaş ve Deryaoğlu (1993) ise fermantasyonu tamamlamış şalgam sularında % NaCl değerlerinin 1,37-1,63 arasında olduğunu bildirmişlerdir.

Rao vd. (2004) *Lactobacillus* suşlarının tuza karşı direnci ve farklı pH değerlerinde gelişme durumlarını incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre; *Lactobacillus* suşlarının %8 tuz konsantrasyonunda glikozu fermente edebildiği ve %10 konsantrasyonda bile laktik asit üretebildiğini görmüşlerdir. Ayrıca, suşlara ve parametrelere bağlı olarak, maksimum spesifik gelişme oranının, hücre biyokütlesinin ve laktik asit üretiminin %1,3 veya 2,5 tuz konsantrasyonlarında gerçekleştiği sonucuna varmışlardır.

Lactobacillus suşları starter olarak, yüksek tuz konsantrasyonlarında tercih edilmesi durumunda, %4 tuz konsantrasyonuna kadar lag fazı olmadan gelişebilmektedir. Bu durumda %4 tuz konsantrasyonu ve 6-6,6 pH uygun koşul olarak düşünülebilir. Daha elverişsiz şartlarda bile bozulma yapan mikroorganizmaların gelişmesini engelleyebilecek etkili bir laktik asit üretimi gerçekleşebilmektedir (Rao 2004).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

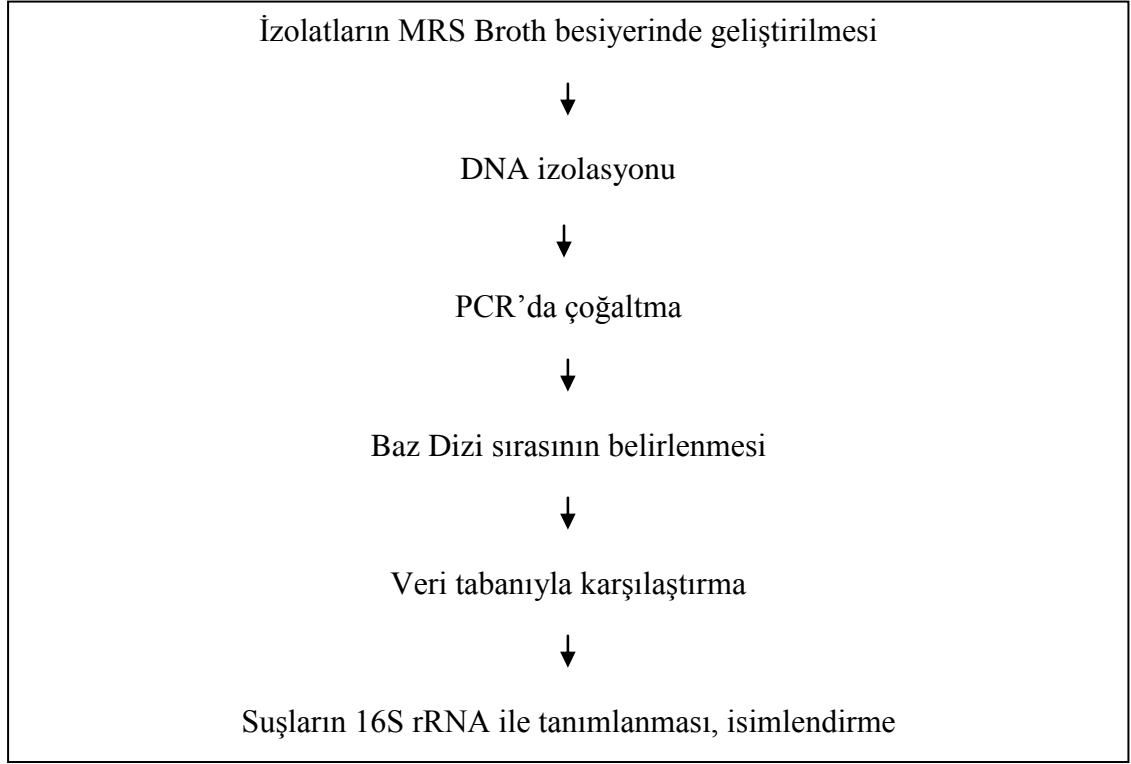
3.1 Materyal

Araştırmada BAP kapsamında yürütülen 12B4343005 numaralı projenin ön çalışmaları (Ayhan vd. 2011) ve diğer bir Yüksek lisans tez çalışması sonucunda izole edilen ve fenolik dekarboksilaz enzimine sahip olduğu saptanan GK1, GK3, GK5, GK11, GK12 ve GK13 nolu 6 adet izolat (Okçu 2011) kullanılmıştır. Denemelerde 24 saat süreyle MRS sıvı besiyerinde (de Man Rogosa Sharpe medium, Merck) aktifleştirilmiş izolatlar ile çalışılmıştır. İzolatların 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi yöntemiyle moleküler tanımlanması yapıldıktan sonra antimikrobiyel aktivite denemelerinde *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 10832 ve *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 suşları kullanılmıştır. Bu suşlar, Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarında yürütülen ve Ankara Üniversitesi BAP Müdürlüğü tarafından desteklenen 12B4343005 numaralı projeden sağlanmıştır. Test bakterilerinin tamamı “Tryptic Soy Broth” (Merck) besiyerinde geliştirilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan bakterilerin stok kültürleri %20 gliserol içeren ilgili besiyerlerinde -20°C’de saklanmış ve her analiz öncesinde izolatlar iki pasaj halinde aktifleştirildikten sonra kullanılmışlardır. Denemeler 2 paralelli olarak yürütülmüştür.

3.2 Yöntem

3.2.1 Laktik asit bakterinin 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi yöntemi ile moleküler tanımlanması

Çalışmada; şalgam suyundan izole edilmiş fenolik dekarboksilaz enzimine sahip olduğu saptanan 6 adet izolatın (Okçu 2011) moleküler tanımlanması aşaması 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi yöntemi (Sanger vd. 1977) ile Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsünde iki kez tekrarlanarak doğrulanmıştır. Şekil 3.1’de izolatların tanımlanmasında izlenen aşamalar görülmektedir. Buna göre; moleküler tanımlama aşamasında ilk olarak bakteriyel DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1 İzolatların moleküler tanımlanmasında izlenen aşamalar

DNA izolasyon aşaması EK 2’de belirtildiği gibi yapılmıştır. Moleküler tanımlama sırasında, bakteriyel genomik DNA izolasyonu amacıyla Qiagen DNeasy Blood&Tissue Kit kullanılmıştır.

DNA izolasyonundan sonra DNA’lar, öncelikli olarak %1’lik agaroz jelde kontrol edilmiştir. Agaroz jel elektroforez aşaması EK 4’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra saflık ve miktar değerlerinin belirlenmesi için NanoDrop ND-1000 spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır.

Tez çalışmasında PCR denemelerinde Sanger yöntemi (1977) kullanılmıştır. Saflık ve miktarı kontrol edilen bakteriyel DNA, PCR’da çoğaltılmış ve ardından baz dizi sırası tespit edilmiştir. Bilindiği gibi PCR 3 aşamalı bir yöntem olup; DNA’nın; çift sarmallı DNA’dan tek sarmallı DNA’ya dönüştürülmek üzere denature edilmesi; oligonükleotit primerlerin, hedef DNA’daki tamamlayıcı bölgelere bağlanması; son olarak DNA’nın,

DNA polimeraz aktivitesi süresince nükleotit eklenmesi ile primerlerden uzatılması ve bunun sonucunda çift sarmallı ürünler oluşması şeklindedir.

DNA çoğaltımı ve PCR optimizasyon çalışmaları için Biometra ve MJ Research Thermocycler cihazları kullanılmış ve PCR optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. PCR'da kullanılan reaktifler; 15-200 ng DNA (2 µl) , 10 pmol ileri (forward) primer (2 µl), 10 pmol floresan işaretlenmiş ters (revers) primer (2 µl), 2,5 mM toplam dNTP (1 µl), 0.5 unit Go Taq DNA Polymerase (0,6 µl)(Promega), 25 mM MgCl₂ (2,4 µl) , 10 µl buffer 5x buffer olacak şekilde toplam 50µl PCR karışımı şeklinde hazırlanmıştır.

PCR aşamasında kullanılan primerler:

16S rDNA Primerleri

F→AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG

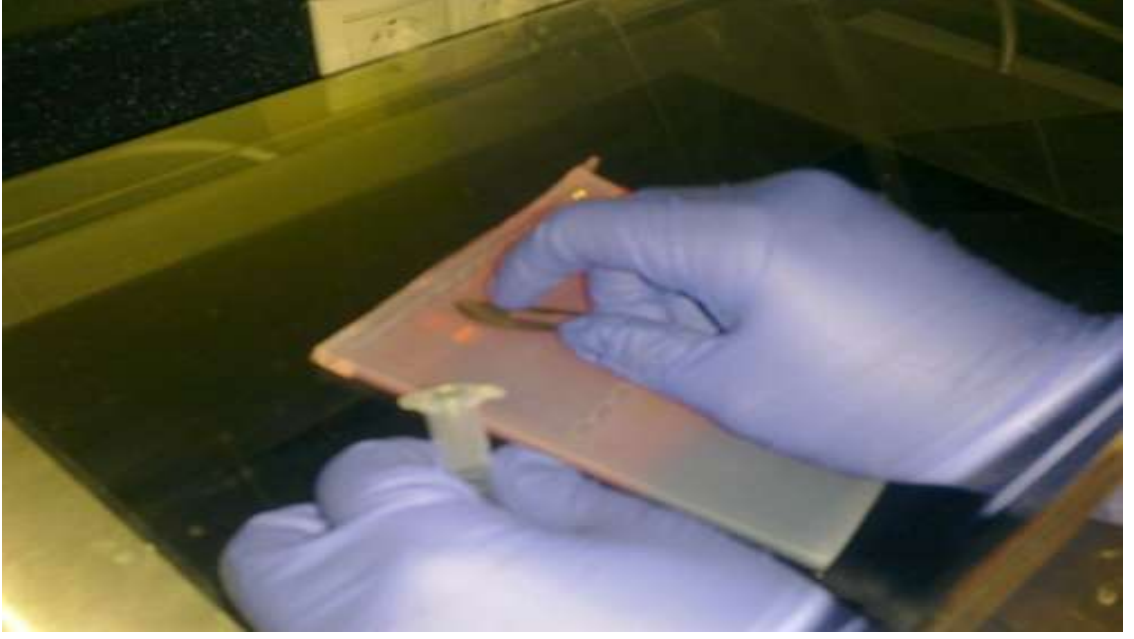
R→CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT (Beasley and Saris 2004)

T_m: 55 °C

DNA çoğaltımı için kullanılan PCR programı

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

PCR sonrasında DNA'lar agaroz jelde yürütülmüştür. Daha sonra görünen bantlar kesilip Promega kit yardımıyla saflaştırılmıştır. PCR sonrası saflaştırma işlemi Ek 5'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

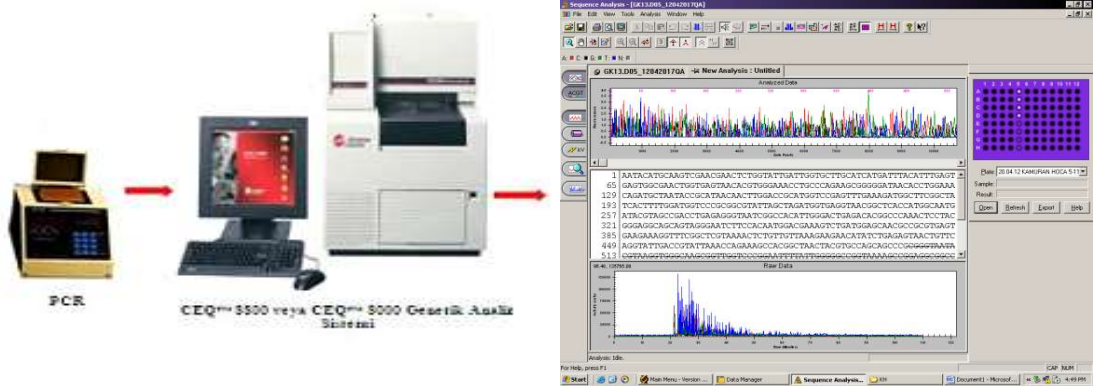


Şekil 3.2 PCR sonrası agaroz jelden DNA'nın kesilerek saflaştırılması

Saflaştırılan PCR ürünleri 5µl AB Gene Plate'e alınmıştır. Seal ile iyice kapatıldıktan sonra PCR'da 94°C'de 4 dakika denatüre edilmiştir. Bu sürenin sonunda hemen buz üzerine alınıp soğutularak, 1500 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bu aşamanın ardından saf DNA örnekleri sekans PCR aşamasına tabi tutulmuş olup PCR protokolü (dizi analizi) EK 6'da belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

Sekans PCR ürünlerinin temizlenmesi işlemi EK 7'de belirtildiği şekilde yapılmıştır. PCR temizleme kiti olarak ise Agencourt CleanSEQ kit kullanılmıştır. DNA dizi analizi saflaştırması Promega; Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System ile yapılmış ve DNA dizi analizi Beckman Coulter CEQ 8000 otomatik dizi analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Dizi analizinden çıkan sonuçlar NCBI gen bankasındaki referans genomlarla eşleştirilmiştir.



Şekil 3.3 İzolatların PCR ile tanımlanması aşamaları

3.2.2 Laktik asit bakterileri ile antimikrobiyel aktivite denemeleri

Çalışmada GK1, GK3, GK5, GK11, GK12 ve GK13 nolu izolatların antimikrobiyel aktiviteleri; *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 10832 ve *Lb plantarum* ATCC 14917 test mikroorganizması olarak kullanılarak Agar Spot testi ile belirlenmiştir (Schillinger ve Lücke 1989).

Bu amaçla izolatlar MRS Broth (Merck) besiyerinde iki kez aktiveleştirildikten sonra (30°C, 24 saat) Tryptic Soy Agar (TSA, Merck) besiyerine her bir aktif kültürden nokta ekimi yapılmıştır. Petriker 30°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılarak koloni oluşması sağlanmıştır. İndikatör olarak kullanılan mikroorganizmaların Tryptic Soy Broth (TSB, Merck) besiyerindeki 18-24 saatlik aktif kültürlerinden 50 µl alınarak, içinde 45°C sıcaklıkta 8 ml yumuşak-TSA (%0,6 agar) bulunan tüplere aktarılmış ve tüp, karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra karışım laktik asit bakterisi izolatlarının kolonileri üzerine dökülmüş ve katılaşması için oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Petri kutuları 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin bitiminde koloni etrafında zon oluşumuna bakılarak sonuçlar pozitif veya negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3 Laktik asit bakterilerinin farklı sıcaklıktaki gelişmesi

İzolatların optimum gelişme sıcaklığının belirlenmesi amacıyla, MRS besiyerinde 30°C’de 24 saat inkübasyon ile geliştirilmiş aktif kültür, 10 ml MRS Broth’a %1 olacak şekilde aşılınmış ve farklı sıcaklıklarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Şalgam suyu üretiminde fermantasyon 10-35°C’de gerçekleştirildiği için inkübasyon sıcaklıkları 10, 15, 20, 25, 30 ve 37,5°C olarak seçilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerin absorbans değerleri 600 nm’de MRS besiyeri şahidine karşı UV/VIS spektrofotometrede (Shimadzu UV-1208) ölçülmüştür.

3.2.4 Laktik asit bakterilerinin farklı tuz konsantrasyonlarındaki gelişmesi

İzolatların tuza dirençliliğinin belirlenmesi amacıyla içinde farklı miktarlarda NaCl olacak şekilde 10’ar ml’lik MRS broth besiyerleri hazırlanmıştır. TS 11149 Şalgam Suyu Standardı’na göre şalgam suyunun NaCl konsantrasyonu %2 daha küçük olması gerektiğinden dolayı besiyerlerinin tuz konsantrasyonu % 1; 1,5; 2 ve 2,5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Değişik oranlarda NaCl içeren besiyerleri 100 µl aktif kültürler ile aşılarak 30°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon süresinin bitiminde kültürlerin absorbansları 600 nm’de, MRS besiyeri şahidine karşı UV/VIS spektrofotometrede (Shimadzu UV-1208) ölçülmüştür.

3.2.5 Laktik asit bakterilerinin farklı pH konsantrasyonlarındaki gelişmesi

İzolatların optimum pH konsantrasyonlarında gelişme parametrelerinin belirlenmesi amacıyla, pH’sı farklı 10 ml MRS broth besiyerleri hazırlanmıştır. TS 11149 Şalgam Suyu Standardı’na göre şalgam suyunun pH’sı 3,3-3,8 olmasından dolayı besiyerlerinin pH’sı 2; 3; 3,5, 4 ve 5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Farklı pH’daki besiyerleri 100 µl aktif kültürler ile aşılarak 30°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kültürlerin absorbans değerleri 600 nm’de MRS besiyeri şahidine karşı UV/VIS spektrofotometrede (Shimadzu UV-1208) ölçülmüştür.

3.2.6 Laktik asit bakterilerinin optimum koşullardaki gelişmesi

Çizelge 3.1’de belirtilen optimum gelişme koşullarında izolatların gelişme eğrilerinin belirlenmesi amacıyla 10 ml MRS broth besiyerine 100 µl aktif kültürler aşılanmış ve farklı sıcaklıklarda inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon esnasında sırasıyla 0., 2., 4., 6., 8., 10., 12., 24., 26., 28., 30., 32., 34., 36. saatlerde alınan örneklerin absorbans değerleri 600 nm’de MRS besiyeri şahidine karşı UV/VIS spektrofotometrede (Shimadzu UV-1208) ölçülmüştür.

Çizelge 3.1 İzolatların optimum gelişme koşulları

| İzolatlar | pH | %NaCl | İnkübasyon Sıcaklığı (°C) |
|------------------|-----------|--------------|----------------------------------|
| GK1 | 5 | 1 | 37,5 |
| GK3 | 5 | 2,5 | 37,5 |
| GK5 | 5 | 1,5 | 37,5 |
| GK11 | 5 | 1,5 | 37,5 |
| GK12 | 5 | 1,5 | 30 |
| GK13 | 5 | 1 | 30 |

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Laktik Asit Bakterilerinin 16S rRNA Gen Bölgesi Dizi Analizi Yöntemi ile Moleküler Tanımlanması

Morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerini belirlemeye yönelik olan klasik fenotiplendirme testleri her ne kadar halen kullanışlı ve vazgeçilemez yöntemler olsa da, bir suşun karakteristik özelliklerini tam olarak yansıtamamaktadır. Ayrıca geleneksel kriterler zaman alıcı, ayırım gücü ve hassasiyetleri bakımından yeterli değildir. API 50 CHL gibi biyokimyasal testlerin genellikle suşları cins düzeyinde tanımlamada daha etkin olduğu ve daha çok biyokimyasal karakterizasyonda etkili oldukları bilinmektedir (Dimitonova vd. 2008, Freitas vd. 2008). API 50 CHL sistemi çok geniş aralığa sahip birçok LAB türünde hızlı bir şekilde fermantasyon profili sergilemektedir. Buna karşın tekrarlanabilir sonuçların olmaması nedeniyle sorun teşkil ettiği ileri sürülmektedir (Kıran 2006). Dolayısıyla, bu test tek başına tanımlama için yeterli olmamakta, moleküler yöntemlerle desteklenmesi gerekmektedir.

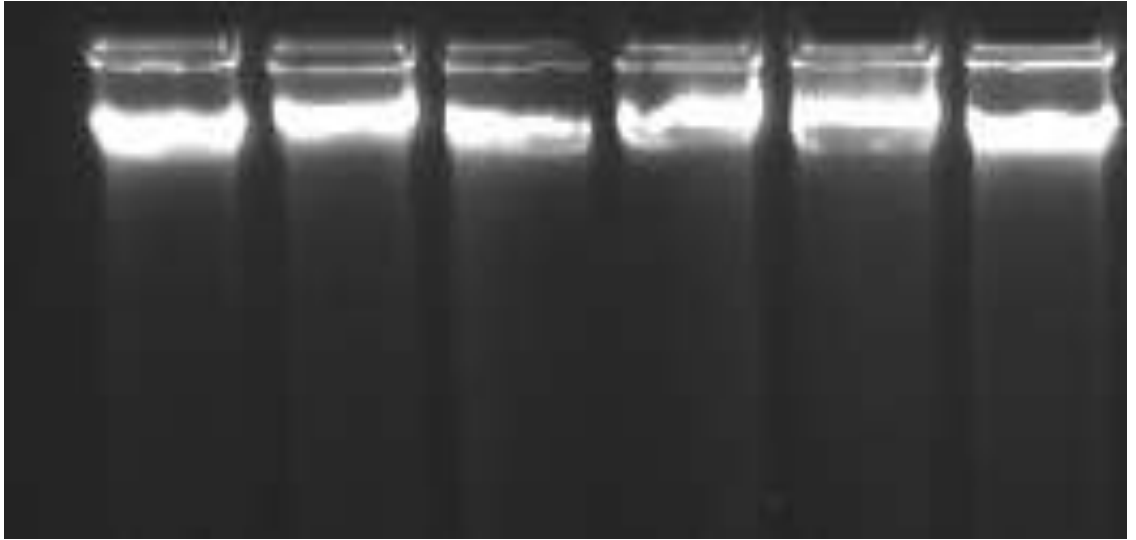
Başka bir Yüksek Lisans tez çalışması sonucunda şalgam suyundan fermantasyon süresince düzenli aralıklarla alınan örneklerden MRS (De Man Rogosa Sharpe, Merck) broth/agar besiyeri kullanılarak laktik asit bakterileri izole edilmiş (Harrigan ve McCane 1990) ve izolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleriyle API 50 CHL hızlı test kiti yardımı ile tanımlaması gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.1) (Harrigan ve McCance 1990, Temiz 2000, Carr vd. 2002, Halkman 2005).

Başka bir çalışmada tanımlanmaya çalışılan suşlardan GK1, GK3, GK5, GK11, GK12, GK13 nolu 6 adet izolatın (Okçu 2011), bu tez çalışmasında moleküler yöntemlerle kesin tanısı yapılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, günümüzde sıklıkla kullanılan 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi yöntemi (Sanger vd. 1977) tercih edilmiştir. Testin uygulanması, hizmet alımı şeklinde Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü ve ODTÜ Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji AR-GE Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.1 API 50 CHL kitleri ile tanımlama sonuçları (Okçu 2011)

| Suş Numarası | API 50 CHL hızlı test kiti sonuçları | % |
|--------------|--|------|
| GK1 | Tanımlanamadı | --- |
| GK3 | <i>Leuconostoc mesenteroides/dextranicum 2</i> | 96 |
| GK5 | <i>Leuconostoc mesenteroides/dextranicum 2</i> | 97,8 |
| GK11 | Tanımlanamadı | --- |
| GK12 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 98 |
| GK13 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 99,9 |

Çalışmada DNA bakteriyel izolasyon aşaması gerçekleştirildikten sonra elde edilen DNA'ların %1'lik agaroz jelde görüntüsü şekil 4.1'de görüldüğü gibidir.



