


Araştırma Makalesi
(Research Article)

Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg., 2021, 58 (1):87-95
<https://doi.org/10.20289/zfdergi.658513>

Osman DOĞAN¹ 

Aysun CEBECİ^{2*} 

¹ Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Kayseri/Türkiye

² Abdullah Gül Üniversitesi, Malzeme Bilimi
ve Nanoteknoloji Mühendisliği Bölümü,
Kayseri /Türkiye

*İletişim (correspondence) e-posta:

aysun.cebeciaydin@agu.edu.tr

Anahtar sözcükler: Ekşi hamur, PCR,
tanımlama, tiplendirme, Van otlı peyniri,

Keywords: Sourdough, PCR, identification,
typing, Van herb cheese,

Bazı geleneksel Türk gıdalarından laktik asit bakterilerinin izolasyonu

Isolation of lactic acid bacteria from some traditional Turkish foods

Alınış: (Received): 12.12.2019

Kabul Tarihi (Accepted): 06.05.2020

ÖZ

Amaç: Bu çalışma ülkemizde geleneksel yöntemlerle üretilen gıda ürünlerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonunu ve tanımlanmasını sağlamak amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Yöntem: Çalışma kapsamında Van otlı peynir ve ekşi hamur örneği kullanılmıştır. Bu örnekler içerdikleri laktik asit bakterileri için çalışılmış ve tanımlanmaları için biyokimyasal ve PCR bazlı moleküler biyolojik tekniklere tabi tutulmuşlardır. Biyokimyasal testler kapsamında örnekler, Gram reaksiyonları, katalaz aktivitesi, gaz üretimi, 10°C ve 45°C'de, %6 ve %16 NaCl konsantrasyonda, pH 4.4 ve pH 9.6'da gelişim göstermeleri açısından incelenmiştir. Moleküler biyoloji deneyleri kapsamında ise tür ve suş düzeyinde tanımlama için PCR-RFLP, 16S rRNA gen dizileme ve RAPD-PCR teknikleri kullanılmıştır.

Araştırma Bulguları: Bir dizi mikrobiyolojik deneylerin sonucunda 26 adet bakteri potansiyel laktik asit bakterisi olarak izole edilmiştir. Bunlardan 25 adedinin *Lactobacillus*, *Pediococcus* ve *Enterococcus* cinslerine ait olduğu tespit edilmiş ve tür ve suş düzeyinde tanımlanmaları sağlanmıştır. Kalan bir adet izolat ise *Staphylococcus hominis* olarak tanımlanmıştır.

Sonuç: Çalışmamız sonucunda 25 adet laktik asit bakterisi gen dizileme ve RAPD-PCR teknikleri kullanılarak tür ve suş düzeyinde başarıyla tanımlanmıştır.

ABSTRACT

Objective: The objective of this study was to isolate and identify lactic acid bacteria from traditionally produced food samples in Turkey.

Material and Methods: Traditional sourdough and herb cheese sample were used for the study. The samples were studied to determine their lactic acid bacteria content, and subjected to biochemical and PCR-based molecular biology techniques for identification and typing purposes. The samples were studied for their Gram reaction, catalase activity, gas production, growth at 10°C and 45°C, 6% and 16% NaCl and pH 4.4 and pH 9.6 for the biochemical tests. For the molecular biology experiments, PCR-RFLP, 16S rRNA gene sequencing and RAPD-PCR were performed to identify organisms at the species and strain level.

Results: Upon completion of a series of microbiology experiments, a total of 26 potential lactic acid bacteria were isolated. Among those, 25 of them belonged to the genera *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Enterococcus* they were further identified at species and strain level. The remaining isolate was identified as *Staphylococcus hominis*.

Conclusion: Identification of 25 lactic acid bacteria at species and strain level was successfully achieved using gene sequencing and RAPD-PCR.

GİRİŞ

Fermentasyon işlemi yüzyıllardan beri gıdaların besin değerinin zenginleşmesi ve raf ömrünün daha uzun olmasını sağlamak amacıyla sıkça kullanılan bir teknik olmuştur. Fermentasyon işlemi gerçekleştiren mikroorganizmalar aynı zamanda insan vücudu için gerekli olan amino asit ve vitaminleri de üretmektedir (Kabak ve Dobson, 2011). Yapılan birçok çalışmada fermente ürünlerde dominant olan mikroorganizmaların laktik asit bakterileri olduğu belirlenmiştir. Laktik asit bakterilerinin mevcut karakteristik özelliklerinin değiştirilmesi ve yeni endüstriyel fenotiplerin oluşturulması için genetik manipülasyon çalışmalarında ciddi bir artış gözlenmektedir. Birçok bilim insanı laktik asit bakterilerinin doğal yollardan izole edilmesine odaklanmıştır. Laktik asit bakterilerinin büyük bir kısmı tabiattan kolayca izole edilebilen, gıda endüstrisinde ve insan sağlığında önemli bir yere sahip olan mikroorganizmalardır (Gezginç ve Akyol, 2010; Leroy ve De Vuyst, 2004). Laktik asit bakterileri, aralarında *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Sporolactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Carnobacterium* cinslerini de barındıran çok sayıda alt gruptan oluşmaktadır.

