

**AZERBAIJAN'IN FARKLI GIDA
ÖRNEKLERİNDEN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE
BAKTERİYOSİN ÜRETİM YETENEKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI
Yüksek Lisans Tezi
Nurana MOLLAYEVA
Eskişehir 2019**

**AZERBAIJAN'IN FARKLI GIDA ÖRNEKLERİNDEN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE BAKTERİYOSİN ÜRETİM
YETENEKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nurana MOLLAYEVA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Temmuz 2019

Bu tez çalışması BAP Komisyonu tarafından kabul edilen 1803F064 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nurana MOLLAYEVA'nın "Azerbaycan'ın Farklı Gıda Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Bakteriyosin Üretim Yeteneklerinin Araştırılması" başlıklı tezi 19/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, İleri Teknolojiler Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof.Dr. Mehmet Burçin MUTLU	:
Üye	: Doç.Dr. Gökalp İŞCAN	:
Üye	: Dr.Öğr.Üyesi Volkan KILIÇ	:

Prof.Dr. Murat TANIŞLI

Enstitü Müdürü

ÖZET

AZERBAIJAN' IN FARKLI GIDA ÖRNEKLERİNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE BAKTERİYOSİN ÜRETİM YETENEKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nurana MOLLAYEVA

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Temmuz 2019

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU

Bu çalışmada Azerbaycan'ın farklı illerine ait süt ürünlerinden laktik asit bakteri izolasyonu yapılmıştır. Bununla beraber örneklerde klasik yöntemle ve Tempo BioMeriux cihazıyla bakteri sayımı gerçekleştirilmiştir. İzole edilmiş laktik asit bakterileri biyokimyasal ve morfolojik olarak tanımlanmıştır. Bu bakterilerin bakteriyosin üretim yeteneklerini belirlemek için spot-on lawn ve 2 farklı agar kuyu difüzyon yöntemleri kullanılmıştır. En iyi sonuçlar MH agar üzerinde yapılan agar kuyu difüzyon yöntemiyle elde edilmiştir. Toplam 98 adet izolatın 29-da antimikrobiyal aktivite saptanmıştır. Kültür bağımlı yöntem olarak PCR ile izolatların 16S rRNA gen bölgeleri çoğaltılmış ve plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır. Kültür bağımsız yöntem olarak örneklerin mikrobiyal çeşitliliğini belirlemek için floresan in situ hibridizasyon (FISH) deneyleri ve toplam nükleik asit ekstraksiyonu yapılmıştır. Illumina MiSeq platformu kullanılarak toplam nükleik asit ekstraktlarından 16S rDNA'ya dayalı gen dizileme gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE yöntemi kullanılarak antimikrobiyal aktiviteye sahip olan ve olmayan bazı izolatların protein profili incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterileri, Bakteriyosin, SDS-PAGE, FISH, Illumina MiSeq

ABSTRACT

ISOLATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM DIFFERENT FOOD SAMPLES OF AZERBAIJAN AND INVESTIGATION OF BACTERIOCIN PRODUCTION CAPACITIES

Nurana MOLLAYEVA

Department of Advanced Technologies

Programme in Biotechnology

Anadolu University, Graduate School of Sciences, July 2019

Supervisor: Professor Doctor Mehmet Burçin MUTLU

In this study, lactic acid bacteria were isolated from dairy products of different regions of Azerbaijan. However, the samples were counted by classical method and Tempo BioMeriux device. Isolated lactic acid bacteria were identified as biochemical and morphological. Spot-on lawn and 2 different agar well diffusion methods were used to determine the bacteriocin production ability of these bacteria. The best results were obtained by agar well diffusion method on MH agar. Antimicrobial activity was detected in 29 of 98 isolates. As culture dependent method, 16S rRNA gene regions of the isolates were amplified and plasmid DNA was isolated. Fluorescence in situ hybridization (FISH) experiments and total nucleic acid extraction were performed to determine the microbial diversity of the samples as culture-independent methods. Gene sequencing based on 16S rDNA from total nucleic acid extracts was performed using the Illumina MiSeq platform. Using SDS-PAGE method, protein profile of some isolates with and without antimicrobial activity was investigated.

Keywords: Lactic acid bacteria, Bacteriocin, SDS-PAGE, FISH, Illumina MiSeq

TEŞEKKÜR

Öncelikle Yüksek Lisans tezimle ilgili tüm süreçte bana yol gösteren, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Danışmanım Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans çalışmam sürecinde ilgi ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Nilgün POYRAZ'a, Erdoğan ÇAKIR'a, Mustafa KARAKAŞ'a ve başta doktora öğrencileri Sevilay YAPICI ve Samira EBRAHİMİ olmakla tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi bu uzun ve zorlu yolda da yorulmadan her zaman her konuda beni destekleyen değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan değerli arkadaşım Kamala MAMMADOVA'ya tüm desteği ve yardımları için teşekkür ederim.

Nurana MOLLAYEVA

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Nurana MOLLAYEVA

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Süt Ürünlerinde Laktik Asit Bakterileri	3
1.2. Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması	4
1.3. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması	8
1.3.1. Lactococcus	9
1.3.2. Streptococcus	9
1.3.3. Leuconostoc	10
1.3.4. Lactobacillus	11
1.3.5. Enterococcus	11
1.3.6. Pediococcus	12
1.3.7. Weisella	13
1.4. Starter Kültür Olarak Kullanılan LAB	13
1.5. Probiyotik Bakteriler	16

1.5.1. Probiyotik bakterilerin insan sağığı üzerine yararlı etkileri	17
1.6. Antimikrobiyal Aktivite	19
1.6.1. Bakteriyosinler	20
1.6.1.1. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması	24
2. MATERYAL-METOT	27
2.1. Materyal	27
2.1.1. Kullanılan örnekler	27
2.1.2. Kullanılan kimyasallar	28
2.1.3. Kullanılan besiyerleri	29
2.1.4. Kullanılan kimyasal çözeltiler	32
2.1.5. Kullanılan boyalar	33
2.1.6. Kullanılan test mikroorganizmaları	34
2.1.7. Ekstraksiyon tamponu	35
2.1.8. SDS -PAGE için gerekli malzemeler	35
2.1.9. FISH tamponları	36
2.2. Metot	37
2.2.1. Homojenizasyon	37
2.2.2. Gıda örneğinin seyreltilmesi ve ekim	38
2.2.3. Mikrobiyolojik sayım yöntemleri	39
2.2.3.1. Klasik sayım yöntemi	39
2.2.3.2. Tempo cihazıyla sayım yöntemi	39
2.2.4. İzolasyon, saflaştırma ve muhafaza	41
2.2.5. Gram boyama	41
2.2.6. Katalaz testi	42
2.2.7. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	43

2.2.8. İzolatların bakteriyosin üretim yeteneklerinin belirlenmesi	44
2.2.9. Toplam nükleik asit ekstraksiyonu	45
2.2.9.1. <i>Illumina MiSeq platformu ile 16S rDNA gen-hedefli DNA dizileme ve komünite analizi</i>	46
2.2.10. SDS-PAGE yöntemi	47
2.2.11. İzolatlardan plazmit DNA izolasyonu	48
2.2.12. FISH (Fluoresan in situ hibridizasyon) yöntemi ve DAPI boyama	50
3. BULGULAR	52
3.1. Bakteri Sayım Sonuçları	52
3.2. Süt Ürünlerinden Elde Edilen İzolatların Biyokimyasal ve Morfolojik Özellikleri	58
3.3. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bakteriyosin Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi	62
3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonuçları (PCR)	64
3.5. Toplam Nükleik Asit Ekstraksiyonu Sonuçları	64
3.5.1. <i>Illumina platformu ile 16S rDNA gen-hedefli MiSeq dizileme</i>	65
3.6. İzolatların Toplam Protein Profillerinin SDS-PAGE Yöntemiyle Belirlenmesi	72
3.7. Plazmit DNA İzolasyonu Sonuçları	73
3.8. FISH Yöntemi ve DAPI Boyama Sonuçları	73
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	76
KAYNAKÇA	84
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. Gıda katkıları olarak kullanılan probiyotikler	19
Tablo 1.2. Bakteriyosinler ve özellikleri	24
Tablo 2.1. Kullanılan kimyasallar	28
Tablo 2.2. MRS agar (Lactobacillus Agar acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE. Merck 1.10660).....	29
Tablo 2.3. MRS broth (Lactobacillus Broth acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE. Merck 1.10661)	29
Tablo 2.4. M17 agar acc. to Terzaghi (Merck 1.15108)	30
Tablo 2.5. M 17 broth acc. to Terzaghi (Merck 1.15029)	30
Tablo 2.6. Plate Count agar (Merck 1.05463). Casein-peptone Dextrose Yeast Agar ;PCA	30
Tablo 2.7. Potato Dextrose agar (Merck 1.10130); PDA	31
Tablo 2.8. VRB (Violet Red Bile Agar) agar (Merck 1.01406)	31
Tablo 2.9. TSB yumuşak agar (Tryptic Soy Broth (TSB)) (Merck 1.05459) + %0,7 agar)	31
Tablo 2.10. Mueller-Hinton broth (Merck 1.10293)	32
Tablo 2.11. Mueller-Hinton agar (Merck 1.05437)	32
Tablo 2.12. Brain Heart broth (Merck 1.10493)	32
Tablo 2.13. Fizyolojik tuzlu su (%0,85' lik sodyum klorür çözeltisi)	32
Tablo 2.14. %20' lik gliserol çözeltisi	33
Tablo 2.15. Kristal violet	33
Tablo 2.16. Safranin	33
Tablo 2.17. Lugol	33
Tablo 2.18. Kullanılan test mikroorganizmaları	34
Tablo 2.19. Ekstraksiyon tamponu	35
Tablo 2.20. SDS-PAGE için gerekli jeller	35
Tablo 2.21. Jel tamponları	35
Tablo 2.22. (%10) SDS solusyonu (sodyum dodesil-sülfat).....	35
Tablo 2.23. APS (%10) Amonyum persülfat solusyonu.....	36
Tablo 2.24. 4x Loading sample buffer (10 ml)	36
Tablo 2.25. Yürütme tamponu (SDS Running Buffer (10x)) (pH: 8.3)	36

Tablo 2.26. Boyama solüsyonu (%0.025 coomassie blue R-250, %40 methanol)/stain solution	36
Tablo 2.27. FISH hibridizasyon tamponu	37
Tablo 2.28. FISH yıkama tamponu	37
Tablo 2.29. Bakteri geliştirme ortamları	39
Tablo 3.1. Klasik sayım sonuçları	53
Tablo 3.2. Tempo BioMeriux sayım sonuçları	56
Tablo 3.3. İzolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri	58
Tablo 3.4. İnhibisyon zon çapları (mm)	63
Tablo 3.5. Illumina platformu ile örneklerden elde edilen veriler ve değerler	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Azerbaycan haritası (örneklerin ait olduğu iller)	27
Şekil 2.2. Kullanılan test mikroorganizmaları	34
Şekil 2.3. Peynir örneği ve Stomacher cihazı yardımıyla homojenizasyon işlemi	38
Şekil 2.4. Dilüsyon ve ekim işlemleri	39
Şekil 2.5. Tempo kitleriyle işlemin gerçekleştirilmesi	40
Şekil 2.6. Bakterilerin izolasyonu ve saf kültürlerin muhafazası	41
Şekil 2.7. Hazır preparatlar	42
Şekil 2.8. Boyanmış preparatlar	42
Şekil 2.9. Applied Biosystems Thermal Cycler cihazı	43
Şekil 2.10. Agaroz jel elektroforez	44
Şekil 2.11. SDS-PAGE jel elektroforez	48
Şekil 2.12. PrepEase Quick Minispin Plasmid kiti	50
Şekil 2.13. Plazmid DNA	50
Şekil 3.1. Farklı besiyerlerinde ekim sonuçları; a) VRBa, b) PDA, c)MRSa, d)M17a, e)PCA	52
Şekil 3.2. Işık mikroskopuyla elde edilen görüntüler	62
Şekil 3.3. İnhibisyon zon görüntüleri	64
Şekil 3.4. Toplam nükleik asit ekstraksiyonu jel görüntüsü	65
Şekil 3.5. Örneklerin okuma sayıları	66
Şekil 3.6. Rarefaction grafiği	67
Şekil 3.7. Genus düzeyinde taksonomik kompozisyon (D4)	68
Şekil 3.8. Aililya düzeyinde taksonomik kompozisyon (D4).....	69
Şekil 3.9. Laktik asit bakterilerine özgü okumalar ve bunların ait olduğu grupların cins düzeyinde dağılımı (D4)	70
Şekil 3.10. Genus düzeyinde taksonomik kompozisyon (D6)	70
Şekil 3.11. Aililya düzeyinde taksonomik kompozisyon (D6)	71
Şekil 3.12. Laktik asit bakterilerine özgü okumalar ve bunların ait olduğu grupların cins düzeyinde dağılımı (D6)	72
Şekil 3.13. SDS-PAGE jel görüntüleri	72
Şekil 3.14. Kesmik örneğine ait DAPI boyama	73

Şekil 3.15. Naxçıvan peynirine ait DAPI boyama	74
Şekil 3.16. İsmayılı peynirine ait DAPI boyama	74
Şekil 3.17. Garabağ Motal peynirine ait DAPI boyama	75
Şekil 3.18. Gedebeş (1) peynirine ait DAPI boyama	75

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AC	: Aerobic Count
APS	: Amonyum Persülfat
BHI b.	: Brain Heart Infusion Broth
CC	: Coliform Count
cfu/ml	: colony forming unit/milliliter
CTAB	: Cetil Trimetil Ammonyum Bromid
DAPI	: 4', 6'-diamidino-2-fenilindol-dihidroklorur
EB	: Enterobacteriaceae
EC	: Escherichia coli
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EMP	: Embden – Meyerhof – Parnas yolu
FAO	: Food and Agriculture Organization
FDA	: U.S. Food and Drug Administration
FISH	: Fluoresan In Situ Hibridizasyon
GRAS	: Generally Recognised as Safe
g/L	: gram/litre
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
kb	: kilo base pairs (1.000bp)
kDa	: kilodalton
LAB	: Lactic Acid Bacteria
LABIP	: Laktik Asit Bakteri Endüstriyel Platformu
Mb (Mbp)	: mega base pairs (1.000.000 bp)

MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Broth
ml	: mililitre
mm	: milimetre
MRS	: Lactobacillus Agar acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE
NaAc	: Sodyum Asetat
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PCA	: Plate Count Agar
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PDA	: Potato Dextrose Agar
PKP	: Fosfoketolaz yolu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Gel Elektroforezi
STA	: Staphylococcus aureus
TAE	: Tris-Asetik asit-EDTA
TC	: Total Coliforms
TMAB	: Toplam Mezofilik Aerob Mikroorganizma
TSB	: Tryptic Soy Broth
VRB agar	: Violet Red Bile Agar
YM	: Yeast and Moulds
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Teşkilatı)
µL	: mikrolitre
16S rRNA	: 16S ribosomal Ribo Nükleik Asit

1. GİRİŞ

Günümüzde araştırmacılar, gıdaların muhafazası konusunda, fiziksel koruma teknikleri ve doğal bileşiklerle gıdaların korunmasına yoğunlaşmıştır. Tüketici tercihleri de kimyasal koruyucularla korunmayan, doğal yapısına müdahale edilmemiş, raf ömrü daha uzun ve sağlığı olumlu yönde etkileyen özelliklere sahip ürünlere yönelmiştir. Bu açıdan, süt, et ve sebzelerden yapılan ürünlerde sıklıkla kullanılan laktik asit bakterileri, probiyotik özelliğe sahip olmaları ve bakteriyosin üretimi gibi metabolik özellikleri nedeniyle dikkatleri üzerine çekmiştir.

Birçok gıdanın üretim süreci ve özelliklerinin iyileştirilmesinde mikroorganizmaların fermentatif faaliyetleri önemli role sahiptir. Fermente edici mikroorganizmalar raf ömrünün uzatılmasına katkıda bulunmanın yanı sıra, tüm fermente gıdalarda, doğrudan veya dolaylı olarak aroma ve lezzet özelliklerinin oluşmasını sağlar. Olgunlaşmış peynirler, lahana turşusu, şaraplar gibi fermente gıdalarda uzun yıllardır mikrobiyal ekoloji ve bununla ilgili fermentasyonlar araştırılmaktadır ve fermentasyonu gerçekleştiren organizmaların aktiviteleri, büyümenin içsel ve dışsal parametrelerine bağlıdır (Jay, 2000).

Laktik asit bakterileri (LAB), karbonhidratların fermentasyonundan nihai ürün olarak laktik asit üretme gibi ortak metabolik özellik gösteren heterojen bir grup mikroorganizma içerir. LAB, Gram (+), spor oluşturmeyen, katalaz negatif, aside toleranslı, fakültatif anaerobik organizmalardır (Mayo ve ark., 2010). Fermentasyon kullanılarak laktik asidin seri üretimi, Fransız kimyager Louis Pasteur tarafından 1856'da *Lactobacillus* sp. keşfedildikten sonra başlamıştır. *Lactobacillus* bakterileri, glukoz ve laktoz gibi karbonhidratlardan laktik asit üretebilir (Ameen ve Caruso, 2017). Biyokimyasal olarak LAB hem laktik asit üreten homofermentatifleri hem de laktik asite ek olarak; asetik asit, etanol, karbon dioksit ve formik asit gibi çeşitli fermentasyon ürünleri üreten heterofermentatifleri içerir. LAB'nin starter kültür ve probiyotik olarak ticari kullanımı ekonomik açıdan büyük öneme sahiptir (Mayo ve ark., 2010).

Starter kültür, gıda ürünlerinde istenen değişiklikleri başlatmak için üretim sırasında bilinçli şekilde eklenen herhangi bir aktif mikrobiyal preparasyondur. Bu mikrobiyal preparatlar laktik asit bakterileri, propiyonibakteriler, mayalar ve küflerden oluşabilir. Starter kültürler süt ürünleri fermentasyonlarında çok büyük role sahiptir. Asit üretme kabiliyetleri, lor peyniri üretimi sırasında peynirin suyundan ayrılmasına yardımcı

olur, düşük moleküler ağırlığa sahip diasetil üretimi, peynirde koku ve aromanın yaranmasını, gaz üretimi peynirde göz oluşumunu sağlar. Bu tür değişiklikler peynir çeşidine bağlı olarak bakteri ve mantar kültürlerinden kaynaklanan enzimler ile bağlantılıdır. Laktik starter kültürler, tek başlarına veya kombinasyon halinde ürünlerin üretim sürecinde kullanılabilir (Hassan ve Frank, 2001).

Probiyotiklerin sağlık üzerine yararları bulunmaktadır ve özellikle gastrointestinal sistemin sağlığında önemli role sahip olduğu belirlenmiştir. Probiyotik gıdalar üzerine araştırmalar tüketicilerin bilinçlendirilmesini sağlayarak, hipertansiyon, postmenopozal bozuklukların hafifletilmesi ve kanserlerin önlenmesi gibi birtakım hastalıkların tedavisi için ilaç kullanımına bir alternatif olarak geliştirilmiştir. Probiyotikler genelde fermentasyon işlemi sürecinde gıdalara eklenir. Probiyotikler çoğunlukla insan gastrointestinal yolunun esas sakinleri olan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerine aittir (Yeo ve ark., 2011).

Gram-pozitif bakterilere dahil olan laktik asit bakterileri, peptid antibiyotikleri, antibiyotik benzeri maddeler, bakteriyosinler ve bakteriyosin benzeri maddeler dahil olmak üzere birçok antimikrobiyal proteinler üretir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler, biyolojik gıda koruyucuları olarak kullanım açısından önemli role sahiptir. İnhibitör spektrumları Gram-pozitif bakterilerle sınırlı olmasının yanı sıra LAB tarafından üretilen birçok bakteriyosin, gıda bozulmasına ve *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, vb. gibi gıda kaynaklı patojenik mikroorganizmalara karşı etkindir. Birçok bakteriyosin ısıya karşı dayanıklıdır ve ısıl işlemle kombinasyon halinde uygulanabilir (De Vuyst ve Vandamme, 1994).

Laktik asit bakterileri gıda endüstrisinde kullanımının yanı sıra hayvancılık sektöründe özellikle silaj yapımında yaygın olarak kullanılmaktadır (Ulusoy, 2013).

Yukarıda saymış olduğumuz önemli özelliklerinden dolayı LAB üzerine araştırmalar günümüzde de devam etmektedir. Dünya nüfusunun artışı doğal ve sağlığa yararlı gıdaların üretimine karşı talebi de arttırmıştır. Bu çalışmada Azerbaycan'ın farklı yörelerine ait olan süt ürünlerinden LAB izolasyonu yapılması ve onların yararlı yönlerinin araştırılması ele alınmıştır.

1.1. Süt Ürünlerinde Laktik Asit Bakterileri

19. yüzyılın sonuna kadar sütün korunması ve güvenliğini arttırmak amaçlı ısıt işlemler mevcut olmadığı için sütün bozulmasını engellemek süt fermentasyonu gibi geleneksel işlemler yardımıyla sağlanmıştır. Modern işleme teknolojileri kullanılarak günümüzde süttten çeşitli süt ürünleri elde edilmektedir. Fermente sütler, yoğurt ve peynir gibi süt ürünleri sağlığa yararlarından dolayı yüksek oranda artan tüketim seviyesine ulaşmıştır (Brisson ve Singh, 2013).

Uygun taşıma ve saklama koşullarında çiğ sütteki mikroorganizmaların baskın biyotası gram pozitifdir. Birkaç gün boyunca buzdolabında tutulan çiğ süt, kaçınılmaz olarak aşağıdaki cinslerdeki bazı bakterilerin veya hepsinin varlığını gösterir: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Oerskovia*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas* üyelerinin yanı sıra Koliform cinsinden en az bir tanesi (Jay, 2000).

Sütün orijinal laktik asit mikroflorası ya yetersiz, kontrol edilemez ve tahmin edilemez ya da sütün maruz kaldığı ısıt işlemlerle tamamen yok edildiğinden, bir başlangıç kültürü daha kontrollü ve öngörülebilir bir fermentasyon sağlayabilir. Bunlar, peynir, fermente süt ve kremalı tereyağı gibi çeşitli süt ürünleri üretiminde kullanılır. LAB başlatıcıları temel olarak laktozdan laktik asit üretme yeteneğine sahip olduğu için kullanılır. Ayrıca, istenmeyen organizmaların inhibisyonu, duysal ve dokusal özelliklerin iyileştirilmesi ve sağlık yararlarına katkı gibi diğer önemli fonksiyonlara sahip oldukları belirlenmiştir (Carminati ve ark., 2010).

Fermente ürünler uygun bir starter kültürün kullanılmasıyla elde edilir. Laktik starter kültür, süt endüstrisinde yaygın olarak kullanılan temel bir başlangıç kültürüdür. Her çeşit peynir yapımı için laktik asit üretimi esastır ve bu amaç için laktik starter kültür kullanılır. Laktik kültürler ayrıca tereyağ, kültürlenmiş ayran, süzme peynir vs. gibi gıdaların üretiminde kullanılır. Laktik starter kültürler her zaman laktozu laktik aside dönüştüren bakterileri içerir, genellikle *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *L. lactis subsp. cremoris* veya *L. lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*. Başlangıç kültürler, tek veya karışık suşlardan oluşabilir. Peynirlerin çoğu sütün laktik fermentasyonu sonucu oluşur. Olgunlaşmış peynirlerin çoğu, laktik asit bakterilerinin metabolik aktivitelerinin ürünü olmasına rağmen, iyi bilinen birkaç peynir, kendi özelliklerini diğer ilişkili organizmalara borçludur. İsviçre peyniri üretiminde *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* genellikle, lezzet gelişimi ve göz oluşumunda olgunlaşma

sürecinde işlev görmek üzere ilave edilen bir *Propionibacterium shermanii* kültürü ile kullanılır (Jay ve ark., 2005).

Asit oluşumundan başka amaçlar için kullanılan başlangıç takviyeleri, peynirlerin organoleptik özelliklerini geliştirmek veya spesifik bir antimikrobiyal aktivite gerçekleştirmek için olgunlaşma veya koruyucu kültürler olarak dikkat çekmektedir. *Lactobacillus casei* / *paracasei* ve *Lactobacillus plantarum* gibi bazı probiyotik LAB, başlangıç aktivitesi olduğunu göstermiştir, bu yüzden "probiyotik başlangıçlar" olarak tanımlanabilirler (Carminati ve ark., 2010).

Süt ürünleri, insan gastrointestinal yoluna probiyotik mikroorganizmaları iletmek için ideal bir gıda aracı olarak belirlenmiştir. Bu ürünler arasında pastörize süt, fermente süt, peynir, süt içecekleri, kurutulmuş ürünler, dondurma ve diğer süt tatlıları gibi probiyotik süt ürünleri yer almaktadır (Xiao ve ark., 2014).

1.2. Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması

Laktik asit bakterileri (LAB), karbonhidratların fermentasyonundan kaynaklanan nihai ürün olarak laktik asit üretimi gibi ortak metabolik özelliğe sahip heterojen mikroorganizma içeren bir gruptur (Salveti ve ark., 2012). LAB' ın tanımlayıcı özellikleri arasında düşük (<55 mol %) G+C içeriğine sahip olmaları (Demir,2019), Gram (+) kok, kokobasil ve basil şeklinde olmaları, aside toleranslı ve fakültatif anaerobik olmaları yer almaktadır (Broadbent, 2001). Aynı zamanda bunlar sporlaşmayan, katalaz negatif organizmalardır. Birkaç tür dışında, LAB üyeleri, genellikle güvenli olarak tanınan patojenik olmayan organizmalardır. Biyokimyasal bir bakış açısı altında LAB hem laktik asit üreten homofermentatifleri hem de laktik asitin yanı sıra asetik asit, etanol, karbon dioksit ve formik asit gibi çeşitli fermantasyon ürünleri sağlayan heterofermentatifleri içerir (Mayo ve ark., 2010; Yücel, 2019). Laktik asit ilk defa 1780 yılında İsveç kimyacı Carl Wilhem Scheele tarafından ekşimiş sütte izole edilmiştir (Önlü, 2018). "Süt asidi" olarak da adlandırılan laktik asit, aşağıdaki kimyasal formüle sahip bir organik asittir: $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CO}_2\text{H}$. Laktik asit, merkezi bir atomdan ve iki terminal karbon atomundan oluşan bir karbon zincirine sahip kiral bileşiktir. Kiral karbon atomuna bir hidroksil grubu bağlanırken, terminal karbon atomlarından biri karboksilik grubunun ve diğer atom ise metil grubunun bir parçasıdır. Optik olarak aktif iki izomerik laktik asit formları mevcuttur: L (+) formu((S) -laktik asit) ve D (-) formu ((R) -laktik asit). L (+)- laktik asit biyolojik izomerdir. Saf laktik asit, renksiz ve hidroskopik bir

sıvıdır. LAB’da homofermentatif mekanizma yardımıyla laktik asit sentezi Embden – Meyerhof – Parnas yolu (EMP) şeklinde gerçekleşir. Embden – Meyerhof – Parnas yolu tek bir glikoz molekülünden iki laktat ünitesi elde edilmesi şeklinde özetlenir (Ameen ve Caruso, 2017). Heterofermentatif mekanizmada ise laktik asit bakterileri hekzoz monofosfat yoluyla glikozu laktik aside dönüştürürler (Gümüş,2019). Laktik asit bakterileri sitokrom içermedikleri için LAB’ın enerji ihtiyacı yalnızca substrat düzeyinde fosforilasyon ile karşılanır (Bostancı,2019).

LAB, süt ve süt ürünleri, sebze ve bitkiler, tahıllar, et ve et ürünleri de dahil olmak üzere çok çeşitli besin ortamlarında bulunur. LAB’ın enzimatik aktiviteleri, fermente ürünlerin nihai organoleptik, reolojik ve besinsel özelliklerine katkı sağlar. LAB türleri ayrıca gastrointestinal sistemin yerleşik mikrobiyota, insan ve hayvanların genitoüriner yolları arasında da bulunur. Bu ortamlarda LAB, immünomodülasyon, intestinal bütünlük ve patojen direnci gibi çok çeşitli sağlığı destekleyici fonksiyonlar oynayan temel bileşenler olarak kabul edilir. Bu nedenlerden dolayı bazı türlerin suşları geleneksel olarak probiyotik olarak kullanılmış ve çeşitli gıda ürünlerinde fonksiyonel bakteri olarak eklenmiştir (Mayo ve ark., 2010).

LAB’ların gastrointestinal sistemde canlılıklarını koruyabilme özellikleri bu mikroorganizmaların düşük pH veya safra tuzları ile geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilme kabiliyetleriyle ilişkilidir. Taksonomik değerlendirilmeler için önemli fizyolojik özellikler olarak karbonhidratları fermentasyon biçimleri, farklı tuz konsantrasyonlarında, çeşitli besin ortamlarında ve sıcaklıklarda gelişebilme özelliği ve antibiyotiklere karşı dirençleri bilinmektedir (Gürsoy ve Kınık, 2005).

LAB tanımlanmasında hem fenotipik hem de genotipik özellikler ele alınmaktadır. Günümüzde genotipik yöntemler daha kesin sonuçlar elde etmeye olanak sağlamıştır. Aynı zamanda genotipik yöntemler fenotipik yöntemlerle belirlenmiş türlerin daha kesin şekilde tanımlanmasını desteklemiştir.

Laktik asit bakterilerinin morfolojik ve fizyolojik karakterizasyonu, karbonhidrat fermentasyon özellikleri ve protein profilleri fenotipik yöntemler yardımıyla belirlenmektedir. Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan özellikler arasında arjininden amonyak oluşumu, eskülini hidrolize etme yetenekleri de yer almaktadır (Özlu,2015). LAB’ın tanımlanması için gram boyama, katalaz testi, tuz toleranslarının belirlenmesi, sıcaklık toleranslarının belirlenmesi, glikozdan gaz üretilmesi gibi morfolojik ve biyokimyasal testler de kullanılmaktadır (Tatlı, 2009).

Karbonhidrat fermentasyon profillerine dayalı birçok tanımlanma sistemi arasında API, Biolog ve VITEK gibi çeşitli ticari tanı sistemleri bilinmektedir. API test kitleri farklı karbonhidratların, izolatlar tarafından fermente edilip edilmemesinin belirlenmesini sağlamaktadır. APIWEB bilgisayar programı yardımıyla testin sonuçları değerlendirilmekte ve veri tabanında yer alan bilgilere göre bakteriler tür ve alt tür düzeyinde tanımlanabilmektedir (Özlü, 2015). API gibi tanımlama sistemleri yardımıyla yapılan biyokimyasal testler tür ve cins bazında ayırım sağlasa da identifikasyonda kullanılan en güvenilir fenotipik yöntemler arasında protein profil analizinin yer aldığı belirtilmiştir. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemiyle toplam hücre protein profillerinin analizi, tür ve alt tür düzeyinde oldukça güvenilir identifikasyon yöntemi olsa da bazı türler için limitlidir. Bu yüzden protein profiline dayalı identifikasyon yöntemiyle elde edilen sonuçların doğruluğunu kanıtlamak için moleküler yöntemlerle desteklenmesi gerekmektedir (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011).

Genel olarak, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* ve *Enterococcus* morfolojik olarak ayırt edilebilirken, *Lactobacillus* ve *Carnobacterium*’ lar ayırt edilemez. *Lactobacillus*, morfolojik olarak streptokoklardan (*Lactococcus*, *Enterococcus* ve *Streptococcus spp.*) ve bifidobakterilerden ayırt edilebilir. Bununla birlikte, pratikte, büyüme koşulları ve hücrelerin büyüme aşaması, hücrelerin morfolojisini ciddi şekilde etkileyebilir. *Lactobacillus* ve *Carnobacterium* arasındaki ayırım kolayca gerçekleştirilebilir çünkü ikincisi pH 4,5 veya asetat agar üzerinde büyüyemez, ancak pH 9.0’ da büyüyebilir. Çok sayıda taksonun (örneğin 64 *Lactobacillus* türü) ayırt edilmesi için basit fizyolojik testler yeterli değildir ve fermentasyon ürünlerinin daha karmaşık analizleriyle desteklenmelidir (Pot ve ark., 1994).

1980’ lerde Kary Mullis tarafından geliştirildiğinden beri, PCR biyolojik ve tıbbi araştırma laboratuvarlarının çalışması için temel olmuştur. DNA’nın kopyalanması, sıralanması veya miktar belirlenmesi gerektiğinde, PCR başlangıç noktasıdır. PCR, DNA polimeraz enziminin hedeflenen bir şablon dizisine tamamlayıcı olan yeni DNA ipliklerini sentezleme yeteneğini kullanır. PCR reaksiyonunun sonunda, spesifik sekans milyarlarca kopya olarak biriktirilir. Türler için tespit yöntemleri olarak 16S rRNA genlerini hedef alan türlere özgü primerlerle donatılmış PCR tabanlı tekniklerin hızlı ve güvenilir olduğu kabul edilmiştir. Spesifik 16S rDNA bazlı oligonükleotit primerlere

sahip PCR, insan dışkısı veya süt ürünleri gibi karmaşık eko sistemlerdeki hedef bakterilerin saptanması için güçlü bir yöntemdir (Majhenič ve ark., 2018).

Organizmanın genetik yapısının analizini temel alan moleküler yöntemler yardımıyla tekniğin tipine bağlı olarak cins, tür, alt tür ve hatta suş düzeyinde tanımlama gerçekleştirilir. PCR reaksiyonu istenilen sayıda tekrarlanan döngülerden ibarettir ve bir döngü üç basamaktan oluşmaktadır; I.Denatürasyon- Çift sarmallı DNA iplikçiklerinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması; II.Bağlanma- çoğaltılması istenen hedef DNA bölgesinin iki ucuna spesifik 20-30 baz uzunluğunda iki ayrı oligonükleotitin yapışması; III.Uzama- zincirin yeni çift zincirli DNA'lar oluşturacak şekilde uzaması (Özlü, 2015). Bu işlem sonucunda elde edilen PZR ürünlerinin tanımlanmasında genellikle kullanılan yöntem ise agaroz jel elektroforezidir. Agaroz jelde elektroforezle çoğaltılan DNA parçasının büyüklüğü belirlenir. PCR yönteminden başka LAB' ın tanımlanmasında; suşların içerdiği plazmit profilleri, değişken alanlı jel elektroforezi (PFGE), rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD), gerçek zamanlı PZR (RT-PCR) ve kültür bağımlı olmayan birçok farklı genotipik yöntemler kullanılmaktadır (DGGE) (Gündoğdu, 2016).