Şekil 4.1 İzolasyon sonucu elde edilen DNA'ların %1'lik agaroz jel elektroforez görünümü

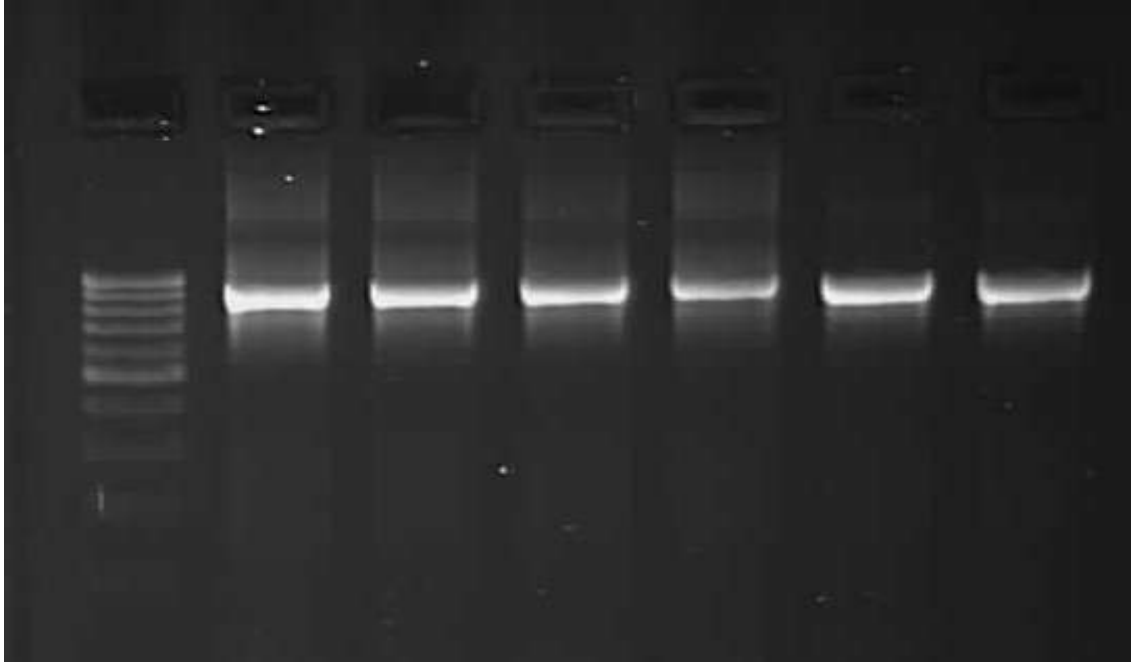
İzolatların DNA'larının saflık kontrolü ve DNA miktarı için NanoDrop DN-1000 spektrofotometrede yapılan ölçüm sonuçları çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 DNA'ların saflık ve miktar değerlerinin belirlenmesi

| İzolatlar | Miktar ng/ul | Saflık A₂₆₀/A₂₈₀ |
|------------------|-------------------------|---|
| GK 1 | 109.6 | 1.90 |
| GK 3 | 342.6 | 1.82 |
| GK 5 | 217.2 | 1.78 |
| GK 11 | 126.5 | 1.80 |
| GK 12 | 505.7 | 1.93 |
| GK 13 | 256.4 | 1.90 |

İzole edilen DNA'ların agaroz jel görüntüleri, DNA'ların bant halinde olduğunu; kırık kalıntılar ve RNA kalıntıları içermediklerini, dolayısıyla izolasyonların başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir. Diğer taraftan spektrofotometre değerlerine bakıldığında DNA miktarlarının yeterli olduğu ve saflık sınırlarının genel olarak kullanılabilir DNA'larda olması gereken 1,81–2,1 değerleri arasında bulunduğu görülmektedir.

İzolatların PCR aşamasından sonra agaroz jel görüntüsü şekil 4.2'de görüldüğü gibidir. Saflaştırılan DNA örneklerinin sekans PCR dizi analizi gerçekleştirildikten sonra, dizi analizinden çıkan sonuçlar NCBI gen bankasındaki referans genomlarla eşleştirilmiştir. İzolatların Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü ve ODTÜ Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Ar-Ge Merkezi'nden alınan dizi analizi sonuçları çizelge 4.3'de karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.2 PCR sonrası agaroz jel görüntüsü

Çizelge 4.3 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi yöntemiyle moleküler tanımlama sonuçları

| İzolatlar | Moleküler Tanımlama Sonuçları (Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü) | % ID | Moleküler Tanımlama Sonuçları (ODTÜ Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji AR-GE Merkezi) | % ID |
|-----------|--|------|---|------|
| GK1 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 98 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 99 |
| GK3 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 97 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 99 |
| GK5 | <i>Pediococcus acidilactici</i> | 97 | <i>Pediococcus pentosaceus</i> | 96 |
| GK11 | Tanımlanamadı | --- | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 98 |
| GK12 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 99 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 100 |
| GK13 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 99 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 99 |

API 50 CHL (BioMérieux, Fransa) ve bu tez çalışmasında yapılan 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi yöntemiyle moleküler tanımlama sonuçlarına göre GK12 ve GK13

numaralı izolatlar *Lactobacillus plantarum* olarak tanımlanmıştır. GK1 izolatu ise API 50 CHL ile tanımlanamazken, 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi moleküler tanımlama sonucunda bunun *Lb. plantarum* olduğu saptanmıştır. GK3 no'lu izolatu API 50 CHL ile *Leuconostoc mesenteroides/dextranicum 2* olduğu sonucuna varılırken, 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi sonucunda bu izolatu *Lactobacillus plantarum* olduğu anlaşılmıştır. Denemelerde elde edilen sonuçlara göre, GK5 için 3 farklı sonuç elde edilmiş olup; izolat API 50 CHL testinde *Leuconostoc mesenteroides/dextranicum 2*, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde yapılan moleküler tanımlama sonucunda *Pediococcus acidilactici*, ODTÜ Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Ar-Ge Merkezi'nde yapılan moleküler testinde ise *Pediococcus pentosaceus* olarak tanımlanmıştır. GK11, API 50 CHL yöntemi ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde yapılan moleküler testte tanımlanamazken, izolatu saflık kontrolü tekrar yapıldıktan sonra, ODTÜ Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Ar-Ge Merkezinde yapılan moleküler testte, GK11'in *Lactobacillus plantarum* olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada; GK1, GK3, GK12 ve GK13 suşlarının moleküler tanımlama sonuçlarının birbiri ile tür bazında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Fermente ürünlerin üretiminde fermentasyon sürerken asit miktarındaki artış bazı bakterilerin ölmesine sebep olur ve fermentasyon *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus pentosaceus* ve genellikle aside dayanıklı ve fermente sebzelerden sıklıkla izole edilen *Lb. plantarum* tarafından tamamlanır (Erten vd. 2008, Tangüler 2010). Benzer olarak İncedayı vd. (2008) sebze fermentasyonu esnasında *Lb plantarum*, *Lb. paracasei* spp. *paracasei*, *Lb. plantarum* spp. *arabinosus*, *Lb. fermentum* ve *Lb. brevis* gibi mikroorganizmaların, şalgam üretiminde ise sadece *Lb. plantarum*'un baskın mikroorganizma olduğunu belirtmişlerdir.

Angelis vd. (2001) tarafından yapılan çalışmada İtalyan peynirinden izole edilen 123 adet izolattan %11'i fenotipik testler ile tanımlanamamıştır. Buna karşı alternatif yöntem olarak PCR işlemi DNA üzerinde 16S rDNA bölgesine bağlanabilecek spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Benzer olarak GK1 suşu API 50 CHL hızlı test kiti ile tanımlanamazken 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi yöntemi ile suşun *Lactobacillus plantarum* olduğu saptamışlardır (Çizelge 4.1, Çizelge 4.3).

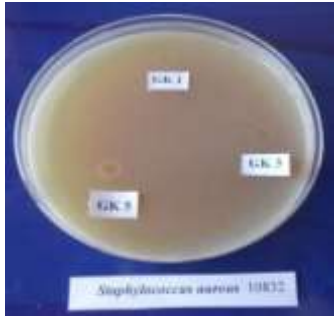
Leisner vd. (2001) Malezya'ya özgü fermente gıdalardan elde ettikleri 43 adet laktik asit bakterisini SDS-PAGE'de hücre duvarı protein profillerinin yanı sıra farklı bir metot olan 16S rRNA gen bölgelerine göre de sınıflandırmışlardır. Böylece DNA'ya bağlı yöntemlerin daha spesifik sonuçlar verdiğini kanıtlamışlardır. Araştırmacılar diğer bir çalışmada ise plazmid profillerini, SDS-PAGE profillerini ve API CHL 50 test sonuçlarını karşılaştırmışlardır. API CHL 50 sonuçlarının tür bazında tanımlanmasını diğer testler ile desteklemişlerdir. Bizim çalışmamızda da GK12 ve GK13 suşları için API 50 CHL sonuçları ile 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi yöntemi benzerlik gösterirken, GK3 ve GK5 için sonuçların farklı olduğu görülmüştür (Çizelge 4.1, Çizelge 4.3).

Son yıllardaki çalışmalar, gıda kökenli LAB'ların mikrobiyal identifikasyonları için temeli genetik özelliklerin belirlenmesine dayalı olan moleküler metotların kullanımı yönündedir. İdentifikasyonda kesin tanımlama yapabilmek için moleküler identifikasyon teknikleri, fenotipik testlere alternatif olarak geliştirilmektedir. Ayrıca laktik asit bakteri suşları arasında ürüne ve üretime uygun olanların seçiminde, bu moleküler biyolojik yöntemlerin gittikçe artan bir öneme sahip olacağı şüphesizdir.

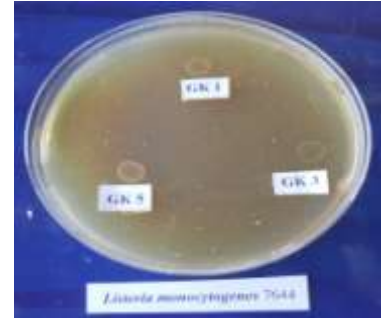
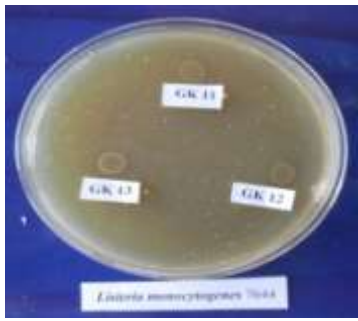
4.2 Laktik Asit Bakterileri ile Antimikrobiyel Aktivite Denemeleri

Araştırmada şalgam suyundan izole edilmiş olan 6 adet laktik asit bakterisinin antimikrobiyel aktivite testleri gerçekleştirilmiştir. Bölüm 3.2.2'de verildiği gibi LAB izolatları Agar Spot testi ile *L.monocytogenes* ATCC 7644, *S. aureus* ATCC 10832 ve *Lb. plantarum* ATCC 14917'e karşı test edilmiştir. Agar Spot testi sonuçlarına göre; inkübasyon sonrası zon oluşumu görülmemiş olup sonuçlar negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.3-4.5).

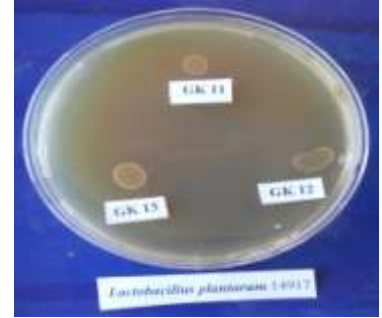
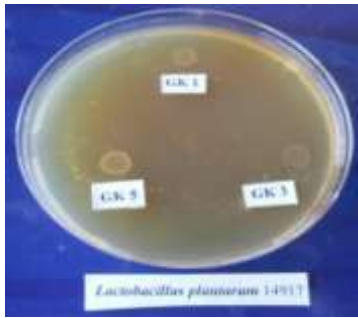
Suşların *Lb. plantarum* ATCC 14917'e karşı zon oluşturmaması, bu suşların starter olabilme kriterlerine uygunluğu açısından önemli bir sonuçtur.



Şekil 4.3 Agar Spot testine göre GK1, GK3, GK5, GK11, GK12 ve GK13 suşlarının *S.aureus* ATCC 10832'e karşı antimikrobiyel aktivite sonuçları



Şekil 4.4 Agar Spot testine göre GK1, GK3, GK5, GK11, GK12 ve GK13 suşlarının *L.monocytogenes* ATCC 7644'e karşı antimikrobiyel aktivite sonuçları



Şekil 4.5 Agar Spot testine göre GK1, GK3, GK5, GK11, GK12 ve GK13 suşlarının *Lb. plantarum* ATCC 14917'e karşı antimikrobiyel aktivite sonuçları

Özkaya (2001) salamura beyaz peynirden izole ettiği suşların antimikrobiyel aktivite özellikleri ilgili yaptığı çalışmada, izole edilen laktobasil suşlarının tamamının Gram pozitif bakterilerinin yanı sıra *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* gibi Gram negatif bakterileri de inhibe ettiğini; bu nedenle laktobasil suşlarının starter

kombinasyonlarında yer alabileceğini belirtmiştir. Laktobasil suşlarının geliştirdikleri pH ile inhibisyon etkisi arasında bir korelasyon olduğu, ancak antimikrobiyel aktivitenin asitlikten kaynaklanmadığı, bakteriyosin veya diğer H₂O₂, diasetil gibi antimikrobiyel maddelerden ileri gelebileceği sonucuna varmıştır.

Coşansu vd. (2006) Türk sucuklarından izole ettiği *Pediococcus* suşlarının, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella Typhimurium* ve *Escherichia coli*'ye karşı gösterdiği antimikrobiyel etkiler üzerine yaptığı çalışmada, 25 adet izolattan sadece 8 tanesinin *L. monocytogenes* ve *S. aureus*'a karşı antagonistik etki gösterdiğini, bununla birlikte *Pediococcus* suşlarının diğer patojenlere karşı önemli ölçüde antagonistik etkisinin olmadığını ifade etmişlerdir.

Bir diğer çalışmada Ayhan vd. (2005) 30 adet yerli *Streptococcus thermophilus* ve 24 adet *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşunu antibakteriyel aktivite açısından *M. luteus* ile karşılaştırmışlardır. *Streptococcus thermophilus*'un bazı suşlarında zayıf zon oluşumu görülürken, bazılarında antimikrobiyel etkinin daha fazla olduğunu ancak *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşlarındaki zon çaplarının daha yüksek olduğunu açıklamışlardır.

Tuncer vd. (2008) bozadan izole ettikleri laktik asit bakterilerinden 6 adedinin antimikrobiyel özelliğinin olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmalarında izolatlardan bir tanesi sadece *Micrococcus luteus*'a karşı inhibisyon zonu oluştururken, diğer 5 adet izolat birden fazla Gram pozitif test bakteriye karşı etkin olduğu ve birbirinden farklı aktivite spektrumuna sahip olduğu belirlenmiştir. Boza örneğinden izole edilen hiçbir izolat Gram negatif bakteriye karşı inhibisyon etkisi göstermemiştir. Tuncer (2009) başka bir çalışmasında ise çiğ süttten izole ettiği 142 adet lactococci izolatından 4 tanesinin indikatör bakterilere karşı antimikrobiyel aktivite gösterdiğini belirlemiştir. Denemede bu izolatlar arasından API sistemi ve 16S rDNA ile *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* olarak tanımlanan YB23'ün ürettiği bakteriyosinin Gram pozitif bakterilerin geniş bir spekturumunu inhibe ettiğini ancak nisin üreten *L. lactis* SIK83'e karşı herhangi bir aktivitenin olmadığını tespit etmiştir.

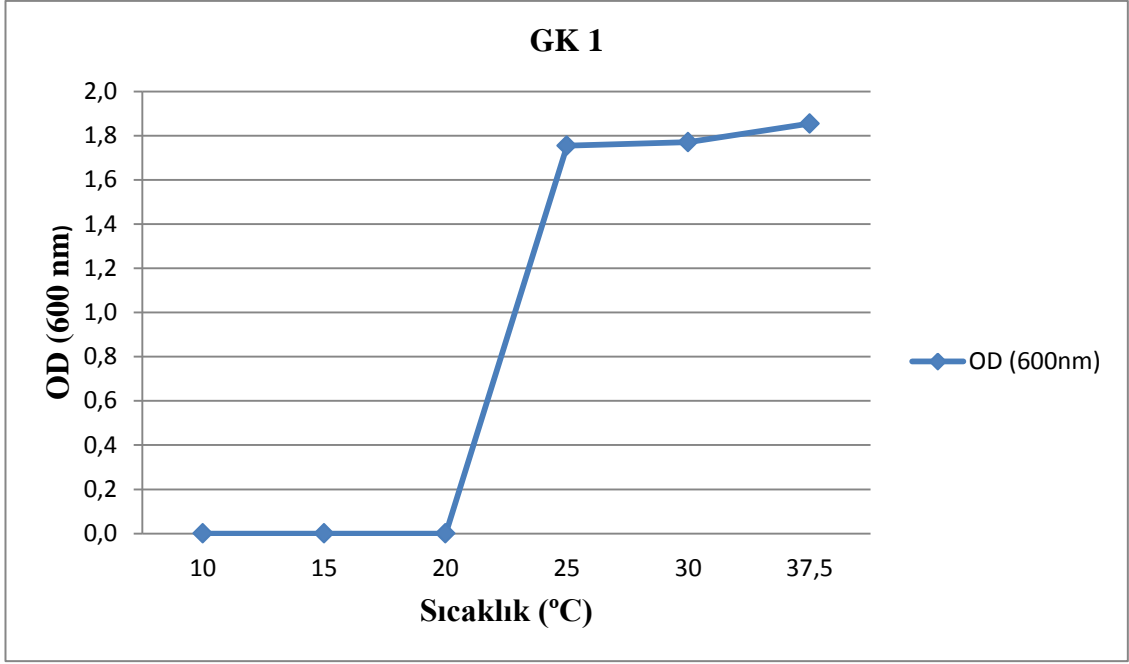
4.3 Laktik Asit Bakterilerinin Optimum Gelişme Sıcaklığının Belirlenmesi

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen laktik asit, fermantasyonda son derece önemlidir ve 20°C'nin altında asit üretimi yavaşlar veya sıfıra doğru azalır. Gelişme aralığı 10 ile 42°C'arasında olup, 39°C'nin üzerinde gelişme durmaktadır. Optimum gelişmenin ise 20-35°C' de olduğu bilinmektedir.

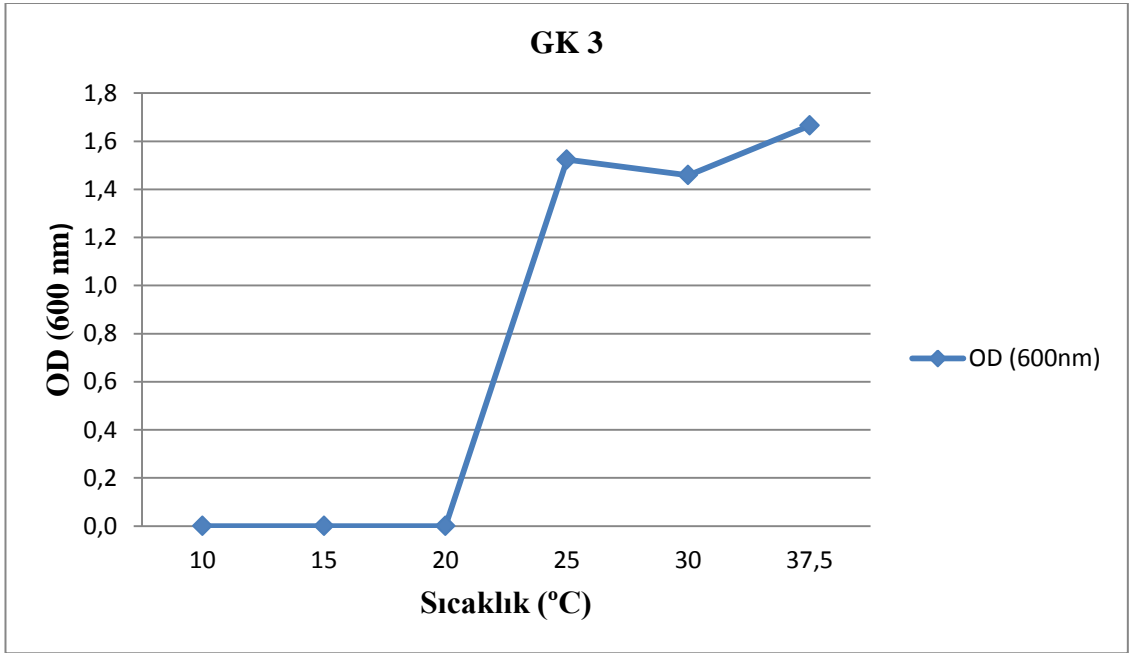
İzolatların optimum gelişme sıcaklığının belirlenmesi amacıyla bölüm 3.2.3'de açıklandığı gibi yürütülen deneme sonucunda; GK1, GK3, GK5 ve GK11 nolu izolatlar 37,5°C'de, GK12 ve GK13 nolu izolatlar ise 30°C'de optimum gelişme göstermiştir (Çizelge 4.4). Çalışmada kullanılan suşların 20°C'nin altında gelişmediği gözlenmiştir.