Fermente ürünlerdeki laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve sınıflandırılması için çeşitli biyokimyasal testler mevcuttur. Laktik asit bakterileri Gram pozitif, katalaz negatif, çubuk ya da kok şekilli ve düşük pH seviyelerine toleranslı organizmalardır. Ancak biyokimyasal testlerin sonuçları birçok tür için ortak olup yeterli derecede ayırtırmayı sağlayacak kadar bilgi vermemektedir. Bu nedenle genetik yöntemler de tercih edilerek daha detaylı bir sınıflandırma yapılmaktadır. Çalışmamız kapsamında, izole kültürlerin biyokimyasal olarak tanımlanması için Gram boyama, bakteri morfolojisi, katalaz testi, gaz testi, 10 °C ve 45 °C sıcaklıkta, pH 4,4 ve pH 9,6'da ve %6 (g/mL) ve %16 (g/mL) NaCl konsantrasyonlarında gelişim durumları incelenmiştir. Genetik olarak tanımlama için kullanılan teknikler arasında ise PCR bazlı teknikler bulunmaktadır. (RAPD-PCR, PCR-RFLP ve DNA dizileme) (Sengun ve ark., 2009; Cebeci ve Gürakan, 2011). RAPD-PCR genellikle aynı türe ait izolatların kendi aralarında sınıflandırılması için kullanılırken PCR-RFLP ise tür düzeyinde ayrımlar için kullanılmaktadır (Cebeci ve Gürakan, 2008). 16S rRNA gen dizileme yöntemi ise tür tayininde güvenilir sonuçlar vermesi nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada, geleneksel Türk fermente gıdalarından olan ekşi hamur ve Van otlı peynirinden laktik asit bakterilerinin izole edilmesi, biyokimyasal ve genetik yöntemler kullanılarak tanımlanması ve ayırtılması amaçlanmaktadır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Bakterilerin izolasyonu

Geleneksel yöntemlerle üretilmiş olan birer adet Van otlı peynir örneği ve Aydın'dan geleneksel ekşi hamur örneği aseptik koşullar altında spatül yardımıyla küçük parçalar haline getirilmiştir. İzolasyon çalışmaları için MRS sıvı besiyeri (Merck, Almanya) ve M17 sıvı besiyerine (Merck, Almanya) ekim yapıp 48 saat 37 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. Gelişme gözlemlenen besiyerlerinde 10⁻¹- 10⁻⁵ oranlarında PBS tampon çözeltisinde seri seyreltme yapılmıştır. PBS tampon çözeltisinde seyreltilen örnekler MRS ve M17 katı (Merck, Almanya) besiyerlerine yayma ekim yapıp aynı sıcaklıkta 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. MRS besiyerinde inkübasyon sırasında oksijeni ortamdaki uzaklaştırmak amacıyla Anaerocult A ve anaerobik kavanoz (Merck, Almanya) kullanılmıştır. Gözlem yapılabilen (10⁻⁴ ve 10⁻⁵) besiyerlerinden seçilen farklı koloni tipleri çizgi ekim yöntemiyle M17 ve MRS katı besiyerlerine ekilip 48 saat 37 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İzole edilen örneklerin isimlendirilmesi ise ayrı besiyerlerinde üretilen örnekler MRS ve M17 koduyla başlayıp, ardından da Van otlı peynir için VP, ekşi hamur izolatları içinse E harfiyle kodlanmıştır. Stok için tüplere dökülen M17, MRS katı besiyerleri eğik şekilde dondurulduktan sonra çizgi ekim yapıp +4 °C'ye kaldırılmıştır.

Biyokimyasal testler ve farklı koşullar altında çoğalma

Bakterilerin morfolojileri için Gram boyama (Merck, Almanya) reaksiyonları üretici firmanın talimatlarına uygun olarak yapılmıştır. Katalaz testi uygulaması için %30 hidrojen peroksit solüsyonu kullanılmıştır. Solüsyon mikroskopik slayt üzerine yerleştirilen bir miktar izolat üzerine damlatılmış ve baloncuk oluşup oluşmadığı gözlenmiştir. Gaz testi için ise izolatların glikozdan CO₂ üretimleri

incelenmiştir. 10mL sıvı besiyerine Durham tüpleri ters bir şekilde yerleştirilmiş ve besiyerleri otoklavlanmıştır. MRS kodlu organizmalar doğrudan MRS sıvı besiyerine ekilmiş, M17 kodlu organizmalar ise %0.5 (g/L) glikoz eklenen modifiye M17 besiyerine ekilmiştir. İzolatların uygun besiyerlerine ekimi yapılarak 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İzole edilen kültürlerin pH'sı, pH metre kullanılarak (ThermoScientific, ABD) 9.6 ve 4.4'e sabitlenmiş M17 ve MRS sıvı besiyerlerinde 72 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Farklı sıcaklıklarda (10 °C ve 45 °C) ve farklı tuz konsantrasyonlarında (%6 NaCl ve %16 NaCl (g/mL)) gelişimleri incelenmiştir.