Kültür bağımsız yöntemler olarak kullanılan toplam DNA ekstraksiyonu ve FISH gibi yöntemler günümüzde farklı örneklerde bakteriyel çeşitliliği belirlemekde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bireysel mikrobiyal hücrelerin yerinde tanımlanması için flüoresan etiketli rRNA-hedefli oligonükleotit problemleriyle yerinde hibridizasyon (FISH) floresan yöntemi geliştirilmiştir. rRNA'lar çeşitli nedenlerden dolayı FISH için ana hedef moleküllerdir: tüm canlı organizmalarda bulunabilirler; göreceli olarak kararlıdır ve yüksek kopya sayılarında (genellikle hücre başına birkaç bin) görülürler ve hem değişken hem de yüksek oranda korunmuş dizi alanlarını içerirler (Amann ve ark., 2001). Prosedür aşağıdaki adımları içerir: numunenin sabitlenmesi(fiksasyon); muhtemelen ön hazırlık adımları da dahil olmak üzere numunenin hazırlanması; ilgili hedef sekansları tespit etmek için ilgili problemlerle hibridizasyon; bağlanmamış problemleri çıkarmak için yıkama adımları, sonuçların montajı, görselleştirilmesi ve belgelenmesi (Moter ve Göbel, 2000).

2001 yılında sekans genomu tamamlanmış ilk laktik asit bakteri genomu halka açıklanmıştır. Bu bakteri *Haemophilus influenzae* RD olmuştur. Aslında 2001 yılında LAB' a ait 4 genom belirlenmiştir, bunlardan üçü patojenler (*Streptococcus pyogenes* M1 GAS, *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 ve *S. pneumoniae* R6), dördüncüsü, gıda sınıfı bir organizma olan *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 olmuştur. LAB türlerinin

yakın zamanda tamamlanmış olan genom dizisi, metabolik yolların küresel bir perspektifte nasıl işlediğini incelemek için mükemmel bir fırsat yaratır (Azcarate-Peril ve Klaenhammer, 2010). LAB genomları, uzunluğu 1.3 ile 3.35 Mbp arasında değişen tek dairesel kromozomlardan oluşmaktadır (Zhang ve Zhang, 2014).

Plazmidler sitoplazmada yer alan, kromozomal DNA'dan bağımsız ve kromozomal DNA'ya oranla çok daha küçük boyutlarda ve farklı sayılarda olan halkasal şekilli DNA molekülleridir. Bunlar kendi kendilerini eşleyebilmek yeteneğine sahiptir. LAB'inde endüstriyel açıdan önemli olan birçok özellik plazmidlerde kodludur. Bu özelliklere laktoz metabolizması, bakteriyosin sentezi, antibiyotiklere dirençlilik, ekzopolisakkarit üretimi ve bakteriyofaj dirençlilik özellikleri örnek olarak gösterilebilmektedir. Plazmid sayısı, büyüklüğü ve bulunduğu bakterideki işlevi bakımından LAB'da cins, hatta tür düzeyinde farklılıklar ortaya çıkmaktadır. LAB plazmidlerine dair yapılan çalışmalarda plazmid büyüklüklerinin 0,87–250 kb arasında değiştiği, bazı türlerde plazmid bulunmazken, bazılarında 16 adet plazmid varlığına rastlandığı belirtilmiştir (Sağlam ve Karahan, 2017).

Kriptik plazmitler adlanan bazı plazmitler fenotipte gözlenmeyen özelliklerle ilişkili genler taşırlar. Kendi kendini transfer edebilme yeteneğine sahip veya konjugatif plazmitler, içerdikleri “tra” genleri sayesinde, diğer tür veya bakteriyel suşlara, plazmit kopyalarını transfer edebilme imkanına sahiptirler. Plazmitlerin en önemli özelliklerinden biri ise, yarı-bağımsız ve bağımsız olarak plazmitin replikasyonuna izin veren, replikasyon orijini adı verilen özel DNA bölgelerine sahip olmalarıdır (Yüksekdağ ve Beyatlı, 2009).

Mikrobiyal genomlar, metabolizmayı, fizyolojiyi, biyosentetik yetenekleri ve organizmaların değişen koşullara ve çevrelere adapte olmalarını etkilediklerinden, genom sekanslarının mevcudiyeti, LAB'ın metabolik potansiyeli ve biyolojik işlem kabiliyetleri hakkındaki bilgilerimizi de genişletmiştir (Azcarate-Peril ve Klaenhammer, 2010).

1.3. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması

Bu grup şu anda 13 cins Gram pozitif bakteriden oluşmaktadır:

Carnobacterium, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Paralactobacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactosphaera*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Vagococcus*, *Weissella* (Jay ve ark., 2005).

Gıda kökenli olmaları ve koruyucu olarak görev yapabilmeleri bunları önemli yapan özellikler olarak bilinmektedir. Gıda mikrobiyolojisi için önemli role sahip laktik asit bakteri grupları aşağıda gösterilmiştir: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* ve *Weissella* (Arslan, 2017).

1.3.1. *Lactococcus*

Lactococcus, sadece L- (+)- laktik asit enantiyomerini glukozdan üreten bir LAB cinsidir (Öztürk, 2019). Bu homofermentatif özellik, pH, glukoz konsantrasyonu ve besin sınırlaması gibi kültür koşullarını ayarlayarak değiştirilebilir. *Lactococcus* türleri bitkilerde, balıklarda ve diğer hayvanlarda yaygın olarak dağılmıştır. 1909’ da Löhnis, fermente süt ürünlerinde *Lc. lactis*’ i keşfetti ve adını “*Streptococcus lactis*” olarak değiştirdi. 1933 yılında Lancefield, laktik streptokokları N grubuna atadı ve bu onları açıkça patojenik streptokoklardan (A, B ve C grupları) ve enterokoklardan (grup D) ayırdı (Kim,2014). *Lactococcus* (eski adıyla Group N streptococci), süt fermentasyonlarında asit üretimi için kullanılan ana mezofilik mikroorganizmalardır. Bunlardan sadece bir tanesi, *Lc. lactis*, süt fermentasyonlarında önemli bir yer tutmaktadır. *Lc. lactis* hücreleri, tek ve çiftli hücrelerin de bulunmasına rağmen, genellikle zincirler halinde ortaya çıkan kokklardır. Homofermentatifdirler ve sütte yetiştirildiğinde, nihai ürünlerinin %95’ inden fazlası laktik asittir (L izomerin) (Hassan ve Frank, 2001). Optimum gelişme sıcaklıkları 30 °C olup (Dağ, 2016) 10°C’ de büyüme gösterirken 45°C’ de büyümmez. Zayıf proteolitiklerdir ve süt proteinlerini kullanabilirler (Hassan ve Frank, 2001).

Lactococcus cinsine *L. lactis*, *L. garviae*, *L. plantarum*, *L.raffinolactis* ve *L. piscium* olmakla 5 bilinen tür dahildir. Bunlardan *L. lactis* 2 alttüre sahiptir; *L. lactis subsp.lactis* ve *L. lactis subsp. cremoris* (Çetin, 2002).

1.3.2. *Streptococcus*

1868’ de, Alman cerrah Theodor Billroth, yaralarla ilgili zincir oluşturan kokları bildiren ilk kişidir ve bu mikroorganizmaları tanımlamak için *Streptococcus* terimini kullanmıştır. *Streptococcus thermophilus* türleri, süt ve süt ürünlerinde ortaya çıkan laktik asit bakterilerinin bakteriyolojisi üzerine çalışmaları sırasında Orla-Jensen tarafından tespit edilmiştir (Du Toit ve ark., 2014).

Streptococcus üyeleri homofermentatiftir ve ışık mikroskobu altında küresel veya oval hücreler olarak görünmektedir. Zincirler veya çiftler halinde düzenlenirler ve bu tip morfolojik düzenlemelerden dolayı streptokok terimi ile adlandırılırlar. Bazı *Streptococcus* türleri kapsüllenmiştir. Büyümeleri genellikle 25-45 ° C arasında sınırlıdır ve optimum sıcaklık 37 °C' dir (Çetin, 2002).

Süt fermantasyonunda yararlı olan *Streptococcus sp.* sadece *S.thermophilus*' tur. Bu mikroorganizma genetik olarak oral streptokoklara (*S. salivarius*) benzer, ancak yine de ayrı bir tür olarak kabul edilir. *S. thermophilus*, ısı direnci, 52°C sıcaklıkta büyüme kabiliyeti ve sadece sınırlı sayıda karbonhidrat fermente etme kabiliyeti ile diğer streptokoklardan ayrılır. *S. thermophilus*, birçok proteolitik enzime sahip olmasına rağmen, sınırlı bir proteolitik kabiliyete sahiptir (Hassan ve Frank, 2001).

1.3.3. *Leuconostoc*

Hücreler Gram pozitif, hareketli olmayan, asporojen ve katalaz negatiftir. Morfolojik olarak, cinsin sadece kok veya kokobasiller türlerden oluştuğu belirlenmiştir. *Leuconostoc* türleri termofilik değildir ve büyüme için optimal sıcaklık 20 °C ile 30 °C arasındadır. 40 °C' nin üzerinde neredeyse hiç büyüme göstermezler. Türler genellikle asidofilik değildir ve pH 6 ila 7 arasında gelişirler (Björkroth ve ark., 2014).

Leuconostoc cinsi glikozdan sadece D-laktik asit üreten ve arginin' den amonyak üretmeyen, heterofermentatif, kokoid LAB olarak bilinmektedir. Morfolojik ve bazı temel özelliklerine göre LAB' nin diğer koklarından farklılıklarına rağmen *Leuconostoc*'ları, heterofermentatif laktobasillerin bazı "kokoid çubukları" ile karıştırmak kolaydır (Kazancıgil, 2018).

Genellikle bitkisel materyallerde, süt ürünlerinde, et, şarap ve diğer gıda ürünlerinde bulunmaktadır. Bundan başka çeşitli peynirlerin üretiminde starter kültür olarak da kullanılır. Diasetil üretme yetenekleri sayesinde süt ürünlerinin lezzetine katkı sağlamaktadır (Kırma, 2016). Proteolitik ve lipolitik enzimlere sahip olma özellikleri sayesinde fermente ürünlerin doku, lezzet, kimyasal bileşim, aroma gibi bazı kalite kriterlerinde önemli role sahiptir (Ekinci ve ark., 2018).

1.3.4. Lactobacillus

Lactobacillus cinsinin üyeleri spor oluşturmeyen, çoğunlukla hareketli olmayan çubuk şekilli veya kokobasil hücreler olmakla genellikle zincirler halinde düzenlenir. (Hassan ve Frank, 2001, Pot ve ark., 2014). Bazı türlerde hücreler T, Y ve V şeklindedir (Demirbaş, 2016).

Genel büyüme sıcaklığı 2°C ile 53°C arasında olmasına rağmen, optimum büyüme sıcaklığı çoğunlukla 30°C ile 40°C arasındadır. Büyüme için pH aralığı 3 ila 8 arasındadır. Cins, fermantasyon son ürünlerine göre üç gruba ayrılabilir. Homofermentatif grup içinde *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lb. delbrueckii subsp. lactis*, *Lb. helveticus* ve *L. acidophilus* yer alır. Homofermentatif *Lactobacillus* üyeleri sadece Embden-Meyerhof yolu ile heksoz şekerleri laktik aside fermente eder. Pentoz şekerlerini veya glukonatı fermente etmezler. Fakültatif olarak heterofermentatif *Lactobacillus* üyeleri ferment heksoz şekeri, sadece laktik aside ya da glikoz sınırlı olduğunda laktik aside, asetik asit, etanol ve formik aside fermente eder. Pentoz şekerleri, fosfoketolaz yolu ile laktik ve asetik aside fermente edilir. Bu gruba *L. casei* dahildir. Zorunlu heterofermentatif *Lactobacillus* üyeleri heksoz şekerlerini, laktik aside, asetik aside (ya da etanol) ve karbondioksit fosfoketolaz yolunu kullanarak fermente eder. Pentoz şekerleri de bu yol kullanılarak fermente edilir. Bu gruba *L. kefir* dahildir (Hassan ve Frank, 2001, Pot ve ark., 2014).

Genelde katalaz ve oksidaz negatif olarak tanınmalar ve nitratları indirgemeler bile, bazı türlerin suşları katalaz, nitrat indirme ve hatta sitokrom aktiviteleri sergiler. Nükleik asit bileşimi açısından kromozomlarında %33-55 G + C bulunur. Bununla birlikte, genel olarak iyi tanımlanmış bir cinsin G-C içeriğinde %10' dan fazla olmaması gerektiği önerilmiştir. Bu nedenle, laktobasiller arasında %33-55 G + C içeriği geniş bir çeşitlilik yelpazesi olduğunu gösterir (Çetin, 2002).

1.3.5. Enterococcus

Enterococcus üyeleri, tek tek, çiftler halinde, kısa zincirler halinde ortaya çıkan Gram-pozitif oval koklardır. Isıya ve antiseptiklere karşı toleranslı oldukları belirlenmiştir. Endosporlar üretmezler. *Ent. gallinarum* ve *Ent. casseliflavus* türleri dışında başka hiçbir tür hareketli değildir. Bazı türler tarafından sarı pigment üretilir. Enterokoklar tipik olarak katalaz negatif olsa da bazı suşlar kanlı agarda ekili olduğunda pozitif bir katalaz testini ortaya çıkarabilir. Optimal büyüme sıcaklığı 37 °C' dir, ancak

birçok tür 10 °C ile 45 °C arasında değişen sıcaklıklarda büyüyebilir. *Enterococcus* cinsinde 43 tür tanınmaktadır (Švec ve Franz, 2014).

Enterococcus cinsindeki mikroorganizmaların aerobik ve fakültatif anaerobik olduğu belirlenmiştir. Bu bakterilerin gelişimi için %6-6,5 arasındaki tuz konsantrasyonu ve oldukça geniş pH aralığı (4-9,6) saptanmıştır. *Enterococcus* üyeleri fruktoz, galaktoz, maltoz, mellebiyoz, sellebiyoz ve laktozdan asit üretme yeteneğine sahiptirler (Arslan, 2017).

Enterococcus üyeleri çevre, gıda ve klinik mikrobiyoloji açısından önemli role sahip mikroorganizmalar olarak bilinmektedir. Genel olarak yüksek patojeniteye sahip olmasalar da bazı türlerin üriner sistem enfeksiyonlarına neden olduğu tespit edilmiştir (Diken, 2016). Bu mikroorganizmalar peynirlerin olgunlaşması ve aroma gelişimini desteklemek için yardımcı kültür olarak, bağırsak hastalıklarının önlenmesi ve tedavisi için probiyotik şeklinde ticari olarak temin edilebilmektedir. Enterokoklar arasında sadece *Ent. faecalis* ve *Ent. faecium* probiyotikler olarak önemlidir (İşevi, 2011).

1.3.6. *Pediococcus*

Pediococcus cinsi üyeleri Gram-pozitif, katalaz-negatif ve oksidaz-negatiftir ve fakültatif aerobik-mikroaerofilik koşullar altında büyür. Bununla birlikte, bazı türlerin suşları, özellikle düşük karbonhidrat içeriği olan ortamlarda yetiştirildiğinde pseudokatalaz aktivitesi gösterir. Homofermentatiftirler ve bu nedenle glikozdan CO₂ üretmezler ve nitratı indirgemezler. Hücreler düzgün biçimde küreseldir ve asla oval veya uzun değildir ve bunlar iki dik yönde alternatif bölünme ile tetrad oluşumuna yol açan diğer tüm laktik asit bakterilerinden farklıdır. Bu nedenle, hiçbir zaman *Leuconostoc*, *Lactococcus* ve *Streptococcus* gibi bir başka şekilde bölünme sonucu oluşan zincirler gibi diğer kok şeklindeki hücrelerin tipik zincirlerini oluşturmazlar. Hareketsizdirler, spor veya kapsül oluşturmazlar. Optimum büyüme sıcaklığı 25–35 °C'dir, ancak bu türlere bağlıdır. Bu mikroorganizmalar genelde pH 5' te büyüyebilirken, *Ped. stilesii* istisna olarak pH 9' da büyüyebilir (Franz ve ark., 2014).

Pediococcus cinsi üyelerinin taze sebze, süt ürünleri, bira ve şarap gibi fermente ürünlerde, etlerde bulunduğu bilinmektedir. Bunlar peynir oluşumuna, sebze ve etlerin fermentasyon kontrolüne, aroma, şekil ve renk oluşumuna önemli katkı sağlamaktadır (Biler, 2009).

Pediococcus ' lar gıda mikrobiyolojisinde hem negatif hem de pozitif role sahiptir. Bunlardan *P. damnosus*, diasetil/ aseton oluşumuna ve bira üretiminde bozulmaya yol açan mikroorganizma olarak bilinmektedir. *P. acidilactici* ve *P. Pentosaceus* ise sosis üretiminde starter kültür ve silaj aşılayıcıları olarak önemli role sahip mikroorganizmalardır. Bunların spesifik özellikleri arasında, argininin hidrolizi, fermente edilen şekerlerin aralığı, farklı pH seviyelerinde (7.0 ve 4.5) büyüme ve üretilen laktik asit konfigürasyonu yer almaktadır (Kazancıgil,2018).

1.3.7. Weissella

Weissella türleri Gram-pozitif, katalaz-negatif, yuvarlatılmış konik uçlu veya oval hücreli asporojen kısa çubuklardır. Çiftler halinde veya kısa zincirlerde ortaya çıkarlar ve bazı türlerin pleomorfizmaya eğilimi vardır. Fakültatif olarak anaerobik kemo-organotroflardır ve sitokrom içermedikleri düşünülür. Glikoz fermantasyonu heterofermentatiftir ve karbonhidratlar, heksoz-monofosfat ve fosfoketolaz yolları yoluyla fermente edilir. Glikoz fermantasyonunun son ürünleri laktik asit, CO₂, etanol veya asetatır. Türlerle ilgili olarak, üretilen laktik asidin konfigürasyonu DL veya D- (-) 'dir. *Weissella* türleri genellikle amino asitleri, peptidleri, mayalanabilir karbonhidratları, yağ asitlerini, nükleik asitleri ve büyüme için vitaminleri gerektirir. Biotin, nikotinik asit, tiamin ve pantotenik asit veya türevleri gereklidir. Arginin bütün türler tarafından hidrolize edilmez. Büyüme 15 °C' de gerçekleşir; Bazı türler 42-45 °C arasında büyür (Björkroth ve ark.,2014).

Diamino asit olarak lisine dayalı spesifik bir peptidoglikan yapısı, *Weissella* için tipiktir. *W. kandleri* ' nin interpeptit köprüsü (Lys-L-Ala-Gly-L-Ala₂) glisin içerir. *Weissella* türleri, MRS ortamı gibi LAB için tasarlanan genel ortam üzerinde iyi büyür (Björkroth ve ark.,2014).

1.4. Starter Kültür Olarak Kullanılan LAB

Fermente gıdaların üretiminde starter kültürler gıdanın aroma ve tekstür gelişiminde önemli role sahip olduğu için endüstrinin starter kültürlerle ilgisi daha da yoğunlaşmıştır.

Standart ve yüksek kalitede fermente süt ürünlerinin üretilmesi uygun özelliklere sahip standart kültürlerin kullanımıyla ilişkilidir. LAB öncelikle laktik asit üretme

yeteneklerinden dolayı starter kültür olarak kullanılsa da aynı zamanda gıdanın duysal ve tekstürel özelliklerinin iyileştirilmesi ve sağlığa katkıda bulunma gibi özellikleri sayesinde starter kültür olarak daha da önem kazanmıştır. LAB' ın ürettiği çeşitli aroma bileşikleri gıdanın organoleptik özelliklerini artırır ve fermente gıdaların spesifik kimliğini belirler (Vapur, 2010; Reda ve ark., 2018).

Fermente süt ürünlerinin yanı sıra LAB pek çok farklı gıdanın fermantasyonunda uzun yıllardır starter kültür olarak kullanılmaktadır. LAB suşlarının bazıları süt ürünlerinin tekstürel özelliklerini iyileştiren ekzopolisakkarit (EPS) üretme yeteneğine sahiptir (Demirgöl ve Sağdıç, 2017; Tarazanova ve ark.,2018). LAB'ın starter kültür olarak kullanılabilmesi için endüstriyel özellikleri belirlenmeli, bunun için öncelikle starter kültürlerin morfolojik ve fizyolojik özellikleri saptanmalı ve kesin identifikasyonu gerçekleştirilmelidir. Starter kültür üretiminde karbonhidrat metabolizma profilleri, optimum gelişme koşulları,antibiyotik ve bakteriyofajlara karşı duyarlılık, tuza toleransları, asit ve aroma bileşikleri oluşturma yetenekleri, bakteriyosin ve ekzopolisakkarit üretimleri gibi endüstriyel öneme sahip özelliklerin ayrıntılı olarak incelenmesi gerekmektedir (Demirgöl ve Sağdıç, 2017).

Fermente gıdaların üretim sürecinde, fermantasyondan sorumlu mikroorganizmalar ya substratın üzerindeki doğal mikroflorada bulunabilir ya da starter kültür olarak ortama ilave edilebilir. Kontrollü fermentasyon şartlarında saf starter kültürler yardımıyla standart kaliteli ürün elde etmek mümkün olmuştur. Şalgam suyu fermantasyonunda etkili olan mikroorganizmaların LAB olduğu belirlenmiştir. İzole edilen türler arasında *Lactobacillus plantarum* ve *Lb. paracasei subsp. paracasei*' nin üstünlüğü saptanmıştır (Bircan, 2013).

Starter olarak kullanılan laktik asit bakterileri peynir teknolojisinde iki önemli göreve sahiptir. Öncelikle peynir üretimi sürecinde, süt şekerinden (laktoz) laktik asit üretmesi ve peynirin olgunlaşma sürecinde, sahip oldukları enzimler yardımıyla proteinleri, karbonhidratları ve yağları hidrolize ederek peynirde tat-koku maddelerinin ve tekstürel özelliklerin oluşmasını sağlamaktır (Sekban, 2019; Wishah, 2017).Starter dışı laktik asit bakterileri olarak adlandırılan ikincil (ek) mikrofloraya fakültatif heterofermentatif laktobasiller aittir ve buna ek olarak *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lecuoconostoc* ve propionik asit bakterileri gösterilmektedir. Bundan başka bazı küfler ve mayalar da peynirde olgunlaşmasına yardımcı olan ikincil mikrofloraya dahildir (Wishah, 2017).

Genel olarak fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanılan starter kültürler iki gruba ayrılmaktadır; 1. Geleneksel starter kültürler; 2. DSS tipi kültürler (Defined-strain starters, karışımı belli olan kültürler) (Soran, 2018).

Geleneksel starter kültürler doğal starter kültürler ve MSS kültürleri (Mixed strain starters, bakteri karışımı belli olmayan kültürler) olmakla 2 gruba ayrılır. Doğal starter kültür kullanımı zamanı fermente ürünün son üretiminden bir parça alınarak bir sonraki üretimde kullanılır. Yunan peynir çeşidi olan Kopanisti doğal starter kültür kullanımıyla elde edilir. Bundan başka, yöresel yoğurt üretiminde starter kültür olarak bir önceki yoğurttan bir kısım alınarak, ısıtıl işlem görmüş ve inkübasyon sıcaklığına kadar soğutulmuş sütlere ilave edilmesi, ekmek hamuru üretiminde ekşi hamurun maya olarak kullanılması örnek olarak gösterilebilir. Bazı İtalyan tipi peynir çeşitlerinin üretiminde genellikle *Str. thermophilus* içeren “doğal süt starterleri” kullanılmaktadır (Soran, 2018).

Doğal starter kültürlerin günlük olarak çoğaltılması, starter bileşiminin düzensiz değişmesine yol açtığı için peynir üretiminde standart kalite elde etmek zorlaşır. Bu problemi çözmek için doğal kültürler inokl olarak kullanılarak, laboratuvar ortamında belirli şartlar altında MSS kültürleri elde edilir. Doğal starter kültürler ve MSS kültürlerin bileşimi tam olarak bilinmediği için sürekli birinden diğerinin elde edilmesi sürdürüldüğü zaman kültürü oluşturan bileşenler arasında oransal olarak değişiklik ortaya çıkabiliyor. Bu yüzden bu teknik geliştirilmiş ve tekrar çoğaltma işlemleri minimuma indirilerek MSS kültürleri normal veya konsantre formda dondurularak veya liyofilize edilerek muhafaza edilip ticari olarak kullanılmaktadır (Soran, 2018).

DSS kültürleri tür ve suş düzeyinde bileşimleri belirlenmiş kültürlerdir, genellikle iki veya daha fazla LAB türü içeren, mezofilik veya termofilik LAB türlerinin karışımından ibarettir (Soran, 2018). Mezofilik kültürlere optimum gelişme sıcaklığı 30 °C olan *Lactococcus* ve *Leuconostoc* cinsleri aittir. Termofilik kültürlere yüksek sıcaklık derecelerinde (50-55°C) haşlanarak üretilen sert peynir eşitleri için kullanılan *Lactobacillus* ve *Streptococcus* cinsleri aittir (Turhan, 2012).

Termofilik karakterli *Lb. bulgaricus* ve *St. thermophilus* yoğurt starteri olarak kullanıldığında fermentasyon sonucunda oluşan laktik asitle sütün asitliğini geliştirir ve pH' yı düşürürler. Bu durumda oluşan asitlik süt kazeininin koagülasyonuna ve yoğurt aroma maddelerinin gelişimine olanak sağlar (Korkmaz, 2011).

Fermente sucuklarda aroma, renk, lezzet ve kıvamın oluşumu çeşitli mikroorganizmaların fermentleriyle oluşturdukları biyokimyasal reaksiyonlar sonucu

oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarda fermente et üretiminde starter kültür olarak *Lactobacillus plantarum*, *Lb. curvatus*, *Lb.pentosus*, *Lb. sakei*, *Pediococcus pentosaceus*, *P. Acidilactici* gibi laktik asit bakterilerinin kullanıldığı belirlenmiştir (Sezer, 2012).

Starter kültürler sucuk üretiminde genellikle raf ömrünü uzatmak için fermantasyonda kullanılır. Bu starter kültürlerlere *Lactobacillus spp.* ve *Pediococcus spp.* gibi laktik asit bakterilerinin dahil olduğu belirlenmiştir (Arabacı, 2017).

1.5. Probiyotik Bakteriler

Probiyotik olarak kullanılan en yaygın LAB cinslerine *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* aittir. *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lb. reuteri*, *S. thermophilus* gibi LAB insan beslenmesinde ve hayvan yem katkısı olarak kullanılan probiyotik özelliğe sahip bakterilerdir (Öngün,2015). Probiyotikler, “yeterli miktarda uygulandığında konakçıya sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlanır (Touret ve ark.,2018). Genellikle güvenli bakteri grubu kabul edilen *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* cinsleri probiyotiklerin birincil adayları arasındadır (Hippe ve ark., 2011). “Probiyotik” terimi ilk defa 1960’ larda ortaya çıkmıştır. Bu kelime Latince “pro” ve “bios” kelimelerinden türetilmiş ve “yaşam için” anlamına gelir ve antibiyotik teriminin anlamca karşıtıdır (Oral, 2015).

Elie Metchnikoff modern probiyotiklerin büyük babası olarak kabul edilmiştir. O, yoğurt gibi fermente süt ürünlerinde düzenli olarak laktik asit bakteri tüketiminin, Bulgar köylü popülasyonlarında artan sağlık ve uzun ömürlülük ile ilişkili olduğu konusunda önemli bir gözlem yapmıştır. Bunu 27 yaşındaki bir Bulgar Doktor Stamen Grigorov tarafından keşfedilen “Bulgar basili” ile ilişkilendirmiş ve daha sonra yoğurttaki sağlıklı bakterilerin sindirime nasıl yardım ettiğini ve bağışıklık sistemini nasıl iyileştirdiğini göstermiştir (Anukam ve Reid, 2014; Nwamaioha ve Ibrahim, 2018).

Probiyotik potansiyeli taşıyan bir mikroorganizma için önemli kriterler LABIP (Laktik Asit Bakteri Endüstriyel Platformu) tarafından belirlenmiştir:

İnsan orjinli olmalıdır; Metabolik etki kabiliyeti olmalıdır (kolesterol asimilasyonu, laktaz aktivitesi, vitamin üretimi); Antimikrobiyel bileşikler üretebilmelidir, Patojen özellik içermemelidir; Gastrik asit ve safra tuzuna direnç göstermelidir; İmmün cevabı stimüle edebilmelidir; Gastrointestinal sistemde kısa süreler için de olsa sürekliliğini

devam ettirebilmelidir (Oral, 2015). Bundan başka mikroorganizmalar, gelişmiş teknikler yardımıyla tanımlanmış ve güvenilir olmalıdır; Patojenlerle rekabet sonucunda probiyotik suşların bağırsak epiteline patojenlerden önce tutunabilmesi gerekmektedir. Probiyotik ürün üretiminde kullanılan suşun teknolojik özelliklerinin uygun olması gerekmektedir. Probiyotik ürün üretiminde, istenmeyen aroma bileşikleri üretmeyen, fajlara karşı dirençli, üretim sürecinde canlı kalabilen suşlar başarılı bir şekilde kullanılabilir (Alp, 2018).

Lactobacillus filogenetik olarak yüzden fazla, *Bifidobacterium* yaklaşık 30 türü olan çeşitli bakteri gruplarıdır. 1995’ te *Haemophilus influenza bakterisinin dizilenmesi* ve dizileme teknolojisindeki hızlı gelişmeler ile birçok probiyotik mikroorganizma dizilenmiştir. Hali hazırda yaklaşık 67 *Lactobacillus* genom sekansı mevcuttur. Bunların çoğunun genomunun büyüklüğü yaklaşık 2 Mb’ dir ve 1.28 Mb ile 3.32 Mb arasında değişmektedir (Bamunuarachchige ve ark., 2011).

Hemen hemen bütün probiyotik laktobasiller, karbonhidratların Embden – Meyerhof yolu (EMP) veya fosfoketolaz yolu (PKP) ile fermantasyonu yoluyla enerji talebini karşılar (Bamunuarachchige ve ark., 2011).

Bifidobacterium’ lar normal çubuklardan çeşitli dallı ve kulüp şekilli formlara kadar belirli bir hücre morfolojisine sahip gram pozitif, kesinlikle anaerobik, hareketli olmayan, spor yapmayan mikroorganizmalardır. *Bifidobacterium*’ lar aside toleranslı mikroorganizmalardır ve büyüme için optimum pH 6.5 ila 7.0 arasındadır (Novik ve ark., 2013).

WHO/FAO kılavuzuna göre, yeni probiyotik bakteri türlerinin izolasyonu ve tanımlanması toprak, yüzeysel su, bitkiler, hayvanlar, gastrointestinal sistem ve özellikle süt ürünleri gibi farklı doğal kaynaklardan yapılmaktadır (Kakelar ve ark., 2019).

1.5.1. Probiyotik bakterilerin insan sağlığı üzerine yararlı etkileri

Probiyotik mikroorganizmalar yutulduğunda, mide asiditesine ve safra tuzlarına karşı dirençli olduğu için gastrointestinal kanaldan geçebilme, metabolizmayı ve yerli mikrobiyota dengesini etkileyebilme yeteneğine sahiptirler. Probiyotikler, konakçı bağırsağında karşılıklı olarak avantajlı bir simbiyoz yaratarak tükettiğimiz gıdalardan faydalanırlar ve vücudumuz onların fizyolojik yaşam süreçlerinin yan ürünlerini kullanır. Probiyotiklerin bağırsak mikrobiyomu üzerinde patojenlere karşı korunma, bağışıklık

uyarımı, gastrointestinal hastalıkların önlenmesi ve tedavisi, osteoporozun ve obezitenin azaltılması, bağırsak mukozal bariyerinin stabilizasyonu, laktoz metabolizması ve kolonik sağlık ve konakçı beslenmesini iyileştirme gibi önemli rolleri vardır (Orike ve ark., 2018).

Probiyotik araştırmaları, büyüme, bağırsak hastalıkları, kalp hastalıkları, alerjik reaksiyonlar, HIV ve kanser gibi çeşitli konulara odaklanmıştır. Bağırsak beyninin probiyotiklerle modülasyonu anksiyete ve depresyon için yeni bir tedavi edici çözüm olarak önerilmiştir (Sugandhi, 2018).

Bağırsak sistemindeki *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarının geniş popülasyonları genellikle sağlıklı bir bağırsağın göstergesidir. Probiyotikler ayrıca süt ürünlerinde, soya sütü, meyve suları, et türevleri ve tahıl bazlı gıdalar gibi yeni ürünlerde fonksiyonel katkılar olarak belgelenmiş ve fizyolojik faydaları ile artan bir şekilde kullanılmaktadır (Fung ve ark., 2011).

Probiyotik bakteri oranının artmasıyla bağırsak mikrobiyotasının değişebileceği kanıtlanmıştır. Bu değişim hidrojen peroksit, organik asitler ve bakteriyosinler gibi patojen inhibe edici maddelerin üretilmesiyle meydana çıkar (Tomaro-Duchesneau, 2014).

Helicobacter pylori (HP), kronik aktif gastrit, peptik ülser ve mide kanserinin ana nedenidir (Song ve ark., 2018). Probiyotik mikroorganizmalar, HP' yi inhibe eden (Catić ve ark., 2018) ve konakçı tarafından antikorların salgılanmasını indükleyen çeşitli antibakteriyel maddeler üretebilir (Song ve ark., 2018).