Çizelge 4.4 İzolatların gelişme sıcaklıkları

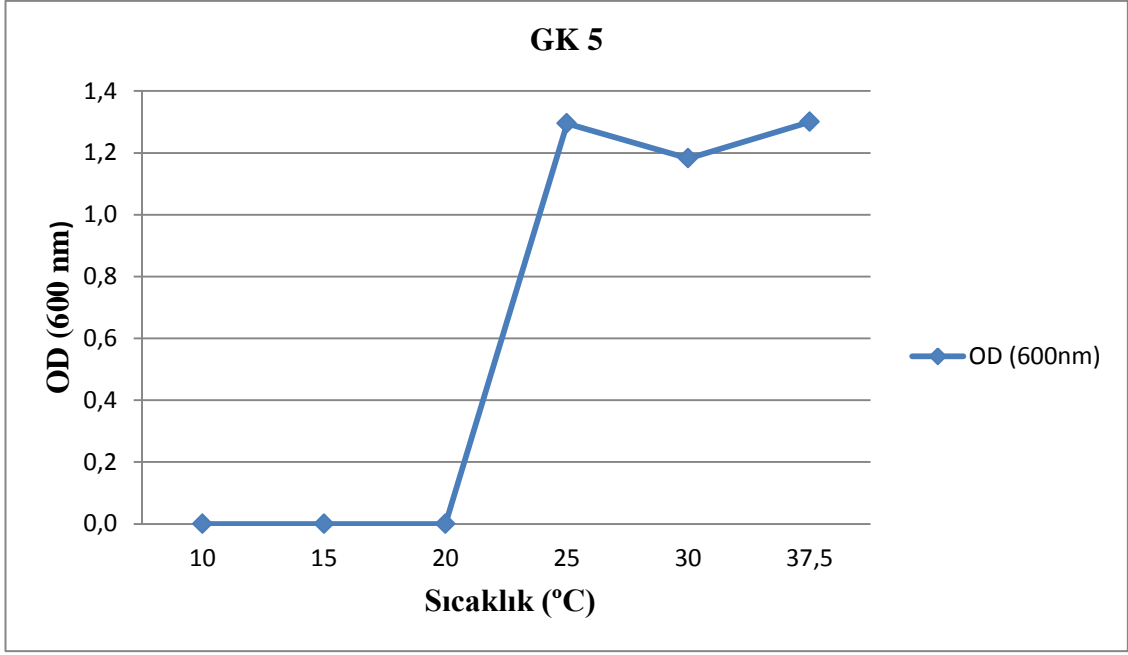
| İzolat No | Optimum gelişme sıcaklığı (°C) |
|-----------|--------------------------------|
| GK1 | 37,5 |
| GK3 | 37,5 |
| GK5 | 37,5 |
| GK11 | 37,5 |
| GK12 | 30 |
| GK13 | 30 |



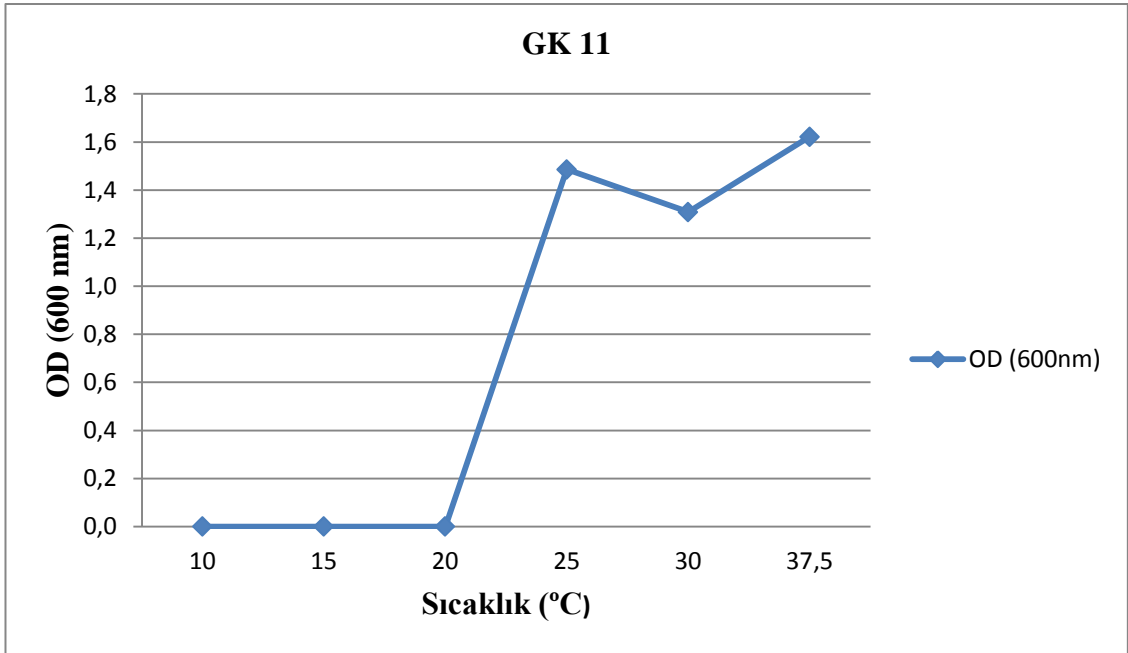
Şekil 4.6 GK 1'in farklı sıcaklık derecelerindeki gelişmesi



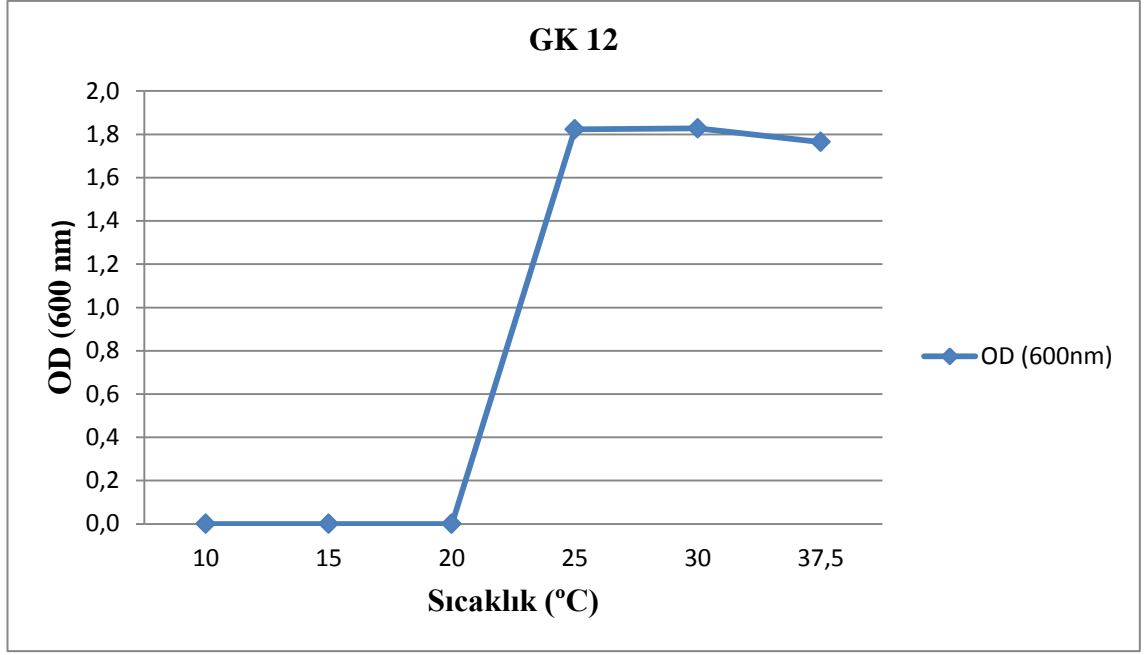
Şekil 4.7 GK3'ün farklı sıcaklık derecelerindeki gelişmesi



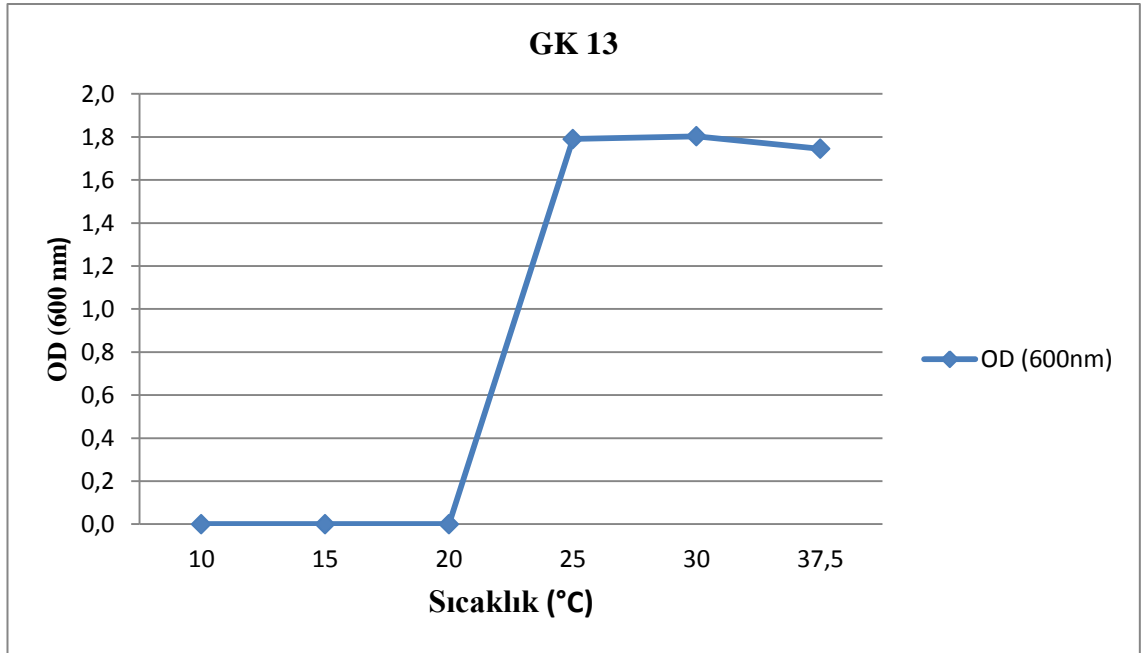
Şekil 4.8 GK5'in farklı sıcaklık derecelerindeki gelişmesi



Şekil 4.9 GK11'in farklı sıcaklık derecelerindeki gelişmesi



Şekil 4.10 GK12'nin farklı sıcaklık derecelerindeki gelişmesi



Şekil 4.11 GK13'ün farklı sıcaklık derecelerindeki gelişmesi

Laktobasillerin için optimum gelişme sıcaklığı 30 ile 40°C arasında olup, türe bağlı olarak 5°C gibi düşük sıcaklıklardan 53°C'lik bir üst sınıra kadar gelişme gösterebilirler (Toqeer 2006). Çalışmamızda da görüldüğü gibi 6 adet suştan 4 tanesi 37,5°C'de

maksimum gelişme gösterirken (Şekil 4.6- 4.9), 2 adet suş 30°C’de maksimum gelişme göstermiştir (Şekil 4.10, 4.11).

Toqeer vd. (2006) *S. cremoris*, *L. lactis* ve *L. acidophilus* ile çalışmışlardır. Araştırma gelişme sıcaklığının pH ve asitlikle ilişkili olduğunu gösterirken tüm suşlar, kendi optimum sıcaklıklarında (*L. lactis* ve *L. acidophilus* için 37 ila 40°C, *S. cremoris* için 37°C) hızla gelişmişlerdir.

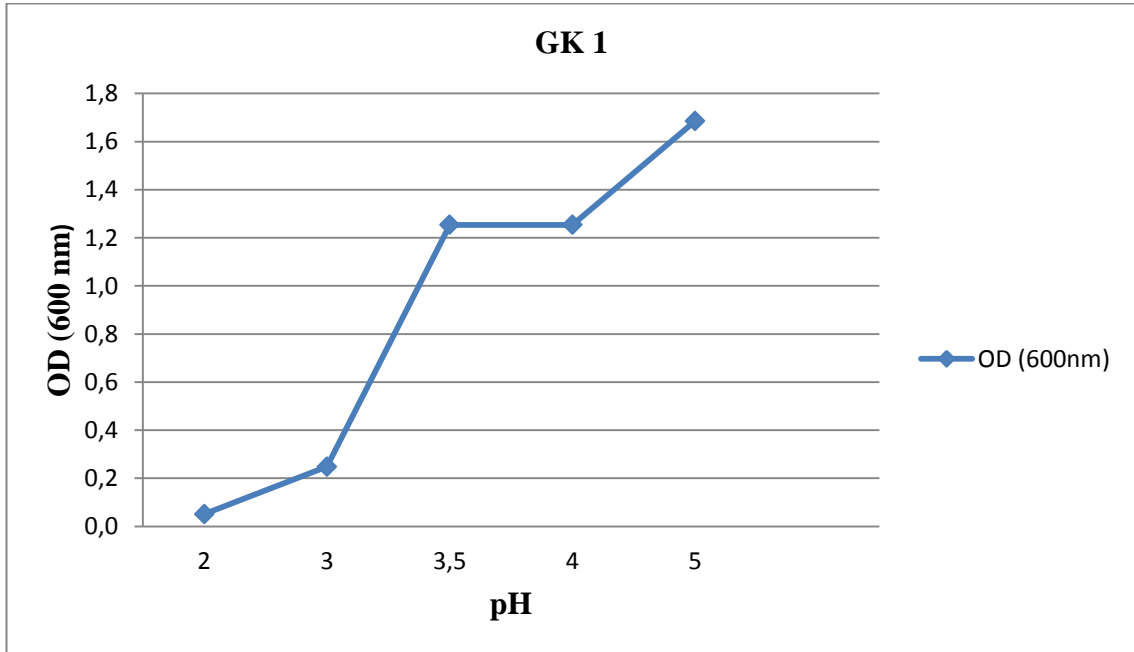
Hofvendahl vd. (1999) sıcaklık ve pH’nın *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435’in gelişmesi ve ürün oluşumu üzerine etkilerini incelemişlerdir. pH 6,5’da sıcaklık 30°C’den 37°C’ye çıkarıldığında, formik asit, asetik asit ve etanol oluşumunun %23 arttığı, 30°C’de pH 6,5’dan 5’e düşürüldüğünde ise ürün oluşumunun %65 arttığı sonucuna varmışlardır. Optimum gelişmenin 35°C de 5,75 pH’da olduğu görülmüştür.

4.4 Laktik Asit Bakterilerinin Farklı pH Konsantrasyonlarındaki Gelişmesi

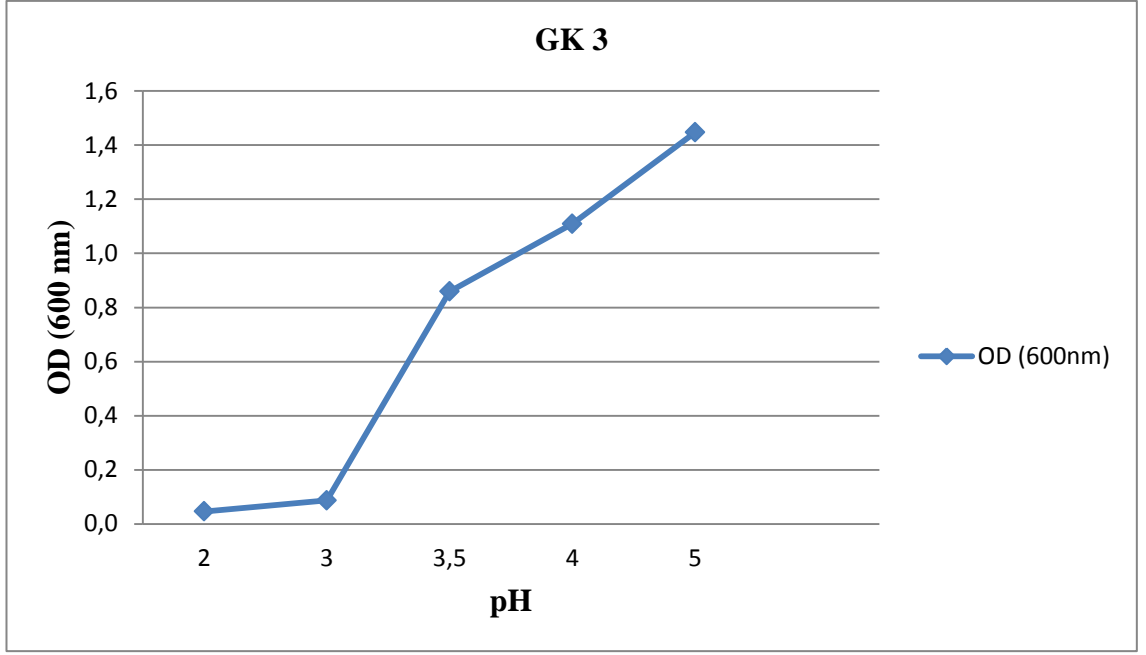
Fermantasyonda kullanılan mikroorganizmaların gelişmesinde ortamın pH’sının değişmesi, hidrojen iyonu konsantrasyonunun değişmesi anlamına gelmektedir. Hidrojen iyonları, enzimlerin tersiyer şeklini sağlayan bağları koparma potansiyeline sahiptir. Kopan bağlara bağlı olarak, enzimler denature olur ve aktif bölge artık orijinal şeklini kaybettiğinden katalizin verimini olumsuz yönde etkiler. Bu yüzden, metabolik reaksiyonların meydana gelme sebebi bu kataliz olduğundan, pH’ın fermantasyondaki metabolik yolu etkileme potansiyeli vardır.

Denemede bölüm 3.2.4’de belirtildiği gibi pH’sı 2; 3; 3,5; 4; 5 olacak şekilde hazırlanan besi ortamında geliştirilen GK1, GK3, GK5, GK11, GK12 ve GK13 suşlarının farklı pH konsantrasyonlarındaki gelişme durumları incelendiğinde, suşlar arasında benzerlik olduğu, bütün suşların pH yükseldikçe gelişmesinin arttığı gözlenmiştir. GK1, GK3 ve GK11’in gelişmelerinde pH 3,5’da ani bir artış gözlenirken (Şekil 4.12-4.13, 4.15), GK12 ve GK13’ün gelişmelerinde pH 3’de ani artış gözlenmiştir (Şekil 4.16, 4.17). GK5’in gelişmesi pH artışıyla beraber artmıştır (Şekil 4.14). Denemede maksimum

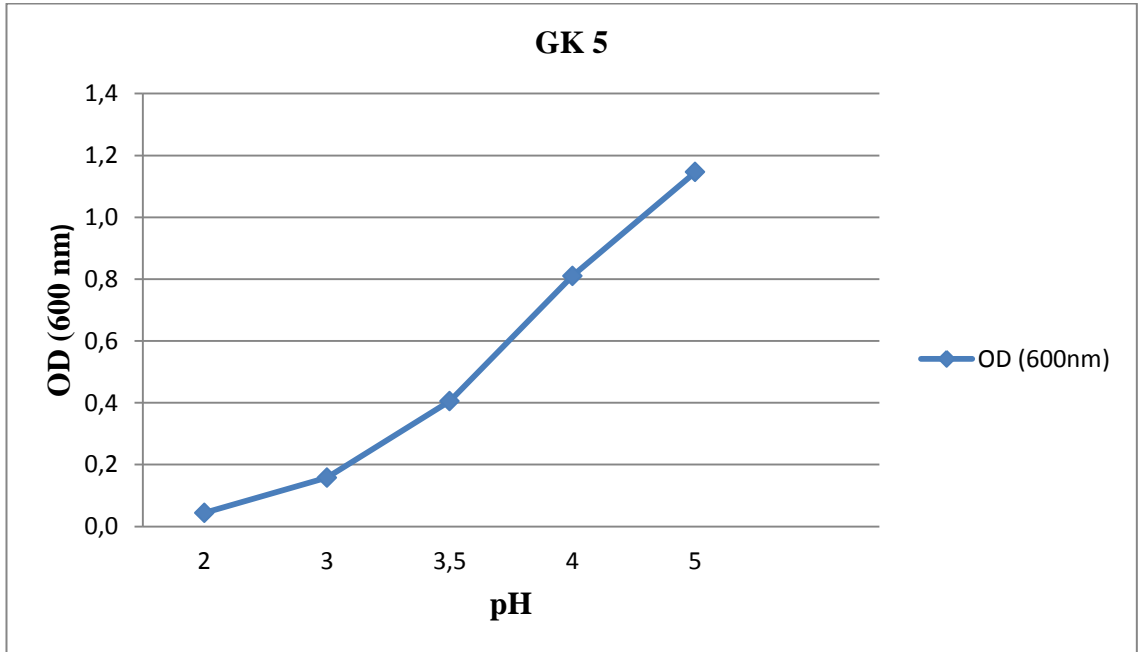
gelişme tüm suşlarda pH 5’de görülmüştür (Çizelge 4.14). TS 11149 Şalgam Suyu Standardı’na göre satışı hazır şalgam suyunda pH değerleri 3,3-3,8 arasındadır (TSE 2003). Canbaş ve Deryaoğlu (1993) ise fermantasyonu tamamlamış şalgam sularında pH değerlerinin 3,33-3,67 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Tangüler (2010), 5 farklı işletmeden fermantasyonun başında aldığı şalgam suyu örneklerinde pH değerlerinin 2,76-6,86 arasında olduğunu, fermantasyonu tamamlamış satışı hazır şalgam sularında ise pH değerlerinin 3,28-3,48 arasında değiştiğini bildirmiştir. Çalışmamızda besiyerinin pH’sı 3,3’den 3,8’e doğru artarken, üzerinde çalıştığımız suşların gelişmesi de buna paralel olarak artış göstermiştir.