DNA izolasyonu

DNA izolasyonu üreticinin (Axygen DNA izolasyon kiti, ABD) prosedürüne göre yapılmıştır. 2mL'lik santrifüj tüplerine aktarılan kültürlü sıvı besiyerleri 12.000g hızında 30 sn santrifüj edilerek bakterilerin pelet şeklinde çökmesi sağlanmıştır. Pelet üzerine 20µL lizozim eklenerek 30 dk. bekletilmiş, ardından 0,25M'lık EDTA'dan 30µL eklenerek 5 dk. buzda bekletilmiştir. Buzdan çıkarılan örnekler 450µL tampon G-A eklendikten sonra 15 sn vortekslenmiş ve ardından 65 °C su banyosunda 10 dk. bekletilmiştir. 400µL tampon G-B ve 1 mL tampon DV-A eklenen örnekler iyice karıştırıldıktan sonra 12.000g hızında 2 dk. santrifüj edilmiştir. Oluşan mavi faz atıldıktan sonra tekrar 1 mL tampon DV-A eklenmiş ve tekrar 12000g hızında 2 dk. santrifüj edilmiştir. Yeni 2 mL'lik santrifüj tüplerine Spin-filtre konulmuş ve santrifüj sonrası altta kalan şeffaf faz spin-filtrelere aktarılmıştır. Tekrar 12.000g hızda santrifüj yapılmıştır. Filtrata 400µL tampon BV eklenmiştir. Yeni 2mL'lik santrifüj tüplerine konan Miniprep kolonu üzerine tampon BV eklenmiş filtrat aktarılmıştır. 12.000g hızda 1 dk. santrifüj edilmiştir. Filtrat atıldıktan sonra miniprep kolon üzerine 500µL tampon W1 eklenip 12.000g hızında 1 dk. santrifüj edilmiştir. Filtrat tekrar atılmış ve 700µL tampon eklenip 12.000g hızda 1 dk. santrifüj edilmiştir. Bu işlem tekrarlanıp oluşan filtrat atıldıktan sonra üzerine 150µL elüsyon tamponu eklenerek DNA izolasyonu tamamlanmıştır. DNA izolatlarının konsantrasyonları NanoDrop 2000 spektrofotometre (ThermoScientific, ABD) kullanılarak ölçülmüştür.

PCR (polimeraz zincir reaksiyonu)

Polimeraz zincir reaksiyonu için SimpliAmp Thermal Cycler (ThermoScientific, ABD) cihazı kullanılmıştır. Her bir reaksiyon için 50µL hacminde karışım hazırlanmıştır. Bu karışım için 50mM MgCl₂ (Dr. Zeydanlı, Turkey), 10 mM 9699-forward primer (Oligomer, Türkiye), 10 mM 9700-reverse primer, 20mM dNTP karışımı (Dr. Zeydanlı, Turkey), 5µL 10X amonyum tampon solüsyonu (Dr. Zeydanlı, Turkey), 1500U *Taq* DNA polimeraz (Dr. Zeydanlı, Türkiye) ve 150ng genomik DNA 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpünde karıştırılmıştır. PCR reaksiyonu koşulları ise şu şekildedir: başlangıç denaturasyonu 95 °C'de 2 dk. ve 35 döngü boyunca 95 °C'de 1 dk. denaturasyon, 58 °C'de 1 dk. bağlanma ve 72 °C 'de 1 dk. uzatma ve son olarak da 72 °C 'de 10 dk. son uzatma işlemleri yapılmıştır.

PCR-RFLP

PCR-RFLP işlemi mayalar, laktik asit bakterileri ve gram pozitif bakterileri için ucuz, hızlı ve kolay bir tanımlama yöntemidir (Esteve-Zarzoso ve ark., 1999; Ruiz ve ark., 2000). PCR-RFLP için SimpliAmp Thermal Cycler kullanılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri *TaqI*, *Mbol*, *XbaI*, *LweI* (ThermoFisher Scientific, ABD) reaksiyonu koşulları ise üretici talimatları doğrultusunda belirtilen konsantrasyon ve sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir.

PCR ürünlerinin dizilemesi

PCR ürünleri EasyPure PCR saflaştırma kitiyle saflaştırılmıştır. Her bir 50 µL'lik PCR ürünü için 5 µL bağlama tampon eklenmiştir (BT). BT-PCR ürün karışımı spin kolon'a aktarılıp 10,000g hızda 1 dk santrifüj edilmiştir. Ardından 650µL yıkama tamponu eklenip 10,000g hızında 2 dk. santrifüj edilmiştir. Son olarak temiz 1.5mL'lik santrifüj tüpüne 40 µL elüsyon tamponu eklenip 10,000g'de 1 dk. santrifüj edilip saflaştırma işlemi tamamlanmıştır. Saflaştırılmış PCR ürünleri MedSanTek (İstanbul, Türkiye) adresinde dizilenmiştir. Dizileme sonuçları MEGAX programı (Kumar ve ark., 2018) kullanılarak incelenmiş ve BLAST analizi (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kullanılarak tür tayinleri yapılmıştır.

RAPD-PCR

RAPD-PCR için SimpliAmp Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır. Reaksiyon için 50 µL'lik karışım hazırlanmıştır. Bu karışım için 50mM MgCl₂, 10mM Primer M13 (Oligomer, Türkiye), 25mM dNTP karışımı, 5µL 10X amonyum tampon solüsyonu, 1500U *Taq* DNA polimeraz (Dr. Zeydanlı, Türkiye) ve 150ng genomik DNA 1.5 mL'lik santrifüj tüpünde karıştırılmıştır. RAPD-PCR cihaz koşulları ise şu şekildedir: başlangıç denaturasyonu 95 °C'de 2 dk. ve 35 döngü boyunca 95 °C'de 1 dk. denaturasyon, 42 °C'de 35 sn bağlanma ve 72 °C'de 2 dk. uzatma ve son olarak da 72 °C'de 10 dk. son uzatma işlemleri yapılmıştır.

Jel görüntüleme

PCR ürünleri %1.5'luk Agaroz (BioMax) jelde 60 dakika 60 V'ta yürütülmüştür. Etidyum bromürle boyanan DNA'lar Jel Görüntüleme Cihazında (Bio-Rad Chemidoc) UV ışık altında görüntülenmiştir.