Diyet takviyeleri ve besinler olarak düzenlenen probiyotikler, maya veya bakterilerden oluşur. Fakat probiyotiklerin çoğu bakteridir. Tablo 1.1' de gıda katkıları olarak kullanılan probiyotikler gösterilmiştir (Chikkamath ve ark., 2018).

Spor oluşturan probiyotik basil suşları bakteri hücrelerinin hayatta kalamayacağı koşullarda (yüksek ısı, düşük pH) spor üreterek canlı kalma özelliğine sahiptir. Probiyotik *Bacillus sp.* bu açıdan öne çıkmaktadır. Yoğurt, bioyoğurt, raf ömrü uzatılmış ekmek, çiğ kurutulmuş et ürünleri, peynir gibi fonksiyonel gıdaların üretimi için *Bacillus* probiotik suşları kullanılır (Zaid ,2018).

Tablo 1.1. Gıda katkıları olarak kullanılan probiyotikler

Seri no	Probiyotikler (bakteri veya maya)	Gıda Ürünleri	Terapötik Kayıtlı Ajan
1.	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lor, yoğurt, ayran, fermente peynir	L.acidophilus, Lacidofil, Lakcid, Lakcid forte, Trilac, Yogurt
2.	<i>L.casei Shirota</i>	Peynir, Yakult (kaymaksız fermente süt içeceği)	
3.	<i>L.delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	Yoğurt	Trilac
4.	<i>L. plantarum</i>	Krema, fermente ekmek	
5.	<i>L. rhamnosus</i>	-	L. acidophilus, Lacidofil
6.	<i>L. reuteri</i>	-	
7.	<i>Bifidobacterium adolescenti</i>	-	
8.	<i>B. bifidum</i>	Seçilmiş süt ürünleri	Trilac, Lactobif
9.	<i>B.breve, B.infantis, B. longum, B.lactis</i>	Bebek sütü ve probiyotik Cheddar benzeri peynir	Junior Bifidus Nestle
10.	<i>Saccharomyces boulardii, Streptococcus thermophilus</i>	-	Enterol

1.6. Antimikrobiyal Aktivite

Laktik asit bakterlerinin, gıda bozucu mikroorganizmalar veya gıda kaynaklı patojenlere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu da bilinmektedir. Laktik asit bakterilerinin antagonistik aktivitesinin farklı bazı mekanizmalar ile meydana çıktığı belirlenmiştir (Dinu ve ark.,2018). Bu bakteriler laktik ve asetik asit gibi organik asitler, H₂O₂, bakteriyosin olarak isimlendirilen antimikrobiyal özellikli proteinler, diasetil, alkol ve CO₂ gibi metabolitler üretebilme özellikleri sayesinde bazı mikroorganizmalar üzerine inhibitör etki gösterebilmektedir. Bu bileşenlerin her biri ayrılıkta inhibitör etkiye sahip olsa da laktik asit bakterilerinin diğer mikroorganizmalara karşı antagonistik etkisi, bunların kombinasyonu sonucu meydana çıkmaktadır (Çon ve Gökalp, 2000). Asitlerin etki spektrumu hücre zarının potansiyelini engellemek, aktif transportu inhibe etmek, hücre içi pH'yı azaltmak ve çeşitli metabolik fonksiyonları inhibe etmek gibi bir sıra özellikleri kapsamaktadır (Toy,2019). LAB' ın fermentasyon sonucu antimikrobiyal maddeler oluşturması çok eski zamanlardan gıda korunmasında kullanılan yöntemdir. LAB bulunduğu ortamda rekabet içerisinde olduğu mikroorganizmalar üzerinde üstünlüğünü korumak için ortamı değiştirmeye çalışır ve bu zaman ortamdaki

karbonhidratları fermentasyon yoluyla düşük moleküler ağırlığa sahip organik bileşiklere dönüştürür (Üner, 2012).

1.6.1. Bakteriyosinler

“Bakteriyosin” terimi ilk olarak 1953 yılında Jacob ve arkadaşları tarafından tanımlanmış protein yapısındaki antimikrobiyal maddeler olarak bilinmektedir (Nalvuran, 2013). Amerika Birleşik Devletleri’nde, laktik asit bakterilerinden gelen bakteriyosinlerin gıdalarda katkı maddesi veya “doğal koruyucu” olarak kullanılabileceğinin farkına varılması nedeniyle son yıllarda ilgi artmıştır. 1988’de, nisin, diğer ülkelerde 40 yıllık ticari kullanımın ardından Amerika Birleşik Devletleri’nde bir gıda koruyucu olarak kullanılması onaylanmıştır. Nisin’ in gıdalarda FDA tarafından onaylanması, Amerikan yiyecek ve içeceklerinde diğer antibiyotik benzeri bileşiklerin olası ticari kullanımına zemin hazırlamıştır. Laktik asit bakterilerinden nisin ve diğer bakteriyosinler üzerinde yapılan araştırmalar, *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella* türleri gibi yaygın ve kalıcı gıda kaynaklı patojenlerin bu bileşikler tarafından spesifik olarak inhibe edilebileceğini veya öldürülebileceğini göstermiştir. Bu raf ömrü arttırıcı maddeler artık gıda maddelerinde ve kişisel ürünlerde kullanımları için aktif olarak araştırılmaktadır (Hoover ve Steenson, 1993). Bundan başka bakteriyosinler; insan, hayvan ve bitki patojenlerine karşı doğal olarak mücadele edebilen ve insan hücrelerine herhangi bir zararı olmayan proteinler olarak bilinmektedir (Üstündağ ve Özdoğan, 2011).

Bakteriyosinler dar etki spektrumuna sahip olmaları ve esasen aynı türe yakın bakterilere etki etme özelliğinden dolayı antibiyotiklerden farklandırılır (Batu ve ark., 2014). Bakteriyosinler bakterilerin çoğunda olduğu tespit edilmiştir, hatta yakın geçmişte bazı Arkea türlerinin bile bakteriyosin ürettiği ortaya çıkmıştır (Akkoç ve ark., 2009). Bakteriyosinlerle ilgili ilk araştırmalar 1925’te *E. coli*’nin ürettiği kolisin’in belirlenmesiyle başlamıştır (Batu ve ark., 2014). Kolisinler gram (-) bakteriler tarafından sentezlenen 30–80 kDa arasında yüksek moleküler ağırlığa sahip protein yapılı bileşiklerdir (Düğenci, 2014). Bakterilerin çoğunluğunu en az bir bakteriyosin üretme yeteneğine sahip olsa da yapılan çalışmaların azlığından dolayı birçok bakteriyosin günümüzde hala izole edilememiştir (Batu ve ark., 2014).

Bakteriyosinler ve antibiyotikler aktivitelerinin benzerliğinden dolayı karıştırılmasına rağmen aralarında bazı farklılıklar mevcuttur. Bu karışıklık

bakteriyosinlerin endüstriyel uygulamalarda kullanımını sınırlayan yasal etken olarak bilinmektedir (Işık, 2018). Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenen ürünler olduğu halde, antibiyotikler enzimatik işleme sonucu aktif formlar kazanan bileşenlerdir. Bundan başka bakteriyosinler gelişme fazında üretilen birincil metabolitler olarak bilirse de antibiyotikler durma fazında üretilen ikincil metabolitlerdir. Bakteriyosinlerin etki spektrumlarının antibiyotiklere göre çok daha dar olduğu bilinmektedir (Demirci, 2013). Her bakteriyosinin kendine has bağışıklık proteini mevcuttur. Bakteriyosinlerin bağışıklık proteinlerini kodlayan genleri, yapısal genleri ile bağlantılıdır. Antibiyotiklerde bu genler yapısal antibiyotik genleri ile bağlantılı değildir (Zengin, 2012).

Bakteriyosinogenik laktik asit bakterileri veya bunların izole edilen bakteriyosinleri, gıdalarda ve yemlerde patojenlerin ve bozulma yapan mikroorganizmaların sık gelişimini kontrol etmek için yararlı olan güvenli katkı maddeleri (GRAS) olarak kabul edilir (Parada ve ark., 2007; Sabo ve ark., 2019). Bakteriyosinlerin izolasyonu ve saflaştırılması için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Tuzlama, çözücü ekstraksiyon, ultrafiltrasyon, adsorpsiyon-desorpsiyon, iyon değişimi ve boyut dışlama kromatografisi gibi biyoteknolojik prosedürler en yaygın yöntemler arasındadır (Parada ve ark., 2007).

Bakteriyosinler, bakteriyel protein sentez aparatı ile sentezlenen düşük moleküler ağırlıklı antimikrobiyal peptitlerdir. Diğer bakterilere karşı inhibe edicidirler. Bir bakteri tarafından üretilen bakteriyosinler, yalnız aynı türe ait diğer bakterileri inhibe edebilme yeteneğine sahipse, genellikle dar spektrumlu bakteriyosinler olarak kabul edilir, aksine, eğer bir başka cinse ait bakterileri de inhibe edebiliyorlarsa, geniş spektrumlu bakteriyosinler olarak kabul edilirler. Bakteriyosin üreten bakteriyel hücreler, konakçı hücrelerin ürettiği spesifik bağışıklık proteinlerinin aracılık ettiği kendi antimikrobiyal peptitlerine karşı dirençlidir (Juturu ve Wu, 2018).

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen antimikrobiyal proteinler üzerine yapılan araştırmalar sonucunda Gram pozitif organizmaların ürettiği antimikrobiyal proteinleri karakterize etmek için altı kriter önerilmiştir. Bunlar aşağıdakilerdir:

1. Bakteriyosinler protein olmalıdır.
2. Bakteriyosinler sadece bakteriyostatik değil hem de bakteri öldürücüdür.
3. Bakteriyosinlerin spesifik bağlanma bölgelerine sahip olma zorunluluğu, muhtemelen bir bakteriyosinin spesifik patojenlere karşı spesifikliğinden sorumludur ve bunları

organik asitler ve genel olarak çoğu antibiyotik gibi diğer geniş spektrumlu antimikrobiyalardan ayırmak için kullanılabilir.

4. Kolisinlerin plazmid bağlantısı, bakteriyosinlerin plazmid aracılı olduğunu öne sürdü.

5. Bakteriyosinlerin öldürücü biyosentez ile üretilmesi gerektiğine ilişkin kriter, bakteriyosin salınım sürecinde bakteriyosin üreten hücrenin ölmesi gerektiğini göstermektedir.

6. Son kriter, bakteriyosinlerin yakından ilişkili bakterilere karşı dar etki spektrumuna sahip olduğunu göstermektedir (Montville ve Kaiser, 1993).

Etki spektrumları, biyokimyasal özellikleri ve genetik determinantları açısından Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler birbirinden farklıdır. Bunlar 3-10 kDa gibi düşük molekül ağırlığına sahip, hidrofilik ve hidrofobik kısımlar içerirler. Nisin ve pediocin AcH gibi bakteriyosinler asidik koşullarda yüksek sıcaklığa dayanıklı olmasıyla dikkat çekmiştir. Otoklavlanma sonrasında Nisin'in pH 5'te aktivitesinin %40'ını, pH 6.8'de ise %90'ını kaybedebildiği belirlenmiştir (Kurt ve Zorba, 2005). LAB tarafından sentezlenen bakteriyosinlerin katyonik, hidrofobik (Gülgör ve Özçelik, 2014) veya amfipatik moleküller olduğu, 20-60 amino asit rezidüsü içerdiği belirlenmiştir. Bakteriyosinler daha çok plazmid kökenli olarak tespit edilmiştir. Bakteriyosinlerin sentezlenmesinde aşağıdaki adımlar bir-birini takip eder:

1. Polipeptid dizisi RNA tarafından kodlanır,
2. Öncü protein olarak ayrılıp bir moleküler sinyalizasyona uğrar,
3. Çeşitli modifikasyonlara maruz kalarak sistein sayısına göre son şeklini kazanır ve hücre dışına salgılanır (Kurt ve Zorba, 2005).

Bakteriyosin üretiminden sorumlu genler kromozom, plazmid veya transpozon üzerinde bulunabilmektedir (Asutay, 2007). Bakteriyosin sentezinin gerçekleşmesi öncü peptidi kodlayan yapısal gen, immünite geni, ABC taşıyıcısını kodlayan gen ve bakteriyosinin hücre dışına taşınmasını sağlayan proteini kodlayan 4 farklı genin yardımıyla sağlanır (Abanoz, 2014).

Bakteriyosinler genellikle sadece hücre membranının elektrolitik yük dengesini bozmak suretiyle inhibisyon gerçekleştirirler (Üstündağ ve Yalçın, 2017). Bakteriyosinlerin öldürücü etkisi hedef hücrelerin sitoplazmik membranlarında iki şekilde meydana çıkmaktadır. Bunlar Wedge-modeli ve Barrel Stave olarak adlandırılan etki mekanizmalarıdır (Abanoz, 2014). İlk etki mekanizmasında bakteriyosinlerin pozitif yüklü N ve C uçlarının, membranların negatif yüklü fosfolipidleriyle birleşmesi

sonucunda por oluşur ve membran fonksiyonlarının bozulmasına yol açar. Diğer etki mekanizmasında ise; bakteriyosinler hücre duvarı sentezinin ön maddesi olan Lipid II molekülüne bağlanır, Lipid II molekülünün peptidoglikan zincirine bağlanmasını engeller ve bu da hücre duvarı sentezininin durdurulmasıyla sonuçlanır (Batu ve ark, 2014; Abanoz, 2014).

Günümüzde nisin ve pediosin PA-1 lisanslı olarak kullanımına izin verilen bakteriyosinler olarak bilinmektedir (Alkış, 2016). Nisin, süt endüstrisinde, özellikle peynir ürünlerinde, endospor oluşturan bakterilerin, özellikle gaz üreten *Clostridium botulinum*'un yanı sıra *L. monocytogenes* gibi diğer proses sonrası kirletici bakterilerin çoğalmasını önlemek için kullanılmaktadır. Isıl işlem görmüş kremlerde, depolama sırasında *Bacillus cereus*'un gelişimi düşük konsantrasyonlarda nisin ile tamamen inhibe edilmiştir. Dilimlenmiş peynirde, polietilen / poliamid ambalajında hareketsiz nisinlerin, LAB, *Listeria innocua* ve *S. aureus* popülasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, peynir fermentasyonunda nisin kullanımı, başlangıç kültürlerinin büyümesini engelleyebilir ve asitlenme ve / veya aroma oluşumu üzerinde zararlı etkileri olabilir. Starterlerin peynir üretimi sırasında nisin zararlı etkisinden korunması ve nisin stabilitesinin artırılması için, lipozomlar içine yerleştirilmiş Nisin Z' nin başarıyla test edildiği ve çedar peynirindeki listerileri engellediği bulundu (G'alvez ve ark., 2008).

Fermente gıdalardan izole edilen LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin renksiz, tatsız ve kokusuz olmaları, toksik olmamaları, genellikle farklı pH ve sıcaklık değerlerine karşı aktivitelerinin stabil kalması ve birçok önemli özelliklerinden dolayı biyokoruyucu olarak gıdalarda kullanım potansiyeli bulunmaktadır (Charyyev, 2016).

Süt ve süt ürünlerinde bakteriyosinler 2 farklı şekilde kullanılabilir:

I. Süt ve süt ürünlerinde bakteriyosinlerin preparat halinde kullanımı- Nisin, pediosin, LTA 2341 ve Mikrogard gibi ticari olarak üretilen bakteriyosin preparatları gıdalarda bozulma yapan bakterilerin kontrolünde kullanılmaktadır.

II. Süt ve süt ürünlerinde bakteriyosin üreten kültürün kullanımı- bu çalışmalar genellikle starter kültür kullanıma uygun olduğunu göstermiştir.

Tablo 1.2' de bazı bakteriyosinler ve özellikleri gösterilmiştir (Altuntaş ve Ayhan, 2010).

Tablo 1.2. Bakteriyosinler ve özellikleri

Bakteriyosin	Üretici mikroorganizma	Özellikler
Nisin	<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i> ATCC 11454	Lantibiyotik, geniş spektrumlu, kromozom /plazmid kaynaklı, bakterisidal, gelişme evresinin sonlarında üretilir
Pediosin A	<i>Pediococcus pentosaceus</i> FBB61 ve L-7230	Geniş spektrumlu, plazmid kaynaklı
Pediosin	<i>Pediococcus acidilactici</i> H Ach	Geniş spektrumlu, plazmid kaynaklı
Leucocin	<i>Leuconostoc gelidum</i> UAL 187	Geniş spektrumlu, plazmid kaynaklı, bakterisidal, gelişme evresinin başlarında üretilir
Helvetisin J	<i>Lactobacillus helveticus</i> 481	Dar spektrumlu, kromozom kaynaklı, bakterisidal
Karnobakteriyosin	<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17	Dar spektrumlu, plazmid kaynaklı, gelişme evresinin başlarında üretilir

1.6.1.1. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması

Bakteriyosinlerin birçok sınıflandırılması mevcut olsa da amino asit dizisi, yapısı ve metabolik davranışlarında meydana gelen değişikliklerden dolayı sınıflandırılmaları halen devam etmektedir (Delibaş, 2016).

Günümüzde bakteriyosinler için farklı sınıflandırmalar mevcut olsa da daha çok Klaenhammer'in özellikle Gram (+) bakterileri baz alarak yaptığı sınıflandırma kullanılmaktadır. Bu sınıflandırma biyokimyasal özelliklere dayanmaktadır ve buna göre bakteriyosinler molekül büyüklüğü, kimyasal yapıları, etki mekanizmaları ve ısı stabilitelerine göre 4 sınıfa ayrılmışlardır. Biyokimyasal tanımlanmadan dolayı daha çok ilk 3 sınıf dikkat çekmektedir (Kurt ve Zorba, 2005). Klaenhammer sınıflandırması aşağıdaki şekilde olmuştur:

Sınıf I: lantibiyotikler yani küçük peptidler (nisin, lacticin 3147 A, lacticin 3147 B, plantarisin C) ısıya karşı stabil biyomoleküllerdir (Uludağ, 2015); Sınıf II: küçük, ısıya karşı stabil peptidler; Sınıf III: ısıya duyarlı büyük proteinler; Sınıf IV: kompleks bakteriosinler olarak adlandırılmaktadır (Gündoğdu, 2016).

Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler, sınıf I ve II' ye ayrılır. Nisin gibi sınıf I bakteriyosin, düşük moleküler ağırlığa (<10 kDa) sahiptir ve termostatik, hidrofobik ve lantionin ve metilantionin gibi modifiye edilmiş translasyon sonrası kalıntıları olan katyonik peptitlerdir (Da Costa ve ark., 2019). Bu gruptaki bakteriyosinler

net pozitif yüke sahip, membran aktif peptidler olup, bakteri zarında gözenek oluşturarak antimikrobiyal aktivite sergilemektedirler (Kurt ve Zorba, 2005). Bu grup lantibiyotikleri içerir. Lantibiyotikler, karakteristik polisiklik tiyoeter amino asitleri lantionin veya metillantiyonin ile doymamış amino asitler dehidroalanin ve 2-aminoizobütirik asidi içeren bir peptit antibiyotik sınıfıdır. Lantibiyotikler ayrıca bileşiğin yapısı ve yüküne göre iki alt gruba ayrılabilir; Vida şeklinde, küçük katyonik peptidlerden oluşan Ia grubu ve küresel şekle sahip anyonik veya nötr peptitlerden oluşan Ib grubu. Grup Ia bakteriyosin örneği, nisin, subtilin, epidermindir. Bazı Grup Ib bakteriyosinleri mersasidin, aktagardin ve sinnamisindir (Al-bayati, 2014).

Sınıf II bakteriyosinlerinin Sınıf I'den farklı olarak lantionin içermediği bilinmektedir (Özkan, 2013). Sınıf II bakteriyosinler ayrıca termostabil, hidrofobik, katyonik ve düşük moleküler ağırlıklı (<10 kDa) peptidlerdir, ancak genel olarak amfipilik bir sarmal yapıya sahiptirler, bu da hedef hücrenin sitoplazmik zarına yerleştirilmesine izin vererek zar depolarizasyonunu ve hücre ölümünü teşvik eder (Da Costa ve ark., 2019). Bu sınıfa modifiye olmamış, ribozomal olarak sentezlenen antimikrobiyal peptidlerin çoğunluğunu oluşturan bakteriyosinler dahildir. Post-transyonal modifikasyona uğramadıkları ve sadece gerekli bakteriyosini, immuniteyi ve transportu kodlayan genlere sahip oldukları için yapısal olarak lantibiyotiklerden daha basittirler. Bu grup bakteriyosinler 4 alt gruba bölünmektedir. Grup IIa; pediosin benzeri güçlü antilisterial bakteriyosinleri, Grup IIb; iki peptid bakteriyosinleri, Grup IIc; halkasal bakteriyosinleri ve Grup IId ise diğer lineer bakteriyosinleri kapsamaktadır. Grup II bakteriyosinlerinin en büyük grubu olan Grup IIa bakteriyosinleri, *Listeria* inhibisyonuna neden olan pediosin benzeri bakteriyosinler olarak adlandırılmaktadırlar (Kaya, 2013).

Eskiden mevcut olan sınıf III bakteriyosinlere yüksek moleküler ağırlıklı (> 30 kDa) ve ısıya dayanıksız olan peptidler dahil olmuştur. Sınıf III bakteriyosinler, IIIa ve IIIb alt sınıflarından ibaret olmuştur. Eski alt sınıf IIIa peptidleri (lisostafin ve enterolisin A), hücre duvarının hidrolizi ile hücre parçalanmasını teşvik eder. Buna karşılık, önceki alt sınıf IIIb (helveticin J), lizise neden olmayan, membran potansiyelinin dağılması ve ATP' nin hücre içi konsantrasyonunda azalmaya neden olan peptidleri içerir (Da Costa ve ark., 2019).

Eski Sınıf IV bakteriyosin molekülleri karbonhidratlar veya fosfolipidler gibi bir veya daha fazla fonksiyonel grubun birleştirilmesine bağlı aktiviteye sahip olmuştur, bunlara, laktosin 27 ve leucocin S gibi bakteriyosinler kompleksleri dahil olmuştur,

atamadan beri, artık bakteriyosin olarak kabul edilmemektedir. Bakteriyosinler, diğer yüksek moleküler ağırlıklı antimikrobiyal proteinleri içermeyen, sadece ribozomlarda sentezlenen küçük peptitlere karşılık gelir (Da Costa ve ark., 2019).

Genel olarak bakteriyosinler sentezlendikleri bakteri türlerinin cins isimlerine göre adlandırılmaktadır (Üstündağ, 2016).

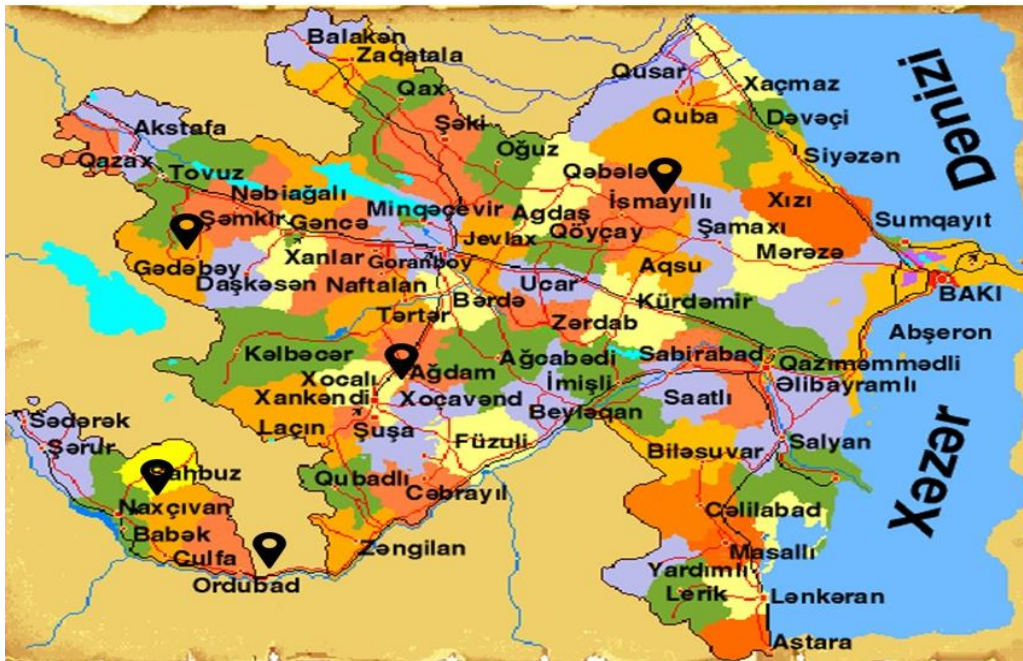
Ticari açıdan en yaygın I. Sınıf bakteriyosinler olarak nisin varyantları, nisin A ve Z'dir; bununla birlikte, nisin Q, U, U2 ve nisin F de dahil olmak üzere diğer varyantlar tespit edilmiştir. Nisin A, nisin Z, nisin F ve nisin Q, *Lactococcus lactis* tarafından üretilir. Nisin U ve Nisin U2, *Strep. uberis* tarafından üretilir. Bunlardan sadece Nisin A ticari olarak, çeşitli şekillerde de olsa, örneğin, %2,5 Nisin A içeren bir ürün olan Nisaplin® olarak temin edilebilir. Ağız sağlığı ile ilgili olarak, lantibiyotik salivarisin A'yı üreten bir *Streptococcus salivarius*'un, ağız kokusunda yer alan bakterileri azalttığı gösterilmiştir. Bu açıdan en önemli II. sınıf bakteriyosin ise, ticari ürünü Alta TM 2341 şeklinde mevcut olan pediocin PA- 1'dir. Bu fermente, bir dizi gıdada raf ömrü uzatıcı olarak ve yemeye hazır et ürünlerinde *L. monocytogenes*'e karşı koruyucu olarak kullanılır (Collins ve ark., 2010).

2. MATERYAL-METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan örnekler

Azerbaycan'dan gerekli koşullar altında laboratuvara getirilmiş yöresel süt ürünlerinden LAB izolasyonu yapılmıştır. Bunlar 5 farklı ile ait beyaz peynir (2 farklı çeşit Gedebeý, Naxçıvan, Garabağ Motal, Ordubad, İsmayıllı), 1 adet kesmik (İsmayıllı) ve 1 adet kaymak (İsmayıllı) örneği olmuştur. İsmayıllı kaymağı (bozulma nedeniyle) sayım işlemleri dışında hiçbir işleme tabi tutulmamıştır. Şekil 2.1'de (http-1) Azerbaycan haritasında örneklerin ait olduğu iller gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Azerbaycan haritası (örneklerin ait olduğu iller)

2.1.2. Kullanılan kimyasallar

Çalışmalarımızda kullanılmış bazı kimyasallar Tablo 2.1’ de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. *Kullanılan kimyasallar*

Kullanılan malzeme	Markası
Agarose	Sigma
MQ su	Gibco
10X TAE çözeltisi	Fisher
PCR Mix	Biolabs
PCR DNA Markır	İnvitrogen
Tris-HCl (1M pH 8)	İnvitrogen
SDS	Amresco
Proteinaz K	Sigma
Lizozim	Sigma
Fenol-Kloroform-İzoamil alkol	Amresco
CTAB	Amresco
İzopropanol	Sigma
Etanol	Riedel de Haen
Tris base	Sigma
EDTA (0.5 M pH 8)	Gibco
SDS-Page için markır	Sigma
Acrylamide/ bis-acrylamide (%30)	Sigma
Temed	Fluka
NaCl (5M)	Promega
PBS (10X)	Multicell
Formamide	Promega
Formaldehid (%37)	Fluka
UltraPure Distilled Water	İnvitrogen
DAPI	Sigma

2.1.3. Kullanılan besiyerleri

Aşağıdaki tablolarda her bir besiyeri için 1 litre hazırlanma içeriği (http-2) gösterilmiştir.

Tablo 2.2. MRS agar (*Lactobacillus Agar acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE. Merck 1.10660*)

Madde	Miktar (g/l)
Dipotasyum hidrojen fosfat	2 g
Diamonyum hidrojen sitrat	2 g
D (+) Glikoz	20 g
Magnezyum sülfat	0,2 g
Mangan sülfat	0,04 g
Et ekstraktı	10 g
Pepton	10 g
Sodyum asetat	5 g
Maya ekstraktı	4 g
Tween® 80	1 g
Agar -agar	14 g
Distile su	1000 ml
Besiyerinin pH'sı 5,7±0,2' ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.	

Tablo 2.3. MRS broth (*Lactobacillus Broth acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE. Merck 1.10661*)

Madde	Miktar (g/l)
Dipotasyum hidrojen fosfat	2 g
D (+) Glikoz	20 g
Magnezyum sülfat heptahidrat	0,2 g
Mangan sülfat tetrahidrat	0,04 g
Et ekstraktı	8 g
Kazein Peptonu	10 g
Sodyum asetat	5 g
di-amonyum hidrojen sitrat	2 g
Yeast ekstraktı	4 g
Distile su	1000 ml
Besiyerinin pH'sı 5,7±0,2' ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.	

Tablo 2.4. *M 17 agar acc. to Terzaghi (Merck 1.15108)*

Madde	Miktar (g/l)
Soya peptonu	5 g
Et peptonu	2,5 g
Kasein peptonu	2,5 g
Maya ekstraktı	2,5 g
Et ekstraktı	5 g
Laktoz monohidrat	5 g
Askorbik asit	0,5 g
Na-β-gliserolfosfat	19 g
Magnezyum sulfat	0,25 g
Agar -agar	12,75 g
Distile su	1000 ml
Besiyerinin pH 7,2 ± 0,2'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.	

Tablo 2.5. *M 17 broth acc. to Terzaghi (Merck 1.15029)*

Madde	Miktar (g/l)
Soya peptonu	5 g
Et peptonu	2,5 g
Kasein peptonu	2,5 g
Maya ekstraktı	2,5 g
Et ekstraktı	5 g
Laktoz monohidrat	5 g
Askorbik asit	0,5 g
Na-β-gliserolfosfat	19 g
Magnezyum sulfat	0,25 g
Distile su	1000 ml
pH 'sı 7,2 ± 0,2'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.	

Tablo 2.6. *Plate Count agar (Merck 1.05463). Casein-peptone Dextrose Yeast Agar ;PCA*

Madde	Miktar(g/l)
Kazein peptonu	5 g
Maya ekstraktı	2,5 g
D (+) Glikoz	1 g
Agar-agar	14 g
Distile su	1000ml
Besiyerinin pH 'sı 7,0±0,2 'ye ayarlanmış 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.	

Tablo 2.7. *Potato Dextrose agar (Merck 1.10130); PDA*

Madde	Miktar(g/l)
Patates infüzyon	4 g
D(+) Glikoz	20 g
Agar-agar	15 g
Distile su	1000 ml
Besiyerinin pH'sı 5,6±0,2'ye ayarlanarak 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.	

Tablo 2.8. *VRB (Violet Red Bile Agar) agar (Merck 1.01406)*

Madde	Miktar(g/l)
Et peptonu	7 g
Maya ekstraktı	3 g
Laktoz	10 g
Sodyum klorür	5 g
Ox bile	1.5 g
Neutral Red	0,03 g
Kristal violet	0,002 g
Agar-agar	13 g
Distile su	1000 ml
Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon, kaynar su banyosunda besiyerini eriterek veya mikrodalga fırında kaynatılarak steril edilebilir. Sterilizasyon sonrası pH 7,4±0,2 olmalıdır.	

Tablo 2.9. *TSB yumuşak agar (Tryptic Soy Broth (TSB)) (Merck 1.05459) + %0,7 agar*

Madde	Miktar(g/l)
Kazein peptonu	17 g
Soya peptonu	3 g
D (+) Glikoz	2,5 g
Sodyum klorür	5 g
Dipotasyum hidrojen fosfat	2,5 g
Agar-agar	7 g
Distile su	1000 ml
Besiyerinin pH 'sı 7,3±0,2 'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir.	

Tablo 2.10. Mueller-Hinton broth (Merck 1.10293)

Madde	Miktar(g/l)
Meat infusion	2 g
Kazein hidrolizat	17,5 g
Nişasta	1,5 g
Distile su	1000 ml
Besiyerinin pH 'sı 7,4±0,2 'ye ayarlanmış ve 121 °C 'de 15 dakika steril edilmiştir.	

Tablo 2.11. Mueller-Hinton agar (Merck 1.05437)

Madde	Miktar(g/l)
Sığır eti–kalp ekstraktı	4 g
Kazein hidrolizat	17,5 g
Nisasta	1,5 g
Agar -agar	13 g
Et infizyonu	2 g
Distile su	1000 ml
Besiyerinin pH 'sı 7,4±0,2 'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.	

Tablo 2.12. Brain Heart broth (Merck 1.10493)

Madde	Miktar(g/l)
Beyin ekstraktı, kalp ekstraktı ve peptonlar	27,5 g
D (+) Glikoz	2 g
Sodyum klorür	5 g
Na ₂ HPO ₄	2,5 g
Distile su	1000 ml
Besiyerinin pH'sı 7,4±0,2 'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.	

2.1.4. Kullanılan kimyasal çözeltiler

Kimyasal çözeltilerin içeriği aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir.

Tablo 2.13. Fizyolojik tuzlu su (%0,85' lik sodyum klorür çözeltisi)

Madde	Miktar(g/l)
Sodyum klorür	85 g
Distile su	1000 ml
Homojenizasyon işlemi için 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra kullanılır (Uyar, 2018).	

Tablo 2.14. %20' lik gliserol çözeltisi

Madde	Miktar(g/l)
Gliserol	20 ml
Distile su	80 ml
Gliserol çözeltisi stok alma işleminde 121 ° C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra kullanılır (Uyar, 2018).	

2.1.5. Kullanılan boyalar

Kullanılan boyaların içeriği tablolar halinde gösterilmiştir.

Tablo 2.15. Kristal violet

Madde	Miktar(g/l)
Kristal violet	2,0 g
Etil Alkol (%95)	20 ml
Amonyum Oksalat	0,2 g
Distile Su	20 ml
Öncelikle kristal violet 10 ml etil alkol içerisinde çözülür ve üzerine 20 ml distile su içerisinde çözünmüş amonyum oksalat aktarılmıştır. Kullanmadan önce karışım filtreden geçirilmiştir (Uyar, 2018).	