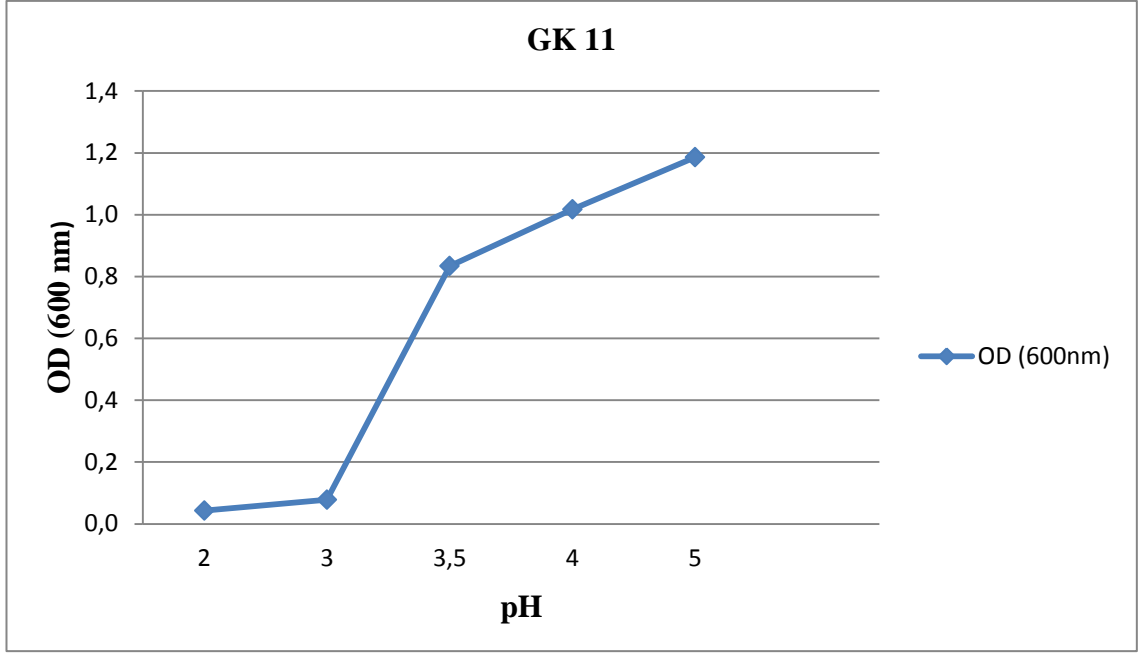
Şekil 4.12 GK1’in farklı pH konsantrasyonlarındaki gelişmesi



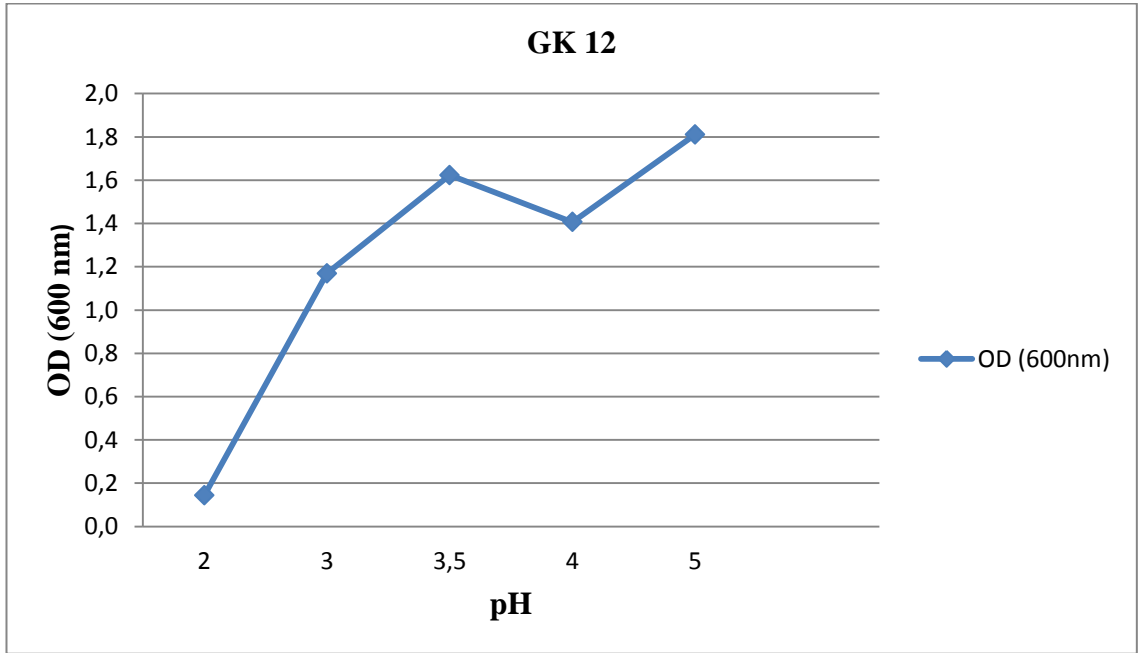
Şekil 4.13 GK3'ün farklı pH konsantrasyonlarındaki gelişmesi



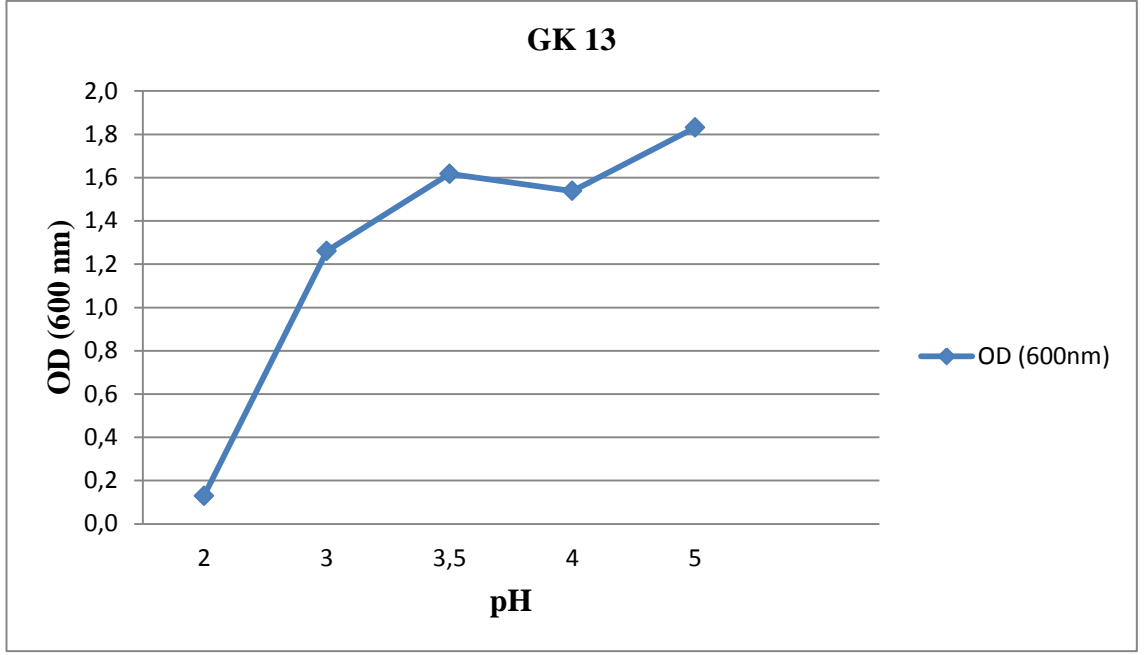
Şekil 4.14 GK5'in farklı pH konsantrasyonlarındaki gelişmesi



Şekil 4.15 GK11'in farklı pH konsantrasyonlarındaki gelişmesi



Şekil 4.16 GK12'nin farklı pH konsantrasyonlarındaki gelişme durumu



Şekil 4.17 GK13'ün farklı pH konsantrasyonlarındaki gelişmesi

4 ila 5 arası pH değerlerinde genel olarak laktik asit bakterileri gıda kaynaklı bakterilerden daha rekabetçidir ve gıda fermantasyonlarında kullanımları büyük oranda bu özelliğe dayanır (Lücke 1996).

Lee (2010) laktik asit bakterilerinin farklı pH ve tuz konsantrasyonlarındaki gelişmelerini incelediği çalışmada, gelişmenin pH 1 ila 7 arasında artarken pH 7 ila 14 arasında azaldığını ve pH 14'de gelişme olmadığını görmüştür. Optimum gelişmenin ise pH 7'de olduğu sonucuna varmıştır.

Rao vd. (2004) yaptıkları çalışmada pH ve tuz konsantrasyonu arasında önemli bir etkileşim olmadığını ve pH'nın test edilen tuz konsantrasyonu aralığında (%0-30) glukoz fermantasyonu için en önemli etmen olduğunu görmüşlerdir.

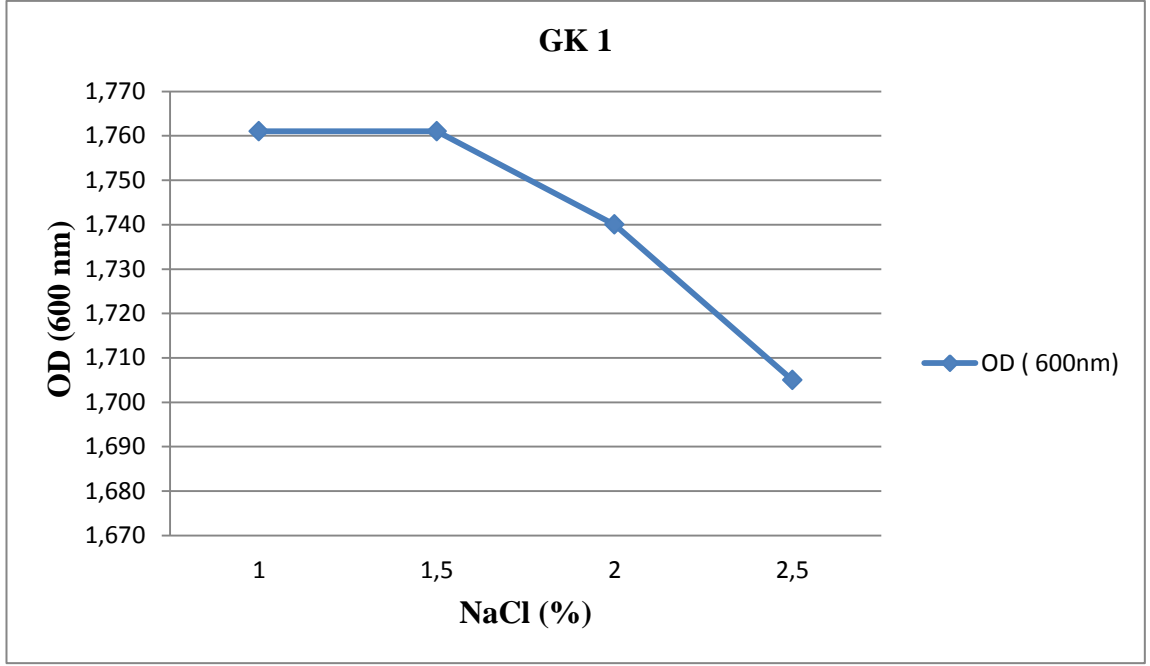
Sonuç olarak, literatür verilerine göre laktik asit bakterilerinin 3,2-9,6 pH aralığında gelişme gösterdiği ifade edilirken, optimum pH'nın 5-7 aralığında olduğu bilinmektedir (Martin 1996). Çalışmamızda tanımlanan laktik asit suşları için maksimum gelişmenin pH 5'de olduğu görülmektedir.

4.5 Laktik Asit Bakterilerinin Farklı Tuz Konsantrasyonlarındaki Gelişmesi

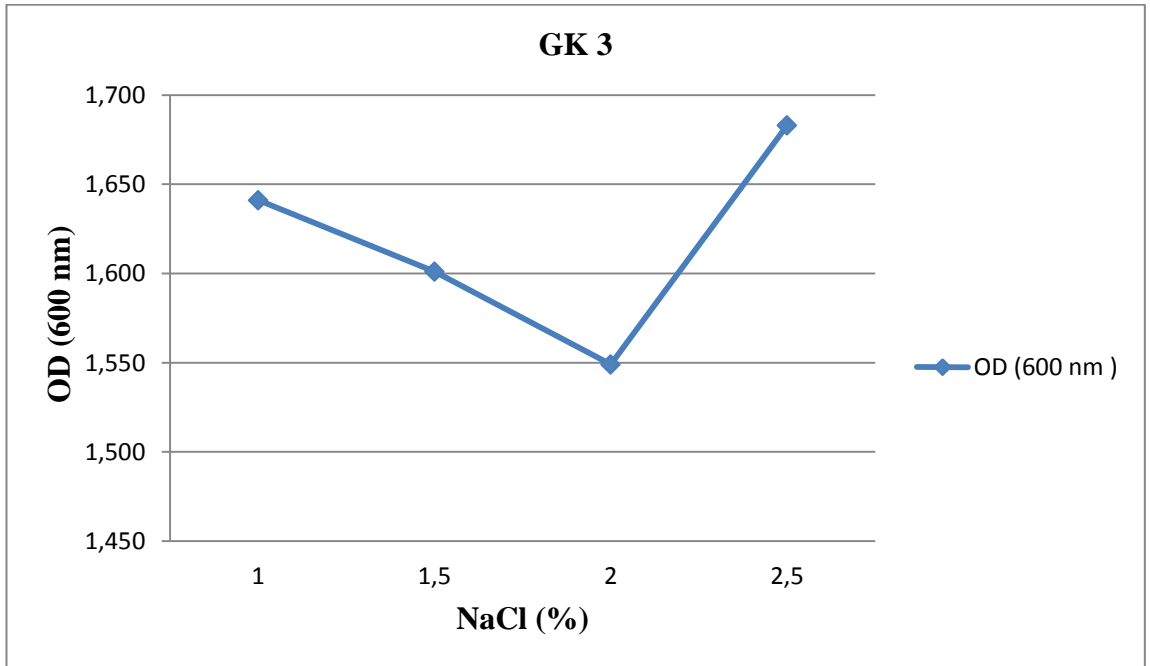
Denemede bölüm 3.2.3’de belirtildiği gibi % 1; 1,5; 2; 2,5 olacak şekilde değişik tuz konsantrasyonlarında hazırlanan besi ortamında geliştirilen GK1, GK3, GK5, GK11, GK12 ve GK13 suşlarının gelişme durumları incelendiğinde suşlar arasında çeşitlilik olduğu (Çizelge 4.5), her suşun farklı tuz konsantrasyonlarındaki gelişme durumunun birbiri ile benzerlik göstermediği gözlenmiştir (Şekil 4.16-4.21). GK1’in gelişmesi NaCl konsantrasyonu %1 ila 1,5 arasında iken herhangi bir değişiklik göstermezken, %1,5’den 2’ye doğru doğrusal olarak azalmıştır. GK3’ün gelişmesi NaCl konsantrasyonu %1’den 2’ye doğru azalırken, %2’den 2,5 konsantrasyona kadar artmıştır. GK5 ve GK13 suşunda ise gelişmenin % NaCl konsantrasyonuna bağlı belirli bir eğilimi olmadığı tespit edilmiştir. GK11 ve GK12 suşunda gelişme NaCl konsantrasyonu %1’den 1,5’a doğru artarken daha sonra azalma eğilimine geçmiştir.

Çizelge 4.5 İzolatların geliştiği optimum tuz konsantrasyonu

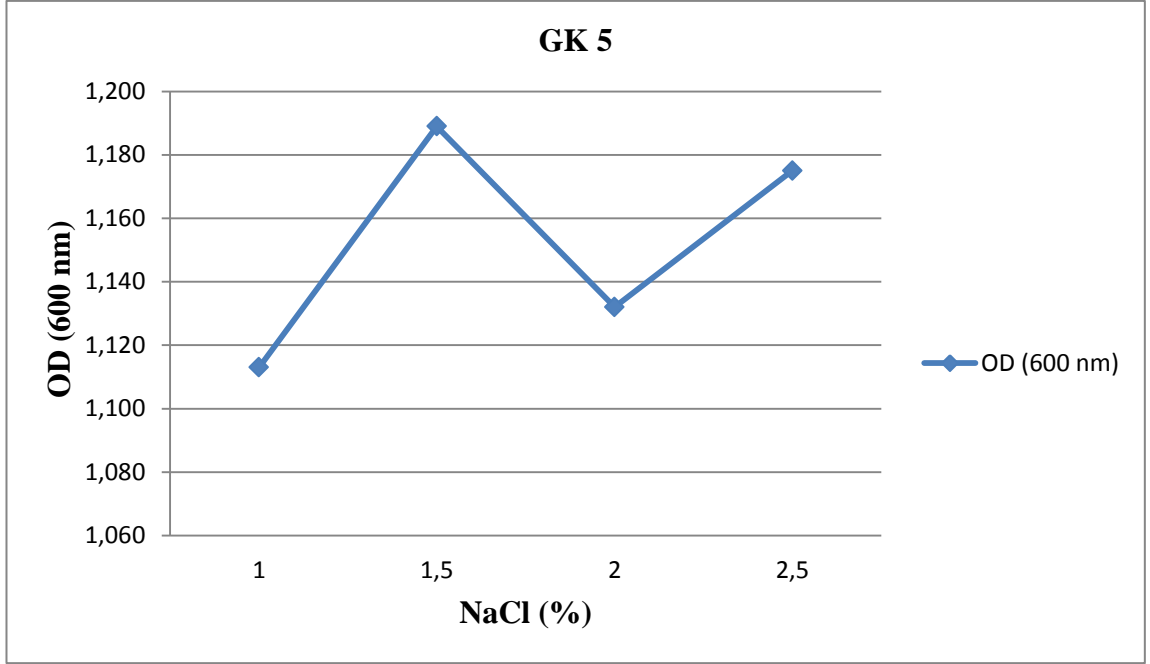
| İzolat No | NaCl (%) |
|-----------|----------|
| GK1 | 1 |
| GK3 | 2.5 |
| GK5 | 1.5 |
| GK11 | 1.5 |
| GK12 | 1.5 |
| GK13 | 1 |



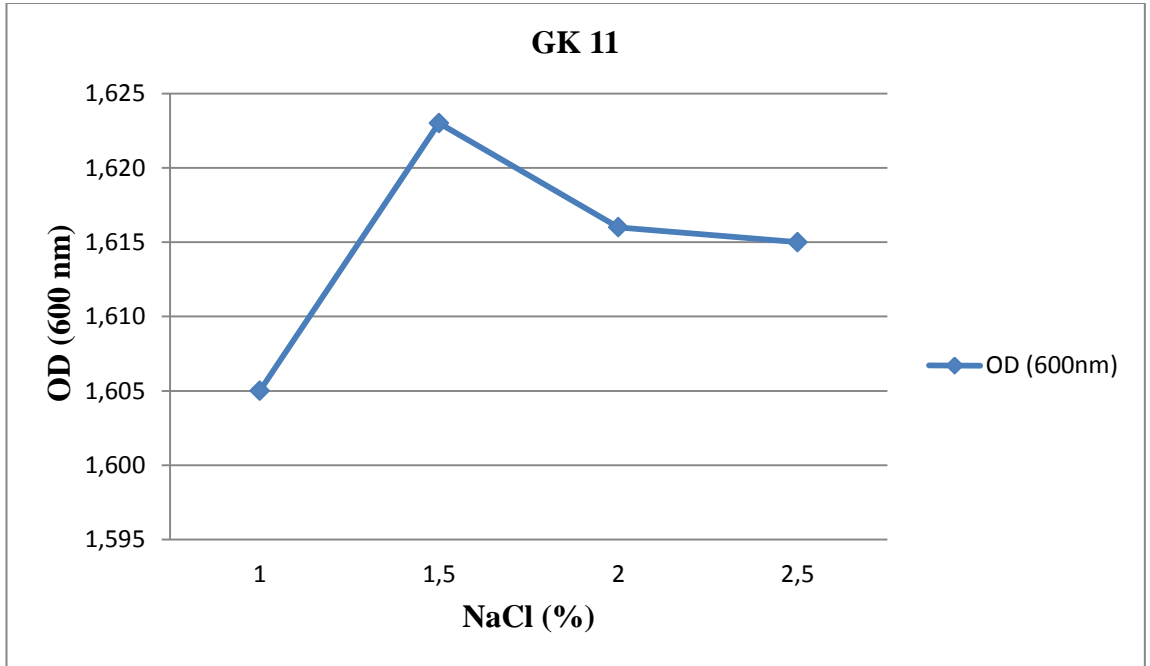
Şekil 4.18 GK1'in farklı NaCl konsantrasyonlarındaki gelişmesi



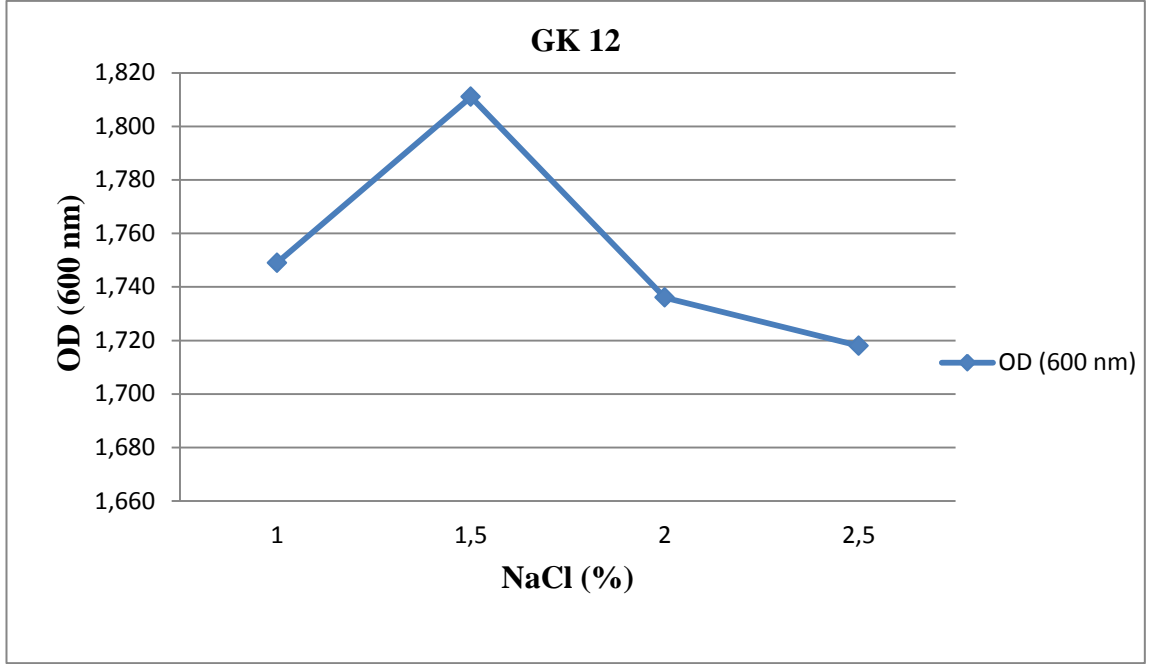
Şekil 4.19 GK3'ün farklı NaCl konsantrasyonlarındaki gelişmesi



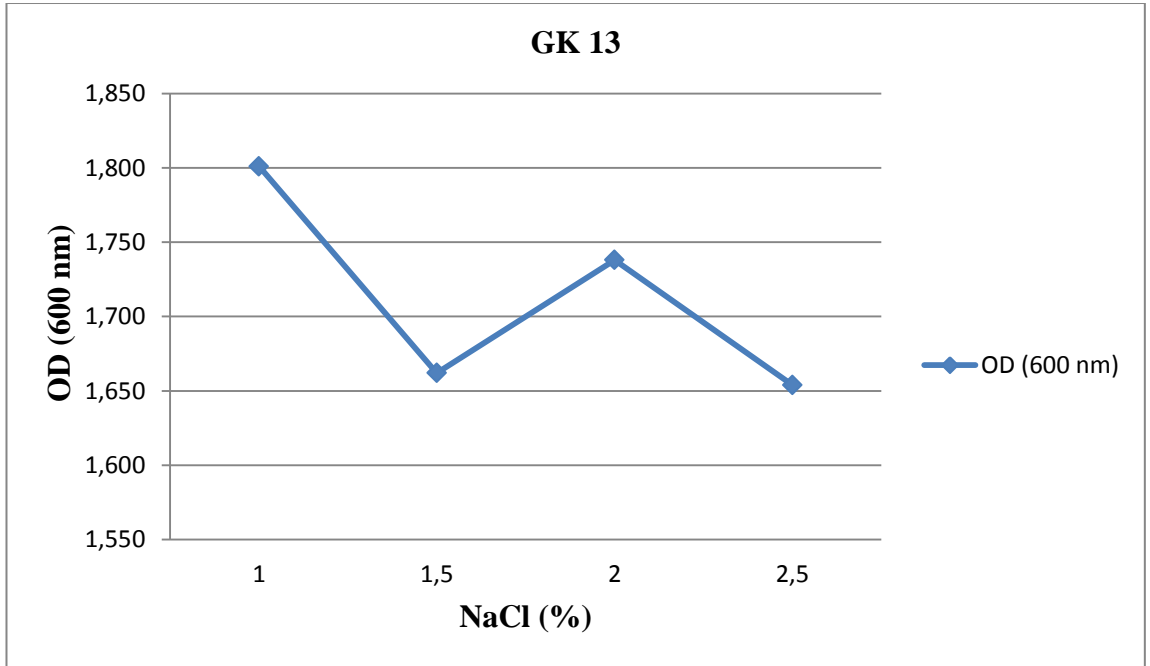
Şekil 4.20 GK5'in farklı NaCl konsantrasyonlarındaki gelişmesi



Şekil 4.21 GK11'in farklı NaCl konsantrasyonlarındaki gelişmesi



Şekil 4.22 GK12'nin farklı NaCl konsantrasyonlarındaki gelişmesi



Şekil 4.23 GK13'ün farklı NaCl konsantrasyonlarındaki gelişmesi

Laktik asit bakterileri arasında homofermantatif laktik asit bakterileri, heterofermantatif olanlara göre tuza daha dirençlidirler. Türler arasında tuza dirençlilik durumu çeşitlilik

göstermektedir (Stiles ve Holzapfel 1997). Çalışmamızda da benzer sonuç elde edilmiş olup her suşun farklı tuz konsantrasyonlarındaki gelişme durumunun birbiri ile benzerlik göstermediği gözlenmiştir.