Filogenetik analizler

RAPD-PCR profilleri GelComparII (AppliedMaths, Belçika) programı kullanılarak incelenmiş ve profil dendrogramları çizilmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Ülkemiz geleneksel fermente ürünler açısından değerlendirildiğinde oldukça zengin bir çeşitliliğe sahiptir. Ancak ne yazık ki tanınırlık açısından aynı şeyi söylemek mümkün değildir. Fermente ürünlerin mikrobiyal içeriklerinin tanımlanması ve çeşitliliklerinin ortaya konulması için yapılacak olan çalışmalar bu zenginliğin tanıtılması amacıyla da kullanılabilir. Ülkemizde Van otlı peyniri ve ekşi hamur örneklerinin laktik asit bakteri florası üzerine yapılmış olan çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Bakırcı ve Köse, 2017, Gerçekaslan ve ark., 2012, İşleyici ve Akyüz, 2009, Sağdıç ve ark., 2003). Çalışmamızın amacı Van otlı peynir ve ekşi hamur örneğinde bulunan Gram pozitif, kok/basil ve katalaz negatif örnekler üzerinde biyokimyasal ve genetik bazlı testler yaparak laktik asit bakteri izolatlarını tanımlanmaya ve tiplendirmeye çalışmaktır.

Bakteri izolasyonları, bakteri morfolojisi, biyokimyasal testler ve mikrobiyolojik gelişim testleri

MRS ve M17 besiyerlerine ekilen geleneksel Van otlı peynirinden 14 izolat, ekşi hamur mayasından da 12 izolat olmak üzere toplamda 26 izolat başarıyla elde edilmiştir. Gram boyamaları sonucu bütün kültürler Gram pozitif olarak gözlenmiştir. M17 sıvı besiyerinde üreyen kültürler kok, MRS sıvı besiyerinde üreyen kültürler kok/basil olarak incelenmiştir (Çizelge 1). Taze kültürler üzerine hidrojen peroksit damlatılması sonucu yalnızca MRS-VP1 örneği katalaz pozitif olarak tanımlanmış, kalan diğer örnekler ise katalaz negatif olarak tanımlanmışlardır (Çizelge 1 ve Çizelge 2). Durham tüpleri kullanılarak yapılan CO₂ gaz testi sonucunda ise tüm örnekler negatif olarak gözlenmiştir.

pH değeri 9.6'ya ayarlanmış M17 sıvı besiyerlerindeki bütün örnekler 37 °C'de 72 saat inkübasyon sonucunda normal seviyede gelişim göstermiştir. pH değeri 9.6'ya ayarlanmış MRS sıvı besiyerlerindeki MRS-E5, MRS-E6, MRS-E9 ve MRS-E10 örnekleri 37 °C'de 72 saat inkübasyon sonucunda normal değerlerin üzerinde gelişim göstermişlerdir. Geriye kalan MRS-E3, MRS-E8, MRS-VP1, MRS-VP2, MRS-VP3, MRS-VP4, MRS-VP5 ve MRS-VP8 örnekleri normal değerlerde gelişim göstermişlerdir. pH değeri 4.4'e ayarlanmış M17 sıvı besiyerlerindeki M17-VP kültürleri 37 °C'de 72 saat inkübasyon sonucunda normal değerlerden bir miktar fazla gelişim göstermişlerdir. pH 4.4 değerindeki sıvı besiyerine ekilen M17 E izolatlarının hiç birinde gelişim gözlenmemiştir. pH değeri 4.4'e ayarlanmış MRS sıvı besiyerlerindeki MRS-VP1, MRS-VP3, MRS-VP4 ve MRS-E örneklerinin ise tamamında 37 °C'de 72 saat inkübasyon sonucunda normal değerlerin üzerinde gelişim gözlenmiştir. MRS-VP2, MRS-VP5 ve MRS-VP8 örneklerinde normal değerlerde gelişim göstermişlerdir. (Çizelge 1) İzolatların hepsinde 45 °C'de 48 saat inkübasyon sonucunda gelişim gözlenmiştir. 10 °C'de 48 saat inkübasyon sonucunda ise örneklerin hiçbirinde gelişim gözlenmemiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. İzolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri ve mikrobiyoloji testleri**Table 1.** Morphological, biochemical and microbiological testing of the isolates

İzolat Adı	Gram boyama	Katalaz	pH4.4	pH9.6	45 °C	10 °C	%6	%16	Gaz
MRS-VP1	(+) kok	+	++++	+	+	-	-	-	-
MRS-VP2	(+) basil	-	+	+	+	-	-	-	-
MRS-VP3	(+) basil	-	+++	+	+	-	+	-	-
MRS-VP4	(+) basil	-	++++	+	+	-	-	++	-
MRS-VP5	(+) basil	-	+	+	+	-	+	-	-
MRS-VP8	(+) basil	-	++	+	+	-	-	-	-
M17-VP1	(+) kok	-	++	+	+	-	+	-	-
M17-VP2	(+) kok	-	++	+	+	-	+	-	-
M17-VP3	(+) kok	-	++	+	+	-	+	-	-
M17-VP4	(+) kok	-	++	+	+	-	+	-	-
M17-VP5	(+) kok	-	++	+	+	-	+	-	-
M17-VP6	(+) kok	-	++	+	+	-	+	-	-
M17-VP7	(+) kok	-	++	+	+	-	+	-	-
M17-VP8	(+) kok	-	++	+	+	-	+	-	-
M17-E1	(+) kok	-	-	+	+	-	+	-	-
M17-E2	(+) kok	-	-	+	+	-	+	-	-
M17-E3	(+) kok	-	-	+	+	-	+	-	-
M17-E4	(+) kok	-	-	+	+	-	+	-	-
M17-E5	(+) kok	-	-	+	+	-	+	-	-
M17-E6	(+) kok	-	-	+	+	-	+	-	-
MRS-E3	(+) kok	-	+++	+	+	-	+	-	-
MRS-E5	(+) kok	-	+++	+++	+	-	+	-	-
MRS-E6	(+) kok	-	+++	+++	+	-	+	-	-
MRS-E8	(+) kok	-	+++	+	+	-	+	-	-
MRS-E9	(+) kok	-	+++	+++	+	-	+	-	-
MRS-E10	(+) kok	-	+++	+++	+	-	+	-	-