Tablo 2.16. Safranin

Madde	Miktar(g/l)
Safranin	0,25 g
Etil alkol (%95)	10 ml
Distile su	100 ml
Safranin alkol içerisinde çözüldükten sonra üzerine distile su ilave edilmiş ve 24 saat sonra çözelti filtre kâğıdından geçirilerek süzülmüştür (Yiğit, 2009).	

Tablo 2.17. Lugol

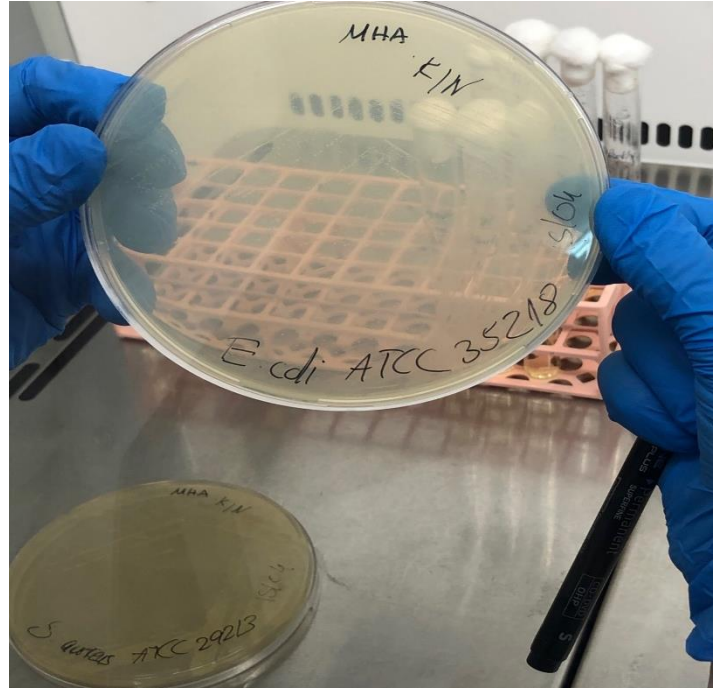
Madde	Miktar(g/l)
İyot	5 g
Potasyum iyodür (KI)	10 g
Distile su	100 ml
Potasyum iyodür 20–30 ml distile suda çözüldükten sonra üzerine iyot eklenmiştir ve çözelti distile su ile 100 ml ’ye tamamlanmıştır (Yiğit,2009).	

2.1.6. Kullanılan test mikroorganizmaları

Kullanılan test mikroorganizmaları Tablo 2.18’de ve Şekil 2.2’de gösterilmiştir.

Tablo 2.18. *Kullanılan test mikroorganizmaları*

Mikroorganizma	Kültürün temin edildiği yer	Optimum Gelişme sıcaklığı
<i>Bacillus cereus</i>	Anadolu Üniv. Eczacılık Fak.	30 °C
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218- AÜ. Ecz. Fak	37 °C
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213-AÜ. Ecz. Fak	30 °C
<i>Salmonella typhi</i>	Anadolu Üniv. Eczacılık Fak.	37 °C



Şekil 2.2. *Kullanılan test mikroorganizmaları*

2.1.7. Ekstraksiyon tamponu

Toplam nükleik asit ekstraksiyonu için kullanılan ekstraksiyon tamponunun pH ' sı 8.0'a ayarlanmalıdır (Poyraz, 2018).

Tablo 2.19. *Ekstraksiyon tamponu*

Madde	Miktar(g/l)
100 mM Tris-HCl	0.7880 gr
100 mM EDTA	1.5760 gr
MQ su	100 ml

2.1.8. SDS -PAGE için gerekli malzemeler

SDS-PAGE için gerekli malzemeler tablolar halinde gösterilmiştir.

Tablo 2.20. *SDS-PAGE için gerekli jeller (Mutlu, 2006)*

Madde	%12' luk 10 ml Ayırma jeli	3 ml Yükleme jeli
H ₂ O	3.3 ml	2.1ml
%30 akrilamid	4 ml	0.5 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 ml	-
1.0 M Tris (pH 6.8)	-	0.38 ml
%10 SDS	0.1 ml	0.03 ml
%10 Amonyum persülfat	0.1 ml	0.03 ml
TEMED	0.004 ml	0.003 ml

Tablo 2.21. *Jel tamponları*

Madde	Ayırma jeli için kullanılan	Yükleme jeli için kullanılan
Tris -base (sigma)	18,16 g	12,11 g
Ultra saf su (deiyonize su)	100 ml	100 ml
Uygun pH'lar ayarlanmıştır (Erbulucu, 2012).		

Tablo 2.22. *(%10) SDS solusyonu (sodyum dodesil-sülfat) (Bölükbaş, 2007)*

Madde	Miktar(g/l)
Sodyumdodesilsülfat (SDS)	10 g
Distile su	100 ml

Tablo 2.23. APS (%10) Amonyum persülfat solusyonu (Bölükbaş, 2007)

Madde	Miktar(g/l)
Amonyum persülfat	10 g
Distile su	100 ml

Tablo 2.24. 4x Loading sample buffer (10 ml)

Madde	Miktar(g/l)
1 M Tris- HCl (pH 6.8)	2 ml
SDS	0.8 g
100% Glycerol	4 ml
14.7 M β -mercaptoethanol	0.4 ml
Bromophenol blue	8 mg
0.5 M EDTA	1 ml
1x Loading sample buffer kullanılmıştır (Üzümcü, 2009).	

Tablo 2.25.Yürütme tamponu (SDS Running Buffer (10x)) (pH: 8.3) (Üzümcü, 2009)

Madde	Miktar(g/l)
25 mMTrisma- Base	3 g
192 mM Glycine	14,4 g
%10 ' luk SDS	1 g
Distile su	1000 ml

Tablo 2.26. Boyama solüsyonu (%0.025 coomassie blue R-250, %40 methanol) / stain solution (Ateş, 2017)

Madde	Miktar(g/l)
Coomassie blue R-250	0.5 g
Methanol	800 ml
Acetic acid	140 ml
Distile su	2000 ml

2.1.9. FISH tamponları

FISH yönteminde kullanılmış FISH hibridizasyon tamponu (Amann ve ark., 1990) ve FISH yıkama tamponu (Amann ve ark., 1990) içerikleri sırasıyla Tablo 2.27 ve Tablo 2.28' de gösterilmiştir.

Tablo 2.27. FISH hibridizasyon tamponu

Madde	Miktar(g/l)
Tris-HCL (1M pH 8)	40µl
NaCl (5M)	360 µl
Formamide	700 µl
SDS (%10)	2 µl
MQ su	900 µl
Hazırlanmış tampon buz içerisinde tutulmalıdır.	

Tablo 2.28. FISH yıkama tamponu

Madde	Miktar(g/l)
Tris-HCL (1M pH 8)	1 ml
NaCl (5M)	700 µl
EDTA (0.5 M)	500 µl
MQ su	50 ml

2.2. Metot

2.2.1. Homojenizasyon

Steril cam kavanozlarda laboratuvara getirilmiş örnekler öncelikle homojenizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bunun için her örnekten 25 g olmakla steril folyo üzerinde hassas terazide tartım yapılmıştır. Tartılan örnek filtreli membran torba içerisine aktarıldıktan sonra üzerine 225 ml FTS (Serum Fizyolojik- %0,85 NaCl) çözeltisi eklenmiş ve 1-2 dakika süre aralığında stomacher cihazında homojen hale getirilmiştir. Bu şekilde seyreltme oranı 1:10 olmakla 10^{-1} lik dilüsyon elde edilmiş ve bu dilüsyon bir sonraki adımlarda kullanabilmek için steril erlene aktarılmıştır (Pichart, 2004; Halkman 2005). Şekil 2.3' de peynir örneği ve Stomacher cihazı yardımıyla homojenizasyon işlemi gösterilmiştir.

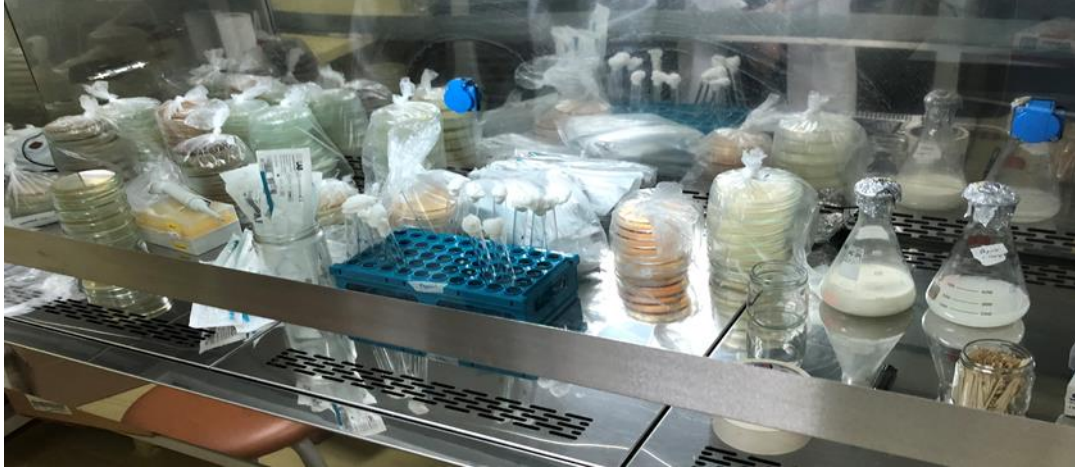


Şekil 2.3. *Peynir örneği ve Stomacher cihazı yardımıyla homojenizasyon işlemi*

2.2.2. Gıda örneğinin seyreltilmesi ve ekim

10^{-1} 'lik dilüsyondan 10^{-7} 'ye kadar dilüsyonlar hazırlanmıştır. Bunun için 10^{-1} 'lik dilüsyondan 1 ml alınıp 9 ml seyreltme çözeltilisine (önceden tüplerde steril ettiğimiz FTS) aktarılmış ve vorteks cihazıyla karıştırılmıştır. İşlem bu şekilde devam ettirilerek 10^{-2} 'lik dilüsyondan diğer dilüsyonlar elde edilmiştir (Halkman, 2005; Harrigan, 1998).

10^{-4} – 10^{-7} aralığındaki dilüsyonlar kullanılarak yayma plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. 15-20 ml katı agar besiyerlerine dilüsyonlardan 0,1 ml aktarılmış ve steril Drigalski spatülü yardımıyla sıvı tüm yüzeye homojen bir dağılım sağlayacak şekilde yayılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra farklı bakterilerin gelişimine uygun olarak inkübasyona tabi tutulmuştur. Sonrasında bakteri koloni sayımı ve LAB için saf kolonilerin izolasyonunu gerçekleştirilmiştir (Tunalı, 2014; Pichart, 2004). Şekil 2.4' de bu aşama gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Dilüsyon ve ekim işlemleri

2.2.3. Mikrobiyolojik sayım yöntemleri

2.2.3.1. Klasik sayım yöntemi

Gerekli inkübasyon süresinin sonunda petri kutusundaki koloniler sayılarak materyeldeki canlı hücre sayısı belirlenir. İstatiksel bir kural olarak doğru bir şekilde sayım gerçekleştirmek için dökme ve yayma ekim zamanı sayım yöntemlerinde bir petri kutusundaki koloni sayısının 30-300 arasında bulunması gerekmektedir. Katı besiyerinde sayım zamanı koloni sayısı petri üzerindeki seyreltme faktörü ile çarpılarak hesaplanma yapılır (Güven ve Zorba, 2016). Toplam mezofilik aerob mikroorganizma (TMAB), toplam koliform (TC), maya ve küf sayımı (YM), laktik asit bakteri (LAB) sayımı için bakteri geliştirme ortamları Tablo 2.29’ da gösterilmiştir (Halkman, 2005).

Tablo 2.29. Bakteri geliştirme ortamları

Bakteri çeşidi	İnkübasyon süresi	İnkübasyon sıcaklığı	Kullanılan besiyeri
TMAB	48 saat	30 °C	PCA
TC	24 saat	37 °C	VRBA
YM	3-5 gün	27 °C	PDA
LAB	48-72 saat	30±10°C	MRSa veya M17a.

2.2.3.2. Tempo cihazıyla sayım yöntemi

Klasik sayım yönteminin yanı sıra Tempo BioMeriux cihazı yardımıyla otomatik sayım gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle sayım zamanı Tempo kitleri kullanılmıştır. Bu kitler 8 adet olmakla besiyeri şişeleri ve kartuşlardan ibaretdir. Şekil 2.5’ de Tempo kitleriyle yapılan işlem gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Tempo kitleriyle işlemin gerçekleştirilmesi

Bu yöntemle sayım yaparken aşağıdaki adımlar takip edilmiştir:

Öncelikle laboratuvara aseptik koşullarda getirilmiş her örnek 25 g tartılarak 225 ml FTS içerisinde homojenize hale getirilip 10^{-1} ’ lik dilüsyon hazırlanmıştır. İlk aşama Tempo Hazırlık istasyonu (Tempo PRep) bilgisayarıyla gerçekleştirilir. Nümuneleri tanımlamak için Tempo Hazırlık istasyonu veya okuma oturumunu açmak gerekir. İlk dilüsyon hazırlanmasından Tempo kartuşlarına aktarılması arasında geçen zaman 45 dakikayı aşmamalıdır. Örnek ismi bilgisayara girildikten sonra önce şişeler üzerindeki barkod sonra sırasıyla kartuşların barkodu okutulmuştur.

İlgili tempo kartının barkodu taratıldıktan sonra ekranda dilüsyon aralığı seçilmiş (1/40; 1/400) ve dilüsyon birimi cfu/ml şeklinde ayarlanmıştır. Seçilen dilüsyon aralığı 1/40 ise 1 ml 10^{-1} dilüsyon +3 ml su, 1/400 ise 0,1 ml 10^{-1} dilüsyon + 3.9 ml distille su besiyerine aktarılır. Öncelikle II dilüent eklenmelidir. II dilüent (distille su) ve nümune besiyerine eklenip vortekslendikten sonra tempo kartıyla birleştirilip Rak’a toplanmıştır. Rak Tempo Doldurucusuna yerleştirilmiştir. İşlem sonucunda hazırlanan örneklerin kartuşlara dolduğu görülmüştür. Sonuncu adımda kartlar inkübasyon Rak’ına yerleştirilip uygun dereceli etüvlere bırakılmıştır. Burada; a) elimizde olan CC (Coliform Count), EB (Enterobacteriaceae), TC (Total Coliforms), EC (E.coli), STA (S.aureus) kitleri 37 °C’ lik etüvde 24- 27 saat; b) AC (Aerobic Count) ve LAB (Lactic Acid Bacteria) 30 °C’ lik etüvde 48 saat; c) YM (Yeasts/ Molds) ise 27 °C’ lik etüvde 3 gün (72-76 saat) inkübe edildikten sonra Tempo® okuyucusuna yerleştirilmiş ve okutma yapılmıştır ([http-3](http://3)).

2.2.4. İzolasyon, saflaştırma ve muhafaza

Ekim sonrası MRS ve M17 agarlarda üremiş LAB olmasından şüphe edilen koloniler seçilerek izole edildikleri besiyerlerinin sıvı haline inoküle edilmiştir. Seçilen koloniler burada geliştirildikten sonra tekrardan katı besi yerlerine ekim yapılarak saf kültürler elde edilmiştir (Elçioğlu,2010). Elde edilen saf kültürler ilerde yapılacak testlerde kullanılmak için -85 °C’de %20’lik gliserol içerisinde stok halinde muhafaza edilmiştir (Yiğit,2009). Şekil 2.6’da izolasyon ve saf kültürlerin muhafazası gösterilmiştir.



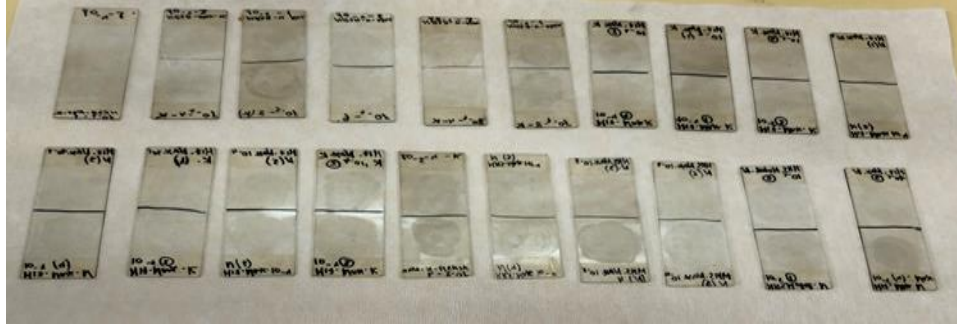
Şekil 2.6. Bakterilerin izolasyonu ve saf kültürlerin muhafazası

2.2.5. Gram boyama

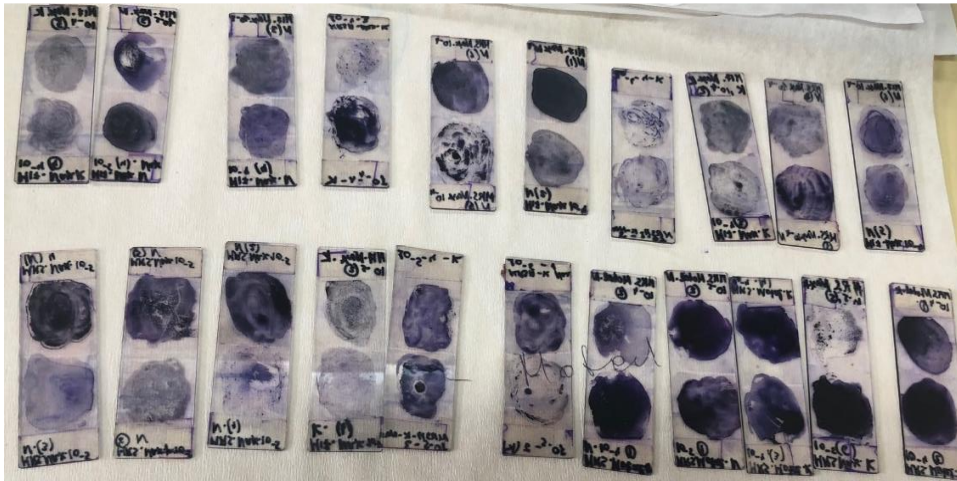
1884 yılında Danimarka’lı bilim adamı Dr. Christian Gram tarafından geliştirilmiş Gram boyama yöntemi bakterilerin sınıflandırılmasında büyük öneme sahiptir. Bakteriler gram özelliklerine göre Gram- pozitif ve Gram- negatif olmak üzere ikiye ayrılır. Gram boyama yöntemi aşağıdaki adımlardan ibarettir.

Lam bek alevinden geçirilerek steril edilmiştir.24-48 saat’lik taze kültürden steril öze ile toplu iğne başı büyüklüğünde alınarak lam üzerine koyulmuş 1 damla su içerisinde emülsifiye edilip öze ile yüzeye yayılmış ve havada kuruması beklenmiştir. Hazırlanmış preparat 3 kez bek alevinden geçirilerek fiksasyon yapılmıştır. Şekil 2.7’de preparatlar gösterilmiştir. Preparat ilk önce kristal violet ile boyanmış ve 1 dakika bekledikten sonra fazla boya su ile (çeşme suyu) akıtılmıştır. Sonra iyot- lügol çözeltisi ile boyayıp 1 dakika bekletilmiştir ve fazla boya su ile akıtılmıştır. Preparat alkolle muamele edilip 10 saniye

bekletilmiş ve yine su ile akıtıldıktan sonra havada kurumaya bırakılmıştır. Şekil 2.8’ de boyanmış preparatlar gösterilmiştir. Son olarak preparata 1 damla immersiyon yağ damlatılıp ışık mikroskobunun 100’ lük objektifiyle incelenmiştir. Aldığımız sonuçlara göre mor renkli bakteriler Gram (+), pembe renkli olanlar ise Gram (-) olarak kabul edilmiştir (Tunahı 2014; Karahan ve ark., 2002).



Şekil 2.7. Hazır preparatlar



Şekil 2.8. Boyanmış preparatlar

2.2.6. Katalaz testi

Çoğu aerobik bakteri katalaz enzimi üretir. Testin prensibi, bir kültür hidrojen peroksit çözeltisi ile karıştırıldığında hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüştürülmesidir ve bu katalaz enziminin var olduğunu gösterir. Birkaç saniye içinde üretilen gaz kabarcıklarının olmaması, kültürün katalaz negatif olduğunu gösterir (Bell ve ark., 2005). Katalaz testi için katı besiyerinde 24-48 saatde geliştirilmiş taze bakteri kültüründen kürdan yardımıyla küçük miktar alınıp lam üzerine koyulmuş ve üzerine %3’ lük H_2O_2 ilave edilmiştir. 1 dakika bekleyerek gaz kabarcıklarının oluşup oluşmadığı gözlenmiştir.

Gaz kabarcığı oluşumu gözlemlenen kültür için test pozitif, gaz kabarcığı görülmeyen kültürler için ise test negatif olarak kabul edilmiştir (Öngün, 2015).

2.2.7. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

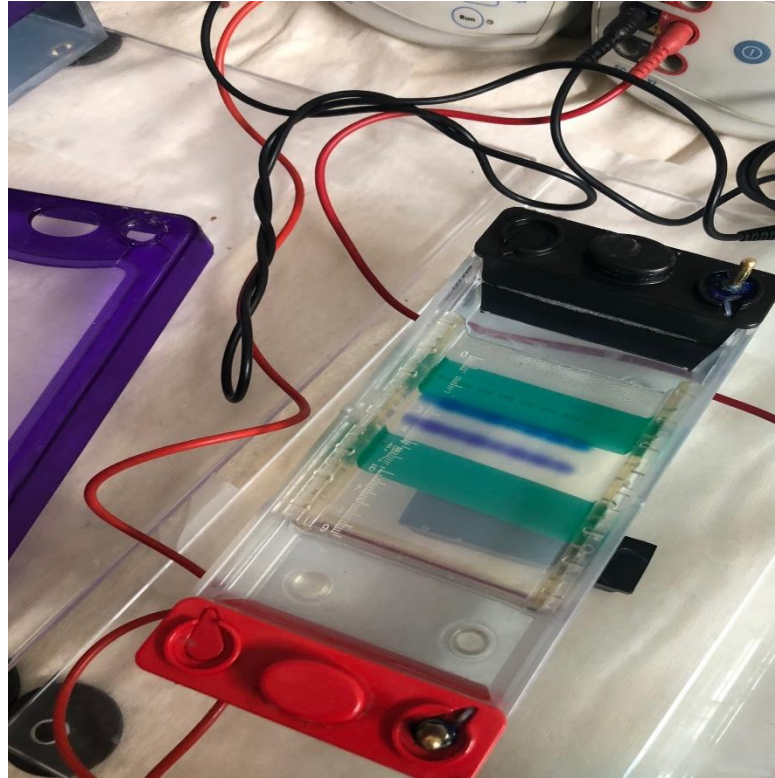
Bu işlemde öncelikle kalıp DNA hazırlanmıştır. Bunun için 24-48 saatlik saf kültürden 1 parça alınarak önceden içerisine 200µl MQ su (Nucleaz Free) olan PCR tüplerine eklenmiş ve çözündürülmüştür. Hazırlanmış bu karışım PCR cihazına yerleştirilip 10 dakika 96 °C’ de hücrelerin lize edilmesi sağlanmıştır (Poyraz, 2018).

Sonraki adımda her bir PCR tüpüne 12.5 µl 1x’ lik Master mix, 9.5 µl su (MQ su), 1µl 27F Forward primer, 1µl 1492 R Reverse primer eklenmiştir. En son 1 µl kalıp DNA eklenmiş ve toplam 25 µl’ ye tamamlanmıştır (Avcı, 2015 protokolü modifiye edilerek kullanılmıştır). Reaksiyonlar için Applied Biosystems® Thermal Cyclers (Şekil 2.9) cihazı kullanılmıştır. PCR tüpleri cihaza yerleştirilerek Bacter 50 programı uygulanmıştır; 1. Denaturasyon- 94 °C’de- 3 dakika; 2. (30x)- Denaturasyon- 94 °C’de- 30 san, Bağlanma- 50 °C’ de-1 dakika, Uzama – 72 °C’ de- 2 dakika; 3. (1x)- Final uzama- 72 °C’ de 10 dakika, 4. 4°C’de süresiz (Ramadan, 2014 protokolü modifiye edilmiştir).



Şekil 2.9. Applied Biosystems Thermal Cycler cihazı

Hazırlanmış PCR ürünleri agaroz jel elektroforeze tabi tutulmuştur. Örnek sayısına göre tabla ölçüsü seçilmiş ve %1'lik jel agaroz jel hazırlanmıştır. PCR ürünleri %1'lik agaroz jele yüklendikten sonra 1X' lik TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) tamponu içine yerleştirilmiş (Şekil 2.10) ve 40 dakika 90 V'da elektrik akımıyla yürütülmüştür. DNA'nın jelde görünür hale gelmesi için jel hazırlanırken içerisine GelRed Nucleic Acid Stain boyama solüsyonu eklenmiştir. İçerisine eklenip tablaya aktarılmış, üzerine tarak takılmış ve 20 dakika donması beklenmiştir. 5 µl örnek 1 µl yükleme boyası (Fermentas 6X Loading Dye Solution) ile karıştırılıp kuyucuklara aktarılmıştır. Bununla beraber oluşan ürün boyutunu tespit edebilmek için 1 kb DNA Ladder marker de boyayla karıştırılarak agaroz jele yüklenmiştir. PCR örnekleri jele yüklenirken bakteri olduğu bilinen (+) kontrol de kullanılmıştır. Sonra Jeller UV veren transillüminatör Biolab Uvitec cihazıyla incelenmiş ve görüntüler kaydedilmiştir (Poyraz,2018; Sönmez, 2018).



Şekil 2.10. Agaroz jel elektroforez

2.2.8. İzolatların bakteriyosin üretim yeteneklerinin belirlenmesi

İzolatların antimikrobiyal etkisini belirlemede 3 farklı yöntem kullanılmıştır. Her 3 yöntem için izolatlardan süpernatant elde edilmiştir. 10ml MRS Broth'da canlandırılmış 24-48 saatlik besiyeri karışık bakteri 15 ml' lik falkon tüpe aktarılmış ve 10000 rpm' de

10 dakika 4 °C’ de santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatantlar şırıngalar yardımıyla çekilerek 0,45 µl por çaplı membran filtreden süzölmüş ve süzöntöler steril deney tüplerine aktarılmıştır (Demir, 2014).

İlk yöntem olarak spot- on lawn metodu kullanılmıştır. Test bakterileri BHI brothda geliştirildikten sonra yoğunlukları Mc Farland 0,5 yoğunluğuna ayarlanmış (Karagöl, 2010) ve sonra BHI agar üzerine steril eküvyonla tam yüzeyi kaplayacak şekilde yayılmıştır. Daha sonra bakterilerden elde ettiğimiz süpernatantlardan 10 µl nokta ekimi yapılmıştır. 37 °C’ de 24 saat inkübasyondan sonra 2 mm veya daha büyük inhibisyon zonları pozitif olarak kabul edilmiştir (Bayram, 2005 modifiye edilmiştir).

Kullanılmış test bakterileri – *E.coli*, *S. aureus*, *S.typhi*, *B.cereus* 30 °C’de 24 saat BHI ve MH Broth’ da canlandırılmıştır.

İkinci yöntem olarak kullandığımız kuyu difüzyon yönteminde hazırladığımız %0,7 agarlı TSİ yumuşak agar küçük tüplere 5 ml olmakla eklenip 50 °C’ lik su banyosunda bekletilmiştir. Sonra öncelikle patojen bakteriden 100 µl olmakla yumuşak agara 45 °C sıcaklık halinde ekleme yapılmış ve tam karıştırılarak önceden petrilere eklenmiş MRS agar üzerine aktarılmıştır. Steril edilmiş mantar delici yardımıyla her petride 8 mm çaplı kuyucuklar açılmış ve kuyucuklara her süpernatantdan 100 µl olmakla eklenmiştir. 24 saat inkübasyondan sonra oluşan 2 mm veya daha büyük inhibisyon zonları pozitif değerlendirilmiştir (Abanoz, 2014 modifiye edilmiştir).

Sonuncu yöntem olarak farklı agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Test bakterileri önceden MH brothda 24 saat canlandırılmış ve 0,1 ml MH agar üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Sonra üzerinde mantar deliciyle delikler açılmış ve her kuyucuğaa 100 µl farklı bakteri süpernatantı eklenmiştir. 2 saat süpernatantın emilmesi beklendikten sonra petrilere etüvde kapakları altta kalmak şartıyla 24 saat tutulmuştur (Al-Bayati, 2014; Sezer, 2007 modifiye edilmiştir).

2.2.9. Toplam nükleik asit ekstraksiyonu

Öncelikle gıda (Gedebey (1), Garabağ Motal, Naxçıvan, Ordubad, İsmayilli beyaz peynirleri ve İsmayilli kesmiği) örneklerimizin 10⁻¹ dilüsyonlarından 1 damla alınarak ışık mikroskopuyla bakteri yoğunluğu belirlenmiştir. Gedebey (2) beyaz peynir örneği yeterli miktarda mevcut olmadığı için bu işlemde kullanılamamıştır. Mikroskopla inceleme sonrasında aşağıdaki adımlar takip edilmiştir:

1. Örnekleri 2 ml olarak ependorf tüplerine aktarıldıktan sonra vortekslenerek homojenize hale getirilmiş ve tüpler her birinde 1 ml örnek olmakla 2' ye bölünmüştür.
- 2.15 dakikada 13000 rpm' de santrifüj yapıldıktan sonra pelet kısmı üzerinden devam edilmiştir.
3. Pelet üzerine 600 µl ekstaksiyon tamponu koyulmuştur.
4. 10 µl lizozim eklenip 15 dakika 37 °C' de çalkalayıcı etüvde inkubasyona bırakılmıştır.
5. 10 µl proteinaz K ekleyip vortekslenmiştir.
6. Her tüpe 0.3 gr zirkonyum boncuklar koyulmuş ve 90 saniye vortekslenmiştir.
7. Sonra 60 µl SDS ekliyoruz ve 30 dakika 37 °C' de çalkalayıcı etüvde inkubasyona bırakılmıştır.
8. 120 µl NaCl solusyonu eklenmiştir.
9. 90 µl CTAB eklenmiştir.
- 10.1 saat 55 °C 'lik su banyosunda bekletilmiştir. 1 saat aralığındayken arada ters- düz edilerek çalkalanmıştır.
11. Sonra 12000 x g' de 10 dakika santrifüjlenmiş ve zirkoniumları almamaya dikkat ederek süpernatant kısmı temiz tüpe aktarılmıştır.
12. Ve üzerine aynı hacim fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) eklenmiş ve 12000 x g' de 2 dakika santrifüjlenmiştir.
13. Üst kısım alınıp temiz tüpe aktarılmış ve üzerine 1/10 kadar NaAc ve 2 hacim %100' lük soğuk etanol eklenmiştir. Suspansiyon karıştırılmış ve -20 °C 'de 1 gece bekletilmiştir.
14. 1 gece beklemenin ardından 14000 x g' de 10 dakika santrifüjlenmiştir.
15. Süpernatant atılmış ve pelet üzerine biraz %70 'lik etanol eklenerek (alkolun soğuk olması önemlidir, önceden -20 °C' de tutulmuş alkol kullanılmıştır) 11 dakika 12000 x g' de santrifüjlenmiştir.
16. Alkolu atıp peleti tamamen kuruttuktan sonra üzerine 100 µl MQ su eklenmiş ve jel elektroforeze tabi tutulmuştur (Poyraz ,2018; Quigley ve ark., 2012 modifiye hali).

2.2.9.1. *Illumina MiSeq platformu ile 16S rDNA gen-hedefli DNA dizileme ve komünite analizi*

Örneklerden elde edilen toplam nükleik asit ekstraktlarından Illumina MiSeq platformu kullanılarak 16S rDNA'ya dayalı gen dizileme, BM Labosis Firması'nda (Ankara, Türkiye) gerçekleştirilmiştir. Illumina platformunda 16S rDNA gen-hedefli,

çift-uçlu dizileme gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon için “Earth Microbiome Project”de ([http-6](http://6)) önerilen protokole uygun primer seti ile gerçekleştirilmiştir. Genin V3-V4 bölgesini hedef alan 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') – 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') primerleri kullanılmıştır (Caporaso ve ark., 2011; Apprill ve ark., 2015; Parada ve ark., 2016).

2.2.10. SDS-PAGE yöntemi

SDS-PAGE proteinlerin poliakrilamid jel gibi bir mobil ortamda elektrik akımı yardımıyla molekül ağırlıklarına göre ayrılmalarını sağlayan bir elektroforez yöntemidir. Bu yöntem yardımıyla karışımdaki proteinlerin çeşitliliğinin tanımlanması, kalitatif ve kantitatif ölçümler yapılması mümkündür. Bu yöntemde öncelikle örneğin (mikroorganizma) proteinleri ozmotik şok, sonikasyon, deterjan ve enzim uygulamaları ile primer yapıya dönüştürülerek elde edilir. Bu ekstraktaki toplam protein miktarı Warburg-Christian, Bradford ve Lowry gibi yöntemlerden biri ile belirlenir. Sonra protein çözeltisi örnek tamponu ile karıştırılır ve bazı kimyasallarla müamele edilerek yükü ve yapısal özellikleri değiştirilip elektroforez işlemine tabi tutulur (Güven, 2008).