Laktik asit bakterileri, yüksek tuz konsantrasyonlarında da gelişmelerine devam edebilmektedir (Rao vd. 2004). Leroy ve De Vuyst (1999) genellikle laktik asit bakterilerinin gelişmelerinin %1-2 oranında NaCl varlığında daha iyi olduğunu ve %3 ve üzeri NaCl konsantrasyonlarında inhibitör etki gözlendiğini vurgulamışlardır. Cai vd. (1997) yaptığı çalışmada ise NaCl'nin fermantasyon kalitesini arttırdığı ancak silajlarda aerobik bozulma yapan mikroorganizmalar üzerinde etkisinin olmadığını görmüşlerdir.

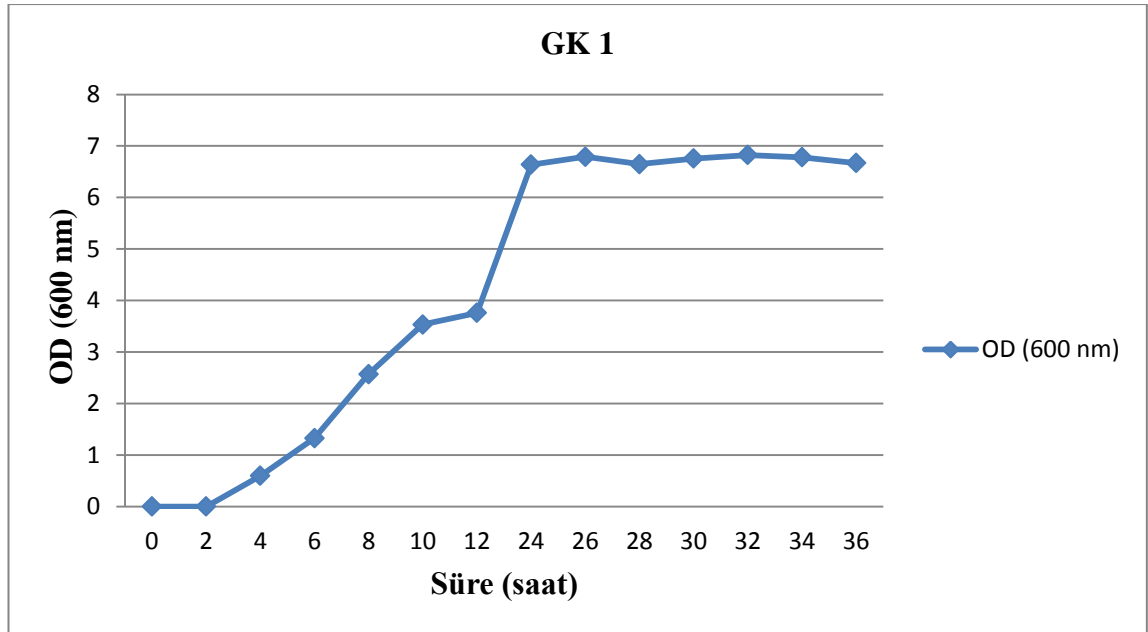
Laktobasillerin %4 tuz konsantrasyonuna kadar lag fazı olmadan gelişebilmesi, starter olarak kullanılması açısından önem arz eder (Rao 2004). TS 11149 Şalgam Suyu Standardı'na göre satışa hazır şalgam suyunda NaCl değerleri %2'den azdır (TSE 2003). Canbaş ve Deryaoğlu (1993) ise fermantasyonu tamamlamış şalgam sularında % NaCl değerlerinin 1,37-1,63 arasında olduğunu bildirmişlerdir. GK1, GK5, GK11 ve GK12 izolatları, besiyerinin tuz konsantrasyonu % 1,37-1,63 arasında iken diğer konsantrasyonlara nazaran daha iyi gelişme göstermiştir. Bu durum bu suşların şalgam suyu üretiminde starter olarak kullanımı konusunda avantaj olarak düşünülebilir. GK13 de %1 NaCl konsantrasyonundaki gelişmesi diğer konsantrasyonlara göre daha fazla olduğu için TS 11149 Şalgam Suyu Standardı'na uygundur.

Rao vd. (2004) *Lactobacillus* suşlarının %8 tuz konsantrasyonunda fermantasyona devam edebildiği ve %10 konsantrasyonda bile hala laktik asit üretebildiğini görmüşlerdir. Çalışmalarında suşlara ve parametrelere bağlı olarak, gelişmenin, hücre biyokütlesinin ve laktik asit üretiminin %1,3 veya 2,5 tuz konsantrasyonunda en iyi sonuca varıldığını görmüşlerdir.

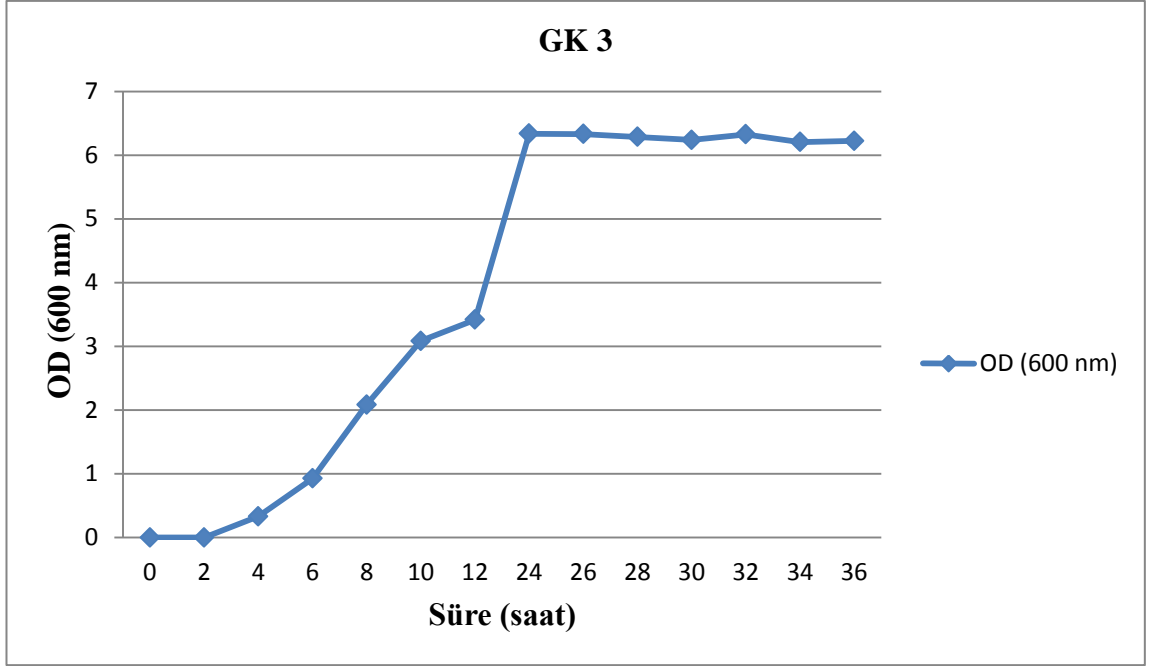
4.6 Laktik Asit Bakterilerinin Optimum Koşullardaki Gelişmesi

Mikroorganizmalar, uygun besiyeri ve çevresel koşullar altında, türlerine özgü bir hızla ürerler. Koşulların uygunluğu devam ettiği sürece, buna paralel olarak çoğalma da sürekli olur.

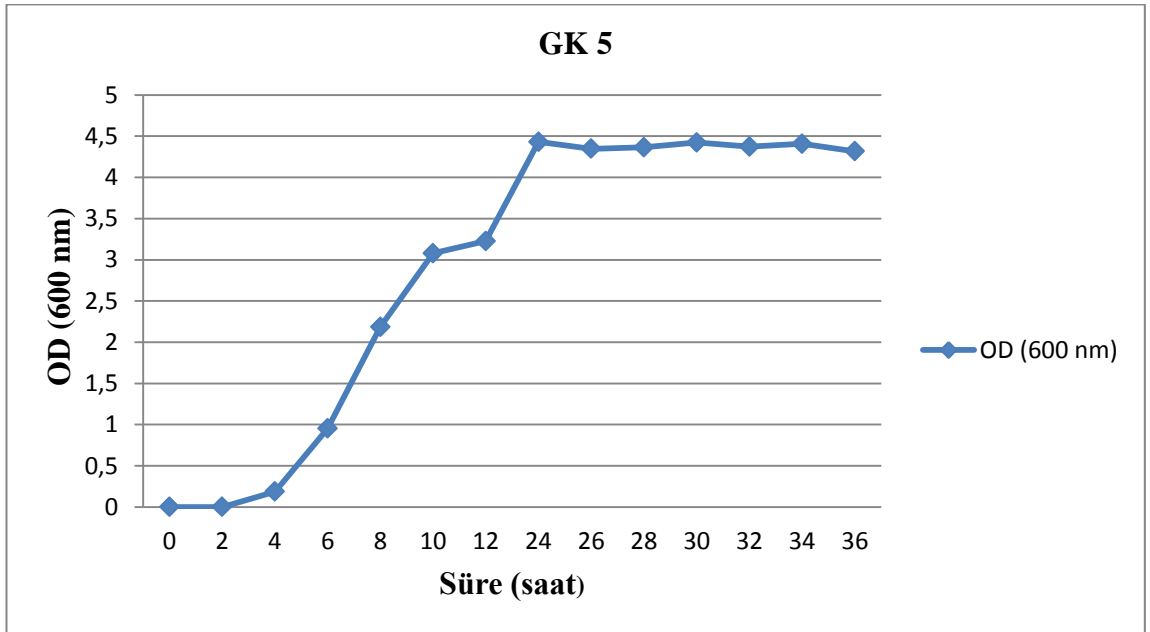
Çalışmada kullanılan 6 adet laktik asit suşunun optimum pH ve tuz konsantrasyonuna sahip besiyerinde optimum inkübasyon sıcaklığındaki gelişmeleri izlenmiştir (Şekil 4.24, 4.25, 4.26, 4.27, 4.28, 4.29). Denemede GK1, GK3, GK5 ve GK11 için; 0-4 saat aralığında, GK12 ve GK13 için 0-6 saat aralığında adaptasyon (lag) fazı olduğu; GK1, GK3, GK5, ve GK11 için 4-24 saat aralığında, GK12 için 6-26 ve GK13 için 6-24 saat aralığında logaritmik evre olduğu görülmüştür. Benzer olarak Toqeer vd. (2006) *S. cremoris*, *L. lactis* ve *L. acidophilus* suşlarının gelişmelerini inceledikleri çalışmada ilk 2 saatten sonra laktik asit bakterilerinin logaritmik evreye girdiğini görmüşlerdir.



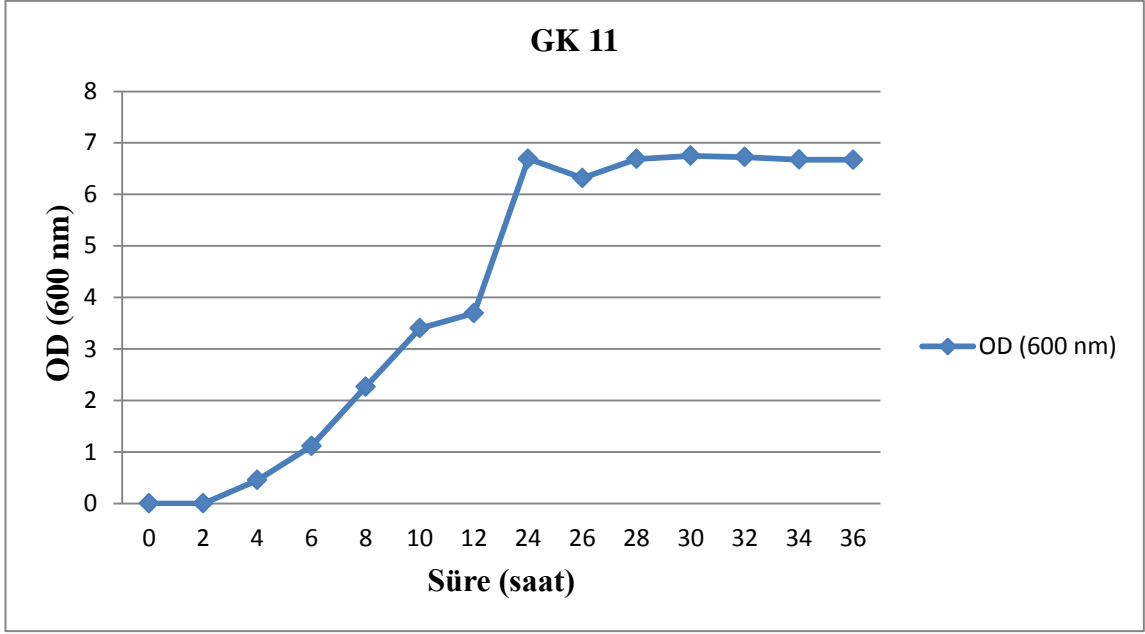
Şekil 4.24 GK1'in optimum koşullardaki gelişme eğrisi



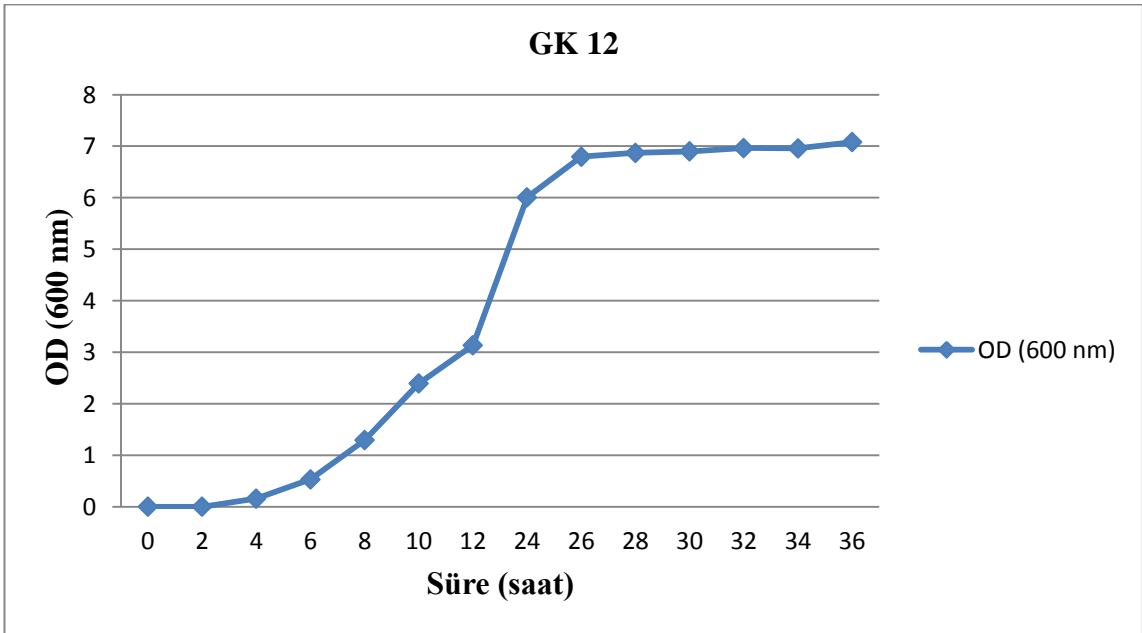
Şekil 4.25 GK3'ün optimum koşullardaki gelişme eğrisi



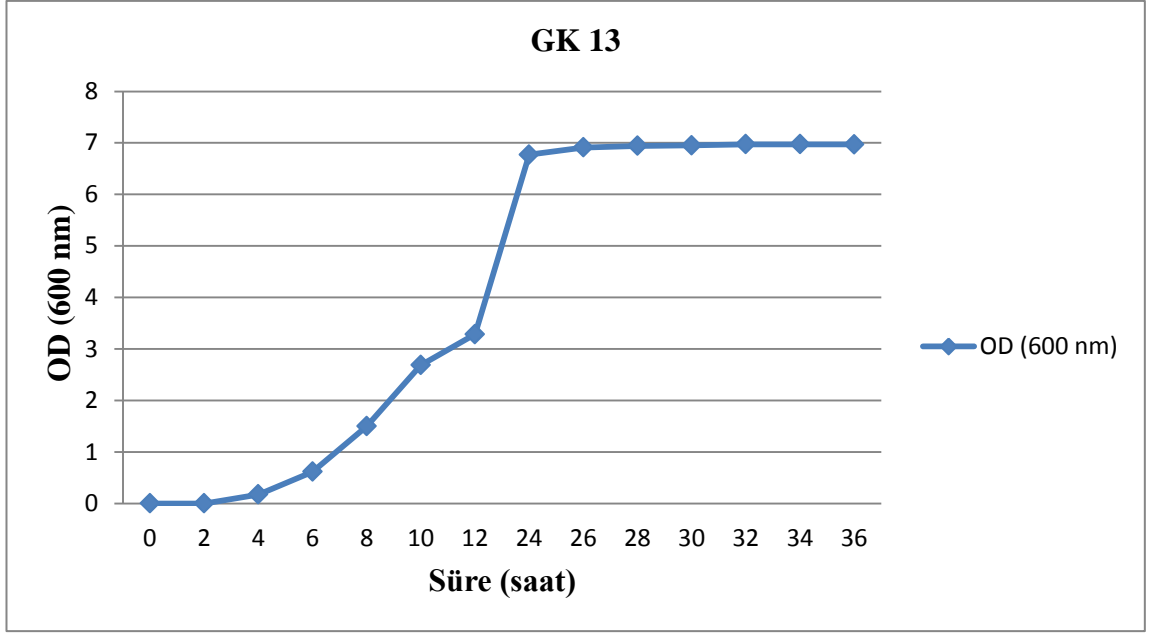
Şekil 4.26 GK5'in optimum koşullardaki gelişme eğrisi



Şekil 4.27 GK11'in optimum koşullardaki gelişme eğrisi



Şekil 4.28 GK12'nin optimum koşullardaki gelişme eğrisi



Şekil 4.29 GK13'ün optimum koşullardaki gelişme eğrisi

Altuntaş (2011) *Pediococcus acidilactici* 13 suşunun gelişme eğrisini ve bu süre boyunca bakteriyosin aktivitesindeki değişimi incelemiştir. *Pediococcus acidilactici* 13 suşunun adaptasyon (lag) fazının 0-6 saat aralığında, logaritmik gelişme fazının ise 6-12 saat aralığında olduğunu belirlemiştir. Bakteriyosin üretiminin logaritmik gelişme evresinin sonunda en üst seviyeye ulaştığını, durma evresinde bakteriyosin aktivitesinde bir artış olmadığını tespit etmiştir. Benzer olarak Jung ve Paik (2000) de *Lactococcus lactis* tarafından üretilen bakteriyosinin logaritmik gelişme evresinin ortalarında üretilmeye başladığını, durma fazının başlarında en yüksek seviyeye ulaştığını ve durma fazının sonlarından itibaren de azaldığını saptamışlardır.

Ayhan vd. (1996) *Lactococcus lactis* LL37 suşunun gelişimini ve nisin oluşumunu incelediği çalışmada, LL37 suşunun 5. saatten itibaren logaritmik evreye girdiğini ve bu evrenin 9. saate kadar devam ettiğini, nisin üretiminin ise gelişme evresi boyunca üretildiğini ve suşun logaritmik evresinin sonunda en üst seviyeye ulaştığını tespit etmişlerdir.

5. SONUÇ

Çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz araştırmanın sonuçlarına göre;

1. API 50 CHL (BioMérieux, Fransa) ve bu tez çalışmasında yapılan 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi ile tanımlama sonuçlarına göre GK12 ve GK13 numaralı izolatlar *Lactobacillus plantarum* olarak tanımlanmıştır. GK1 izolatu ise API 50 CHL ile tanımlanamazken, 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi ile moleküler tanımlama sonucunda bunun *Lactobacillus plantarum* olduğu saptanmıştır. GK3 no'lu izolatu API 50 CHL ile *Leuconostoc mesenteroides/dextranicum* 2 olduğu sonucuna varılırken, 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi sonucunda bu izolatu *Lactobacillus plantarum* olduğu anlaşılmıştır. Denemelerde elde edilen sonuçlara göre, GK5 için 3 farklı sonuç elde edilmiş olup; izolat API 50 CHL testinde *Leuconostoc mesenteroides/dextranicum* 2, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde yapılan moleküler tanımlama sonucunda *Pediococcus acidilactici*, ODTÜ Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Ar-Ge Merkezi'nde yapılan moleküler testinde ise *Pediococcus pentosaceus* olarak tanımlanmıştır. GK11, API 50 CHL yöntemi ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde yapılan moleküler testte tanımlanamazken ODTÜ Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Ar-Ge Merkezinde yapılan moleküler testte, izolatu *Lactobacillus plantarum* olduğu sonucuna varılmıştır.

2. Suşların antimikrobiyel aktivite özelliklerinin araştırılması amacıyla *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. aureus* ATCC 10832 ve *Lb. plantarum* ATCC 14917'e karşı Agar Spot testi uygulanmış; test sonucu hiçbir bakteride zon oluşumu görülmemiştir. Bakterilerin antimikrobiyel özellikleri negatif olarak değerlendirilmiştir.

3. Suşların optimum gelişme sıcaklığının belirlenmesi amacıyla aktif kültürler 10, 15, 20, 30 ve 37,5 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası GK1, GK3, GK5 ve GK11 37,5 °C'de optimum gelişme gösterirken GK12 ve GK13 30

°C’de optimum gelişme göstermiştir. Çalışmada kullanılan suşların 20°C’nin altında gelişmediği gözlenmiştir.