%6 NaCl (g/mL) konsantrasyonlu M17 besiyerlerindeki kültürlerin tamamında 37 °C'de 48 saat inkübasyon sonucunda gelişim gözlenmiştir. %6 NaCl (g/mL) konsantrasyonlu MRS sıvı besiyerlerindeki MRS-VP3, MRS-VP5 ve MRS-E örneklerinin tamamında gelişim gözlenmiştir. MRS-VP1, MRS-VP2, MRS-VP4 ve MRS-VP8 örneklerinde ise gelişim gözlenmemiştir. %16 (g/mL) NaCl konsantrasyonlu M17 sıvı besiyerlerinde M17-E örneklerinin hiç birinde gelişim gözlenmemiştir. M17-VP2, M17-VP7 ve M17-VP8 örneklerinde gelişim gözlenmiş, geri kalan M17-VP örneklerinde ise gelişim gözlenmemiştir (Çizelge 1).

Moleküler karakterizasyon

Biyokimyasal tanımlanması yapılan kültürlerin tür seviyesinde tanımlanması için öncelikli olarak PCR-RFLP işlemleri uygulanmıştır. Ancak elde edilen sonuçlar laboratuvarımızda bulunan kısıtlı sayıda laktik asit bakteri referans kültürleriyle eşleştirememiştir. Bu sebeple, izolatların tanımlama işlemlerinin yapılabilmesi için saflaştırılmış PCR örneklerinden 16S rRNA gen bölgesi için dizileme yapılmıştır (Çizelge 2). Dizileme işlemleri sonucunda Van otlı peyniri izolatlarından MRS besiyerine ekilen izolatların büyük çoğunluğu *L. plantarum* olarak tanımlanmış, bir izolat ise *Staphylococcus hominis* olarak tanımlanmıştır. *L. plantarum* suşu fermente bitkisel ürünlerde sıklıkla rastlanılan bir türdür, Van otlı peynirlerinde en sık rastlanılan laktobasil türü olduğuna dair yayınlar mevcuttur (Sağdıç ve ark., 2003, İşleyici ve Akyüz, 2009). *S. hominis* suşu ise hayvan ve insan cilt yüzeyinde bulunan koagülaz negatif bir bakteri türüdür. Bu bakteriler genellikle oportünistik patojenlerdir. Koagülaz negatif *Staphylococcus* cinsi organizmalara Fransız peynirlerinde, soslerde ve klinik ortamlarda rastlandığı bildirilmiştir (Coton ve ark., 2010). *S. hominis* türünün bakteriyosin ürettiği ve bu sayede *S. aureus* türünün gelişimini engellediği bildirilmektedir (Pauer ve ark., 2019). *S. hominis* türünün aksine *S. aureus* koagülaz pozitif bir organizmadır ve gıda endüstrisi ve insan sağlığı için önemli bir sorun olduğu bilinmektedir. Tekinsen ve Ozdemir 2006 yılında Van otlı peyniri üzerine yaptıkları çalışmada bütün örneklerde *S. aureus* türü bakterileri tespit etmişlerdir. *S. hominis* türünün Van otlı peynirinde bulunması, gıda zehirlenmesinin önemli nedenlerinden biri olan *S.*

aureus bakterisine karşı önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu sebeple *S. hominis* izolatının antibakteriyel özelliklerine yönelik çalışmaların yapılması planlanmaktadır.