SDS-PAGE denemelerinde kullanılan jel iki kısımdan oluşur: Alt kısım ayırma jeli, üst kısım yükleme jeli olarak adlandırılır. Dikey jel sisteminde iki adet 10 x 8 cm ve 10 x 7.5 cm ölçülerinde cam plaka kullanılmıştır. Cam plakalar Bio-Rad jel elektroforez tankına sıvıyı sızdırmayacak şekilde yerleştirildikten sonra 5ml %12' lik ayırıcı jel dökülmüştür. Üzerine distile su ilave edilerek jelin üst kısmı sabitlenmiş ve ayırıcı jelin polimerizasyonu için 1 saat beklenmiştir. Jelin kurduğuna emin olduktan sonra su filtre kağıdı ile kurutulmuştur ve üstte kalan kısım yükleme jeli ile tamamlandıktan sonra tarak yerleştirilmiştir. Yükleme jelin polimerizasyonu için 40 dakika beklendikten sonra plakalar elektroforez tankına yerleştirilmiş elektrot tamponu ilave edilmiş ve tarak çıkarılmıştır. İzolatlardan hazırlanan örnekler jel kuyucuklarına 25 µL olacak şekilde aktarılmıştır. Jel sistemine; yükleme jeldeki göç için 90V, ayırıcı jelde göç için ise 120 V akım ayarlanmıştır (Şekil 2.11). Ayırıcı jelde yaklaşık 2 saat yürütülen örnekler jelin son kısmına ulaştığında plakalar tampon içerisinden alınmıştır. Jel cam plakalar arasından dikkatli bir şekilde çıkartılarak plastik bir kaba alınmış ve Commasie Brilliant Blue çözeltisinde 1 gece bekletilmiştir. Bu işlemin ardından jel boyadan arınmak için saf suda bir kaç defa bekletilmiş ve boya tamamen çıkana kadar saf su yenilenmiştir (Uymaz, 2009).

Yüklenen örneklerin hazırlanması için aşağıdaki işlemler gerçekleştirilmiştir.

Katı besiyerinde canlanan (sıvı besiyerinde olursa santrifüj işlemi ile yapılır) kültürden pirinç tanesi kadar alınmıştır. 50mM TRİS-HCL' dan 100 µl alarak örnekler homojenize hale getirilmiştir. İçerisine göz kararı glass Beads (cam boncuk) aktararak 5 dakika vortekslenmiştir. Üzerine 200 µl SDS loading buffer aktarılmış ve sonra cam beher içerisinde 5 dakika kaynatılmıştır (Mutlu, 2006 modifiye edilmiştir).



Şekil 2.11. SDS-PAGE jel elektroforez

2.2.11. İzolatlardan plazmit DNA izolasyonu

Plazmit izolasyonu için PrepEase™ Quick MiniSpin Plasmid Kiti kullanılmıştır (Şekil 2.12) ve antimikrobiyal aktivite gösteren bakterilerden rastgele seçilerek işleme alınmıştır. İzolatlar MRS brothda 24-48 saat canlandırılmış ve aşağıdaki adımlar takip edilmiştir.

1. Taze kültürden 2 ml mikrosantrifüj tüplerine eklenmiş ve 11000 xg'de 30 saniye santrifüjlenmiştir. Bu işlem yeterli miktarda pelet elde edebilmek için 3 defa tekrarlanmıştır ve sıvı kısım atılmıştır.

2. Bakterileri lizise uğratmak ve nötr hale getirmek için aşağıdaki adımlar takip edilmiştir.

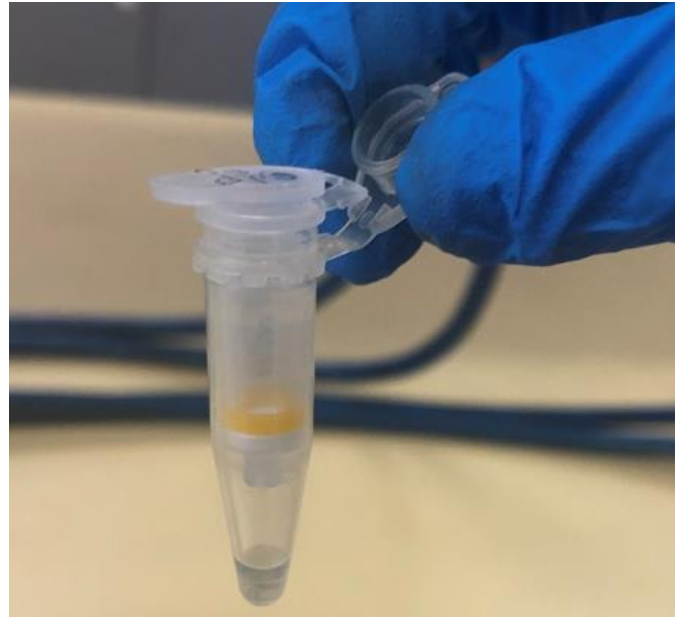
a. Pelet üzerine 250 µl RNase A-A1 buffer eklenmiştir. Burada RNase A önceden A1 buffer' a eklenerek iyice karıştırılmalıdır.

b. 250 µl A2 buffer eklenmiş 6-8 defa ters-düz edilerek peletin çözünmesi sağlanmıştır ve 2-3 dakika oda temperaturunda inkübe edilmiştir.

- c.300 µl A3 buffer eklenmiş ve 6-8 defa ters-düz edilerek karıştırılmıştır.
3. Lizatı berraklaştırmak için 11000 xg' de oda sıcaklığında veya 4 °C' de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- 4.DNA' yı kolona tutturmak için aşağıdaki adımlar takip edilmiştir.
- a.PrepEase TM MiniSpin kolonu 2 ml' lik toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
 - b.Berrak lizat bu kolon içerisine aktarılmıştır.
 - c.11000xg' de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
 - d.Süzüntü atılmıştır.
5. Kolonun yıkanması ve kurutulması için aşağıdaki adımlar takip edilmiştir.
- a. 450 µl etanol içeren AQ buffer kolona eklenmiştir.
 - b.11000 x g' de santrifüj gerçekleştirilmiştir.
 - c.Süzüntü atılmıştır.
6. DNA' nın uzaklaştırılması için aşağıdaki adımlar takip edilmiştir.
- a. PrepEase TM MiniSpin kolonu 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüp içerisine yerleştirilmiştir.
 - b.Üzerine 50 µl AE Buffer eklenmiştir.
 - c. 1 dakika inkübe edilmiştir.
 - d. 11000x g'de1 dakika santrifüjlenmiştir.
 - e.Süzüntü plazmid DNA içermiştir (Şekil 2.13).
- Elde ettiğimiz plazmid DNA jel elektroforeze tabi tutulmuştur.



Şekil 2.12. PrepEase Quick Minispin Plasmid kiti



Şekil 2.13. Plazmid DNA

2.2.12. FISH yöntemi ve DAPI boyama sonuçları

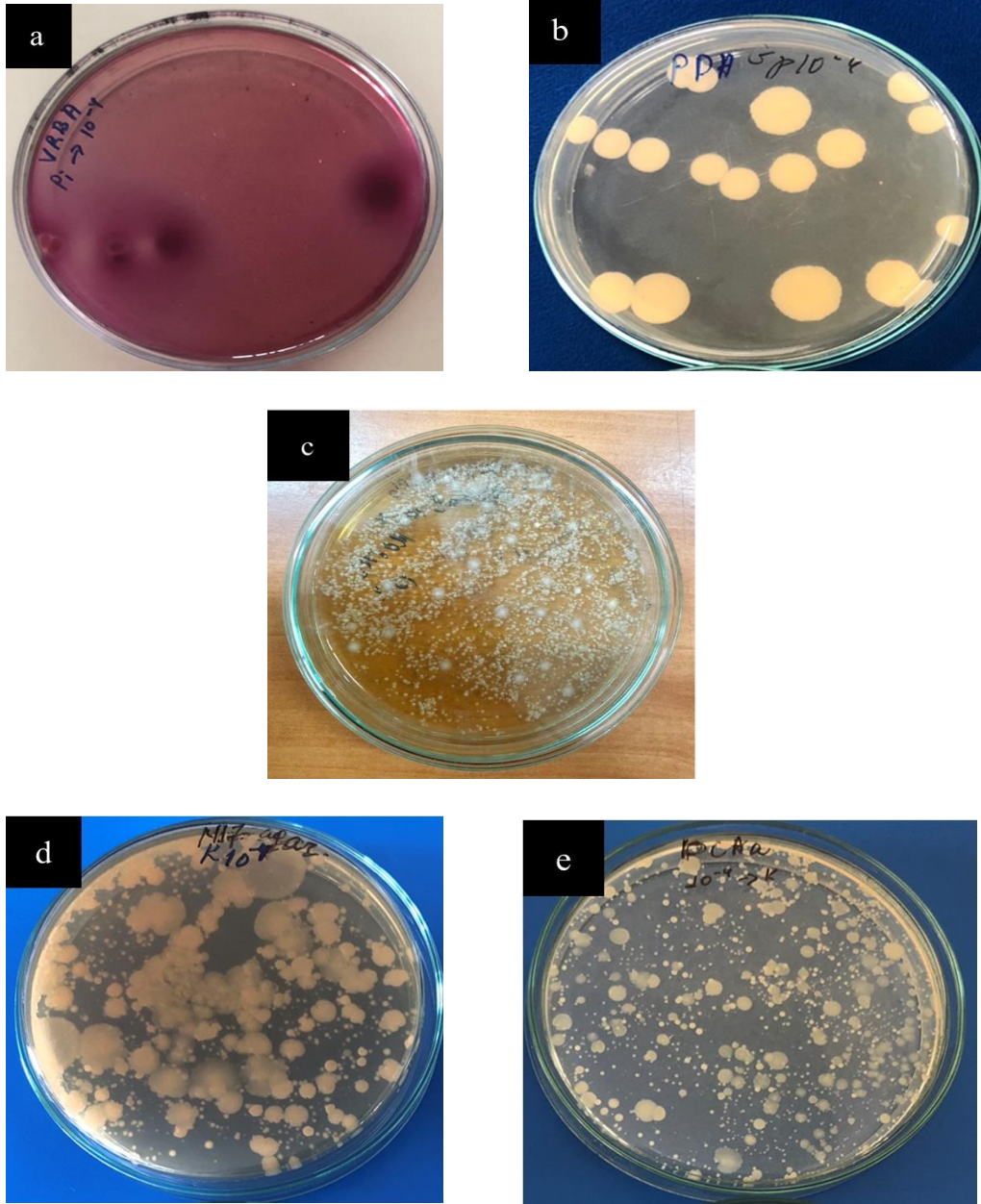
Çalışmada kullanılmış örneklerin bakteriyel içeriğini belirlemek amaçlı FISH yöntemi uygulanmıştır. Her örnekten 2 ml olmakla ependorf tüplere aktarılmış ve 8000 x g' de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı atılmış örnekler üzerine 2 ml 1x'lik PBS eklenmiş ve 8000 x g'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Yine süpernatant kısım atılmış ve her bir tüpe 1 ml PBS aktarılmıştır. Bu karışımdan 0,5 ml alınıp yeni tüpe aktarılmış

ve üzerine %4 Formaldehid içeren PBS karışımından 1,5 ml eklenmiştir.Bu karışım 1 gece fiksasyon için 4°C’de muhafaza edilmiştir.Fiksasyon sonrasında örnek yaklaşık 10 ml 1x’ lik PBS ile karıştırılmış ve 0.2 µm por çaplı membran filtreden geçirilmiştir. Membran filtreler kuruduktan sonra kesikler hazırlanıp işaretlenmiştir.Prob olarak EUB 338 kullanılmıştır. 2 µl prob 18 µl hibridizasyon tamponu ile karıştırılmış ve bu karışım filtrenin üzerine eklenmiştir.Bu işlemden sonra filtreler nemli ve karanlık ortamda 46 °C’ ye ayarlanmış fırında 2 saat hibridizasyon işlemine tabi tutulmuştur.2 saatin ardından filtreler 48 °C su banyosunda tutulmuş yıkama tamponu içerisine atılmış ve 15 dakika bekletilmiştir. Filtre kağıdı tampon içerisinden alınıp kuruması beklendikten sonra üzerine 25 µl DAPI eklenip 5 dakika bekletilmiştir. Bundan sonra filtreler önce saf etanol içerisinde yıkanmış ardından MQ su ile yıkanmış ve kuruması beklenmiştir. Son olarak filtreler montajlamak üzere lam üzerine alınmış ve üzerine gliserol damlatıldıktan sonra lamelle kapatılmıştır.Bu şekilde filtreler floresan mikroskopla görüntülenene kadar karanlıkta -20 °C’de bekletilmiştir (Amann ve ark., 1990;Amaan ve ark., 1995).

3. BULGULAR

3.1. Bakteri Sayım Sonuçları

Her bir örnek için farklı besiyerlerinde ekim ve inkübasyon sonrası elde edilen 30-300 arası koloniler sayılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Farklı besiyerlerinde ekim sonuçları; a) VRBa, b) PDA, c) MRSa, d) M17a, e) PCA

Klasik sayıma ek olarak Tempo BioMeriux cihazı yardımıyla otomatik sayım sonuçları elde edilmiştir. Tablo 3.1 ve Tablo 3.2’ de sırasıyla klasik ve Tempo BioMeriux cihazıyla sayım sonuçları gösterilmiştir. Elde ettiğimiz sayım sonuçları Azerbaycan (2010) (http-4) ve Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği’ ne (2011) (http-5) göre değerlendirilmiştir.

Tablo 3.1. *Klasik sayım sonuçları*

Gıda Örneği	Farklı Besi Ortamlarında Koloni Sayısı (CFU/mL)				
	MRSA	M17A	VRBA	PCA	PDA
Ordubad peyniri	10 ⁴ x240	10 ⁴ x120	10 ⁻⁴ x1	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<
	10 ⁴ x240	10 ⁴ x64	10 ⁻⁴ x3	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<
	10 ⁵ x95	10 ⁵ x34	-	10 ⁴ x300<	10 ⁵ x250
	10 ⁵ x76	10 ⁵ x44	-	10 ⁴ x300<	10 ⁵ x180
	10 ⁶ x3	10 ⁶ x10	-	10 ⁶ x56	10 ⁶ x32
	10 ⁶ x7	10 ⁶ x5	-	10 ⁶ x54	10 ⁶ x60
	10 ⁷ x1	-	-	10 ⁷ x6	10 ⁷ x5
	10 ⁷ x2	-	-	-	10 ⁷ x7
Naxçıvan peyniri	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x2	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<
	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x1	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<
	10 ⁵ x300<	10 ⁵ x300<	-	10 ⁵ x300<	10 ⁵ x240
	10 ⁵ x300<	10 ⁵ x280	-	10 ⁵ x300<	10 ⁵ x150
	10 ⁶ x20	10 ⁶ x23	-	10 ⁶ x70	10 ⁶ x85
	10 ⁶ x7	10 ⁶ x15	-	10 ⁶ x84	10 ⁶ x97
	10 ⁷ x3	-	-	-	10 ⁷ x8
	10 ⁷ x2	-	-	-	-

Tablo 3.1. (Devam) Klasik sayım sonuçları

Gıda Örneği	Farklı Besi Ortamlarında Koloni Sayısı (CFU/mL)				
	MRSA	M17A	VRBA	PCA	PDA
Gedebeş peyniri 1	10 ⁴ x 280	10 ⁴ x160	-	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<
	10 ⁴ x240	10 ⁴ x150	-	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x270
	10 ⁵ x99	10 ⁵ x45	-	10 ⁵ x300<	10 ⁵ x167
	10 ⁵ x200	10 ⁵ x71	-	10 ⁵ x300<	10 ⁵ x95
	10 ⁶ x25	10 ⁶ x3	-	10 ⁶ x100	10 ⁶ x20
	10 ⁶ x19	10 ⁶ x8	-	10 ⁶ x80	10 ⁶ x17
	10 ⁷ x9	10 ⁷ x2	-	10 ⁷ x9	-
	10 ⁷ x3	10 ⁷ x10	-	10 ⁷ x4	10 ⁷ x5
Gedebeş peyniri 2	10 ⁴ x 112	10 ⁴ x 220	-	10 ⁴ x 300<	10 ⁴ x 300<
	10 ⁴ x 130	10 ⁴ x 300<	-	10 ⁴ x 300<	10 ⁴ x 300<
	10 ⁵ x77	10 ⁵ x145	-	10 ⁵ x120	10 ⁵ x170
	10 ⁵ x85	10 ⁵ x71	-	10 ⁵ x170	10 ⁵ x110
	10 ⁶ x13	10 ⁶ x10	-	10 ⁶ x22	10 ⁶ x54
	10 ⁶ x15	10 ⁶ x6	-	10 ⁶ x13	10 ⁶ x62
	10 ⁷ x5	10 ⁷ x1	-	-	10 ⁷ x5
	10 ⁷ x1	-	-	10 ⁷ x4	-
İsmayılı peyniri	10 ⁴ x 300 <	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x9	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<
	10 ⁴ x 300 <	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x6	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<
	10 ⁵ x 300<	10 ⁵ x 300<	10 ⁵ x 1	10 ⁵ x 240	10 ⁵ x 100
	10 ⁵ x 300<	10 ⁵ x 300<	-	10 ⁵ x 300<	10 ⁵ x 209
	10 ⁶ x 74	10 ⁶ x92	-	10 ⁶ x28	10 ⁶ x10
	10 ⁶ x 65	10 ⁶ x79	-	10 ⁶ x41	10 ⁶ x39
	10 ⁷ x 5	10 ⁷ x 8	-	10 ⁷ x 3	-
	10 ⁷ x 10	10 ⁷ x 9	-	10 ⁷ x 1	10 ⁷ x 1

Tablo 3.1. (Devam) Klasik sayım sonuçları

Gıda Örneği	Farklı Besi Ortamlarında Koloni Sayısı (CFU/mL)				
	MRSA	M17A	VRBA	PCA	PDA
İsmayılı kesmiği	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	-	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x38
	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	-	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x39
	10 ⁵ x300<	10 ⁵ x300<	-	10 ⁵ x103	10 ⁵ x7
	10 ⁵ x300<	10 ⁵ x300<	-	10 ⁵ x104	10 ⁵ x3
	10 ⁶ x21	10 ⁶ x61	-	10 ⁶ x7	10 ⁶ x1
	10 ⁶ x14	10 ⁶ x45	-	10 ⁶ x9	10 ⁶ x2
	10 ⁷ x1	10 ⁷ x4	-	10 ⁷ x5	-
	10 ⁷ x1	10 ⁷ x4	-	10 ⁷ x2	10 ⁷ x1
İsmayılı kaymağı	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x8	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<
	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x2	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<
	10 ⁵ x212	10 ⁵ x200<	-	10 ⁵ x160	10 ⁵ x300<
	10 ⁵ x280	10 ⁵ x280<	-	10 ⁵ x300<	10 ⁵ x300<
	10 ⁶ x52	10 ⁶ x80	-	10 ⁶ x40	10 ⁶ x40
	10 ⁶ x35	10 ⁶ x40	-	10 ⁶ x25	10 ⁶ x68
	10 ⁷ x11	10 ⁷ x3	-	10 ⁷ x15	10 ⁷ x3
	10 ⁷ x6	10 ⁷ x5	-	10 ⁷ x18	10 ⁷ x3
Garabağ Motal peyniri	10 ⁴ x22	10 ⁴ x300<	-	10 ⁴ x 40	10 ⁴ x17
	10 ⁴ x23	10 ⁴ x300<	-	10 ⁴ x21	10 ⁴ x18
	10 ⁵ x1	10 ⁵ x300<	-	10 ⁵ x2	10 ⁵ x2
	-	10 ⁵ x300<	-	10 ⁵ x4	10 ⁵ x2
	10 ⁶ x5	10 ⁶ x300<	-	-	-
	-	10 ⁶ x300<	-	-	-
	10 ⁷ x6	-	-	-	-
	-	-	-	-	-

Tablo 3.2. *Tempo BioMeriux sayım sonuçları*

Nümune	Test	Mod	Sonuç
Ordubad P.	TC	24-27 s	=2,5 E4 CFU/mL
Ordubad P.	STA	24-27 s	<10 CFU/mL
Ordubad P.	EC	22-27 s	=3,0 E2 CFU/mL
Ordubad P.	EB	22-27 s	=9,9 E2 CFU/mL
Ordubad P.	CC	22-27 s	=3,5 E2 CFU/mL
Ordubad P.	AC	40-48 s	> 4,9 E5 CFU/mL
Ordubad P.	LAB	40-48 s	> 4,9 E5 CFU/mL
Ordubad P.	YM	72-76 s	> 4,9 E4 CFU/mL
Gedebey P. (1)	TC	24-27 s	=3,0 E2 CFU/mL
Gedebey P. (1)	STA	24-27 s	=45 CFU/mL
Gedebey P. (1)	EC	22-27 s	=2,1 E2 CFU/mL
Gedebey P. (1)	EB	22-27 s	=3,0 E2 CFU/mL
Gedebey P. (1)	CC	22-27 s	=21 CFU/mL
Gedebey P. (1)	AC	40-48 s	> 4,9 E5 CFU/mL
Gedebey P. (1)	LAB	40-48 s	> 4,9 E5 CFU/mL
Gedebey P. (1)	YM	72-76 s	> 4,9 E4 CFU/mL
Gedebey P. (2)	TC	24-27 s	=8,3 E2 CFU/mL
Gedebey P. (2)	STA	24-27 s	=67 CFU/mL
Gedebey P. (2)	EC	22-27 s	-
Gedebey P. (2)	EB	22-27 s	= 100 CFU/mL
Gedebey P. (2)	CC	22-27 s	=1,9 E2 CFU/mL
Gedebey P. (2)	LAB	40-48 s	= 3,0 E5 CFU/mL
Gedebey P. (2)	AC	40-48 s	> 4,9 E5 CFU/mL
Gedebey P. (2)	YM	72-76 s	> 4,9 E4 CFU/mL
Naxçıvan P.	TC	24-27 s	<10 CFU/mL
Naxçıvan P.	STA	24-27 s	<10 CFU/mL
Naxçıvan P.	EC	22-27 s	<10 CFU/mL
Naxçıvan P.	EB	22-27 s	>4,9 E4 CFU/mL
Naxçıvan P.	CC	22-27 s	<10 CFU/mL
Naxçıvan P.	AC	40-48 s	= 2,0 E2 CFU/mL
Naxçıvan P.	LAB	40-48 s	= 3,0 E5 CFU/mL
Naxçıvan P.	YM	72-76 s	= 10 CFU/mL

Tablo 3.2. (Devam) *Tempo BioMeriux* sayım sonuçları

Nümune	Test	Mod	Sonuç
Garabağ Motal P.	TC	24-27 s	=2,8 E2 CFU/mL
G.Motal P.	STA	24-27 s	=1,3 E2 CFU/mL
G.Motal P.	EC	22-27 s	=1,4 E2 CFU/mL
G.Motal P.	EB	22-27 s	=44 CFU/mL
G.Motal P.	CC	22-27 s	<10 CFU/mL
G.Motal P.	AC	40-48 s	> 4,9 E5 CFU/mL
G.Motal P.	LAB	40-48 s	> 4,9 E5 CFU/mL
G.Motal P.	YM	72-76 s	=4,9 E4 CFU/mL
İsmayılı P.	TC	24-27 s	> 4,9 E4 CFU/mL
İsmayılı P.	STA	24-27 s	=1,2 E2 CFU/mL
İsmayılı P.	EC	22-27 s	-
İsmayılı P.	EB	22-27 s	> 4,9 E4 CFU/mL
İsmayılı P.	CC	22-27 s	> 4,9 E4 CFU/mL
İsmayılı P.	AC	40- 48 s	> 4,9 E5 CFU/mL
İsmayılı P.	LAB	40-48 s	> 4,9 E5 CFU/mL
İsmayılı P.	YM	72-76 s	> 4,9 E4 CFU/mL
İsmayılı K.	TC	24-27 s	=86 CFU/mL
İsmayılı K.	STA	24-27 s	=10 CFU/mL
İsmayılı K.	EC	22-27 s	=86 CFU/mL
İsmayılı K.	EB	22-27 s	=21 CFU/mL
İsmayılı K.	CC	22-27 s	=32 CFU/mL
İsmayılı K.	AC	40-48 s	> 4,9 E5 CFU/mL
İsmayılı K.	LAB	40-48 s	> 4,9 E5 CFU/mL
İsmayılı K.	YM	72-76 s	> 4,9 E4 CFU/mL
İsmayılı Kaymağı	TC	24-27s	> 4,9 E4 CFU/mL
İsmayılı Kaymağı	STA	24-27s	<10 CFU/mL
İsmayılı Kaymağı	EC	22-27s	-
İsmayılı Kaymağı	EB	22-27s	> 4,9 E4 CFU/mL
İsmayılı Kaymağı	CC	22-27s	> 4,9 E4 CFU/mL
İsmayılı Kaymağı	AC	40-48s	> 4,9 E5 CFU/mL
İsmayılı Kaymağı	LAB	40-48s	> 4,9 E5 CFU/mL
İsmayılı Kaymağı	YM	72-76s	> 4,9 E4 CFU/mL

3.2. Süt Ürünlerinden Elde Edilen İzolatların Biyokimyasal ve Morfolojik Özellikleri

İzolatlar saf halde katı kültürlerde 24-48 saat 37°C 'de canlandırılarak gram boyama ve katalaz testlerine tabi tutulmuş ve Tablo 3.3 'deki sonuçlar elde edilmiştir. Şekil 3.2 'de ışık mikroskobu görüntülemeleri gösterilmiştir. İzolatlar arasından gram(+) ve katalaz(-) olanlar seçilmiş geri kalan kısım elenmiştir. Işık mikroskobuyla morfolojik olarak inceleme sonucu elde edilen verilere göre Garabağ Motal peynirinde yoğunluk derecesine göre basil, kokobasil ve kok şekilli bakteriler, Naxçıvan peynirinde basil, kok ve kokobasil şekilli bakteriler, İsmayılı peynirinde kok ve kokobasil şekilli bakteriler, İsmayılı kesmiğinde kok, basil ve kokobasil şekilli bakteriler, Gedebe (1) peynirinde kok, basil ve kokobasil şekilli bakteriler, Gedebe (2) peynirinde kok ve kokobasil şekilli bakteriler, Ordubad peynirinde kok, basil ve kokobasil şekilli bakteriler olduğu tespit edilmiştir. Toplam 98 izolat üzerinden çalışmalara devam edilmiştir.

Tablo 3.3. İzolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

İzolat Adı	İzole Edildikleri Kaynak	Hücre Morfolojisi	Gram Boyama	Katalaz Testi
1.G.M. a1	Garabağ M. P.	Basil	+	-
2.G.M. a2	Garabağ M. P.	Kokobasil	+	-
3.G.M. a3	Garabağ M. P.	Kok	+	-
4.G.M. a4	Garabağ M. P.	Kokobasil	+	-
5.G.M. a5	Garabağ M. P.	Basil	+	-
6.G.M. a6	Garabağ M. P.	Basil	+	-
7.G.M. a7	Garabağ M. P.	Basil	+	-
8.G.M. a8	Garabağ M. P.	Basil	+	-
9.N. a1	Naxçıvan p.	Basil	+	-
10.N. a2	Naxçıvan p.	Basil	+	-
11.N. a3	Naxçıvan p.	Basil	+	-
12.N. a4	Naxçıvan p.	Kok	+	-
13.N. a5	Naxçıvan p.	Basil	+	-
14.N. a6	Naxçıvan p.	Basil	+	-
15.N. a7	Naxçıvan p.	Kok	+	-

Tablo 3.3. (Devam) *İzolatlardan morfolojik ve biyokimyasal özellikleri*

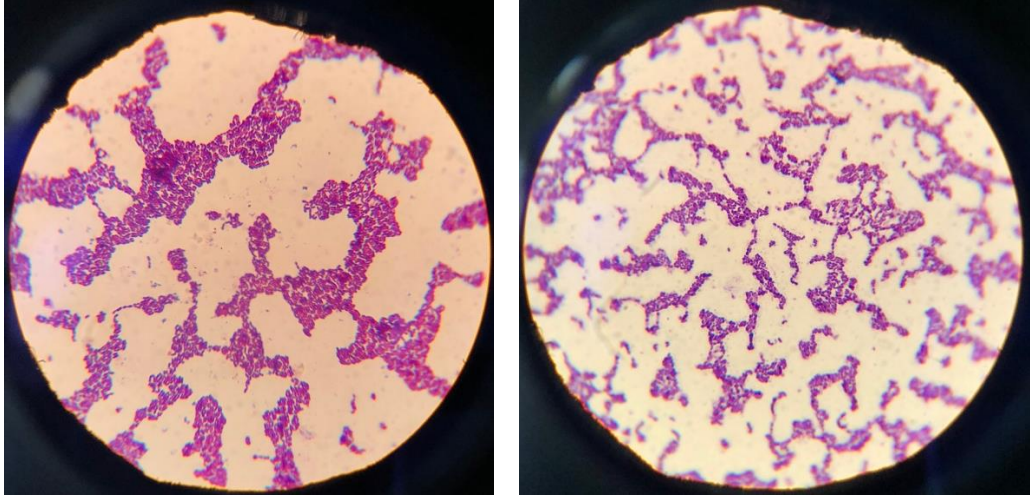
İzolad Adı	İzole Edildikleri Kaynak	Hücre Morfolojisi	Gram Boyama	Katalaz Testi
16.N. a8	Naxçıvan p.	Basil	+	-
17.N. a9	Naxçıvan p.	Kok	+	-
18.N. a10	Naxçıvan p.	Basil	+	-
19.N. b1	Naxçıvan p.	Kok	+	-
20.N. b2	Naxçıvan p.	Basil	+	-
21.N. b3	Naxçıvan p.	Kok	+	-
22.N. b4	Naxçıvan p.	Basil	+	-
23.N. b5	Naxçıvan p.	Kok	+	-
24.N. b6	Naxçıvan p.	Basil	+	-
25.N. b7	Naxçıvan p.	Kokobasil	+	-
26.N. b8	Naxçıvan p.	Kokobasil	+	-
27.N. b9	Naxçıvan p.	Kok	+	-
28.N. b10	Naxçıvan p.	Kok	+	-
29.N. c1	Naxçıvan p.	Basil	+	-
30.N. c2	Naxçıvan p.	Kokobasil	+	-
31.N. c3	Naxçıvan p.	Basil	+	-
32.N. c4	Naxçıvan p.	Basil	+	-
33.N. c5	Naxçıvan p.	Basil	+	-
34.N. c6	Naxçıvan p.	Kok	+	-
35.P. a1	İsmayılı p.	Kok	+	-
36.P. a2	İsmayılı p.	Kok	+	-
37.P. a3	İsmayılı p.	Kok	+	-
38.P. a4	İsmayılı p.	Kok	+	-
39.P. a5	İsmayılı p.	Kok	+	-
40.P. a7	İsmayılı p.	Kok	+	-
41.P. a8	İsmayılı p.	Kokobasil	+	-
42.P. a9	İsmayılı p.	Kok	+	-
43.P. a10	İsmayılı p.	Kok	+	-
44.P. b1	İsmayılı p.	Kok	+	-
45.P. b2	İsmayılı p.	Kok	+	-
46.P. b3	İsmayılı p.	Kok	+	-

Tablo 3.3. (Devam) İzolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

İzolat Adı	İzole Edildikleri Kaynak	Hücre Morfolojisi	Gram Boyama	Katalaz Testi
47.K. a1	İsmayılı kes.	Kok	+	-
48.K. a2	İsmayılı kes.	Basil	+	-
49.K. a3	İsmayılı kes.	Kok	+	-
50.K. a4	İsmayılı kes.	Basil	+	-
51.K. a5	İsmayılı kes.	Basil	+	-
52.K. a6	İsmayılı kes.	Basil	+	-
53.K. a7	İsmayılı kes.	Kok	+	-
54.K. a8	İsmayılı kes.	kokobasil	+	-
55.K. a9	İsmayılı kes.	Kok	+	-
56.K. a10	İsmayılı kes.	kokobasil	+	-
57.K. b1	İsmayılı kes.	Kokobasil	+	-
58.K. b2	İsmayılı kes.	Kok	+	-
59.K. b3	İsmayılı kes.	Kok	+	-
60.G1. a1	Gedebey p. (1)	Kok	+	-
61.G1. a2	Gedebey p. (1)	Basil	+	-
62.G1. a3	Gedebey p. (1)	Kok	+	-
63.G1. a4	Gedebey p. (1)	Kok	+	-
64.G1. a5	Gedebey p. (1)	Kok	+	-
65.G1. a6	Gedebey p. (1)	Kokobasil	+	-
66.G1. a7	Gedebey p. (1)	Kok	+	-
67.G1. a8	Gedebey p. (1)	Kok	+	-
68.G1. a9	Gedebey p. (1)	Kokobasil	+	-
69.G1. a10	Gedebey p. (1)	Kok	+	-
70.G1. b1	Gedebey p. (1)	Kok	+	-
71.G1. b2	Gedebey p. (1)	Basil	+	-
72.G1. b3	Gedebey p. (1)	Kok	+	-
73.G1. b4	Gedebey p. (1)	Basil	+	-
74.G1. b5	Gedebey p. (1)	Basil	+	-
75.G2. a1	Gedebey p. (2)	Kok	+	-

Tablo 3.3. (Devam) İzolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

İzolat Adı	İzole Edildikleri Kaynak	Hücre Morfolojisi	Gram Boyama	Katalaz Testi
76.G2. a2	Gedebey p. (2)	Kok	+	-
77.G2. a3	Gedebey p. (2)	Kokobasil	+	-
78.G2. a4	Gedebey p. (2)	Kok	+	-
79.G2. a5	Gedebey p. (2)	Kokobasil	+	-
80.G2. a6	Gedebey p. (2)	Kok	+	-
81.G2. a7	Gedebey p. (2)	Kok	+	-
82.G2. a8	Gedebey p. (2)	Kokobasil	+	-
83.G2. a9	Gedebey p. (2)	Kok	+	-
84.Op. a1	Ordubad p.	Kok	+	-
85.Op. a2	Ordubad p.	Kokobasil	+	-
86.Op. a3	Ordubad p.	Kok	+	-
87.Op. a4	Ordubad p.	Kok	+	-
88.Op. a5	Ordubad p.	Kok	+	-
89.Op. a6	Ordubad p.	Kok	+	-
90.Op. a7	Ordubad p.	Kok	+	-
91.Op. a8	Ordubad p.	Basil	+	-
92.Op. a9	Ordubad p.	Basil	+	-
93.Op. a10	Ordubad p.	Basil	+	-
94.Op. b1	Ordubad p.	Kok	+	-
95.Op. b2	Ordubad p.	Kok	+	-
96. Op. b3	Ordubad p.	Kok	+	-
97. Op. b4	Ordubad p.	Kok	+	-
98. Op. b5	Ordubad p.	Kok	+	-



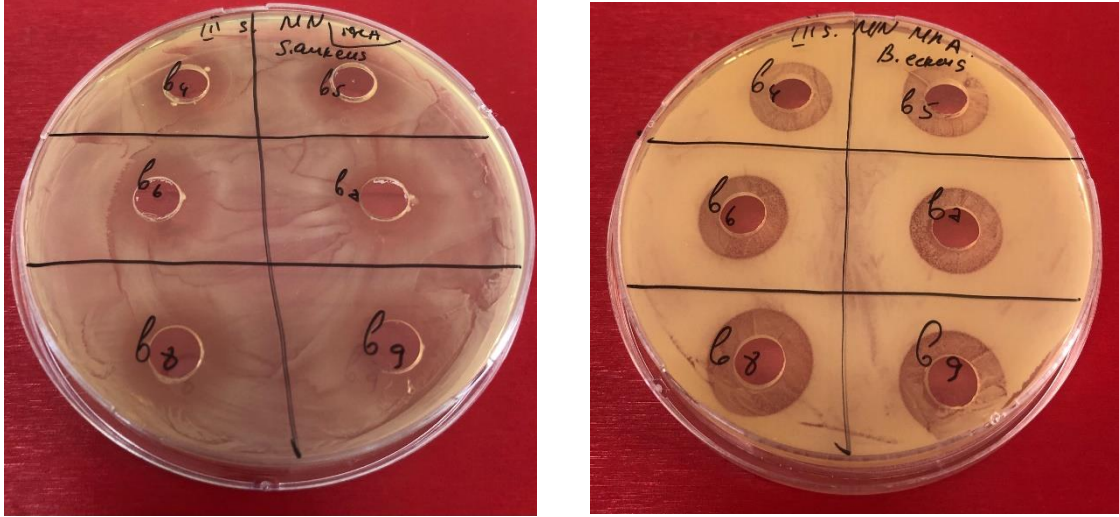
Şekil 3.2. Işık mikroskopuyla elde edilen görüntüler

3.3. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bakteriyosin Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi

Toplam 98 adet izolatın 3 farklı yöntemle bakteriyosin üretim yetenekleri test edilmiştir. Bu yöntemlerden spot- on lawn metodu etkili olmadığı için diğer yöntemler denenmiştir. Tekrarlanan testler sonucunda kullandığımız son kuyu difüzyon yöntemiyle elde edilmiş inhibisyon zon çapları ölçülmüş ve pozitif olarak kabul edilmiştir. Tablo 3.4’ de inhibisyon zon çapları gösterilmiştir. Sonuç olarak zon çapları 2 mm ve üzeri olan 29 izolatın antimikrobiyal aktiviteye sahip pozitif sonuçlar olduğu kabul edilmiştir. Aktiviteye sahip bakteriler tüm test bakterilerine karşı etkili olmuştur. Sadece K. b1 izolatı *B.cereus*’a karşı etkisiz olmuştur. Şekil 3.3’ de pozitif sonuç elde ettiğimiz görüntüler gösterilmiştir. Bu izolatlar Naxçıvan peynirine ait N.c4 (b4), N.b3 (b5), N.a7 (b6), N.c5 (b7), N.c6 (b8), N.a8 (b9) izolatlarıdır.