4. pH’sı 2; 3; 3,5; 4; 5 olacak şekilde hazırlanan besi ortamlarında geliştirilen GK1, GK3, GK5, GK11, GK12 ve GK13 suşlarının farklı pH konsantrasyonlarındaki gelişme durumları incelendiğinde suşlar arasında benzerlik olduğu, bütün suşların pH yükseldikçe gelişmelerinin arttığı anlaşılmıştır. GK1, GK3 ve GK11’in gelişmelerinde pH 3,5’da ani bir artış gözlenirken, GK12 ve GK13’ün gelişmelerinde pH 3’de ani artış gözlenmiştir. GK5’in gelişme durumu pH artışıyla beraber artmıştır. Tüm suşlardaki maksimum gelişme pH 5’de görülmüştür.

5. Suşların, NaCl konsantrasyonu % 1; 1,5; 2; 2,5 olacak şekilde hazırlanan besi ortamlarındaki gelişme durumları farklı şekilde değişim göstermiştir.

6. Çalışmada kullanılan 6 adet laktik asit suşunun çalışmamızda belirlediğimiz optimum koşullardaki (optimum pH’ya ve tuz konsantrasyonuna sahip besiyerinde optimum inkübasyon sıcaklığındaki gelişme) gelişme eğrileri oluşturulmuştur. Gelişme eğrilerine bakıldığında GK1, GK3, GK5 ve GK11 için 4-24 saat aralığında, GK12 için 6-26 saat ve GK13 için 6-24 saat aralığında logaritmik evre olduğu görülmüştür.

İdentifikasyonda olumsuz sonuçlardan kurtulabilmek ve kesin tanımlama yapabilmek için moleküler identifikasyon teknikleri, fenotipik testlere alternatif olarak geliştirilmektedir. Tez çalışmamızda 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi ile kesin tanımlama yapılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmada; GK1, GK3, GK12 ve GK13 suşlarının moleküler tanımlama sonuçlarının birbiri ile tür bazında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Literatür verilerine göre, şalgam suyu üretiminde; pH'nın düşmesinin sağlanması, laktik asit üretmesi ve duyuşsal özellikleri iyileştirmesi sebebiyle starter kültür kullanımının önemli olduğu bilinmektedir. Sebze fermantasyonunda en sık kullanılan starter kültür *Lb. plantarum*'dur Denemelerimizde incelediğimiz 6 adet izolattan 4 tanesinin *L. plantarum* olarak tanımlanmıştır. Bu izolatların optimum gelişme sıcaklıkları ve gelişme miktarları göz önüne alındığında, şalgam suyu üretiminde GK12 ve GK13 suşlarının diğer suşlara göre starter olarak daha avantajlı olduğu düşünölmektedir. Şalgam suyu üretiminde bu suşların prosese katkısı, gelecek çalışmalar için potansiyel bir veri kaynağı olabilir.

Yeni tanımlanan suşlar, duyuşsal ve besinsel özellikleri geliştirilmiş gıdaların elde edilebilmesi için şüphesiz olumlu katkı sağlayacaklardır. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar laktik asit bakterisi ile çalışan araştırmacılar için bir veri tabanı oluşturacak ve tanımlama için harcanacak zaman böylece ortadan kalkmış olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdel-Bar, N., Harris, N.D. and Rill, R.L., 1987, Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. J. Food Scien., 52(2), 411-415.
- Akpınar, D. ve Kılıç, G.B. 2011. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen antifungal bileşenler. Gıda, 37, 1–8. www.gidadernegi.org, Erişim Tarihi: 05.06.2013
- Altuntaş, E.G., Ayhan, K., Okcu, G., Erkanlı, K., Balcı, M.H. ve Sonakın, S.S. 2009. Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel aktiviteleri. Gıda, 35(3), 197–203 s.
- Altuntaş, E.G., Cosansu, S. and Ayhan, K. 2010. Some growth parameters and antimicrobial activity of a bacteriocin producing strain *Pediococcus* sp 13. International Journal of Food Microbiology, 141(1-2), 28-31.
- Altuntaş, E.G. 2011. Bacteriocin üreten *Pediococcus* sp. 13 suşunun 16S rRNA ile tanımlanması ve karakterizasyonu. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, 100, Ankara.
- Angelis, M., Corsetti, A., Tosti, N., Rossi, J., Corbo, M.R. and Gorbetti, M. 2001. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. Appl. Environ. Microbiol., 67 (5), 2011-2020.
- Anonim. 2003. Şalgam suyu standardı. TS 11149, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- Anonymous. 2006. FDA, U.S. Food and Drug Administration, EAFUS: A Food Additive Database.
- Arslan, D., Ünver, A. vVe Özcan, M. 2005. Kontrollü şartlarda şalgam suyu üretimi. 8. Gıda Kongresi, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 229-232, İzmir.
- Aslım, B., Beyatlı, Y. ve Halkman, K. 2000. Yogurt starter kültür metabolitlerinin inhibisyon etkisi. Turkish Journal of Biology, 24, 65–78.
- Ayhan, K. ve Akçelik, M. 1992. Laktik Asit Bakterilerinin tedavi edici rolü. Biyoteknoloji Haber Bülteni, 5, 2–3.
- Ayhan, K., Aydar, L.Y., Durlu, F. ve Tunail, N. 1996. *Lactococcus lactis* subsp. LL37 suşunun nisin üretiminde fermantasyon parametrelerinin belirlenmesi ve nisinin preparasyonu. Kükem Dergisi, 19 (2), 49-58.

- Ayhan, K. ve Coşansu, S. 1998. Fermente et ürünlerinde starter kültür kullanımı ile patojenlerin inhibisyonu. *Gıda Dergisi*, 23(2), 95–100.
- Ayhan, K., Kolsarıcı, N. and Özkan, G.A. 1999. The effects of a starter culture on the formation of biogenic amines in Turkish soudjoucks. *Meat science*, 53, 183–188.
- Ayhan, K., Durlu-Özkaya, F. and Tunail, N. 2005. Commercially important characteristics of Turkish origin domestic strains of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *International Journal of Dairy Technology*, 58 (3), 150-157.
- Ayhan, K., Altuntaş, E.G. ve Okçu, G. 2011. Şalgam suyundan laktik asit bakterilerinin izolasyonu, tanımlanması ve fenolik asit dekarboksilaz üreten suşların seçimi. Proje numarası: 12B4343005, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu, 27.
- Balcazar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Vendrell, D., Girones, O. and Muzquiz, L. 2007. Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids. *Comparative Immunol., Microbiology and Infectious Diseases* 30, 111-118.
- Batish, V.K, Lal, R. and Grover, S. 1997. Antifungal attributes of lactic acid bacteria-A review. *Critical reviews in Biotechnology*, 17 (3), 209–225.
- Beasley, S.S.and Saris, P.E.J. 2004. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from human milk. *Appl. Environ. Microbiol.*,70, 5051-5053.
- Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J. and Noller, H.F. 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Esherichia coli*. *Proc. Nat.l Acad. Sci. October*, 75(10), 4801–4805, USA.
- Cai, Y., Ohmomo, S., Ogawa, M. and Kumai, S. 1997. Effect of NaCl-tolerant lactic acid bacteria and NaCl on the fermentation characteristics and the aerobic stability of silage. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 307-313.
- Canbaş, A. ve Fenercioğlu, H. 1984. Şalgam suyu üzerinde bir araştırma. *Gıda*, 9(5), 299-286.
- Canbaş, A. ve Deryaoğlu, A. 1993. Şalgam suyunun üretim tekniği ve bileşimi üzerinde bir araştırma. *Doğa-Turkish Journal of Agricultural and Forestry*, 17, 119-129.
- Caplice, E. and Fitzgerald, G.F. 1999. Food fermentations role of microorganism in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 131–149.
- Carr, F., Chill, D. and Miada, N. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28 (4), 281–370.

- Coşansu, S., Kuleaşan, H., Ayhan, K. and Materon, L. 2006. Antimicrobial activity and protein profiles *Pediococcus* spp. isolated from Turkish “Sucuk”. Journal of Food Processing and Preservation 31 (2), 190–200.
- Couret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M. and Vernoux, J.P. 2003. Isolation characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. Lait, 83, 269–306.
- Çakır, İ. 2003. *Lactobacillus* ve bifidobacterlerde bazı probiyotik özelliklerin belirlenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, 92, Ankara.
- Çon, A. ve Gökalp, H. 2000. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal metabolitleri ve etki şekilleri. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 30, 180-190.
- Daeschel, M.A., 1989, Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol., January, 164-167.
- Dimitonova, S.P., Bakalov, B.V., Aleksandrova-Georgieva and Danova, S. T. 2008. Phenotypic and molecular identification of lactobacilli isolated from vaginal secretions. Journal of Microbiology Immunology and Infection, 41 (6), 469-477.
- Demir, N., Acar, J. and Bahçeci, K.S. 2004. Effects of storage on quality of carrot juices produced with lactofermentation and acidification. European Food Research Technology, 218, 465–468.
- Demir, N., Bahçeci, K.S. and Acar, J. 2006. The effects of different initial *Lactobacillus plantarum* concentrations on some properties of fermented carrot juice. Journal of Food Processing and Preservation, 30 (3), 352–363.
- Dicks, L.M.T., van Vuuren, H.J.J. and Dellaglio, F., 1990. Taxonomy of *Leuconostoc* species, particularly *Leuconostoc oenos*, as revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns, DNA base compositions and DNA-DNA hybridizations. International Journal of Systematic Bacteriology, 40, 83-91.
- Dinçer, E., Kıvanç, M. ve Karaca, H. 2010. Biyokoruyucu olarak laktik asit bakterileri ve bakteriyosinler. Gıda, 35(1), 55–62.
- Durlu-Özkaya, F., Karabiçak, N., Kayalı, R. and Esen, B. 2005. Inhibition of yeast isolated from traditional Turkish cheeses by *Lactobacillus* spp. International Journal of Dairy Technology, 58 (2), 111–114.
- Dykes, G.A and von Holy A. 1994. Strain typing in the genus *Lactobacillus*. Letters in Applied Microbiology, 19, 63-66.
- Ehrmann, M. A. and Vogel, R.F. 2005. Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. Trends in Food Science and Technology, 16 (1-3), 31-42.

- Erkuş, O. 2007. Isolation, phenotypic and genotypic characterization of yoghurt starter bacteria. Yüksek Lisans Tezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, 117, İzmir.
- Erten, H., Tangüler, H. and Canbaş, A. 2008. A traditional Turkish lactic acid fermented beverage: Shalgam (Salgam). Food Reviews International, 24, 352-359.
- Erten, H. ve Tangüler, H., 2010. Fermente Bitkisel Ürünler, İçinde: Gıda Biyoteknolojisi, (N. Aran, editör), Nobel Yayın Dağıtım Tic. Ltd. Şti., 241-277, Ankara.
- Frank, J.F. and Marth, E.H., 1977, Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* by homofermentative lactic acid bacteria in skim milk, J. Food Protect., 40(11), 754-759.
- Freitas, D.B., Reis, M.P., Lima-Bittencourt, C.I., Costa, P.S, Assis, P.S., Chartone-Souza, E. and Nascimento, A.M.A. 2008. Genotypic and phenotypic diversity of *Bacillus* spp. isolated from steel plant waste. BMC Research Notes, 1 (92), 1-92.
- Galvez, A., Lopez, R.L., Abriouel, H., Valdivia, E. And Omar, N.B. 2008. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. Critical Reviews in Biotechnology, 28(2), 125-152.
- Geredeli, S. ve Anlı, E. 2005. Şaraptaki laktik asit bakterilerinin malolaktik fermantasyondaki önemi. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi Yayınları, 3 (1), 1-14.
- Gezginç, Y. ve Akyol, İ. 2010. Geleneksel yoğurtlardan izole edilen *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus*'ların tanımlanması. Kahramanmaraş Sutcu Imam University Journal of Natural Science, 13 (2), 23-29.
- Giraffa, G. and Neviani, E. 2000. Molecular identification and characterization of food associated lactobacilli. Italian Journal of Food Science, 4(2), 403-424.
- Halkman, A.K. 2005. Gıda mikrobiyolojisi uygulamaları, MERCK, Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd. Şti., 358, Ankara.
- Hansen, E. B. 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. International Journal of Food Microbiology, 78, 119-131.
- Harris, L.J. 1998. The microbiology of vegetable fermentations. In: Microbiology of Fermented Food. Wood, B. J. B. (eds), Blackie Academic and Professional, 45-52, London.
- Harrigan, W.F. and McCance, M.E. 1990. Laboratory methods in food and dairy microbiology 8th edn. Academic Press, 452, London.

- Hebert, E.M., Raya, R.R., Tailiez, P. and de Giori, G.S. 2000. Characterization of natural isolates of *Lactobacillus* strains to be used as starter cultures in dairy fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 59, 19–27.
- Hofvendahl, K., Niel, W.J. and Hahn-Hagerdal, B. 1999. Effect of temperature and pH on growth and product formation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 growing on maltose. *Application Microbiology Biotechnology*, 51, 669-672.
- Holzapfel, W.H., Geisen, R., and Schillinger, U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 24 (3), 343–362.
- Holzapfel, W.H. 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Microbiology*, 75, 197–212.
- Huys, G., Pearson, M., Kampfer, P., Denys, R., Cnockaert, M., Inglis, V. and Swings, J. 2003. *Aeromonas hydrophila* subsp. *ranae* subsp. nov., isolated from septicemic farmed frogs in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53 (3), 885- 891.
- Iversen, C., Lancashire, L., Waddington, M., Forsythe, S. and Ball, G. 2006. Identification of *Enterobacter sakazakii* from closely related species: The use of Artificial Neural Networks in the analysis of biochemical and 16S rDNA data. *BMC Microbiology* 6(28), 1471-2180.
- İncedayı, B., Uylaşer, V. and Çopur, Ö. U. 2008. A traditional Turkish beverage shalgam: Manufacturing technique and nutritional value. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 6 (3-4), 31-34.
- İşleroğlu, H., Yıldırım, Z. ve Yıldırım, M. 2008. Yöresel peynirden antimikrobiyel aktiviteye sahip laktik asit bakterisinin izolasyonu ve tanısı. *GOÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25 (1), 1-6.
- İyiçınar, H., 2007. Kontrollü şartlarda şalgam suyu üretimi üzerine farklı formülasyonların etkisi. *Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi*, 57, Konya.
- İzmirli, M. 2010. Prostat kanserinin ELAC2 ve SRD5A2 genlerindeki polimorfizmler ile ilişkisinin araştırılması. *Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi*, 182, Adana.
- Jung, M.Y. and Paik, H.D. 2000. Identification and partial characterization of lactacin JW3, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* JW3 isolated from commercial swiss cheese products. *Food Science Biotechnology*, 9 (2), 116-123.
- Keppler, K., Geisen, R. and Holzapfel, W.H., 1994. An α -amylase sensitive bacteriocin of *Leuconostoc carnosum*. *Food Microbiol.*, 11 (1), 39-45.

- Kesenkaş, H., Gürsoy, O., Kınık, Ö. and Akbulut, N., 2006. Extension of shelf life of dairy products by biopresevation: protective cultures. *Gıda* 31 (4), 216–223.
- Kılıç, S., 1990, Yoğurt kültürünü oluşturan *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* bakterilerinin antibakteriyal özellikleri üzerine bir araştırma. *Gıda*, 15(6), 333-338.
- Kıran, F. 2006. Hücre duvarı protein profilleri ve plazmid içeriklerine göre laktik asit bakterilerinin moleküler tanısı. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, 142, Ankara.
- Kleerebezem, M. and de Vos, W.M. 2011. Lactic acid bacteria: life after genomics. *Microbial Biotechnology*, 4, 318-322.
- Kuleaşan, H. 2002. Laktobasiller tarafından üretilen bakteriosinlerin tanımlanması, sınıflandırılması ve bunların bazı gıda kaynaklı patojenler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, 82, Ankara.
- Kullen M.J., Sanozky-Dawes, R.B., Crowell, D.C. and Klaenhammer, T.R. 2000. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *J. Appl. Microbiol.*, September, 511-516.
- Lee, S.A. 2010. In vitro study of the effect pH and salt concentration on the growth of lactic acid bacteria and mold in Doenjang (Korean fermented soybean paste). International Baccalaureate Extended essay Biology, Taejong Christian International School, 51.
- Leisner, J.J., Vancanneyt, M., Rusul, G., Pot, B., Lefebvre, K., Fresi A. and Tee, L.K. 2001. Identification of lactic acid bacteria constituting the predominating microflora in an acid-fermented condiment (tempoyak) popular in Malaysia. *Int.J. Food Microbiol.*, 63 (1-2), 149-157.
- Leroy, F. ve De Vuyst, L. 1999. The presence of salt and a curing agent reduces bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CTc 494, a potential starter culture for sausage fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (12), 5350-5356.
- Leroy, F. ve De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 67–78.
- Lindgreen, S.E. ve Dobrogosz, W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, 87 (1–2), 149–163.
- Lonvaud-Funel, A. 1995. Microbiology of malolactic fermentation: Molecular aspects. *FEMS Microbiology Letters*, 126, 209-214.

- Lücke, F.K., 1996. Indigenous Lactic Acid Bacteria of Various Food Commodities and Factors Affecting Their Growth and Survival, In: Lactic Acid Bacteria: Current Advances in Metabolism, Genetics and Applications. Bozoğlu, F. ve Ray, B. (eds), NATO ASI Series, Vol. 98, pp.253-268, Berlin.
- Martin, A.M., 1996. Fermentation Processes for the Production of Lactic Acid, In: Lactic Acid Bacteria: Current Advances in Metabolism, Genetics and Applications. Bozoğlu, F. ve Ray, B. (eds), NATO ASI Series, Vol. 98, pp.268-302, Berlin.
- Messens, W., Neysens, P., Vansieleghem, W., Vanderhoeven, J. and De Vuyst, L. 2002. Modeling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in response to temperature and pH values used for sourdough fermentations. Applied and Environmental Microbiology, 68 (3), 1431–1435.
- Mete, A. 2011. Őalgamdan izole edilen laktik asit bakterilerinin dekarboksilasyon aktivitelerinin belirlenmesi ve biyojen amin üretme yeteneklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi., Sakarya Üniversitesi, 51, Sakarya.
- Miller, K.G., Alfonsott, A., Nguyen, M., Crowell, J.A., Johnson, C. D. and Rand, J.B. 1996. A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Neurobiology, 93, 12593–12598.
- Morishita, Y. and Shiromizu, K. 1986. Characterization of lactobacilli from meats and meat products. International Journal of Food Microbiology, 53, 2683- 2685.
- Mullan, W.M.A. 2000. Causes and control of early gas production in ceddar cheese. International Journal of Dairy Technology, 53 (2), 63–68.
- Mullan, W.M.A. 2001. Microbiology of starter cultures. Dairy Science and Food Technology, <http://www.dairyscience.info/index.php/cheese-starters/49-cheese-starters.html>. Erişim Tarihi: 31.01.2012.
- Nikoloeva, T.N., Zorina, V.V. and Bondarenko, V.M. 2004. The role of cytokines in the immunoreactivity modulation with bacteria of the *Lactobacillus* genus. J Microbiol Epidemiol Immunol., 6, 101-106.
- Okçu, G. 2011. Geleneksel olarak üretilen Şalgam suyundan laktik asit bakterilerinin izolasyonu, tanımlanması ve fenolik asit dekarboksilaz enzim üreten suşların seçimi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, 61, Ankara.
- O’Keeffe, T. and Hill, C. 1999. Bacteriocins: Potential in food preservation. doi: 10.1006/rwfm.1999.0150.

- Osmanağaoğlu, Ö., Kıran, F. ve Oral, B. 2011. Bazı laktik asit bakterilerinden 16S rDNA ara bölge (ISR) temel alınarak gerçekleştirilen filogenetik analizler. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Kesin Raporu, Ankara Üniversitesi, 205, Ankara.
- O’Sullivan, D.J. 1999. Methods for analysis of the intestinal microflora. Curr Issues Intest Microbiol., 2000 Sep;1(2), 39-50.
- Özcan A. Ö., Aran N., 2003. Laktik asit bakterilerinin gıda muhafazasında koruyucu kültür olarak kullanımları. Gıda Teknolojisi, 60–64.
- Özçelik, F. İç, E. 1996. Hıyar turşusu üretiminde kontrollü fermantasyon. Gıda, 21 (1), 49–53.
- Özkalp, B., Özden, B., Tuncer, Y., Şanlıbaba, P. and Akçelik M. 2007. Technological characterization of wild-type *Lactococcus lactis* strains isolated from raw milk and traditional fermented milk products in Turkey. Dairy Science and Technology (Le Lait), 87, 521-534.
- Özkaya, F.D. 2001. Salamura beyaz peynirden izole edilen bazı Laktokok, Enterokok ve Laktobasil suşlarının proteolitik aktivite, bakteriyosin etkenliği ve biyojen amin oluşumu açısından karşılaştırılması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, 134, Ankara.
- Özler, N. ve Kılıç, O. 1996. Şalgam şuyu üretiminde araştırmalar. Gıda, 21 (5), 323-330.
- Rao, MS., Pintado, J., Stevens, WF. and Guyot, J.P. 2004. Kinetic growth parameters of different amyolytic and non-amyolytic *Lactobacillus* strains under various salt and pH conditions. Biosour Technol., 94(3), 331-337.
- Rodriguez, H., Curiel J.A., Landete, J.M., Rivas, B., Felipe, F.L., Cordoves, C.G., Mancheno, J.M. and Munoz, R. 2009. Food phenolics and lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 132 (2–3), 79–90.
- Ruíz-Barba, J.L. and Jiménez-Díaz, R. 1994. Vitamin and amino acid requirements of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentations. Journal of Applied Bacteriology, 76 (4), 350–355.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977. DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. PNAS 74(12), 5463-5467.
- Schillinger, U. and Lücke, F.K. 1987. Identification of lactobacilli from meat and meat products. Food Microbiol., 4, 199-208.
- Schillinger, U. and Lücke, F.K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Applied Environmental Microbiology, 55, 1901-1906.