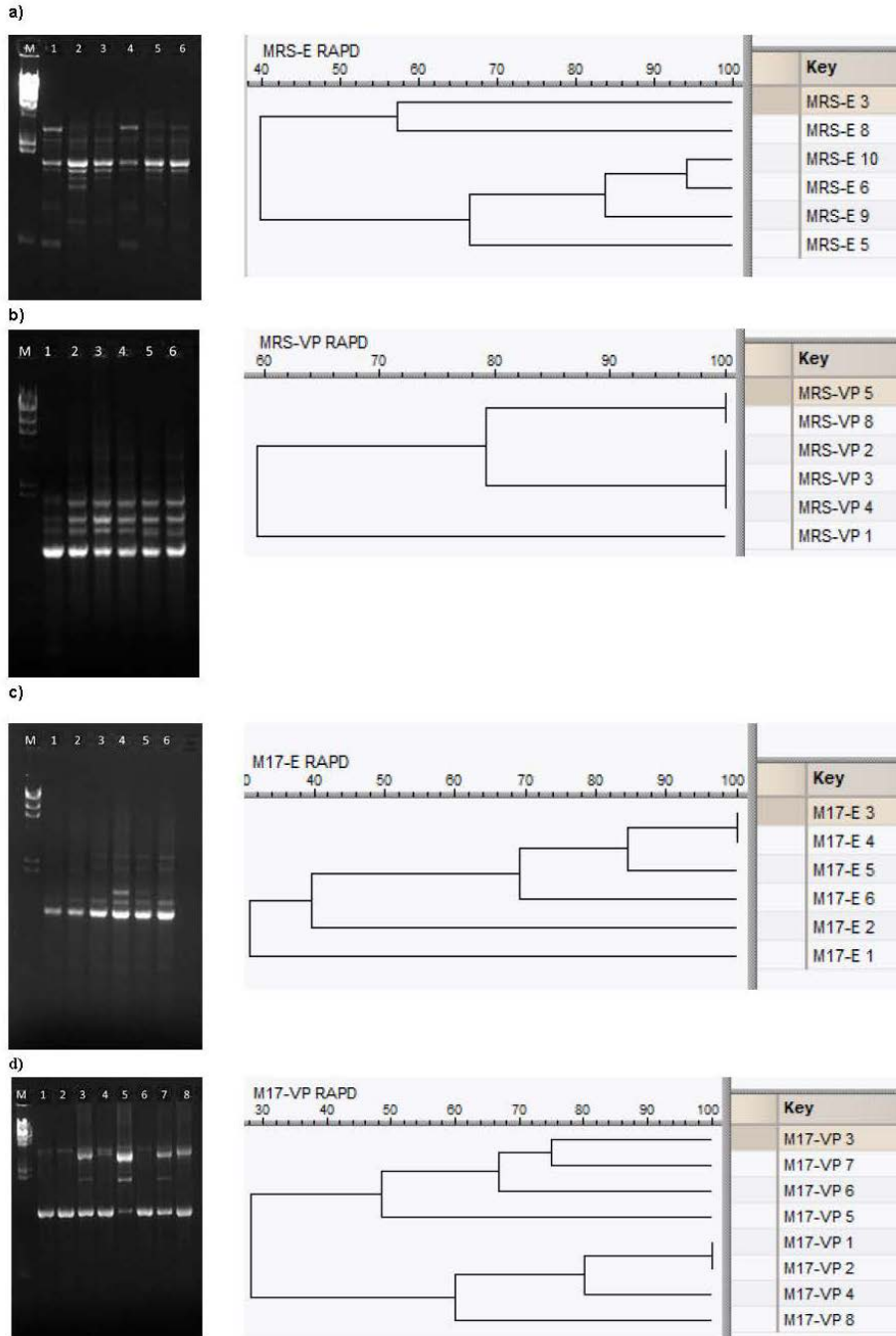
Çizelge 2. Geleneksel Van otlu peynirinden ve hamurdan izole edilen kültürlerin 16S rRNA gen dizilimi sonucunda ait oldukları türler
Table 2. Species assignment of bacterial cultures isolated from traditional Van herb cheese and sourdough according to the sequencing of 16S rRNA gene

Kültür	Kaynak	Tür
MRS-VP1	Geleneksel Van otlu peyniri	<i>Staphylococcus hominis</i>
MRS-VP2	Geleneksel Van otlu peyniri	<i>Lactobacillus plantarum</i>
MRS-VP3	Geleneksel Van otlu peyniri	<i>Lactobacillus plantarum</i>
MRS-VP4	Geleneksel Van otlu peyniri	<i>Lactobacillus plantarum</i>
MRS-VP5	Geleneksel Van otlu peyniri	<i>Lactobacillus plantarum</i>
MRS-VP6	Geleneksel Van otlu peyniri	<i>Lactobacillus plantarum</i>
MRS-E3	Ekşi Hamur	<i>Pediococcus acidilactici</i>
MRS-E5	Ekşi Hamur	<i>Pediococcus acidilactici</i>
MRS-E6	Ekşi Hamur	<i>Pediococcus acidilactici</i>
MRS-E8	Ekşi Hamur	<i>Pediococcus acidilactici</i>
MRS-E9	Ekşi Hamur	<i>Pediococcus acidilactici</i>
MRS-E10	Ekşi Hamur	<i>Pediococcus acidilactici</i>
M17-E1	Ekşi Hamur	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-E2	Ekşi Hamur	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-E3	Ekşi Hamur	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-E4	Ekşi Hamur	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-E5	Ekşi Hamur	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-E6	Ekşi Hamur	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-VP1	Geleneksel Van otlu peyniri	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-VP2	Geleneksel Van otlu peyniri	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-VP3	Geleneksel Van otlu peyniri	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-VP4	Geleneksel Van otlu peyniri	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-VP5	Geleneksel Van otlu peyniri	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-VP6	Geleneksel Van otlu peyniri	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-VP7	Geleneksel Van otlu peyniri	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-VP8	Geleneksel Van otlu peyniri	<i>Enterococcus faecium</i>

MRS besiyerine ekilen ekşi hamur örneğinden toplam 6 adet bakteri izolatu seçilmiş, bunların hepsi dizileme işlemi sonrasında *Pediococcus acidilactici* olarak tanımlanmıştır. *Pediococcus* cinsi organizmalara ekşi hamur çalışmalarında rastlanıldığı görülmektedir (Bakırcı ve Köse, 2017). Gül ve arkadaşları 2005 yılındaki çalışmalarında *P. acidilactici* türüne rastladıklarını bildirmişlerdir. *P. acidilactici* suşlarına potansiyel probiyotik özellikleri nedeniyle probiyotik çalışmalarda da rastlanılmaktadır (Barbosa ve ark., 2015, Takata ve ark., 2011, Ferguson ve ark., 2010).