Tablo 3.4. İnhibisyon zon çapları (mm)

İndikatör test bakterileri				
	Escherichia coli	Staphylococcus aureus	Salmonella typhi	Bacillus cereus
İzolot adı				
N. a6	12	7	7	8
G.M. a7	9	4	10	8
N. c1	11	5	8	8
N. a10	12	5	5	7
N. c2	12	4	9	7
N. b1	10	10	10	10
N. b5	11	12	11	10
G.M. a8	12	12	10	9
G.M. a6	12	10	8	10
N. c3	12	12	9	7
N. c4	14	7	12	10
N. b3	10	9	12	10
N. a7	12	9	9	12
N. c5	12	7	12	9
N. c6	12	10	12	10
N. a8	12	7	10	10
G1.a4	11	14	8	7
G2.a8	11	17	10	10
G2.a4	7	4	10	4
G1.b6	10	5	10	12
G1.b2	12	6	10	11
G1.b5	10	2	7	9
G2.a7	10	5	7	7
G1.a6	12	17	10	12
G2.a9	11	14	7	8
K. b3	7	8	7	7
K. b2	9	10	12	7
K. b1	7	9	7	0
P. b1	7	6	10	5



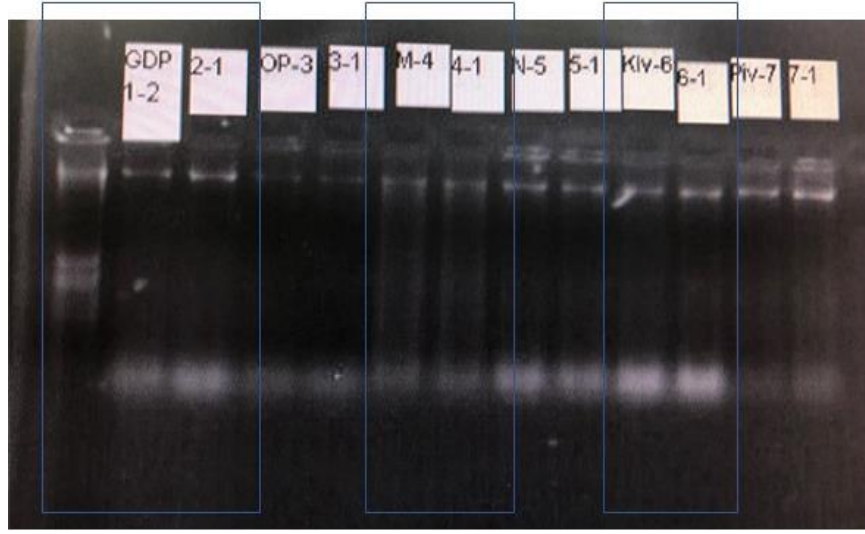
Şekil 3.3. İnhibisyon zon görüntüleri

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonuçları (PCR)

Elde edilmiş PCR ürünleri %1'lik agaroz jellerde yürütülme işlemine tabi tutulduktan sonra incelenmiştir. Burada bakterilerimiz için beklenen baz çifti (1500 bp) elde edilememiştir. Bildiyimiz gibi reaksiyon sonucunu etkileyen bileşenler kalıp DNA, primer, dNTP ve magnezyumdur. Bundan başka diğer etki edici faktör annealing sıcaklığıdır. Bizim çalışmamızda tüm faktörler sabit tutularak sadece farklı primer setleri kullanılarak reaksiyonlar tekrarlanırsa da istenilen sonuç elde edilememiştir.

3.5. Toplam Nukleik Asit Ekstraksiyonu Sonuçları

Yaptığımız çalışmada örneklerin bakteriyal çeşitliliğini tespit edebilmek için toplam nukleik asit ekstraksiyonu yapılmıştır. Öncelikle ışık mikroskopuyla damla halinde örneklerin bakteri yoğunluğu tespit edilmiştir. Gedebe (1) peynirinde çok miktarda kok şekilli bakteri yoğunluğu, Ordubad peynirinde hem basil, hem kok şekilli bakteri yoğunluğu, Garabağ Motal peynirinde orta yoğunlukta kok şekilli bakteri, Naxçıvan peynirinde orta yoğunlukta kok şekilli bakteri, İsmayilli kesmiğinde zayıf miktarda kok şekilli bakteri, İsmayilli peynirinde orta yoğunlukta kok şekilli bakteriler tespit edilmiştir. Uygun ekstraksiyon protokolü kullanılarak 5 adet farklı peynir örneği ve 1 adet kesmik örneğinden toplam nukleik asit ekstraksiyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen jel görüntüleri şekil 3.4' de gösterilmiştir. Jel görüntüsünde mavi çizgilerle işaretlenmiş örneklerimiz sonraki analizlerde kullanılmıştır.

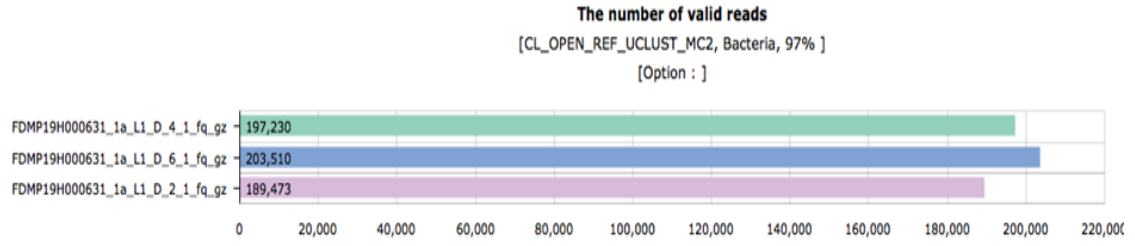


Şekil 3.4. Toplam nukleik asit ekstraksiyonu jel görüntüsü

3.5.1. Illumina platformu ile 16S rDNA gen-hedefli MiSeq dizileme

Illumina platformu ile elde edilen ampikon büyüklüğü ortalama ~420 baz olmuştur. Barkod ve primer diziler uzaklaştırıldıktan sonra elde edilmiş okuma uzunluğu ortalama 400bp olarak tespit edilmiştir. Verilerin taksonomik profili ve istatistiksel dağılımı EzBiocloud yazılım paketiyle belirlenmiştir. Bu platform ile gerçekleştirilmiş analizde OTU toplama stratejisi *de novo* kümeleme algoritması kullanılarak yapılmıştır. Dizilerin hizalanması için PyNASt, taksonomi atama işlemi için Uclust ve PKSSU4 veritabanı kullanılmıştır. Elde edilen OTU' lardan tek bir dizi ile temsil edilen dizi verileri uzaklaştırılmış ve istatistiksel çeşitlilik tahminleri bu veriler üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3.5'de örneklerin okuma sayıları verilmiştir. Burada D2 kodlu Gedebe (1) peyniri örneğinin okuma sayısı 189.473, D4 kodlu Garabağ Motal peyniri örneğinin okuma sayısı 197.230, D6 kodlu İsmayılı kesmiği örneğinin okuma sayısı 203.510 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.5. Örneklerin okuma sayıları

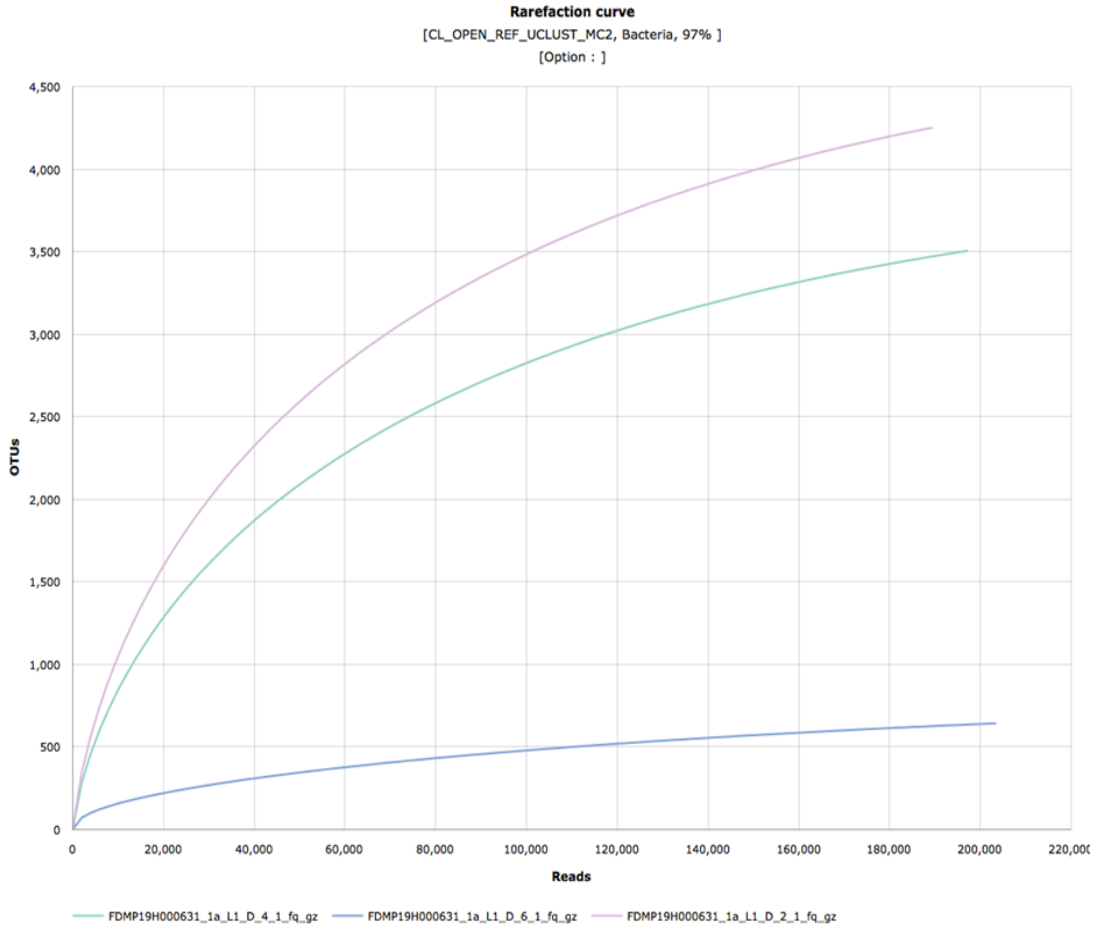
Illumina platformu ile dizileme sonucu elde edilen veriler ve hesaplanan tahmini çeşitlilik ve tür zenginliği değerleri Tablo 3.5’de gösterilmiştir.

Tablo 3.5. Illumina platformu ile örneklerden elde edilen veriler ve değerler

Cluster					Option					
Method	CL_OPEN_REF_UC LUST_M C2		Database		chunlab					
Cut off	0.97		Normalizat ion		none					
Target	Bacteria		Count		1000					
Sample name	Target reads	OTUs	ACE	CHAO	Jackknife	NPSannon	Shannon	Simpson	Phylogenetic Diversity	Good's cov. of library (%)
D4	197230	3505	4126.02	3913.08	4333.00	3.08	3.04	0.29	4564	99.58
D6	203510	643	933.40	837.45	882.51	2.15	2.14	0.22	1144	99.89
D2	189473	4251	5023.91	4798.78	5269.00	3.84	3.79	0.13	5344	99.46

Good’s coverage değerlerine bakıldığında (0.9989-0.9946) örnekleme noktasındaki çoğu filotipin başarılı bir şekilde tanımlandığı görülmektedir (Tablo 3.5).

Örneklere ait dizi okumalarına göre seyrelme (Rarefaction) grafiği Şekil 3.6’da gösterilmiştir.

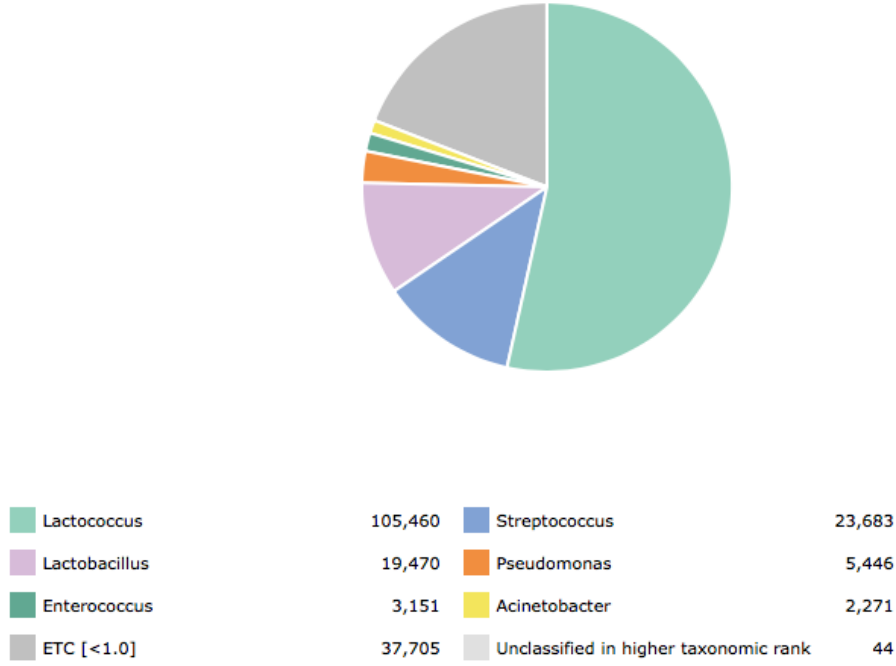


Şekil 3.6. Rarefaction grafiği

Filogenetik çeşitliliğin bir ölçüsü olan “PD” (phylogenetic diversity), ağaç üzerindeki belirli bir takson kümesini kapsayacak şekilde gerekli olan tüm filogenetik dalların minimum toplam uzunluğu olarak tanımlanmaktadır. Daha büyük PD değerleri, daha fazla tahmini çeşitlilik özelliği anlamına gelmektedir. Bizim çalışmamızdaki D2 ve D4 örnekleri çeşitlilik açısından zengin örnekler olarak görülse de D6 örneği bu anlamda daha düşük bir değere sahip olmuştur.

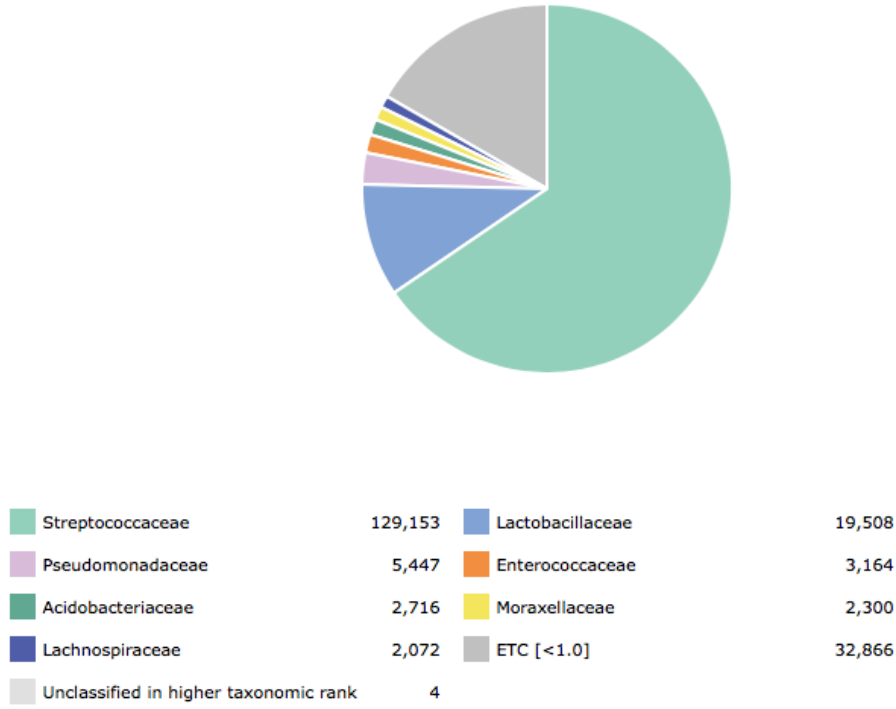
Bu çalışmada D4 ve D6 kodlu örnekler ileri analizlerde değerlendirilmiştir.

Örnekler arasında D4 kodlu Garabağ Motal peyniri örneğine ait kaliteli okuma sayısı 197.230'dur. EzBiocloud databank üzerinden yapılan taksonomik analiz sonuçları Şekil 3.7 ve Şekil 3.8' de gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Genus düzeyinde taksonomik kompozisyon (D4)

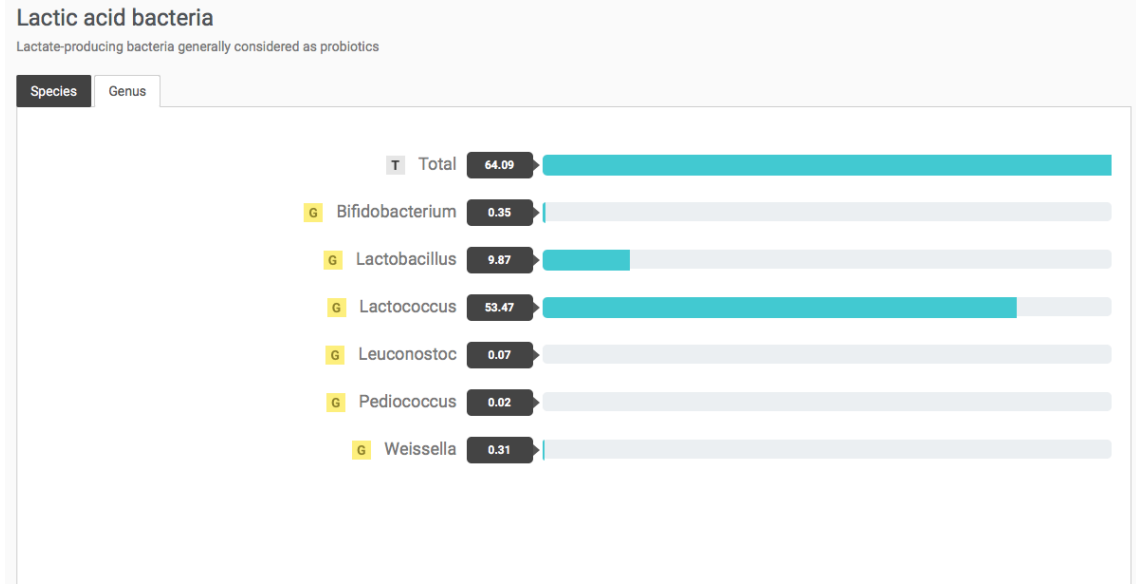
Genus düzeyinde *Lactococcus* cinsinin 105.460 okuma ile en yüksek oranda temsil edildiği görülmektedir. Daha sonra 23.683 okuma sayısı ile *Streptococcus* ve 19.470 okuma sayısı ile *Lactobacillus* cinsleri gelmektedir.



Şekil 3.8. *Familya düzeyinde taksonomik kompozisyon (D4)*

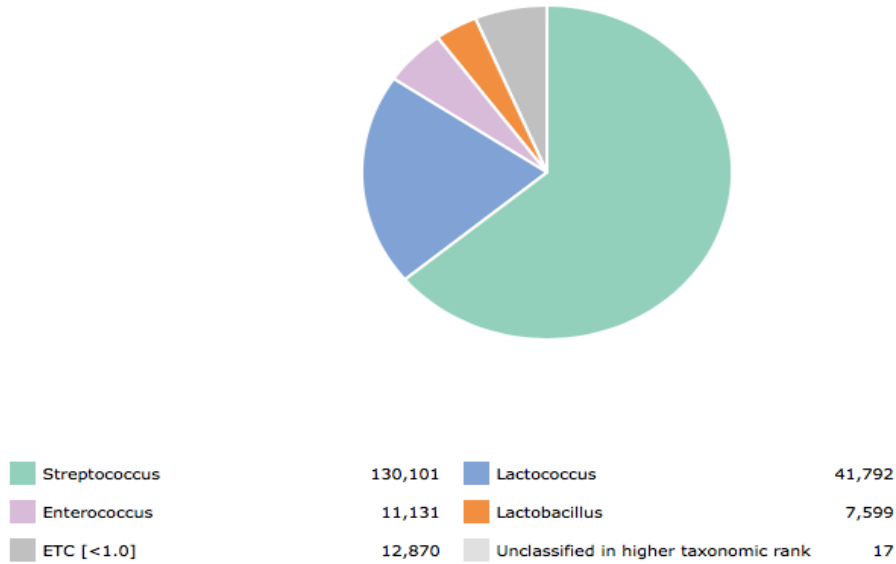
Familya düzeyinde *Streptococcaceae*'nın 129.153 okuma ile en yüksek oranda temsil edildiği görülmektedir. Bunu takiben *Lactobacillaceae* baskın olarak görülmektedir.

D4 örneğine ait 16S ampikon dizileri okumaları içindeki laktik asit bakterilerine özgü okumalar ve bunların ait olduğu grupların cins düzeyinde dağılımı Şekil 3.9' da gösterilmiştir.



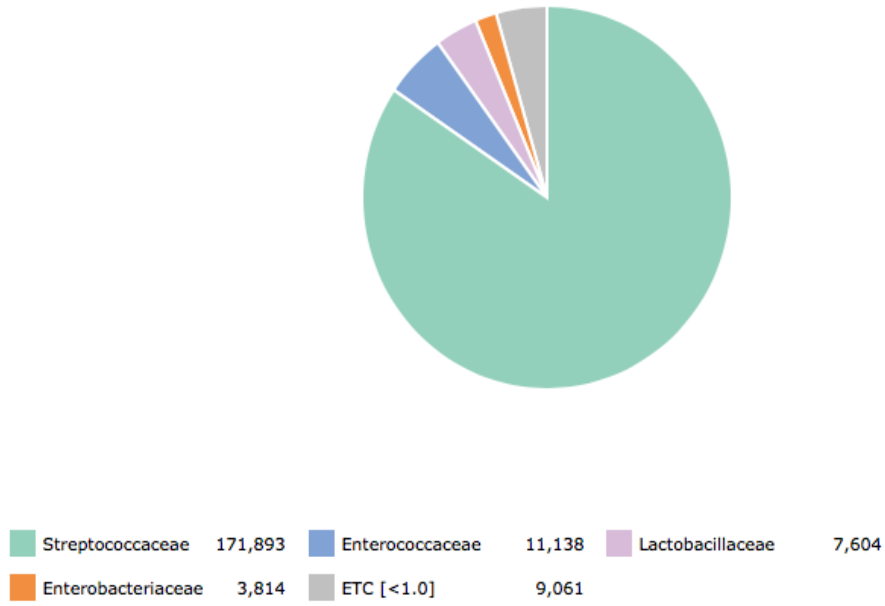
Şekil 3.9. Laktik asit bakterilerine özgü okumalar ve bunların ait olduğu grupların cins düzeyinde dağılımı (D4)

D6 kodlu İsmayılı kesmişi örneğine ait kaliteli okuma sayısı 203.510 olmuştur. EzBiocloud databank üzerinden yapılan taksonomik analiz sonuçları Şekil 3.10 ve 3.11’ de gösterilmiştir.



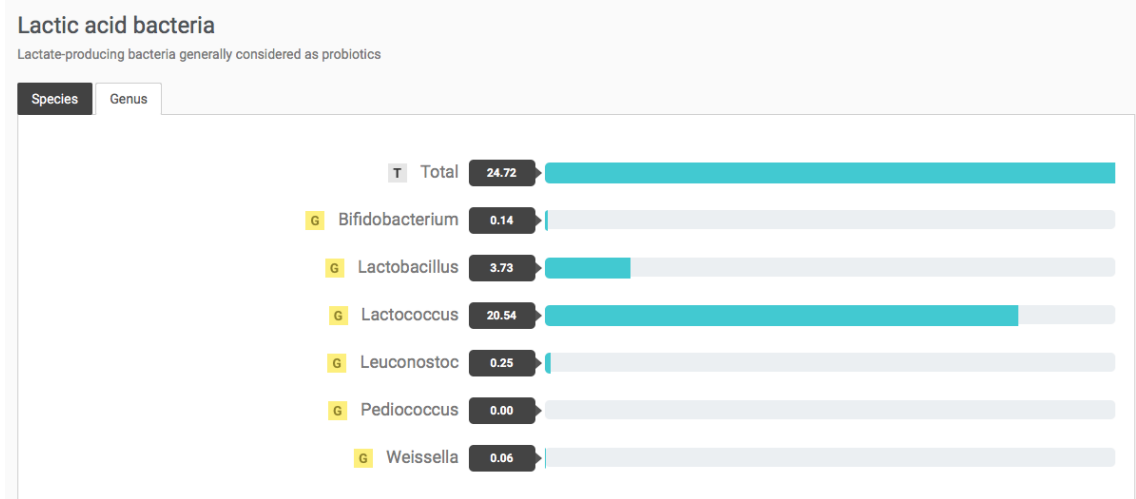
Şekil 3.10. Genus düzeyinde taksonomik kompozisyon (D6)

D6 örneğimizde *Streptococcus* cinsi 130.101 okuma sayısı ile ilk sırada yer almıştır. Bundan sonra 41.792 okuma sayısı ile *Lactococcus* cinsi en yüksek okuma düzeyine ulaşmıştır (Şekil 3.10). Familya düzeyinde değerlendirdiğimizde *Streptococcaceae* baskın olarak görülmektedir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Familya düzeyinde taksonomik kompozisyon (D6)

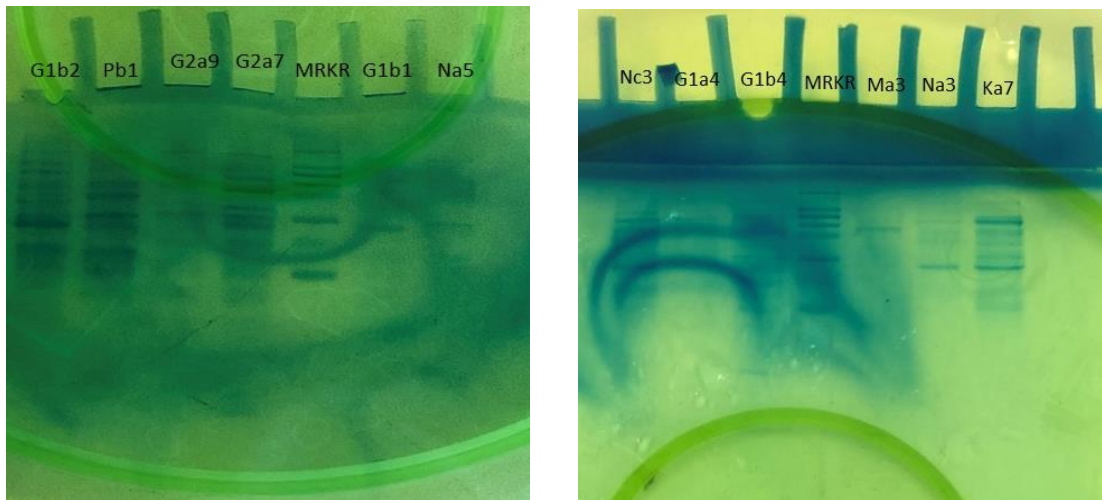
D6 örneğine ait 16S ampikon dizileri okumaları içindeki laktik asit bakterilerine özgü okumalar ve bunların ait olduğu grupların cins düzeyinde dağılımı Şekil 3.12’ de gösterilmiştir.



Şekil 3.12. Laktik asit bakterilerine özgü okumalar ve bunların ait olduğu grupların cins düzeyinde dağılımı (D6)

3.6. İzolatların Toplam Protein Profillerinin SDS-PAGE Yöntemiyle Belirlenmesi

Antimikrobiyal özelliğe sahip olan ve olmayan bazı bakterilere SDS-PAGE yöntemi uygulama sonucu Şekil 3.13'deki görüntüler elde edilmiştir. Burada N.c3, G1.a4, G1.b4, G1.b2, P.b1, G2.a9 ve G2.a7 izolatları aktiviteye sahip, M.a3, N.a3, K.a7, G1.b1, N.a5 izolatları ise aktivite göstermeyen izolatlar olarak seçilmiş ve toplam protein profili analiz edilerek elde edilen protein bantları karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışmada 200.000-6.500 dalton arasında moleküler ağırlığa sahip proteinler içeren standart Sigma protein karışımı kullanılmıştır. Bu izolatlarda 200.000-36.000 arasındaki bantların yoğun olduğu gözlenmiştir.



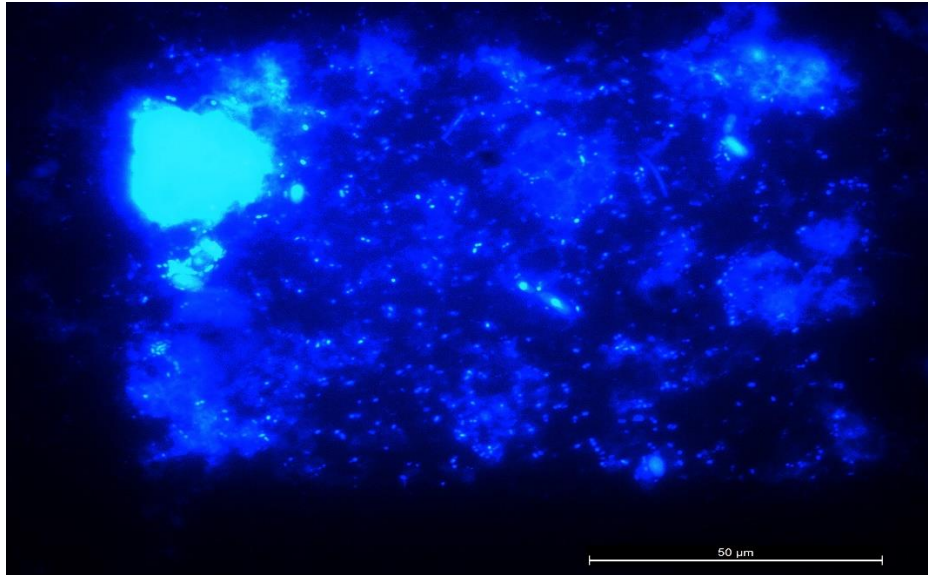
Şekil 3.13. SDS-PAGE jel görüntüleri

3.7. Plazmit DNA İzolasyonu Sonuçları

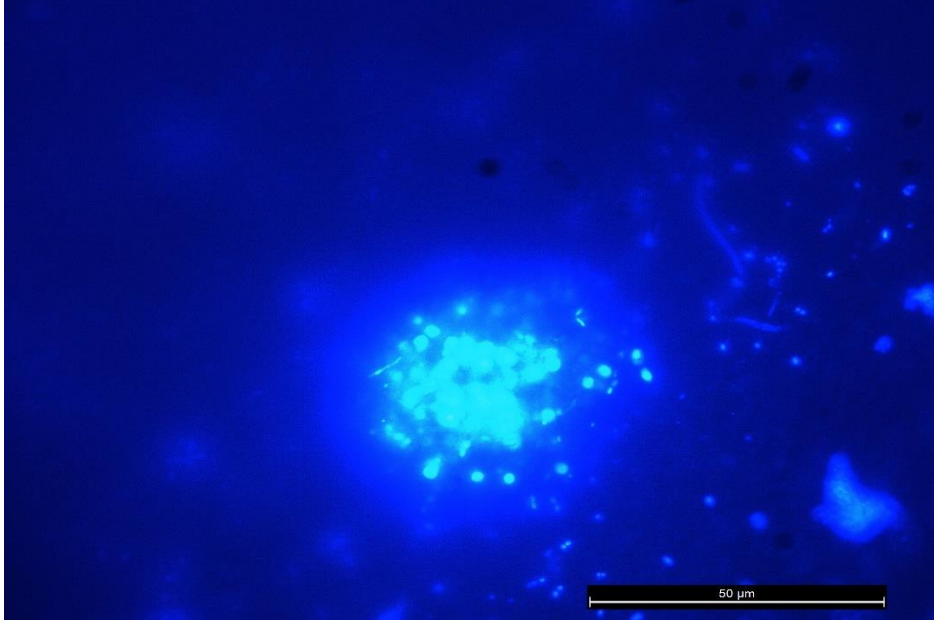
Plazmit DNA izolasyonu antimikrobiyal aktiviteye sahip bazı izolatlar için gerçekleştirilmiştir. Lakin beklenen sonuç elde edilememiştir. Genel olarak bakterilerde plazmitlerin saptanmasını etkileyen bir çok faktör vardır. Bunlar içinde esas olarak besiyeri bileşimi, plazmit giderici kimyasalların etkisiyle sıcaklığın değiştirilmesi, kültürün muhafaza süresi ve kullanılan kitin çalışıp çalışmadığı önemlidir. Bu faktörlerin herhangi birinin sonucu etkilediği varsayılmaktadır. Bundan başka pozitif kontrol kullanılmadığı için kitin çalıştığından emin olunmamıştır.