- Seçkin, A.K., Tosun, H. ve Aritürk, R. 2010. Biyokorumanın süt endüstrisinde kullanım olanakları. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 5 (3), 36–46.
- Stackebrandt, E. and Goebel, B.M. 1994. Taxonomic Note: A Placa for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence analysis in the present species definition in bacteriology. International Journal of Systematic Bacteriology, 44 (4), 846-849.
- Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria and foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology, 36, 1-29.
- Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Peláez, C., Requena, T. 2007. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. International Dairy Journal, 17, 1107–1114.
- Tangüler, H. 2010. Şalgam suyu üretiminde etkili olan laktik asit bakterilerinin belirlenmesi ve şalgam suyu üretim tekniğinin geliştirilmesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, 367, Adana.
- Tekinşen, O.C. ve Atasever, M., 1994, Süt ürünleri üretiminde starter kültür, Selçuk Ü. Vet. Fak. Yayını, 150, Konya.
- Temiz, A. 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. 3. Baskı. Hatipoğlu Yayınları, 291, Ankara.
- Tokatlı, M. 2013. Ankara Çubuk Yöresi Turşularından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmaları, Teknolojik ve Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi ve Starter Olarak Kullanılma Olanaklarının Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, 183, Ankara.
- Toqeer, A. Rashida, K. And Najma A. 2006. Influence of temperature on growth pattern of *Lactococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* and *Lactobacillus acidophilus* isolated from camel milk Biotechnology 5 (4), 481-488.
- Tunail, N. ve Köşker, Ö. 1989. Süt Mikrobiyolojisi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 17, 137, Ankara.
- Tunail, N. 2009. Mikrobiyoloji, Bölüm 9. Taksonomi ve Prokaryotların Sınıflandırılması (198–199). Pelin Ofset, Ankara 448 sayfa. ISBN: 978-605-603-62-0-0.
- Tuncer, Y., Özden, B. ve Avşaroğlu, M.D. 2008. Bozanın bazı mikrobiyolojik özelliklerinin ve laktik asit bakterisi izolatlarının antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12 (1), 19-25.

- Tuncer, Y. 2009. Phenotypic and genotypic characterization of nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* YB23 isolated from raw milk in Turkey. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 23 (4), 1504-1508.
- Türker, N., Aksay, S., and Ekiz, H.İ. 2004. Effect of storage temperature on the stability of anthocyanins of a fermented black carrot (*Daucus carota* var. *L.*) beverage: Shalgam. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (12), 3807-3813.
- Ünal, N. ve İstanbulluoğlu, E. 2009. İnsan ve sığır kökenli *Staphylococcus aureus* izolatlarının fenotipik ve genetik özelliklerinin araştırılması. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 56, 119-126.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 51, 221-271.
- Wollowski I, Rechkemmer G. and Pool-Zobel, B. 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clinical Nutr.*, 73 (2), 451-455.
- You, H.J., Oh, D.K. and Ji, G.E. 2004. Anticancerogenic effect of a novel chiroinositol-containing polysaccharide from *Bifidobacterium bifidum* BGN4. *FEMS Microbiol Lett.*, 240, 131-136.
- Yörük, G.N. ve Güner, A. 2011. Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması ve *Weissella* türlerinin gıda mikrobiyolojisinde önemi. *Ankara Üniversitesi Vet. Bil. Dergisi*, 6 (2), 163-176.
- Yüksekdağ, Z.N ve Beyatlı, Y. 2003. Kefir mikroflorası ile laktik asit bakterilerinin metabolik, antimikrobiyel ve genetik özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1 (2), 49-69.

EKLER

EK 1 Araştırmada Kullanılan Besiyerleri

EK 2 Gram Pozitif Bakterilerden Genomik DNA İzolasyonu

EK 3 DNA İzolasyonu Aşamasında Kullanılan Malzemeler

EK 4 Agaroz Jel Elektroforezi

EK 5 PCR Saflaştırma Protokolü

EK 6 PCR Protokolü (Dizi analizi)

EK 7 Agencourt CleanSEQ ile Sekans Ürünlerinin Temizlenmesi

EK 8 Suşların Dizi Analizleri ve NCBI Gen Bankasındaki Referans Genomlarla Eşleştirilmesi

EK 1 Araştırmada Kullanılan Besiyerleri

MRS Broth (Merck)

Ticari olarak bulunan bu besiyerinden 52,2 g alınıp 1 litre destile su içerisinde çözölmüş, tüplere 5 ml olacak şekilde dağıtılmış ve ardından 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edilmiştir (pH 5,7 ± 0,2).

Tryptic Soy Broth (TSB, Merck)

Ticari olarak bulunan bu besiyerinden 30 g alınıp 1 litre destile su içerisinde çözölmüş, tüplere 10 ml olacak şekilde dağıtılmış ve ardından 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edilmiştir (pH 7,3 ± 0,2).

Tryptic Soy Agar (TSA, Merck)

Ticari olarak bulunan bu besiyerinden 40 g alınıp 1 litre destile su içerisinde çözölmüş, 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edildikten sonra steril petri kutularına dağıtılmıştır (pH 5,7 ± 0,2).

Yumuşak Tryptic Soy Agar (Yumuşak-TSA(%0,6 Agar) , Merck)

Ticari olarak bulunan TSB besiyerinden 30 g ve % 0,6 agar olacak şekilde 1 litre destile su içerisinde çözölmüş, tüplere 10 ml olacak şekilde dağıtılmış ve ardından 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edilmiştir.

EK 2 Gram Pozitif Bakterilerden Genomik DNA İzolasyonu

1. MRS Broth besiyerinde 18 saat süre ile geliştirilen hücreler (10 ml) 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir.
2. Pellet 500µl TE tampon içerisinde çözülerek 14.000 g'de 1 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilir.
3. Pellet 500 µl SET tampon içinde çözülür, 50 µl lizozim eklenir ve 30 dakika 37 °C'de inkübe edilir.
4. Hücre süspansiyonu iki mikrosantrifüj tüpüne bölünür. 200 µl TE tampon ve 30 µl %20'lik SDS (her tüpe ayrı ayrı) eklenir. Birkaç kez karıştırılır.
5. 100 µl 5 M NaCl eklenir ve hemen karıştırılır.
6. Eşit hacimde (≈500µ) fenol eklenir ve emülsiyon oluşana kadar iyice karıştırılır. Kısa süre vortekslenir.
7. 14.000g'de 15 dakika santrifüj edilir ve fazların ayrılması sağlanır. (+4°C'de)
8. Kesik uç ile üst faz yeni bir tüpe aktarılır.
9. Eşit hacimde (≈500µl) kloroform/izoamil alkol eklenir ve nazikçe karıştırılır. (Bu basamak 2 kez yapılabilir.)
10. 14.000 g'de 15 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilir ve üst faz yeni tüplere aktarılır.
11. Tüpte bulunan süpernatantın 2 katı kadar hacimde -20°C'de saklanan %100'lük etanolden eklenir.
12. 12.000 rpm'de +4°C'de 15 dakika santrifüj işlemine tabi tutulur.
13. Pellet havada kurutulur.
14. 100 µl TE tampon ya da suda çözülür.
15. DNA saflığı spektrofotometrede (A_{260}/A_{280} oranı) kullanılarak ölçülür.

EK 3 DNA İzolasyonu Aşamasında Kullanılan Malzemeler

- 1) Sakaroz-EDTA-TrisHCl (SET) Tampon: %20 sakkaroz, 50 mM TrisHCl, pH:7.6
- 2) 10mg/ml RNaz A
- 3) 20mg/ml proteinaz K
- 4) 5mg/ml lizozim
- 5) %20 SDS (otoklavlamak gerekmektedir.)
- 6) 5M NaCl
- 7) %100 etanol
- 8) Fenol (tuz ile doyurulmuş)
- 9) Kloroform/izoamil alkol
- 10) TE tampon

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

Tris 21g

EDTA 0.37g

Distile su 100 ml

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

SET (sucrose-EDTA-tris HCl) Tampon

Tris HCl 0.788g

EDTA 1,86g

Sakaroz 20g

dH₂O 100ml

Mix (50µl): Su 29,75µl, Tampon 10µl, dNTP (2mM) 1µl, F (20pmol) 1µl, R (20pmol) 1µl, MgCl₂ 4µl, Taq 0.25µl, DNA 3µl

EK 4 Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz Jel Hazırlanması

1-Gerekli miktarlarda agaroz tartılır ve erlene koyulur.

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

2-Gerekli miktarda TBE eklenir.

3-Hafifçe çalkalanıp mikrodalga fırına koyulur.

4-Mikrodalga fırın örnek kaynamaya başlayana kadar yüksek ayarda çalıştırılır.

5-Aralıklarla erlen mikrodalga fırından çıkarılıp çalkalanır.

6-Kaynamaya başladıktan sonra mikrodalga fırın ayarı düşürülür. Tamamen eriyene kadar çalkalanarak ısıtılır.

7-EtBr eklenir ve çalkalayarak tüm çözeltiliye dağılması sağlanır.

8-Trayin çatlamaması için çözeltili muslukta biraz soğutulur.

9-Traye yavaşça dökülür ve polimerize olması için en az 15 dakika beklenir.

EK 5 PCR Saflaştırma Protokolü

(Promega; Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Systems)

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

EK 6 PCR Protokolü (Dizi analizi)

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

PCR protokolü (dizi analizi)

| | |
|-------------------------|---------------------------|
| PCR Ürünü | 4-5 µl (100-300ng) |
| Forward Primeri | 2,0 µl |
| **Premix | 5,0 µl |
| ddH₂O | x.x µl |
| Toplam | 20,0 µl |

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

**Premix

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

Hazırlanan karışım bölünerek -20°C'de saklanır.

PCR programı

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

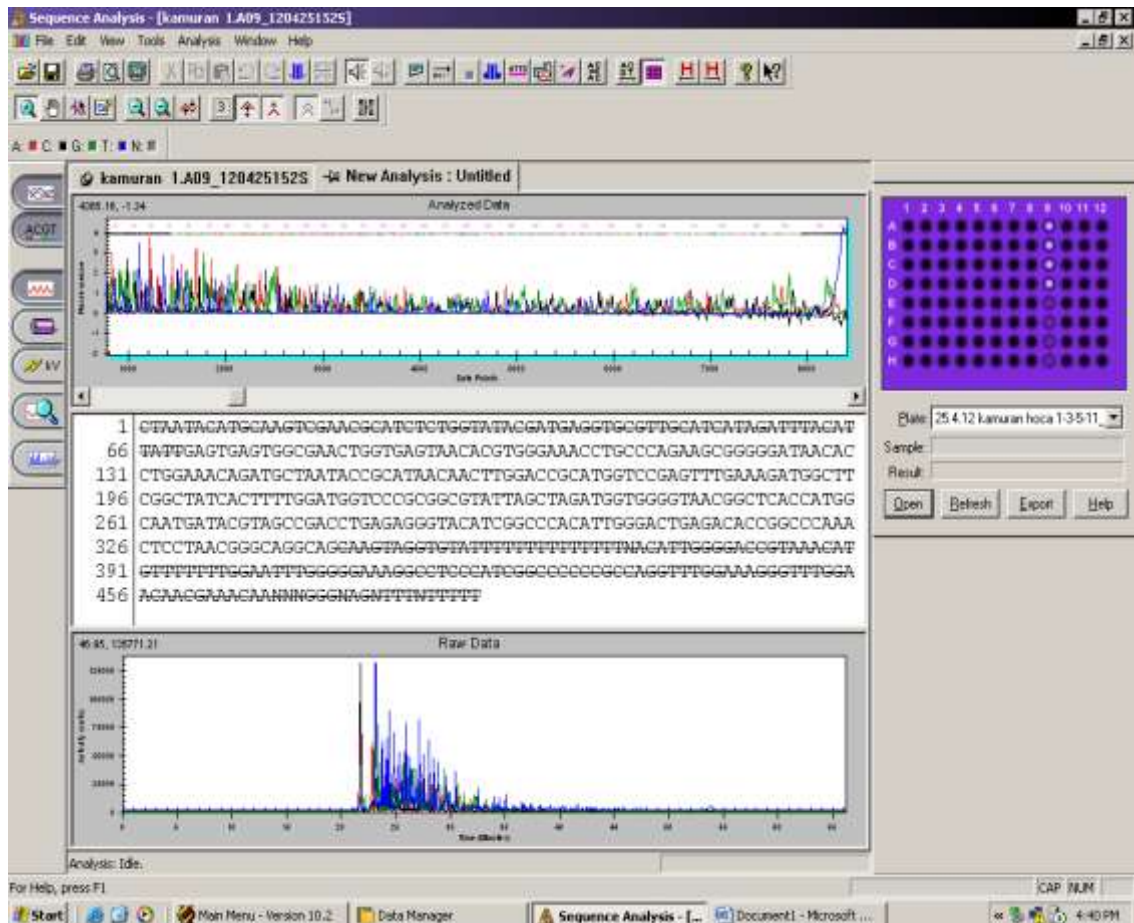
EK 7 Agencourt CleanSEQ ile Sekans Ürünlerinin Temizlenmesi

1. PCR'dan alınan örnekler 1500 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir.
2. Seal açıldıktan sonra 20 µl agencourt cleanSEQ eklenir.
3. %85'lik etanolden 62 µl eklenir ve 7-8 kez pipetaj yapılır.
4. SPRI plate üzerinde 10 dakika üzerine bastırılarak beklenir.
5. SPRI plate üzerinde alkol uzaklaştırılır.
6. 100 µl %85'lik alkolden eklenir. Bu kez 3 dakika SPRI plate üzerinde, üzeri bastırılarak beklenir.
7. SPRI plate üzerinde alkol uzaklaştırılır.
8. AB Gene Plate SPRI plate üzerinden alınır ve ters çevrilerek 10 dakika oda koşullarında kurutma gerçekleştirilir.
9. 40 µl SLS (her zaman taze) eklenir.
10. Kuyuların içi iyice temizlenene dek pipetaj yaparak örneğin çözünmesi sağlanır.
11. Çözünen örnekler AB Gene Plate'ten Beckman sample plate'e aktarılır.
12. Örneklerin üzerine birer damla mineral oil damlatılır. Ayrıca Beckman Buffer Plate'in $\frac{3}{4}$ 'ü dolacak şekilde buffer konulup ve CEQ 8000 otomatik dizi analizi sistemine yüklenir.

EK 8 Suşların Dizi Analizleri ve NCBI Gen Bankasındaki Referans Genomlar ile Eşleştirilmesi

Suş: GK 1

GAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCG
GGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGC
ATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCC GCG
GCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAG
CCGACCTGAGAGGGTACATCGGCCACATTGGGACTGAGACACCGGCCCAA
ACTCCTAACGGGCAGGCAG



BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

NCBI BLAST: Nucleotide Nucleotide Sequences - AE201AM018

Nucleotide Sequence (274 letters)

RID: AE201AM018 (Expires on 12-11 19:24 pm)
 Query ID: M314321
 Description: None
 Molecule type: nucleic acid
 Query Length: 274

Database Name: nt
 Description: nucleotide collection (nt)
 Program: BLASTN 2.2.26+ > Citation

Other reports: > Search Summary > Taxonomy reports > Distance tree of results

Graphic Summary
 Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select All None Selected 0

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|------------|
| <input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain N4-2-1 | 475 | 475 | 100% | 0e-131 | 98% | AF117213.1 |
| <input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain 500004 | 473 | 473 | 100% | 3e-130 | 98% | AF388871.2 |
| <input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain Y1305 | 473 | 473 | 100% | 3e-130 | 98% | AF388870.1 |
| <input type="checkbox"/> Lactobacillus sp. DMS14-160 ribosomal RNA, gene, partial sequence | 473 | 473 | 100% | 3e-130 | 98% | AF291248.1 |

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

NCBI BLAST: Microbes Formatting Results - AKDVF18054

Nucleotide Sequence (180 letters)

RID: AKDVF18054 (Expires on 12-13 18:52 pm)
 Query ID: M319395
 Description: None
 Molecule type: nucleic acid
 Query Length: 180

Database Name: Representative genomes
 Description: > See details
 Program: BLASTN 2.2.26+ > Citation

Other reports: > Search Summary > Taxonomy reports > Distance tree of results

Graphic Summary
 Descriptions

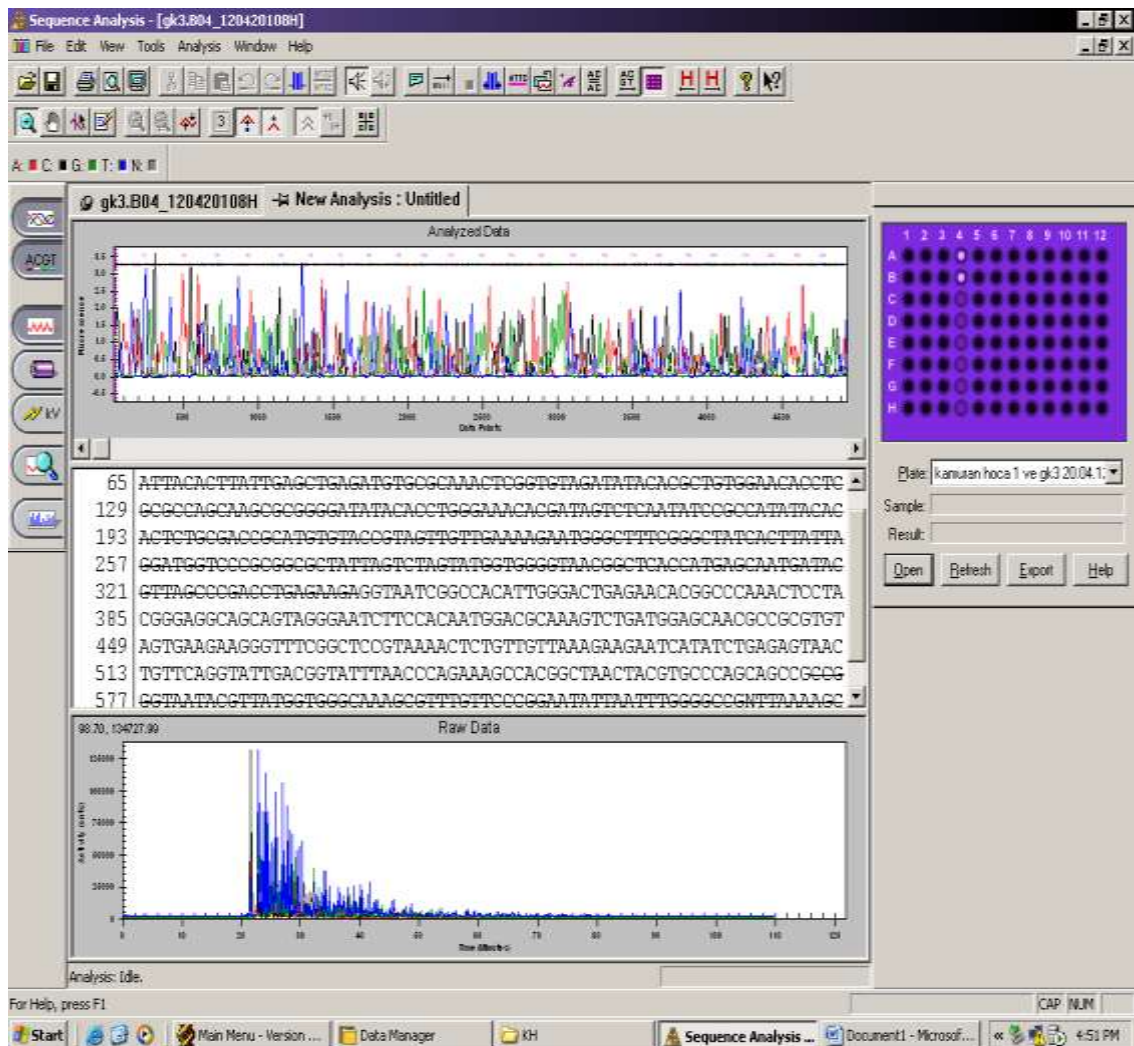
Sequences producing significant alignments:

Select All None Selected 0

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|-------------|
| <input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum WCF51, complete genome | 329 | 1649 | 100% | 4e-88 | 99% | C_009597.2 |
| <input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum WCF51, complete genome | 291 | 1438 | 100% | 2e-78 | 99% | NC_008497.1 |
| <input type="checkbox"/> Lactobacillus thurmerus O2 chromosome, complete genome | 289 | 1445 | 99% | 7e-76 | 96% | NC_012198.1 |
| <input type="checkbox"/> Lactobacillus reuteri DSM 20016 chromosome, complete genome | 289 | 1701 | 99% | 7e-76 | 96% | NC_006111.1 |

Suş: GK 3

GGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGAACACGGCCAAACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAAGTCTGATGGAGCAACGCC
GCGTGTAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAG
AATCATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCCAGAAA
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG



BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

NCBI BLAST: Microbe Formatting Results - AK5YF2VG614

Nucleotide Sequence (180 letters)

WID: AK5YF2VG614 (Expires on 12-13 18:53 pm)

Query ID: U33893

Description: none

Molecule type: nucleic acid

Query Length: 180

Database Name: Representative genomes

Description: [View details](#)

Program: BLASTN 2.2.28+ [View Changelog](#)

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Statistics tree of results](#)

Graphic Summary

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

| Alignments | Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|-------------------------------------|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|-------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Lactobacillus plantarum NCFS1 complete genome | 327 | 1639 | 100% | 2e-67 | 99% | NC_004962.2 |
| <input type="checkbox"/> | Lactobacillus plantarum DSM 9843 complete genome | 289 | 1445 | 100% | 7e-76 | | NC_112198.1 |
| <input type="checkbox"/> | Lactobacillus reuteri DSM 20016 complete genome | 289 | 1701 | 100% | 7e-76 | 96% | NC_008513.1 |
| <input type="checkbox"/> | Lactobacillus casei ATCC 334 complete genome | 289 | 1445 | 100% | 7e-76 | 96% | NC_008528.1 |

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

NCBI BLAST: Blast water Formatting Results - AJ25819W14

Nucleotide Sequence (233 letters)

WID: AJ25819W14 (Expires on 12-11 19:27 pm)

Query ID: U34543

Description: none

Molecule type: nucleic acid

Query Length: 233

Database Name: nt

Description: nucleotide collection (nt)

Program: BLASTN 2.2.28+ [View Changelog](#)

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Statistics tree of results](#)