M17 besiyerine ekilen Van otlu peyniri izolatları ise *Enterococcus faecium* olarak belirlenmiştir. *Enterococcus* türleri süt ve süt ürünlerinde sıklıkla rastlanılan bakteriler arasındadır (İşleyici ve Akyüz, 2009, Gelsomino ve ark., 2002). Lipolitik ve proteolitik özellikleri sayesinde geleneksel peynirlerin tipik tatlarına katkıda bulunmaktadırlar (Vancannet ve ark., 2002; İnoğlu ve Tuncer, 2013; Santos ve ark., 2015; Kesenkaş ve ark., 2016; Amaral ve ark., 2017). M17 besiyerine ekimi yapılan ekşi hamur örneği izolatlarının hepsi yine *E. faecium* olarak tanımlanmıştır. Ekşi hamurdan izole edilen *E. faecium* türlerinin varlığı literatürde bildirilmiştir (Tan ve ark., 2013; Taghi-Zadeh ve Nejati, 2017). Probiyotik olarak kullanılabilirlikleri açısından yapılmış olan çok sayıda çalışmada ümit verici sonuçlar elde edilmiştir. Antibakteriyel madde üretimlerinin bulunması, virülans faktörlerinin azlığı/bulunmaması, antibiyotik dirençliliklerinin düşük olması ve kolon kanseri hücre hattına tutunabilme özellikleri nedeniyle potansiyel probiyotik organizmalar arasında görülmektedirler (Tan ve ark., 2013; Santos ve ark., 2015; Amaral ve ark., 2017; Taghi-Zadeh ve Nejati, 2017)

Tür seviyesinde tanımlama işlemlerinin tamamlanmasının ardından izolatlar arasındaki farklılaşmayı görebilmek için M13 primeri kullanılarak RAPD-PCR yapılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Van otlu peyniri ve ekşi hamur izolatlarının RAPD-PCR analizleri ve dendrogramları a) MRS-E izolatları. M: Phage Lambda / HindIII, 1: MRS-E3, 2: MRS-E5, 3: MRS-E6, 4: MRS-E8, 5: MRS-E9, 6: MRS-E10 b) MRS-VP izolatları . M: Phage Lambda / HindIII, 1: MRS-VP1, 2: MRS-VP2, 3: MRS-VP3, 4: MRS-VP4, 5: MRS-VP5, 6: MRS-VP8 c) M17-E izolatları. M: Phage Lambda / HindIII, 1: M17-E1, 2: M17-E2, 3: M17-E3, 4: M17-E4, 5: M17-E5, 6: M17-E6. d) M17-VP izolatları M: Phage Lambda / HindIII, 1: M17-VP1, 2: M17-VP2, 3: M17-VP3, 4: M17-VP4, 5: M17-VP5, 6: M17-VP6, 7: M17-VP7, 8: M17-VP8.

Figure 1. RAPD-PCR analysis and dendrograms of the Van herb cheese and sourdough isolates. a) MRS-E isolates. M: Phage Lambda / HindIII, 1: MRS-E3, 2: MRS-E5, 3: MRS-E6, 4: MRS-E8, 5: MRS-E9, 6: MRS-E10 b) MRS-VP isolates. M: Phage Lambda / HindIII, 1: MRS-VP1, 2: MRS-VP2, 3: MRS-VP3, 4: MRS-VP4, 5: MRS-VP5, 6: MRS-VP8 c) M17-E isolates. M: Phage Lambda / HindIII, 1: M17-E1, 2: M17-E2, 3: M17-E3, 4: M17-E4, 5: M17-E5, 6: M17-E6. d) M17-VP isolates. M: Phage Lambda / HindIII, 1: M17-VP1, 2: M17-VP2, 3: M17-VP3, 4: M17-VP4, 5: M17-VP5, 6: M17-VP6, 7: M17-VP7, 8: M17-VP8.

RAPD-PCR analizi laktik asit bakterilerinin ayrıştırılmasında sıklıkla kullanılan bir analizdir (Cebeci ve Gürakan, 2011). Bunun nedeni çalışılmasının kolaylığı ve suşlar arasındaki farklılıkları göstermedeki hassasiyetidir. Bununla beraber, RAPD-PCR analizlerinin laboratuvarlar arasında farklılık gösterdikleri, tekrarlanabilirliklerinin düşük olduğu ve kontaminasyona açık oldukları bilinmektedir. Bu nedenlerle, tür tanımlaması amacıyla kullanılmamakta, ancak suşların ayırt edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Laboratuvarımızda yapılan RAPD-PCR analizleri, bu problemlerden etkilenmemek amacıyla yüksek standardize edilmiş protokoller kullanılarak ve örneklerin tekrarlanabilirliği üç ayrı kez çalışılarak yapılmaktadır. RAPD-PCR jel fotoğrafları incelendiğinde MRS grubu izolatlarında ortak bir banda rastlanılmamıştır. Ancak M17 grubu izolatlarının çoğunluğunda 2000bp civarında bir bant olduğu gözlemlenmektedir.