3.8. Floresan in situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi ve DAPI Boyama

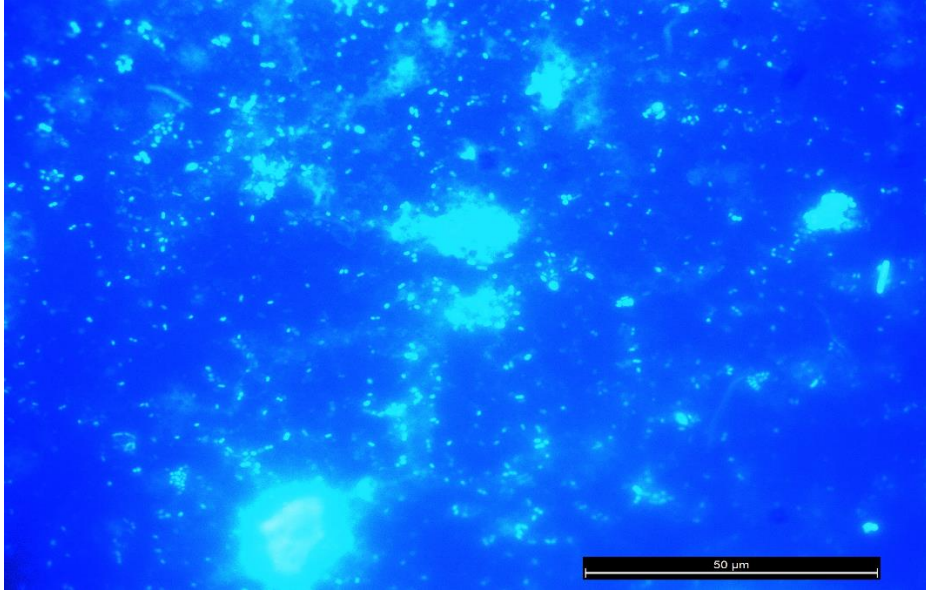
Bu çalışmada farklı süt örneklerinde mikrobiyal çeşitliliği belirlemek için Bacteria spesifik Eub 338 probu ve DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol-dihidroklorur) boyası kullanılmıştır. Çalışmamızda DAPI sinyalleri iyi sonuç vermiş olsa da problemlarla yapılan hibridizasyon sonucu örneklerin çoğunda ışına görüntülenmemiş veya çok düşük düzeyde sinyaller görüntülenmiştir. 5 örneğe ait floresan mikroskobu ile elde edilen DAPI boyama sonuçları Şekil 3.14- Şekil 3.18'de gösterilmiştir. Görüntülere bakıldığında farklı morfolojiye sahip bakterilerin olduğu görülmektedir.



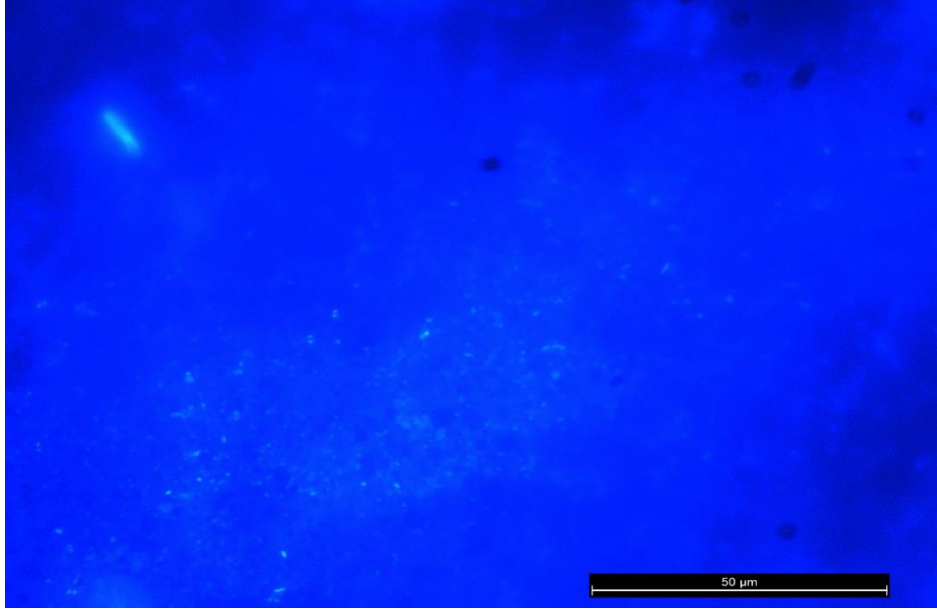
Şekil 3.14. Kesmik örneğine ait DAPI boyama



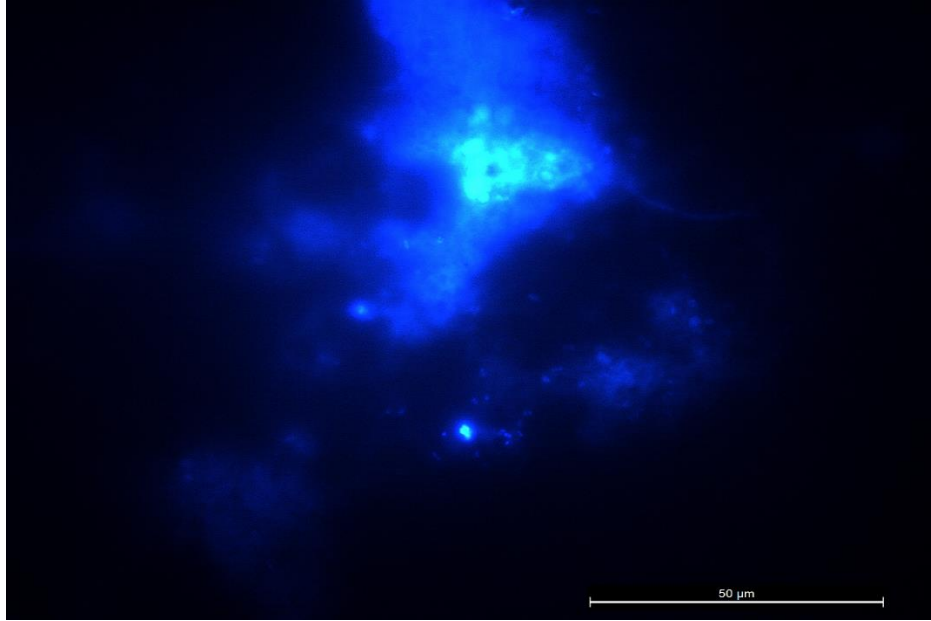
Şekil 3.15. *Naxçıvan peynirine ait DAPI boyama*



Şekil 3.16. *İsmayılıl peynirine ait DAPI boyama*



Şekil 3.17. *Garabağ Motal peynirine ait DAPI boyama*



Şekil 3.18. *Gedebeý (1) peynirine ait DAPI boyama*

Floresan mikroskobuyla görüntülemelere göre kesmik örneğinde yoğun olarak kok şekilli bakteriler, Naxçıvan peynirinde kok, diplokokk, streptokokk ve basil şekilli bakteriler, İsmayılı peynirinde yoğun olarak kok, diplokokk ve basil şekilli bakteriler, Gedebeý (1) peynirinde kok şekilli bakteriler, Motal peynirinde hem kok hem de basil şekilli bakteriler görülmüştür.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada Azerbaycanın farklı illerine ait süt ürünleri temin edilmiş, bu örneklerin her biri için klasik sayım ve Tempo BioMeriux cihazıyla otomatik sayım gerçekleştirilmiştir. Sayım sonuçları Azerbaycan (2010) ([http-4](#)) ve Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'ne (2011) ([http-5](#)) göre değerlendirilmiştir. Bundan sonra laktik asit bakterileri olduğu düşünülen bakteriler izole edilmiş ve bu bakterilerin bakteriyosin üretim yetenekleri araştırılmıştır. İzole edilmiş bakteriler içerisinde gram pozitif ve katalaz negatif olanlar seçilmiş ve sonraki süreçler bu bakteriler üzerinden devam ettirilmiştir. Spot- on lawn ve 2 farklı kuyu difüzyon yöntemleri kullanılarak, 98 adet LAB izolatu olduğu düşünülen bakterilerin 4 adet farklı test bakterisine karşı antimikrobiyal etkisi belirlenmiştir. Bunlardan 29 bakteri izolatu tekrarlanan testlerde tüm test bakterilerine karşı etkili olmuştur. Sadece bir izolat (K.b1) *B.cereus* test bakterisine karşı etki göstermemiştir. Bunlar ağırlıklı olarak Garabağ Motal, Naxçıvan, iki farklı Gedebeş peyniri, İsmayılı peyniri ve İsmayılı kesmiğine ait isolatlar olmuştur. Sonrasında isolatlar moleküler yöntemlere tabi tutulmuştur. Ek olarak örneklerin bakteriyel çeşitliliğini tespit etmek için toplam nükleik asit ekstraksiyonu ve FISH gerçekleştirilmiştir. İzolatların antimikrobiyal aktivitesi plazmid genleri tarafından kodlandığı için plazmit DNA izolasyonu yapılmaya çalışılmıştır. Aynı zamanda antimikrobiyal aktiviteye sahip olan ve olmayan bazı isolatlarda protein profil analizi için SDS-PAGE yöntemi uygulanmış ve bunların protein bantları karşılaştırılarak incelenmiştir.

Türk gıda tebliğine göre aynı ürünün analizi zamanı en az 10 adet numune aynı zamanda analiz edilmelidir. Azerbaycan gıda kodeksi tebliğine göre bakteri limiti qr, sm^3 için değerlendirilmektedir. Türk gıda kodeksi tebliğine göre ise limit kob/g-ml olarak değerlendirilmektedir. Sayım sonuçları tebliğlere göre değerlendirildiğinde kaymak ve peynir gibi süt ürünlerinde *Staphylococcus*, *Salmonella* ve *L.monocytogenes* gibi patojen bakteriler örneklerde belirli miktarlar için belirli sayıda istenmeyen bakteriler olarak gösterilmektedir. Bizim çalışmamızda Tempo BioMeriux sayım sonuçlarının daha detaylı bilgi vermesi göz önünde bulundurularak tebliğlerle karşılaştırma yaptığımızda bazı değerlerin istenen değerlerin üstünde çıktığı görülse de bunun getirme, saklanma ve çalışma koşullarında oluşabilecek kontaminasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bizim sayımlarımızda tebliğlerde adı geçen bakterilerden *Staphylococcus* sayımı yapılmıştır.

Çalışmaların yapıldığı süreç kapsamında izolatlar ve örneklerden elde ettiğimiz 10^{-1} dilüsyonlar gerekli koşullarda muhafaza edilmiştir. Buna rağmen bazı izolatlar ve örneklerde değişiklik saptanmış ve çalışmaların ilerleyen aşamalarında kullanılmamak üzere elenmiştir.

Yu ve arkadaşları (2015) tarafından yapılmış bir çalışmada Rusya'nın Kalmykiya, Buryats ve Tuva bölgelerinden toplanan fermente kısırak ve inek sütlerinden, ekşi krema ve peynirden LAB'lar izole edilmiştir. Toplamda, bu örneklerden de Man, Rogosa ve Sharpe agar (MRS agar) ve M17 agar kullanılarak 599 LAB suşu izole edilmiştir. 16S rRNA ve murE gen dizileme ve multipleks PCR deneyi ile 7 cins ve 30 tür tespit edilmiştir ve baskın LAB izolatları, tüm izolatların% 39.9' unu temsil eden *Lactobacillus* cinsi üyeleri olmuştur. Bizim çalışmamızda da LAB izolatları MRS agar ve M17 agar kullanılarak elde edilmiştir. Tüm örneklerimizden elde edilen izolatlar gram boyama ve katalaz testine tabi tutulmuş, LAB izolatı olduğu düşünülen 98 adet izolat üzerinden çalışmaya devam edilmiştir. Illumina MiSeq platformu ile 16S rDNA gen-hedefli DNA dizileme ve komünite analizi sonucunda D4 ve D6 kodlu örneklerimizde sırasıyla *Lactococcus* ve *Streptococcus* cinsi üyelerinin baskın olduğu belirlenmiştir.

Colombo ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada (2018) süt ortamından izole edilmiş 500 izolatın 394' ü hem Gram pozitif, hem de katalaz negatif olarak tespit edilmiştir. Bunlardan 15'i benzersiz olarak değerlendirilmiş ve PCR ile çoğaltılmış 16S rRNA'nın sekanslanması ile tanımlanmıştır. Sonuç olarak bunlardan 11'inin *Lactobacillus*, 2'sinin *Pediococcus* ve 2'sinin *Weissella* cinsine ait suşlar olduğu ortaya çıkmıştır. Bizim çalışmamızda gram boyama ve katalaz testi sonucunda sadece gram (+) ve katalaz negatif izolatlar seçilmiş diğerleri elenmiştir, bu şekilde eleme sonucunda 98 izolat üzerinden çalışmalara devam edilmiştir.

Laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretiminin belirlenmesine ilişkin çok fazla farklı yöntemler kullanılsa da tek başına bu yöntemler güvenilir sonuç elde etmek için yetersiz kalmaktadır. Bizim çalışmamızda da birçok faktör sonucu etkilemiştir, bu yüzden izolatların etkisi yöntemlere göre farklılık göstermiştir. Bazı izolatlar bir yöntemle pozitif sonuç verse de tekrar amaçlı diğer yöntemde etkisiz olmuştur.

Bakteriyosinlerin büyümesini ve üretimini etkileyen faktörler olarak inkübasyon süresi ve sıcaklığı önemli role sahiptir. Büyüme için optimum sıcaklık bakteriyosin aktivitesinin gözlemlenmesi için gerekli olan inkübasyon sıcaklığıdır. Laktik asit

bakterileri için bu genellikle 32°C'lik bir sıcaklıktır. Bakteriyosin aktivitesinin gözlenmesi için en az 24 saat inkübasyon süresi gereklidir (Hoover ve Harlander,1993).

Unakal ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada *Enterococcus faecium*'dan elde edilen bakteriyosinin termostabilitesi izlenmiş ve bakteriyosinin 60, 80 ve 100°C de 30 dakika boyunca ve 121°Cde 15 dakika boyunca stabil olduğu görülmüştür. Bakteriyosinin bakteriyosinogenik aktivitesi, enzim proteinaz K ile müamele edildiğinde tamamen kaybolurken, lizozim ve lipaz ile muamele edildiğinde etkilenmeden kalmıştır.

Kumari ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan bir çalışmada fermente yabani Himalaya incir turşusundan izole edilmiş ve *Lactobacillus* cinsi olarak tanımlanmış SS7 izolatu kuyu difüzyon yöntemiyle *E. coli*, *L. monocytogenes* ve *B. cereus*'a karşı maksimum antagonistik aktiviteye sahip bakteriyosin üretmiştir, ancak *Bacillus cereus*' a karşı etkisi diğerlerinden daha fazla olmuştur. Bu çalışmada bakteriyosin, 121°C 'ye kadar stabilitesini koruduğu için termo kararlı olduğu tespit edilmiştir. Maksimum antimikrobiyal aktivite, 6-7 pH aralığında gözlemlenmiştir, ancak proteolitik enzim papain ilavesi bakteriyosin aktivitesini olumsuz etkilemiştir . Bizim çalışmamızda da aynı yöntem kullanılmış ve 29 izolatin her birinin (K.b1 izolatu istisna) test bakterileri olarak seçilmiş *E.coli* ve *B. cereus* üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir.

Kumar ve arkadaşları (2018) yaptıkları çalışmada fermente edilmiş “appam” sulu hamurundan MRS ortamı kullanarak bakteriyosin üreten laktik asit bakterileri (*Pediococcus pentosaceus*) izole etmiş ve bu çalışmada antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek için kuyu difüzyon yöntemi kullanmışlar. İzolat tarafından üretilen bakteriyosin, incelenen test organizmaları arasında *Listeria monocytogenes* MTCC657 ve *Acinetobacter baumannii* MTCC 1425'e karşı aktif olmuştur. Bu çalışmada, pH 6.0 'da, sıcaklık 30°C ve 24 saatte bakteriyosin üretiminin arttığı gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda da 24 saatte 30°C'de inhibisyon zon çapları belirgin bir şekilde gözlemlenmiştir.

Elyass ve arkadaşları (2017) tarafından yapılmış bir çalışmada Sudan usulü fermente edilmiş sığır eti ürünü olan “Shermout” dan laktik asit bakterileri (*Lactobacillus plantarum* PM4) izole edilmiştir. Kısmen saflaştırılmış bakteriyosinin inhibe edici aktivitesi, proteolitik enzimler proteinaz-k ve pepsin tarafından tamamen durdurulduğu tespit edilmiştir. En yüksek inhibe edici aktivite, pH 5.5 ve pH 3,7 aralığında gözlenmiştir ve pH 9'da aktivitede kayda değer bir azalma olmuştur.

Bizim çalışmamız bakteriyosinle ilgili yukarıda bahsettiğimiz çalışmalarla kıyaslandığında benzer yöntemler ve test bakterileri kullanıldığı görülmektedir. Buna ek olarak çalışmamızın devamında diğer çalışmalarda olduğu gibi pH ayarlamaları yapılması, saflaştırılmış bakteriyosinin enzimlerle etkileşiminin değerlendirilmesi ve ısıya karşı dirençliliğinin belirlenmesi planlanmaktadır.

Bakteriyosinler, hem yakından ilişkili hem de ilişkili olmayan bakterileri inhibe etmek veya öldürmek için ribozomlar tarafından sentezlenen antibakteriyel proteinler veya peptitlerdir (Wang ve ark., 2018). Wang ve arkadaşları (2018) yapmış oldukları çalışmada fermente edilmiş balıktan bakteriyosin üreten probiyotik bakteri olduğu düşünülen *Lactobacillus plantarum* LPL-1 bakterisi izole etmiş ve bu bakterinin gıda kaynaklı patojen *Listeria monocytogenes* 54002'e karşı yüksek inhibe edici aktiviteye sahip olduğunu belirlemişler. Bu bakteriden saflaştırılmış bakteriyosinin *L.monocytogenes* 54002 'ye karşı antibakteriyel etkinliği belirlenmiş ve inhibisyon zon çapı yaklaşık 16.6 mm olmuştur .

Ahn ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmada bakteriyosin üreten bir laktik asit bakterisini (*Pediococcus asidilactici*) maltlardan izole etmişler ve bu bakteriyosin sağlığı tehdit eden mikroorganizmalar (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus curvatus*, *Listeria monocytogenes* ve *L. innocua*) dahil olmak üzere birçok Gram pozitif bakteriyi inhibe etmiştir. Bizim çalışmamızda tüm izolatlar *Staphylococcus aureus* test bakterisine karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Chowdhury ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan bir çalışmada yoğurttan izole edilmiş bakteriyosin üreten *Lactobacillus spp.*, bazı ana gıda kaynaklı patojenlere karşı geniş ölçüde antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Antimikrobiyal analiz modifiye agar sandviç metodu ve kuyu difüzyon metodu ile yapılmıştır. İzolat test organizmalarına karşı 3 en yüksek (42 mm) ve 4 en düşük (15 mm) antimikrobiyal aktivite göstermiştir. İzole *Lactobacillus spp.* bakteriyosinlerine karşı en yüksek duyarlılığı *Bacillus subtilis* ve en az duyarlılığı *Staphylococcus aureus* göstermiştir.

Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz en büyük zon çapı 17 mm olmak üzere *S.aureus* test bakterisine karşı saptanmıştır.Bu iki izolatımız Gedebe peynirlerine ait G1. a6 ve G2. a8 izolatları olmuştur.

Bu çalışma kapsamında örneklerin bakteriyal çeşitliliğini belirlemek amacıyla toplam nukleik asit ekstraksiyonu yapılmıştır. Uygun ekstraksiyon protokolü kullanılarak 5 adet farklı peynir örneği ve 1 adet kesmik örneğinden toplam nukleik asit ekstraksiyonu

başarıyla gerçekleştirilmiştir. Elde ettiğimiz toplam nükleik asit ekstraktlarından Illumina MiSeq platformu kullanılarak 16S rDNA'ya dayalı gen dizileme, BM Labosis Firması'nda (Ankara, Türkiye) gerçekleştirilmiştir. Illumina platformunda 16S rDNA gen-hedefli, çift-uçlu dizileme D2, D4, D6 kodlu örnekler için gerçekleştirilmiştir. Bundan sonra ileri analizler D4 ve D6 kodları üzerinden devam ettirilmiştir. Bu analizlere göre D4 kodlu Garabağ Motal peyniri için okuma sayısı 197230 olarak elde edilmiştir. D6 kodlu Ismayıllı kesmiği örneğimiz için kaliteli okuma sayısı 203510' a ulaşmıştır. D4 ve D6 örneklerimizin Good's coverage değerleri (%) sırasıyla 99.58 ve 99.89 olmakla çoğu filotipin başarılı bir şekilde tanımlandığını göstermektedir.

Abdallah ve arkadaşları (2018) yaptıkları çalışmada Chott El Jerid'de (Güney Tunus Sahra Çölü'ndeki en büyük hipersalin geçici göl ve Afrika'nın kuzeyindeki en büyük çöküntülerden biri) yaşayan mikrobiyal toplulukların çeşitliliği ve bolluğunu nemli mevsimler boyunca moleküler yöntemler (Illumina Miseq dizilimi, DGGE ve qPCR) kullanılarak incelemişler. 16S rRNA gen analizleri, bakteri topluluğunda *Proteobacteria*'ların (özellikle *Ralstonia* türleri) dominant olduğunu, ardından *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria* ve *Verrucomicrobia*'nın geldiğini ortaya koymuştur.

Her ne kadar Illumina tabanlı teknolojiler (örneğin MiSeq) gibi yüksek verimli sıralama mikrobiyal ekolojide devrim yaratmış olsa da, düşük baz çeşitliliği sorunu nedeniyle çevresel mikrobiyal topluluk analizi için ampikon diziliminin uyarlanması kolay değildir (Wu ve ark., 2015).

Sun ve arkadaşları (2018) yaptıkları çalışmada doğal fermantasyon kullanarak geleneksel olarak elde edilen Çin soya fasulyesi ezmelerinde (10 ile ait 23 örnek) mikrobiyal çeşitliliği araştırmış ve 2 × 300 bp Illumina Miseq dizileme kullanarak bunları sıralamıştır. 16S primerleri bakteri rRNA geninin V3-V4 bölgesini büyütmek için kullanılmıştır. Toplamda, on dokuz örnekten 687.888 bakteri dizisi elde edilmiştir. Bakteriyel sekanslar arasında, *Firmicutes* (% 74.77), *Proteobacteria* (% 22.61) ve *Actinobacteria* (% 2.55), baskın filalar olmuştur. *Firmicutes*'in çoğunu *Staphylococcus* cinsi oluşturmuştur. Numunelerdeki mikrobiyal topluluğun, büyük olasılıkla fermantasyon sırasındaki çevre ve üretim süreci dahil olmak üzere coğrafi farklılıklar ve dış faktörler nedeniyle benzersiz olduğu belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') – 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') primerleri kullanılarak V3-V4 gen bölgeleri hedef alınmıştır.

Sant'Anna ve arkadaşları (2019) tarafından yapılmış bir çalışmada geleneksel yöntemle başlangıç kültür kullanılarak çiğ süttten elde edilen Minas zanaat peyniri üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışma, işlenmemiş çiğ sütün bakteri topluluğunu, endojen başlangıç kültürünü ve altmış günde Serra do Salitre bölgesinde (Brezilya) olgunlaşan peynirin iç ve dış yüzeyindeki bakteri topluluğundaki olası değişimleri ortaya çıkararak Illumina MiSeq 16S rRNA gen amplikonu dizilemesiyle değerlendirmeyi amaçlamıştır. Bu çalışmada peynirin olgunlaşma süresi boyunca *Planococcaceae* ve *Streptococcaceae* familyalarının yaygın olduğunu saptamıştır. Bundan başka *Planococcaceae* ve *Leuconostocaceae* familyalarının birlikte bu peynirlerin yüzeyinde güçlü etkileşimler geliştirdiği tespit edilmiştir. Ek olarak, coğrafi konum, nem ve asitlik gibi çevresel faktörlerin mikrobiyal değişimi tetikleyen ana nedenler olduğu belirlenmiştir.

Çalışmalardan görüldüğü gibi Illumina Miseq platformu yardımıyla farklı alanlardaki mikrobiyal çeşitlilik belirlenebilmektedir. Bizim çalışmamızda farklı peynir örneklerinin bakteriyal topluluğu analiz edilmiş ve her örnek için genus ve familya düzeyinde farklı grupların baskın olduğu görülmüştür. D4 kodlu örneğimizde genus düzeyinde *Lactococcus* cinsi (105.460) yüksek oranda temsil edilmiş ve bunu *Streptococcus* (23.683) ve *Lactobacillus* (19.470) cinsleri takip etmiştir. D6 kodlu örneğimizde ise *Streptococcus* cinsi ilk sırada (130.101 okuma sayısı) ve *Lactococcus* cinsi (41.792 okuma sayısı) ikinci sırada yer almaktadır. Her iki örnek için familya düzeyinde *Streptococcaceae* baskın olarak görülmektedir.

Bizim çalışmamızda süt ürünlerinin mikrobiyal çeşitliliğini belirlemek için ek olarak FISH yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde Bacteria için genel Eub 338 probu kullanılmış ve DAPI boyama gerçekleştirilmiştir. Son olarak örnekler floresan mikroskopuyla görüntülenmiş ve Eub 338 probuyla zayıf sinyaller elde edilmiştir. Prob sinyallerinin zayıflaması hibridizasyon sonrası örneklerle ait filtreleri kapatırken solmayı engelleyici madde olarak citifluor (antifade solüsyon) yerine gliserol kullanılması ve görüntülemeye kadar aradan bir süre zaman geçmesiyle ilişkilendirilmiştir. Bu yüzden çalışmalarımızın devamında FISH yönteminin tekrarlanması hedeflenmiştir. Genel olarak DAPI boyamaları üzerinden örneklerimiz morfolojik olarak değerlendirildiğinde basil, kok, diplokok şekilli hücrelerin daha baskın olduğu belirlenmiştir.

FISH yöntemi çok farklı alanlarda mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

Bu yöntem gıda ve çevre su örneklerinde bulunan *Enterobacteriaceae* sayımı (Ootsubo ve ark., 2003), yiyecek ve suda *Escherichia coli* tespiti (Lin ve Tsen, 1999), şarapta laktik asit bakterilerinin (LAB) tanımlanması (Blasco ve ark., 2003), Alman Kuzey Denizi kıyısındaki Wadden Denizi sedimanlarının mikrobiyal topluluk kompozisyonunu belirlemede (Llobet-Brossa ve ark., 1998) ve bir çok süt (Bottari ve ark., 2006; Kollöffel ve ark., 1999; Oliveira ve ark.,2004; Machado ve ark.,2013; Gunasekera ve ark., 2003) ve et ürünleriyle ilgili çalışmalarda (Gory ve ark., 1999; Baysal, 2014) kullanılmıştır.

Floresan oligonükleotit prob hibridizasyonu, saf kültürlerde izolasyona ihtiyaç duymadan karma topluluklardaki spesifik mikroorganizmaları tanımlamak için gıda mikrobiyolojisinde de önemli bir araç haline gelmiştir (Bottari ve ark.,2006) .

FISH yöntemi kullanımı, hızlı ve doğru bir *Pseudomonas* sayımı sağlamakla beraber süt fabrikalarında belirli kirlilik kaynaklarının tanımlanmasını, pastörizasyon işleminin doğru validasyonunu ve pastörize sütün raf ömrünün tahmin edilmesini kolaylaştırmıştır (Bottari ve ark.,2006; Gunasekera ve ark., 2003).

Salmonella spp., *Listeria monocytogenes*, dünya genelinde gıda kaynaklı hastalıkların ana nedenlerinden ikisi olarak bilinen mikroorganizmalardır. Gıdalardaki bu mikroorganizmaların tespiti için geleneksel yöntemler iyi bilinse de pozitif sonuçlar sadece 5 gün sonra elde edile bilmektedir. Bilimsel gelişmeler, bu patojenik mikroorganizmaların hızlı tespiti için birçok yöntemin geliştirilmesine yardımcı olmuştur (Oliveira ve ark.,2004).

Oliveira ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan çalışmada farklı florokromlarla işaretlenmiş (*Salmonella*'ya özgü prob, floresan ve *L.monocytogenes*'e özgü prob, rodamin ile etiketlenmiştir) iki oligonükleotit prob kullanan floresan in situ hibridizasyon (FISH) tekniği kullanılmıştır. Bu iki probun karışık bakteri popülasyonları veya doğrudan süt numuneleri ile hibridizasyonu, bu iki patojenin floresan mikroskopisi ile eşzamanlı olarak tanımlanmasına izin vermiştir. Sonuç olarak, süt örneklerinin bakteriyolojik analizine uygulanan FISH teknolojisi, tek bir mikroskop lamında birden fazla sonucun görselleştirilmesine izin veren benzersiz özelliklere sahip bir teknik olarak kabul edilmiştir. Bu çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda sadece *Bacteria* spesifik Eub 338 probu ve bir tek DAPI boyama kullanılmıştır.

Lactobacillus türleri vücudumuzdaki baskın ve faydalı bakterilerden birini oluşturur ve gelişmiş ülkelerde mikrobik bir adjuvan olarak kullanılır. Bu probiyotik

bakterilerin tanımlanması geleneksel olarak kültür bazlı tekniklerle yapılır. Bununla birlikte, bu tür yöntemler çok zaman alıcıdır ve özellikle karışık bakteri kompleksi topluluklarında *Lactobacillus* bulunduğunda yanlış sonuçlar verebilmektedir (Machado ve ark.,2013).

Machado ve arkadaşları tarafından yapılmış (2013) çalışmada, yeni bir Peptid Nükleik Asit (PNA) Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) probu kullanarak *Lactobacillus spp*'yi doğru bir şekilde tanımlamak amaçlanmıştır. Bu çalışmada Prob (Lac663), farklı *Lactobacillus* türlerine ait 36 suşta ve diğer bakteri türlerinin 20 suşunda test edilmiştir. Yöntemin duyarlılığı % 100 ve özgüllüğü % 95.0 olmuştur. Bu çalışmada bizim çalışmamızda kullandığımızdan farklı bir prob kullanılmıştır.

Yukarıda bahsetmiş olduğumuz FISH tekniğine dayalı yapılmış gıda çalışmalarında daha çok spesifik bakterilerin varlığı belirlenmeye çalışılmıştır,bizim çalışmamızda ise örneklerin genel mikrobiyal topluluğu belirlenmeye çalışılmıştır.

Kollöffel ve arkadaşları (1999) tarafından yapılan bir çalışmada in situ hibridizasyon tekniğiyle gruba ve türe özgü oligonükleotit problemleri kullanılarak üç farklı olgun Gruyere Sure peynirinin yüzey mikroflorasının belirlenmesi mümkün olmuştur. Burada prob olarak Eub 338' in kullanılmasıyla, mikrobiyal topluluğun büyük bir kısmı (%70'i) saptanabilmiştir. rRNA-hedefli oligonükleotit problemleri ile flüoresan in situ hibridizasyon ile tespit edilebilen bakteri sayısı olarak tanımlanan fizyolojik olarak aktif bakteriler, 4 '6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) boyaması ile saptanan toplam sayılar ve canlı sayım tekniği ile karşılaştırılmıştır. Bizim çalışmamızda da Eub 338 probu kullanılmış ve DAPI boyama gerçekleştirilmiştir, ama bu çalışmadan farklı olarak sadece peynir yüzeyleri değil örneklerin hem iç hem dış yüzeyini içeren dilüsyonlar değerlendirilmiştir.