Graphic Summary

Descriptions

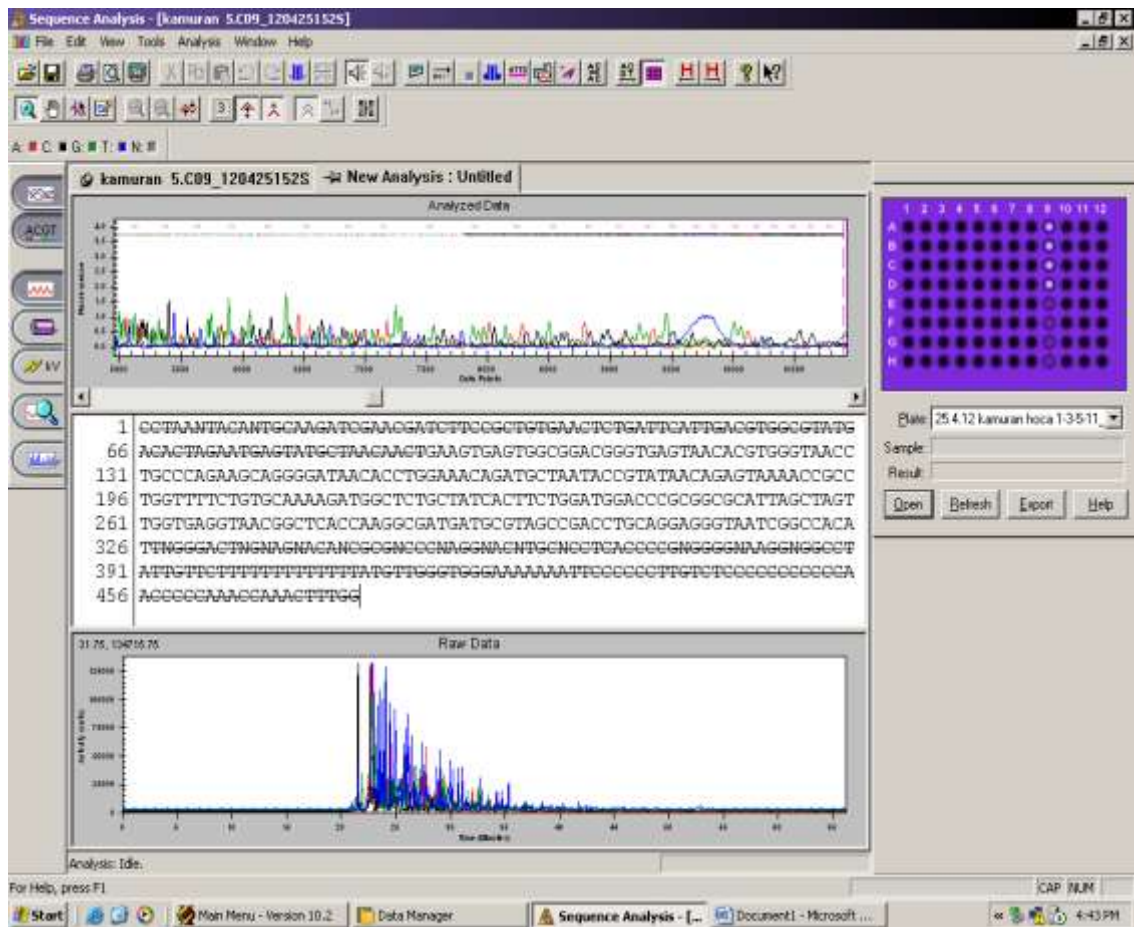
Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

| Alignments | Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|-------------------------------------|---|-----------|-------------|-------------|---------|-------|------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Lactobacillus plantarum gene for 16S rRNA, partial sequence, strain FN 30 | 392 | 392 | 100% | 7e-104 | 97% | U008542.1 |
| <input type="checkbox"/> | Lactobacillus sp. HCC11-MR316 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 387 | 387 | 100% | 3e-104 | 97% | NC126973.1 |
| <input type="checkbox"/> | Lactobacillus sp. HCC11-F2304 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 387 | 387 | 100% | 3e-104 | 97% | NC126973.1 |
| <input type="checkbox"/> | Lactobacillus plantarum gene for 16S rRNA, partial sequence, strain DAG56 | 387 | 387 | 100% | 3e-104 | 97% | AF072043.1 |

Suş: GK 5

GAAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCAGAAGC
AGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGTAAAACC
GCCTGGTTTTCTGTGCAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCG
CGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGATGATGCGT
AGCCGACCTGCAGGAGGGTAATCGGCCACA



BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

NCBI BLAST: Nucleotide Formatting Results - AE20TM4295

Nucleotide Sequence (234 letters)

Query ID: U326971
 Description: None
 Molecule type: nucleic acid
 Query Length: 234

Database Name: nt
 Description: nucleotide collection (nt)
 Program: BLASTN 2.2.28+

Sequences producing significant alignments:

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|------------|
| Pediococcus acididurans strain BC 18 193 ribosomal RNA gene, partial sequence | 396 | 396 | 100% | 5e-107 | 97% | U30024.1 |
| Pediococcus acididurans strain ATCC 4 195 ribosomal RNA gene, partial sequence | 396 | 396 | 100% | 5e-107 | 97% | F051196.1 |
| Uncultured Pediococcus sp. clone 1488 195 ribosomal RNA gene, partial sequence | 396 | 396 | 100% | 5e-107 | 97% | K2520467.1 |
| Pediococcus acididurans strain 183 ribosomal RNA, partial sequence, strain ELS-2 | 396 | 396 | 100% | 5e-107 | 97% | AB941214.1 |

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

NCBI BLAST: Microbes Formatting Results - AR30MU0614

Nucleotide Sequence (180 letters)

Query ID: U318455
 Description: None
 Molecule type: nucleic acid
 Query Length: 180

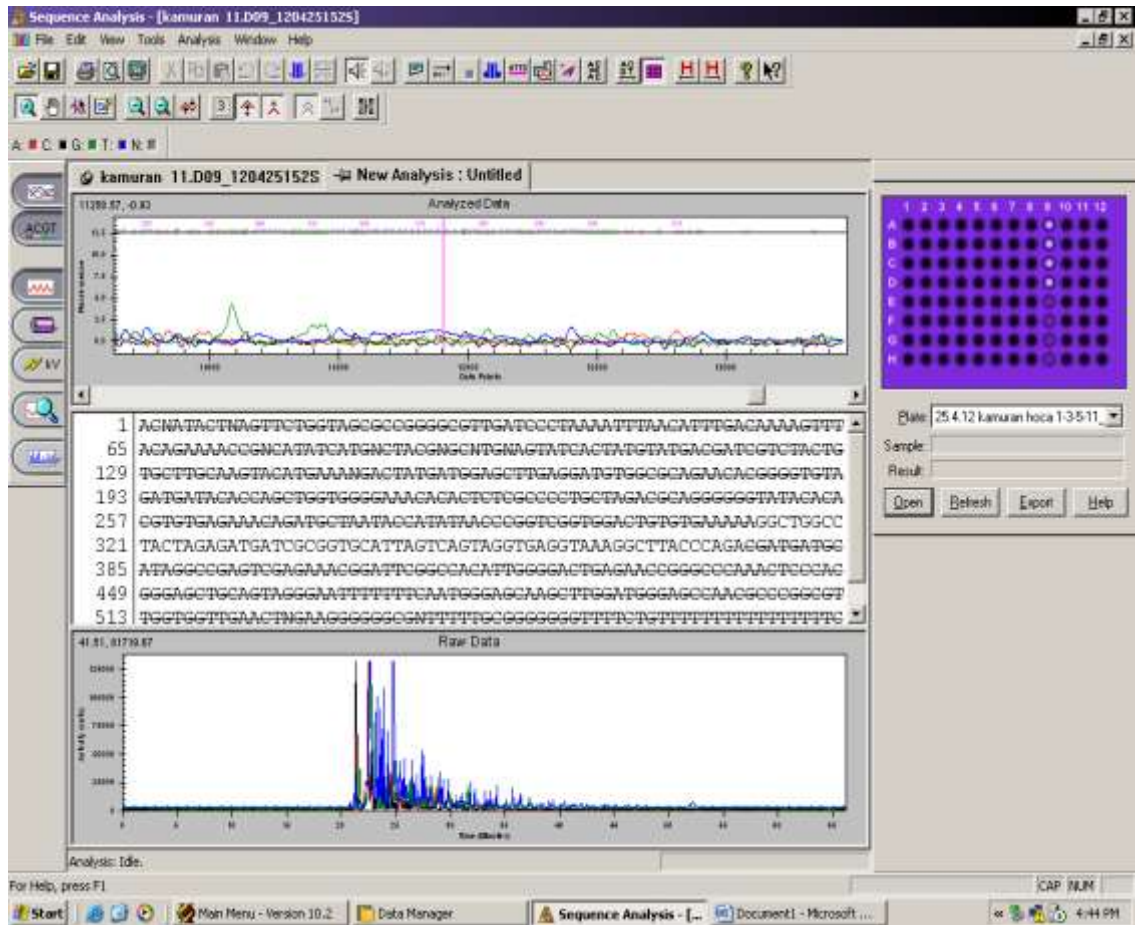
Database Name: Representative genomes
 Description: See details
 Program: BLASTN 2.2.28+

Sequences producing significant alignments:

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|-------------|
| Pediococcus acididurans strain ATCC 4 195 ribosomal RNA gene, partial sequence | 302 | 1208 | 100% | 9e-88 | 96% | U30024.1 |
| Pediococcus acididurans strain ATCC 20245, complete genome | 302 | 1510 | 100% | 9e-88 | 96% | C_388525.1 |
| Pediococcus acididurans strain ATCC 20245, complete genome | 302 | 2114 | 100% | 9e-88 | 96% | NC_002578.1 |
| Pediococcus acididurans strain ATCC 20245, complete genome | 279 | 1359 | 100% | 4e-73 | 94% | NC_004907.2 |

Suş: GK 11

GGCTGGCCTACTAGAGATGATCGCGGTGCATTAGTCAGTAGGTTGAGGTAAA
GGCTTACCCAGA



BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

NCBI BLAST: Nucleotide Sequence Formatting Results - AJJME6901R

Nucleotide Sequence (63 letters)

RID: AJJME6901R (Expires on 12-07-2011 am)

Query ID: UJ9513

Description: None

Molecule type: nucleic acid

Query Length: 63

Database Name: nt

Description: nucleotide collection (nt)

Program: BLASTN 2.2.26+ [Citation](#)

No significant similarity found. For reasons why, click here.

Other reports: [Search Summary](#)

BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine.

NCBI 1998-2011 02/25



BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

NCBI BLAST: Microbial Formatting Results - AK38052015

Nucleotide Sequence (180 letters)

RID: AK38052015 (Expires on 12-13 18:59 pm)

Query ID: UJ29547

Description: None

Molecule type: nucleic acid

Query Length: 180

Database Name: Representative genomes

Description: [See details](#)

Program: BLASTN 2.2.26+ [Citation](#)

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Domain tree of results](#)

Graphic Summary

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

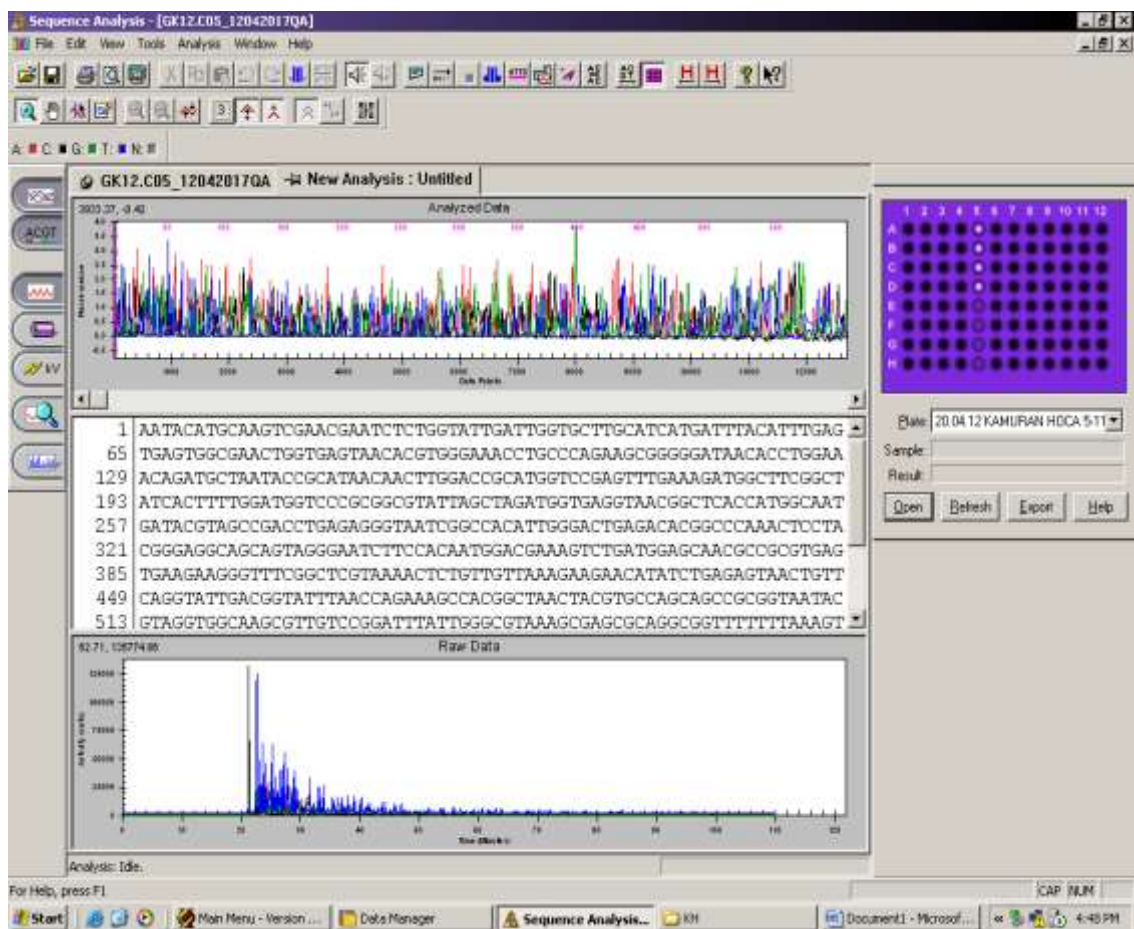
Select All None Selected 0

| Alignments | Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|--------------------------|---|-----------|-------------|-------------|---------|-------|-------------|
| <input type="checkbox"/> | Lactobacillus plantarum WCFR1, complete genome | 316 | 1584 | 100% | 3e-84 | 90% | NC_004962.2 |
| <input type="checkbox"/> | Lactobacillus plantarum DSM 9843, complete genome | 294 | 1451 | 100% | 2e-77 | 90% | NC_008492.1 |
| <input type="checkbox"/> | Carnobacterium sp. IT-4 intronsome, complete genome | 289 | 2313 | 100% | 7e-76 | 96% | NC_015301.1 |
| <input type="checkbox"/> | Lactobacillus reuteri DSM 20016 intronsome, complete genome | 287 | 1787 | 96% | 3e-75 | 97% | NC_006511.1 |

Windows taskbar showing system tray with date 12.12.2011 and time 15:59.

Suş: GK 12

AATACATGCAAGTCGAACGAATCTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGA
TTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCC
CAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCT
TGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATG
GTCCC GCGGCGTATTAGCTAGATGGTGAGGTAACGGCTCACCATGGCAATG
ATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGG
CCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAA
GTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAC
TCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGT
ATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGG
TTTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAAGCCT



BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

NCBI BLAST: Nucleotide Formatting Results - AE298769015

Nucleotide Sequence (592 letters)

Query ID: J050001
 Description: None
 Molecule type: nucleic acid
 Query Length: 592

Database Name: nt
 Description: nucleotide collection (nt)
 Program: BLASTN 2.2.28+

Sequences producing significant alignments:

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|------------|
| <input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain ATCC 30541 [ref] ribosomal RNA gene, partial sequence | 1068 | 1068 | 100% | 0.0 | 99% | J050001.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain ATCC 30541 [ref] ribosomal RNA gene, partial sequence | 1068 | 1068 | 100% | 0.0 | 99% | F0202253.1 |
| <input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain DSM 9843 [ref] ribosomal RNA gene, partial sequence | 1068 | 1068 | 100% | 0.0 | 99% | F0202258.1 |
| <input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain DSM 9843 [ref] ribosomal RNA gene, partial sequence | 1068 | 5212 | 100% | 0.0 | 99% | F0202261.1 |

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

NCBI BLAST: Microbes/ Formatting Results - AK35535014

Nucleotide Sequence (180 letters)

Query ID: J050071
 Description: None
 Molecule type: nucleic acid
 Query Length: 180

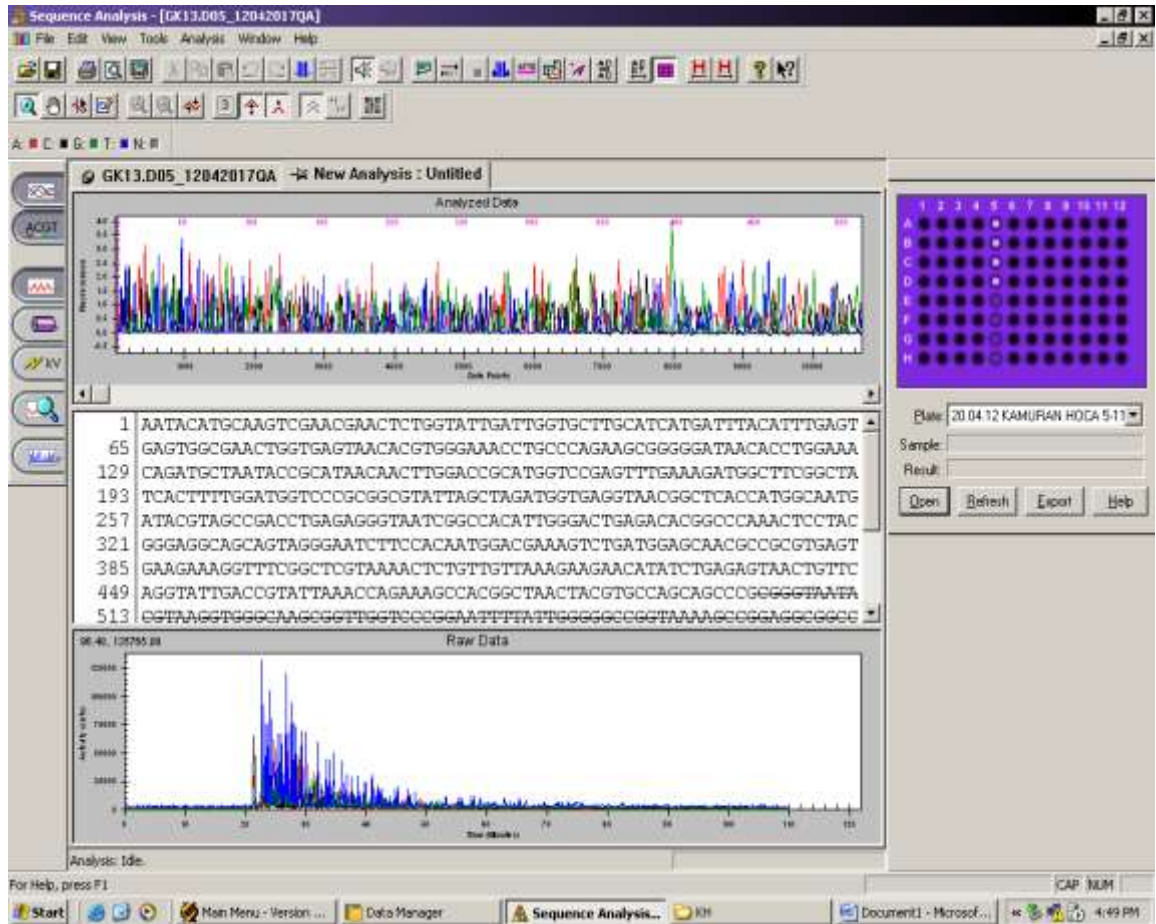
Database Name: representative genomes
 Description: - See details
 Program: BLASTN 2.2.28+

Sequences producing significant alignments:

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|-------|-------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum WFS1, complete genome | 333 | 1667 | 100% | 3e-05 | 100% | NC_095492.2 |
| <input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain ATCC 30541, complete genome | 360 | 1484 | 100% | 3e-79 | 96% | NC_000887.1 |
| <input type="checkbox"/> Lactobacillus rhamnosus GG chromosome, complete genome | 294 | 1473 | 100% | 2e-77 | 96% | NC_013188.1 |
| <input type="checkbox"/> Lactobacillus casei ATCC 334 chromosome, complete genome | 294 | 1473 | 100% | 2e-77 | 96% | NC_009424.1 |

Suş: GK 13

AATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGAT
TTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCC
AGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTT
GGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGG
TCCC GCGCGTATTAGCTAGATGGTGAGGTAACGGCTCACCATGGCAATGA
TACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGC
CCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAG
TCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAAGGTTTCGGCTCGTAAACT
CTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACCGTA
TTAAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCCG



BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

NCBI BLAST: Nucleotide Sequence Formatting Results - AEZWA3RH5

Nucleotide Sequence (503 letters)

Query ID: AEZWA3RH5 (Expires on 12-11 19:39 am)
 Description: none
 Molecule type: nucleic acid
 Query Length: 503

Database Name: nt
 Description: nucleotide collection (nt)
 Program: BLASTN 2.2.28+ (Citation)

Sequences producing significant alignments:

| Description | Max score | Total score | Query cover | E-value | Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|-----------|
| <input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone M004601.185 ribosomal RNA gene, partial sequence | 929 | 929 | 99% | 0.0 | 99% | J048162.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <i>Lactobacillus plantarum</i> strain ATCC 30069, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 929 | 929 | 99% | 0.0 | 99% | F023255.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Lactobacillus plantarum</i> strain DSM 2187, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 929 | 929 | 99% | 0.0 | 99% | F023256.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Lactobacillus plantarum</i> 18, complete genome | 929 | 4518 | 99% | 0.0 | 99% | C25977.1 |

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

NCBI BLAST: Microbial Formatting Results - AN3K0UR9Y14

Nucleotide Sequence (180 letters)

Query ID: AN3K0UR9Y14 (Expires on 12-13 19:04 am)
 Description: none
 Molecule type: nucleic acid
 Query Length: 180

Database Name: Representative genomes
 Description: (see details)
 Program: BLASTN 2.2.28+ (Citation)

Sequences producing significant alignments:

| Description | Max score | Total score | Query cover | E-value | Ident | Accession |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|-------|-------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> <i>Lactobacillus plantarum</i> NCFS1, complete genome | 326 | 1630 | 100% | 6e-87 | 99% | NC_024952.2 |
| <input type="checkbox"/> <i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 2187, complete genome | 298 | 1492 | 100% | 1e-78 | 99% | NC_011198.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 30069, complete genome | 298 | 1492 | 100% | 1e-78 | 99% | NC_008529.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20016, complete genome | 292 | 1740 | 100% | 6e-77 | 96% | NC_008511.1 |

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Nurhan SAMANTIR

Doğum Yeri :Uşak

Doğum Tarihi :02.03.1981

Medeni Hali :Evlü

Yabancı Dili :İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise :Uşak Süper Lisesi 1999

Lisans :Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü 2004

Yüksek Lisans :Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (Eylül 2011- Ocak 2014)

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl

Akaş Akbalık Gıda San. ve Tic. Ltd. Şti., Üretim Şefi (MANİSA) 2004

Seyran Gıda San. ve Tic. Ltd. Şti., Kalite Kontrol Şefi (DENİZLİ) 2005

Burcu Ekmek ve Unlu Mamulleri, Üretim Şefi (DENİZLİ) 2006

Ankameks Gıda San. ve Tic. Ltd. Şti. (ANKARA) 2008

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Etimesgut İlçe Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü (ANKARA) 2011

Yayınları :

1- **Samantir, N.** 2011. Laktik Asit Bakterilerinin Gıdalarda Küf Gelişimi ve Mikotoksin Oluşumunun Engellenmesindeki Rolü. *Yüksek Lisans Semineri*. Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü. Ankara. 37 sayfa.