Dünya genelinde süt ürünleriyle ilgili bizim çalışmamıza benzer bir çok çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Literatür taramalarımız sonucunda Azerbaycana ait süt örneklerinde yapılan çalışmalara katkı sağlamak adına çalışmamızı farklı yöntemler kullanarak birçok yönden değerlendirmeye karar verilmiş ve tez kapsamında bahs ettiğimiz bir çok yöntem ve analiz metodları kullanılarak genel bir bilgi elde edilmeye çalışılmıştır.Sonuç olarak örneklerimiz hem mikrobiyolojik analizlere hem de moleküler yöntemlere tabi tutularak tez içeriğimizde detaylı bahs ettiğimiz bilgiler elde edilmiştir. Bundan başka çalışmamızda İllumina MiSeq platformu ile yapılan analizler de süt ürünlerine dair mikrobiyal çeşitliliği belirlemede önemli ölçüde katkı sağlamıştır.

KAYNAKÇA

- Abanoz, H. S. (2014). *Enterococcus faecalis* KT11'in probiyotik potansiyelinin belirlenmesi ve bakteriyosin üretimi üzerine çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Abdallah, M. B., Karray, F., Kallel, N., Armougom, F., Mhiri, N., Quéméneur, M., ... & Sayadi, S. (2018). Abundance and diversity of prokaryotes in ephemeral hypersaline lake Chott El Jerid using Illumina Miseq sequencing, DGGE and qPCR assays. *Extremophiles*, 22(5), 811-823.
- Ahn, H., Kim, J., Kim, W. J. (2017). Isolation and characterization of bacteriocin producing *Pediococcus acidilactici* HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria. *Food Control*, 80, 59-66.
- Akkoç, N., Şanlıbaba, P., Akçelik, M. (2009). Bakteriyosinler: Alternatif Gıda Koruyucuları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 25 (1-2) 59-70.
- Al-Bayati, A. A. K. (2014). *Isolation and molecular identification of some lactic acid bacteria from traditionally made fermented food*. Yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Alkış, A. (2016). *Geobacillus toebii* HBB-218 tarafından üretilen bakteriyosinin bozulmayı engellemek amacıyla konserve gıdalara uygulanması. Yüksek Lisans Tezi. Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Alp, D. (2018). *Doğal kaynaklardan izole edilen laktik asit bakterilerinin bazı probiyotik özelliklerinin araştırılması ve in vitro bağırsak modelinde patojenlerin tutunmasını engelleme özelliklerinin belirlenmesi*. Doktora tezi. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Altuntaş, E. G. ve Ayhan, K. (2010). Süt ve süt ürünlerinde bakteriyosinlerin kullanımı. Pamukkale Üniversitesi. *Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16 (1), 113-120.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., & Stahl, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and environmental microbiology*, 56(6), 1919-1925.

- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), 143-169.
- Amann, R., Fuchs, B. M., & Behrens, S. (2001). The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Current opinion in biotechnology*, 12(3), 231-236.
- Ameen, S.M., Caruso, G. (2017). Chemistry of Lactic Acid. *Lactic Acid in the Food Industry*, 7-15.
- Anukam, K. C., and Reid, G. (2014). Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's Observation. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 2, 466-474.
- Apprill, A., McNally, S., Parsons, R., & Weber, L. (2015). Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 75(2), 129–137.
- Arabacı, M.E. (2017). *Spontane fermente et ürünleri: laktik asit bakterilerinin muhtemel starter kültür olarak izolasyonu ve karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Arslan, S. (2017). *Türkiye'nin farklı yörelerinden toplanan beyaz peynir örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Erzurum: Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Asutay, D. (2007). *Yöresel bir gıdadan izole edilen bakteriyosin üreten bakterinin teşhisi ve bakteriyosinin karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Tokat: Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ateş, S. (2017). *İdrar ve gaita örneklerinden izole edilen enterococcus faecalis ve enterococcus faecium suşlarının ısı şok proteinlerinin SDS-PAGE yöntemi ile analizi*. Yüksek Lisans Tezi. Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Avcı, M. (2015). *Farklı peynir çeşitlerinden bakteriyosin (Enterosin) üreticisi enterokok suşlarının izolasyonu ve üretilen bakteriyosinlerin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile tanısı*. Yüksek Lisans Tezi. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Azcarate-Peril, M. A., and Klaenhammer, T. R. (2010). Genomics of lactic acid bacteria: the post-genomics challenge- from sequence to function. Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G.M. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications*, 35- 50. Blackwell Publishing.
- Bamunuarachchige, T.C., Wickramasinghe, H.A.M., Dissanayaka, D.M.J.C., ve Wickrama-rathna, N.A.D.(2011). Genetic engineering of probiotic microorganisms. Liong, M.T. *Probiotics Biology, Genetics and Health Aspects*, 110- 134. Germany: Springer Science & Business Media.
- Batu, H.S., Aşam, E., Dikici, A. (2014). Gıda teknolojisinde bakteriyosinler ve yeni gelişmeler. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 108-117.
- Bayram, M. (2005). *Gıda ürünlerinde bakteriyosin üreten bakterinin izolasyonu ve bakteriyosinin karakterize edilmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Tokat: Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Baysal, A. H. (2014). Comparison of conventional culture method and fluorescent in situ hybridization technique for detection of *Listeria* spp. in ground beef, Turkey, and chicken breast fillets in Izmir, Turkey. *Journal of Food Protection*, 77(12), 2021–2030.
- Bell, C., Neaves, P., Williams, A. P. (2005). *Food microbiology and laboratory practice*, 253-254. Oxford : Blackwell Science
- Biler B. (2009). *Pediococcus acidilactici pbf suşu tarafından üretilen bakteriyosinin karakterizasyonu ve saflaştırılması*. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Bircan, S.(2013). *Şalgam suyundan izole edilen bazı laktik asit bakterilerinin moleküler karakterizasyonu ve bunların starter kültür olarak kullanılma potansiyellerinin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Adana: Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Björkroth, J., Dicks, L.M.T. ve Endo, A. (2014). The genus *Weissella*. Holzapfel, W. H., Wood, B.J.B. *Lactic Acid Bacteria Biodiversity and Taxonomy*, 417- 421. John Wiley & Sons, Ltd.
- Björkroth, J., Dicks, L.M.T., Endo, A., and Holzapfel, W.H. (2014). The genus *Leuconostoc*. Holzapfel, W. H., Wood, B.J.B. *Lactic Acid Bacteria Biodiversity and Taxonomy*, 391-395. John Wiley & Sons, Ltd.

- Blasco, L., Ferrer, S., Pardo, I. (2003). Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for in situ identification of wine lactic acid bacteria. *Fems Microbiol. Lett.*, 225, 115-123.
- Bostancı, B. (2019). *Süt ve süt ürünlerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve moleküler identifikasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Afyon: Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Bottari, B., Ercolini, D., Gatti, M., Neviani, E. (2006). Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73, 485-494.
- Bölükbaş, C.S. (2007). *Echinococcus granulosus protoskolekslerinin in vitro ortamda gelişimi ve protein yapılarının sds-page yöntemi ile belirlenmesi*. Doktora Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Brisson, G., Singh, H. (2013). Milk composition, physical and processing characteristics. Chandan, R.C., Kilara, A. *Manufacturing Yogurt And Fermented Milks*, 21-44. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell.
- Broadbent, J. R. (2001). Genetics of lactic acid bacteria. Marth, E. H., Steele, J. L., *Applied Dairy Microbiology*. 2nd ed., 243-284. CRC Press.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1), 4516-4522.
- Carminati, D., Giraffa, G., Quiberoni, A., Binetti, A., Suárez, V., ve Reinheimer, J. (2010). Advances and trends in starter cultures for dairy fermentations. Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G. M. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications*, 177-188. Blackwell Publishing.
- Catić, A., Pavlović, D., Veličković-Radovanović, R., Stojanović, D. (2018). Probiotics: rational applications, patients “opinion and healthcare professionals” role in their proper selection and use. *Acta Medica Medianae*, 57(3), 107-114.
- Charyyev, M.G. (2016). *Bozadan izole edilen Enterococcus faecium YT52 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Chikkamath, V., Kummari, S., Naik, V., and Nagappa, A.N. (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotic on human health and disease - A review. *Manipal Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 19-24.
- Chowdhury, A., Malaker, R., Hossain, M.N., Fakruddin, M., Noor, R., ve Ahmed, M. M. (2014). Bacteriocin profiling of probiotic lactobacillus spp. Isolated from yoghurt. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry*. Research Article.
- Collins, B., Cotter, P.D., Hill, C, and Ross, R. P. (2010). Applications of lactic acid bacteria-produced bacteriocins. Mozzi, F., Raya, R. R., Vignolo, G. M. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications*, 89-102. Blackwell Publishing.
- Colombo, M., Castilho, N. P. A., Todorov, S.D ., ve Nero, L. A.(2018). Beneficial properties of lactic acid bacteria naturally present in dairy production. *BMC Microbiology* ,18,219. Research Article.
- Çetin, A. E. (2002). *Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from raw milk*. Master of Science. İzmir: İzmir Institute of Technology, Department: Biotechnology and Bioengineering.
- Çon, A. H., Gökalp H.Y. (2000). Production of bacteriocin-like metabolites by lactic acid cultures isolated from sucuk samples. *Meat Science*, 55 89-96.
- Da Costa, R. J., Voloski, F. L. S., Mondadori, R. G., Duval, E. H., ve Fiorentini, A. M. (2019). Preservation of meat products with bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from meat. *Journal of Food Quality*.
- Dağ ,S. (2016). *Laktik asit bakterilerinden sentezlenen ekzopolisakkaritlerin buğday suyu özelliklerine etkisinin incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- De Vuyst, L., Vandamme, E.J. (1994). Lactic acid bacteria and bacteriocins: their practical importance. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria Microbiology, Genetics and Applications*, 2-7. Boston: Springer.
- Delibaş,Y.(2016). *Mastitisli sığır sütlerinden izole edilen enterococcus faecium suşlarının ürettiği bazı bakteriyosinlerin tanısı*. Yüksek Lisans Tezi. Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Demir, E. (2014). *Fermente süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinde bakteriyosin üretiminin karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Demir, E. (2019). *Gıda kaynaklı laktik asit bakterilerinin bazı güvenilirlik özelliklerinin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Burdur: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Demirbaş, F.N. (2016). *Ekşi hamur kaynaklı bazı laktik asit bakterilerinin teknofonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Bayburt: Bayburt Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Demirci, T. (2013). *Çeşitli gıdalardan izole edilmiş farklı laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretme yeteneklerinin ve bakteriyosin kısmi karakteristiklerinin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Konya Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Demirgöl, F., ve Sağdıç, O. (2017). Laktik starter kültür üretim teknolojisi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi* ,7(11), 27-37.
- Diken, K. (2016). *Farklı kaynaklardan enterococcus faecalis ve enterococcus faecium izolasyonu, moleküler tanısı ve genotiplendirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Kütahya: Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Dinu, L.D., Babata, S. I., Ciurea, A.N., Lunita, A.M.(2018). Antimicrobial effect and antibiotic resistance of lactic acid bacteria from some commercial dairy products. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 51 (1).
- Du Toit, M., Huch, M., Cho, G., and Franz, C. M.A.P. (2014). The genus Streptococcus. Holzapfel, W. H., Wood, B.J.B. *Lactic Acid Bacteria Biodiversity and Taxonomy*, 457-476. John Wiley & Sons, Ltd.
- Düğenci, S.T.(2014). *Bazı gram negatif bakterilerin bakteriyosin üretimlerinin araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ekinci, M. S., Akyol İ., Ramadan, A. K., Yazdıç, F. C., Özköse, E. (2018). Molecular identification and partial characterization of pediococcus sp. and leuconostoc sp. Isolated from traditionally made dairy products. *Ksü Tarım Ve Doğa Derg*, 21(1), 44-50.
- Elçioğlu, Ö., (2010). *Kargı tulum peynir'inden izole edilen laktik asit bakterilerinin starter ve probiyotik kültür özelliklerinin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Elyass, M. E., Shigidi, M. T., Attitalla, I. H., Mahdi, A. A. (2017). Characterization and optimization of bacteriocin from lactobacillus plantarum isolated from fermented beef (shermout). *Open Journal of Applied Sciences*, 7, 83-97
- Erbulucu, T. (2012). *Amsonia orientalis Decne' nin farklı populasyonları arasındaki genetik çeşitliliğin RAPD ve SDS PAGE yöntemleri ile belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi.Kocaeli: Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Franz, C. M.A.P., Endo, A., Abriouel, H., Reenen C.A.V., Galvez, A. ve Dicks, L.M.T. (2014). The genus *Pediococcus*. Holzapfel, W.H., Wood, B.J.B. *Lactic Acid Bacteria Biodiversity and Taxonomy*, 359-366. John Wiley & Sons, Ltd.
- Fung W., Lye H., Lim T., Kuan C., Liong M. (2011). Roles of probiotic on gut health. Liong, M. *Probiotics Biology, Genetics and Health Aspects*, 140-160. Germany: Springer Science & Business Media.
- G'alvez, A., L'opez, R. L., ve Abriouel, H. (2008). Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28, 125–152.
- Gory, L., Millet, L., Godon, J.J., Montel, M.C. (1999). Identification of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus warneri* Isolated from meat by fluorescent in situ hybridization with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Syst Appl. Microbiol.*, 22, 225-228.
- Gunasekera, T.S., Dorsch, M.R., Slade, M.B., Veal, D.A. (2003). Specific detection of *Pseudomonas* spp. in milk by fluorescence in situ hybridization using ribosomal RNA directed probes. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 936-945.
- Gülgör, G., Özçelik,F. (2014). Bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin probiyotik amaçlı kullanımı . *Akademik Gıda*, 12(1), 63-68. Derleme Makale.
- Gümüş, A. (2019). *Geleneksel turşulardan izole edilen laktik asit bakterilerinin çeşitli ağır metalleri bağlama kapasitesinin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Bayburt: Bayburt Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Gündoğdu, G.(2016). *Çiğ süt örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Amasya: Amasya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Gürsoy, O., ve Kınık, Ö. (2005). Laktobasiller ve probiyotik peynir üretiminde kullanım Potansiyelleri. *Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 11(3), 361-371.

- Güven, S. ve Zorba, N.N.D. (2016). *Genel Mikrobiyoloji ve Laboratuvar Kılavuzu*, 217-221. Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık.
- Güven, T. (2008). *Hastane kaynaklı pseudomonas aeruginosa suşlarının sds- page ve pfge yöntemleri ile karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Adana: Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Halkman, K., (2005). *Gıda mikrobiyolojisi uygulamaları*. Ankara: Başak Matbaacılık Ltd. Şti. 76-84, 135-233.
- Harrigan, W. F. (1998). *Laboratory methods in food microbiology*. 3rd edition, San Diego, CA. : Academic Press, 156- 159.
- Hassan, A.N., Frank, J. F. (2001). Starter cultures and their use. Marth, E. H., Steele, J. L., *Applied Dairy Microbiology*. 2nd ed, 151-195. CRC Press.
- Hippe, B., Zwielehner, J., Pirker, A., Smith, W.M, and Haslberger, A. G. (2011). Detection and identification of probiotic microorganisms and other beneficial organisms from the human GI tract. Liong, M. *Probiotics Biology, Genetics and Health Aspects*, 57-81. Germany: Springer Science & Business Media.
- Hoover, D.G., Harlander, S.K. (1993). Screening Methods For Detecting Bacteriocin Activity. Hoover, G., Steenson, L.R. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, 73-99. : California: Academic Press, Inc.
- Hoover, D.G., Steenson, L.R. (1993). Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. 25-26. California: Academic Press, Inc.
- Xiao, J., Zhang, Y., Yang, Z., (2014). Lactic acid bacteria in health and disease. Zhang, H., Cai, Y. *Lactic Acid Bacteria Fundamentals and Practice*, 303- 375. Amsterdam: Springer.
- Işık, C. (2018). *Lactobacillus plantarum S54'ün bakteriyosini olan plantarisin geninin ekspresyon profillerinde çevre koşullarına ve gıda patojenlerine bağlı olarak meydana gelen değişimlerin araştırılması*. Doktora Tezi. Erzurum: Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- İşevi, T. (2011). *Silaj Kaynaklı Laktik Asit Bakterilerinin Bakteriyosin İçerikleri Yönünden İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. (2005). Milk, fermentation, and fermented and nonfermented dairy products. *Modern Food Microbiology*, 7th ed., 150-169. USA: An Aspen Publication.

- Jay, J.M.(2000). *Modern Food Microbiology*, 6 th ed, 113-128. Gaithersburg: An Aspen Publication.
- Juturu, V., Wu, J.C. (2018). Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. *Biotechnol Adv.*,36(8), 2187-2200.
- Kakelar , H.M., Barzegari, A., Hanifian,S., Barar, J., Omid,Y. (2019). Isolation and molecular identification of lactobacillus with probiotic potential from abomasums driven rennet. *Food Chemistry*, 272, 709–714.
- Karag l, B.(2010). * eşitli kaynaklardan izole edilen laktik asit bakterilerinin bakteriyosin benzeri madde üretme yetenekleri*. Yüksek Lisans Tezi.Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Karahan, A. G., ArıdoĒan, B. C.,  akmak ı, L. (2002). *Genel mikrobiyoloji uygulama kılavuzu*.  sparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 35-36.
- Kaya, H. . (2013). *Tarhana izolatu bazı laktik asit bakterilerinin bakteriyosinleri ve fermentasyonda patojen bakteriler üzerine etkisi*. Yüksek Lisans Tezi. Denizli:
- Kazancıgil, E. (2018). * eşitli tulum peynirlerinden izole edilmiş laktik asit bakterilerinin bazı teknolojik özelliklerinin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Konya: Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kıran, F., OsmanaĒaoĒlu,  . (2011). Laktik asit bakterilerinin (LAB) identifikasyonunda/ tiplendirmesinde kullanılan moleküler yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* , 27(1), 62-74.
- Kırma,  . (2016). *Gıda kaynaklı laktik asit bakterileri kullanılarak ekzopolisakkarit  retimi*. Yüksek Lisans Tezi.  stanbul:  stanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kim, W. (2014). The genus Lactococcus. Holzapfel, W. H., Wood, B.J.B. *Lactic Acid Bacteria Biodiversity and Taxonomy*, 429-437.John Wiley & Sons, Ltd.
- Kollöffel, B., Meile, L., Teuber, M. (1999). Analysis of brevibacteria on the surface of Gruy re cheese detected by in situ hybridization and by colony hybridization. *Lett Appl Microbiol.*, 29,317–322.
- Korkmaz, A.G. (2011). *YoĒurt ve peynir için starter kültür  retimi*. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kumar, K. N., Devadas, S. M., Murugan, S., Krishnan, S. G. ve Thayumanavan,T. (2018). Production and characterization of bacteriocin by lactic acid bacterium-

- pediococcus pentosaceus nksml isolated from fermented “appam” batter. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(3), 1315-1330.
- Kumari K., Sharma S., ve Kaundal, K. (2018). Production, purification and efficacy of bacteriocin isolated from natural lactic acid fermentation of wild himalayan fig fruit. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(2), 879-885.
- Kurt, Ş., Zorba, Ö. (2005). Bakteriyosinler ve gıdalarda kullanım olanakları. *YYÜ Vet Fak Derg.*, 16 (1), 77-83.
- Quigley, L., O’ Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald G.F. ve Cotter, P.D. (2012). A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. *Journal Of Applied Microbiology*, 1364-5072.
- Lin, C.K., Tsen, H.Y. (1999). Comparison of the partial 16S rRNA gene sequences and development of oligonucleotide probes for the detection of Escherichia coli cells in water and milk. *Food Microbiol.*, 16, 551–562.
- Llobet-Brossa, E., Rosselló-Mora, R., Amann, R. (1998). Microbial community composition of wadden sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2691-2696.
- Machado, A., Almeida, C., Carvalho, A., Boyen, F., Haesebrouck, F. Rodrigues, L., Cerca, N., Azevedo, N.F. (2013). Fluorescence in situ hybridization method using a peptide nucleic acid probe for identification of Lactobacillus spp. in milk samples. *International Journal of Food Microbiology* ,162, 64–70.
- Majhenič, A.Č., Lorbeg, P.M.ve Treven, P. (2018). Enumeration and identification of mixed probiotic and lactic acid bacteria starter cultures. Tamime, A. Y. ve Thomas, L.V. *Probiotic Dairy Products*, 2 nd ed, 207-238.
- Mayo, B., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez-Martín, P., Bardowski, J. (2010). Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G. M. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications*, 3-33.
- Montville, T.J., Kaiser, A.L. (1993). Antimicrobial Proteins: Classification, Nomenclature, Diversity, and relationship to bacteriocins. Hoover, G., Steenson, L.R. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, 31-34. California: Academic Press.
- Moter, A., Göbel, U.B. (2000). Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of Microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 85–112.

- Mutlu, M. B. (2006). *Tuz Gölü bakterilerinin karakterizasyonu ve mevsimsel dağılımı*. Doktora Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Nalvuran, Z. (2013). *Peynirlerden izole edilen farklı enterococcus türlerinin bakteriyosin üretme yeteneklerinin ve bakteriyosinlerinin karakteristiklerinin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Konya: Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Novik, G., Sidarenka A., Kiseleva, E., Kolomiets, E., and Dey, E. S. (2013). Probiotics. Brar, S.K., Dhillon, G.S., Soccol, C.R. *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*, 187- 235. Springer Science & Business Media.
- Nwamaioha, N. O. ve Ibrahim, S.A. (2018). Selective medium for the enumeration and differentiation of lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus. *Journal of Dairy Sci.*, 101 ,4953–4961.
- Oliveira, M., Blasco, L., Ferrer, S., Bernardo, F. (2004). Rapid and simultaneous detection of Salmonella spp. and Listeria monocytogenes in milk by Fluorescent In Situ Hybridisation. *Rev. Port. Cien. Vet.*, 99(552), 215-218.
- Ootsubo, M., Shimizu, T., Tanaka, R., Sawabe, T., Tajima, K., Ezura, Y. (2003). Seven-hour fluorescence in situ hybridization technique for enumeration of Enterobacteriaceae in food and environmental sample. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 1182-1190.
- Oral, H. (2015). *Farklı kaynaklardan izole edilen laktik asit bakterilerinin bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Orike, E.L., Adeyemo, S.M. and Omafuvbe, B.O. (2018). Probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from fermenting cassava. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 13, 69-76.
- Öngün, P. (2015). *Anne sütünden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, karakterizasyonu, bazı probiyotik ve starter özelliklerinin araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi. Aksaray: Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Önlü, H. (2018). *Laktik asit bakterilerinin bazı suşlarında L-laktat dehidrogenaz geni ile ilgili nakavt çalışmaları*. Doktora Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Özkan, C. (2013). *Çeşitli yırtıcı kuşlardan izole edilen laktik asit bakterileri'nin bakteriyosin benzeri madde üretim yeteneklerinin belirlenmesi ve üretim*

- koşullarının optimizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Özlü, H. (2015). *Bazı peynirlerden izole edilen laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretme yeteneği*. Doktora Tezi. Erzurum: Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Öztürk, E.(2019). *Farklı kaynaklardan izole edilen laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Manisa: Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Parada, A. E., Needham, D. M., & Fuhrman, J. A. (2016). Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental microbiology*, 18(5), 1403-1414.
- Parada, J.L., Caron, C.R., Medeiros, A.B.P., ve Soccol, C.R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology And Technology*, 50 (3), 512-542.
- Pichart, K. (2004). *Gıda Mikrobiyolojisi. Gıda Endüstrisi İçin Temel Esaslar Ve Uygulamalar*. Sekin, Y., Karagözlü, N., Literatür Yayıncılık, 30-34.
- Pot, B., Felis, G. E., De Bruyne, K., Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., Leisner, J., and Vandamme, P. (2014). The genus *Lactobacillus*. Holzappel, W. H., Wood, B.J.B. *Lactic Acid Bacteria Biodiversity and Taxonomy*, 249-335. John Wiley & Sons, Ltd.
- PoT, B., Ludwig, W., Kersters, K., ve Schleifer, K. (1994). Taxonomy of lactic acid bacteria. DE Vuyst, L., and Vandamme, E. J. *Bacteriocins Of Lactic Acid Bacteria Microbiology, Genetics and Applications*, 14-67. New York: Springer Science+Business Media.
- Poyraz, N. (2018). *Atık su arıtma sistemlerinde mikrobiyal kommunité analizi ve biyodegradasyon potansiyellerinin tespiti*. Doktora Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ramadan, A. K. R. (2014). *Isolation and characterization of some lactic acid bacteria from home-made dairy products and investigation of some antimicrobial and enzymatic properties*. Yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Reda, F.M. Hussein, B.M. ve Enan, G. (2018). Selection and characterization of two probiotic lactic acid bacteria strains to be used as starter and protective cultures for food fermentations. *Journal Of Pure And Applied Microbiology*, 12 (3), 1499-1513.
- Sabo, S.S., Converti, A., Ichiwaki, S., ve Oliveira, R. P. S. (2019). Bacteriocin production by lactobacillus plantarum st16pa in supplemented whey powder formulations. *J. Dairy Sci.*, 102,87–99.
- Sağlam, H., Karahan, A. G. (2017). Laktik asit bakterilerinin plazmidleri ve bunların özellikleri. *Institute of Natural and Applied Science Journal*, 10 (2), 252-285.
- Salveti, E., Torriani, S., Felis, G. E. (2012). The genus lactobacillus: a taxonomic update. *Probiotics & Antimicro. Prot.*, 4(4), 217-26.
- Sant'Anna, F. M., Wetzels, S. U., Cicco, S. H. S., Figueiredo, R. C., Sales, G. A., Figueiredo, N. C., ... & Souza, M. R. (2019). Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time. *Food microbiology*, 82, 349-362.
- Sekban, H.(2019). *Golot peynirinin olgunlaşma kriterlerine farklı starter kültürlerin etkisinin araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi. Ordu: Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Sezer, Ç. (2007). *Gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretme yeteneklerinin araştırılması*. Doktora Tezi. Kars: Kafkas Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Sezer, Y.C. (2012). *Fermente sucuktan izole edilen bazı laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak kullanım potansiyelinin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Kayseri: Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Song, H., Zhou, L., Liu, D., Yao, X. And Li, Y. (2018). What roles do probiotics play in the eradication of helicobacter pylori? Current knowledge and ongoing research. *Gastroenterology Research and Practice*.
- Soran, G.Ş. (2018). *Geleneksel peynirlerin üretimine uygun doğal starter kültürlerin üretimi ile bu kültürlerin laktik asit bakteri floralarının tanımlanması ve karakterizasyonu*. Doktora tezi. Şanlıurfa: Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Sönmez, M. (2018). *Anne sütünde izole edilen laktik asit bakterilerinin 16S rRNA dizi analizi ile tanımlanması, antibiyotik dirençlilik ve antibakteriyal aktivitelerinin*

- belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Muş: Muş Alparslan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.*
- Sugandhi, G.P. (2018). Probiotics conventional benefits and cautions in intake- A review. *Agricultural Research Communication Centre*, 39(3), 251-254.
- Sun, X., Lyu, G., Luan, Y., Zhao, Z., Yang, H., & Su, D. (2018). Analyses of microbial community of naturally homemade soybean pastes in Liaoning Province of China by Illumina Miseq Sequencing. *Food research international*, 111, 50-57.
- Švec, P., Franz, C. M.A.P. (2014). The genus *Enterococcus*. Holzapfel, W. H., Wood, B.J.B. *Lactic Acid Bacteria Biodiversity and Taxonomy*, 175-186.
- Tarazanova, M., Huppertz, T., Kok, J., ve Bachmann, H.(2018). Altering textural properties of fermented milk by using surface-engineered *Lactococcus lactis*. *Microbial Biotechnology* ,11(4), 770–780.
- Tatlı, D. (2009). *Geleneksel süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Adana: Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.*
- Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S. & Prakash, S. (2014), Modification Of The Gut Microbiota To Promote Human Health. H Floch M., Kim A. *Probiotics, Prebiotics And Gut Health*, 18-29. UK: Future Medicine Limited.
- Touret, T., Oliveira, M., Semedo-Lemsaddek ,T.(2018). Putative probiotic lactic acid bacteria isolated from sauerkraut fermentations. *Research Article*, 13 (9).
- Toy, N. (2019). *Farklı gıdalardan tanımlanan laktik asit bakterilerinin organik asit üretimi, antimikrobiyal aktivitesi ve antibiyotik direnç özelliklerinin araştırılması. Doktora Tezi. Adana: Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.*
- Tunalı, Y. (2014). *Farmosötik mikrobiyoloji uygulamaları. Dora Yayıncılık*, 77- 84.
- Turhan, İ. (2012). *Kaşar peyniri üretimi için starter kültür izolasyonu ve isolatların ftir spektroskopisi ile tanısının yapılması. Yüksek Lisans Tezi. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.*
- Uludağ, H. (2015). *Klinik ve gıda kaynaklı enterokoklar tarafından üretilen bakteriyosinin bazı patojen bakteriler üzerine antimikrobiyel aktivitelerinin karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Adana: Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.*
- Ulusoy, S.(2013). *Laktik asit bakterilerinden(LAB) tannaz üretimi. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.*

- Unakal, C., Yismaw, G., Gebrehiwot, A., Endris, M. ve Moges, F. (2012). Effect of bacteriocin produced from enterococcus faecium against drug resistant bacterial isolates. *International Journal of Biomedical and Advance Research*.
- Uyar, B. (2018). *Ağız mikroflorasındaki laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliğinin araştırılması*. Doktora Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Uymaz, B. (2009). *Probiyotik özellik taşıyan gıda ve insan kaynaklı laktobasillerin izolasyonu tanımlanması ve bakteriyosin üretim yeteneklerinin karakterizasyonu*. Doktora tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Üner, A. (2012). *Laktik asit bakterileri tarafından üretilen antimikrobiyal maddelerin gıda patojeni olan mayalar üzerine etkisinin incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Üstündağ, A. Ö. ve Özdoğan, M. (2011). Kanatlı hayvan beslemede bakteriyosinlerin kullanım olanakları. *Hayvansal Üretim* 52(2), 69-73.
- Üstündağ, A. Ö. (2016). *Bakteriyosin ve organik asitin Japon bildircinlarında büyüme performansı, ince bağırsak histomorfolojisi ve mikrobiyolojisi ile yemlerdeki mikroorganizma sayısı üzerine etkileri*. Doktora Tezi. Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Üstündağ, H.Ç., Yalçın, H. (2017). Bakteriyosinler ve gıdalarda kullanımı. *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.*, 5(1), 53-65.
- Üzümcü, Z. (2009). *Pseudomonas sp. suşlarında cold shock protein izolasyonu ve SDS-PAGE analizi*. Yüksek Lisans Tezi. Adana: Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Vapur, U.E. (2010). *Farklı starter kültür oranları ile hayvansal ve mikrobiyel kaynaklı peynir mayaları kullanılarak üretilen tam yağlı beyaz peynirlerin özelliklerinin belirlenmesi*. Doktora Tezi. Bursa: Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Wang, Y., Shang, N., Qina, Y., Zhanga, J., Lia, P. (2018). The complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* LPL-1, a novel antibacterial probiotic producing class IIa bacteriocin. *Journal of Biotechnology* 266, 84–88.
- Wishah, R. (2017). *Utilization of some adjunct bacteria strains in cheese production in addition to starter culture and their effects on the cheese properties*. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Wu, L., Wen, C., Qin, Y., Yin, H., Tu, Q., Van Nostrand, J. D., ... & Zhou, J. (2015). Phasing amplicon sequencing on Illumina Miseq for robust environmental microbial community analysis. *BMC microbiology*, 15(1), 125.
- Yeo, S., Ewe, J., Tham, C.S., ve Liong, M. (2011). Carriers of probiotic microorganisms. Liong, M. *Probiotics Biology, Genetics and Health Aspects*, 191-192. Germany: Springer Science & Business Media.
- Yıldırım, Y. (2005). *Beyaz peynir yapımında bazı probiyotik bakterilerin kullanılmasının Listeria Monocytogenes üzerine etkisi*. Doktora Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Yiğit, T. (2009). *Süt ve süt ürünlerinden probiyotik bakterilerinin izolasyonu ve tanımlanması*. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Yu, J., Wang, H. M., Zha, M. S., Qing, Y. T., Bai, N., Ren, Y., ... & Zhang, H. P. (2015). Molecular identification and quantification of lactic acid bacteria in traditional fermented dairy foods of Russia. *Journal of dairy science*, 98(8), 5143-5154.
- Yücel, M. (2019). *Aflatoksin M1'in (AFM1) laktik asit bakterileri tarafından bağlanması*. Yüksek Lisans Tezi. Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Yüksekdağ, Z.N., Beyatlı, Y. (2009). Bazı laktik asit bakterilerinin fizyolojik, biyokimyasal, plazmit dna ve protein profil özelliklerinin incelenmesi. *GIDA*, 34(2), 91-98.
- Zaid, A.A. (2018). Study the effect of probiotic bacteria isolated from foods on pathogens. *Biomedical Research*, 29 (12), 2509-2515.
- Zengin, N.(2012). *Doğal olarak üretilen yoğurtlardan izole edilen Streptococcus thermophilus ve Lactobacillus delburieckii subsp bulgaricus'un bakteriyosin üretme yeteneklerinin belirlenmesi ve ürettikleri bakteriyosinlerin karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Konya: Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Zhang, W., Zhang, H. (2014). Genomics of Lactic Acid Bacteria. Zhang, H., Cai, Y. *Lactic Acid Bacteria Fundamentals And Practice*, 205-238. Amsterdam: Springer.
- http-1: <http://portal.azertag.az/az/node/1788>. (Erişim tarihi: 20.05.2019).
- http-2: <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/Default.aspx?F6E10F8892433CFFAAAF6AA849816B2EF4376734BED947CDE>. (Erişim tarihi:10.05.2019).

http-3:

https://www.biomerieuxusa.com/industry/tempo?doc=USA_PRD_LST_G_PRD_USA_20. (Erişim tarihi: 24.05.2019).

http-4: http://www.sehiyye.gov.az/files/pdf/qida_mehsullari_tehluquesizlik.pdf. (Erişim tarihi: 27.05.2019).

http-5: <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-7-1.pdf>. (Erişim tarihi: 27.05.2019).

http-6: <http://www.earthmicrobiome.org/> (Erişim tarihi: 04.08.2019).