MRS-E izolatlarında yapılan RAPD-PCR analizleri sonucunda oluşturulan dendrogramlarda %80 benzerlik eşiği kullanıldığında (Cebeci ve Gürakan, 2011) 6 örnekte 4 ayrı grup olduğu gözlemlenmiştir. En düşük benzerlik ise %40 olarak görülmektedir (Şekil 1a). MRS-VP izolatları değerlendirildiğinde ise %80 benzerlik eşiğinde yalnızca 3 grup olduğu görülmektedir. MRS-VP1 izolatı geri kalan izolatlara olan benzerliği ise %60 seviyesindedir (Şekil 1b). M17 besiyerinden elde edilen sonuçlardan M17-E izolatlarında %80 benzerlik eşiğinde 4 grup oluşmaktadır ve grupların en düşük benzerliği %30 civarındadır (Şekil 1c). M17-VP izolatlarında ise toplam 8 izolat arasında %80 benzerlik eşiğinde 6 ayrı grup olduğu, bu grupların en düşük benzerliklerinin ise %30'dan düşük olduğu görülmektedir (Şekil 1d). Sonuç olarak M13 primerinin Van otlı peyniri ve ekşi hamur izolatlarında başarılı biçimde suşları ayırt edebildiği gözlemlenmektedir.

SONUÇ

Van otlı peynir ve ekşi hamur örneklerinden yapılan laktik asit bakteri izolasyonları sonucunda toplam 26 bakteri izolatı elde edilmiştir. Bu izolatlarda yapılan biyokimyasal testler ve mikrobiyolojik gelişim koşullarının ardından 25 tanesi laktik asit bakterisi olarak değerlendirilmiş ve genetik tanımlama işlemlerine geçilmiştir. 16S rRNA geni dizilemesi işlemi sonucunda izolatların büyük çoğunluğunun *E. faecium* grubuna ait oldukları belirlenmiştir. Ardından gelen baskın türler arasında *P. acidilactici* ve *L. plantarum* türü bakteriler bulunmaktadır. Bir adet izolat ise dizileme sonucunda *S. hominis* olarak tanımlanmıştır. Tür düzeyinde tanımlama işleminin ardından ise suş düzeyinde ayrıştırma sağlamak amacıyla RAPD-PCR çalışılmıştır. Sonuç olarak geleneksel fermente ürünlerden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, tanımlanması ve ayırt edilmesi başarıyla tamamlanmıştır. Çalışmamız sonucunda tanımladığımız bakteri türleri probiyotik potansiyeli bulunan türlerdir. Bu nedenle, bundan sonraki çalışmalarımızda izolatlarımızın probiyotik özellikleri üzerine çalışmalar yapmayı planlanmaktadır. Bu çalışmalar arasında asit ve safra tuzuna dayanıklılık, antibakteriyel madde üretimi ve bağırsak hücre hatlarına tutunabilme özellikleri bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

- Amaral, D.M.F., L.F. Silva, S.N. Casarotti, L.C.S. Nascimento and A.L.B. Penna. 2017. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolated from cheese: Survival in the presence of medications under simulated gastrointestinal conditions and adhesion properties. *Journal of Dairy Science*, 100 (2): 933–949.
- Bakırcı F. ve Köse E. 2017. Ekşi Hamurlardan Laktik Asit Bakterileri ve Mayaların İzolasyonu ve Tanımlanması. *Akademik Gıda*, 15 (2): 149-154.
- Barbosa, J., S. Borges, and P. Teixeira. 2015. *Pediococcus acidilactici* as a potential probiotic to be used in food industry. *International Journal of Food Science & Technology*, 50 (5): 1151–1157.
- Cebeci, A., and G.C. Gürakan. 2008. Molecular methods for identification of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* using methionine biosynthesis and 16S rRNA genes. *Journal of Dairy Research*, 75 (04): 392.
- Cebeci, A., and G.C. Gürakan. 2011. Comparative typing of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains using multilocus sequence typing and RAPD-PCR. *European Food Research and Technology*, 233 (3): 377–385.

- Coton, E., M.H. Desmouts, S. Leroy, M. Coton, E. Jamet, S. Christieans and R. Talon. 2010. Biodiversity of Coagulase-Negative *Staphylococci* in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology*, 137 (2-3): 221–229.
- Esteve-Zarzoso, B., C. Belloch, F. Uruburu, and A. Querol. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49 (1): 329–337.
- Ferguson, R. M. W., D. L. Merrifield, G. M. Harper, M. D. Rawling, S. Mustafa, S. Picchietti, S. J. Davies. 2010. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Microbiology*, 109 (3): 851–862.
- Gelsomino, R., M., Vancanneyt, T.M., Cogan, S., Condon and J. Swings. 2002. Source of *Enterococci* in a Farmhouse Raw-Milk Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (7): 3560–3565.
- Gezginç, Y. ve İ. Akyol. 2010. Geleneksel Yoğurtlardan İzole Edilen *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus*ların Tanımlanması. *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*, 13 (2): 23–29.
- Gül H., Özçelik S., Sağdıç O. and Certel M. 2005. Sourdough bread production with lactobacilli and *S. cerevisiae* isolated from sourdoughs. *Process Biochemistry*, 40 (2): 691-697.
- İnoğlu, Z.N., and Y. Tuncer. 2013. Safety Assessment of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains Isolated from Turkish Tulum Cheese. *Journal of Food Safety*, 33 (3): 369–377.
- İşleyici Ö. ve Akyüz N. 2009. Van İlinde Satışa Sunulan Otlu Peynirlerde Mikrofloranın ve Laktik Asit Bakterilerinin Belirlenmesi. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20 (2): 59-64.
- Kabak, B. and A.D.W. Dobson. 2011. An Introduction to the Traditional Fermented Foods and Beverages of Turkey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51 (3): 248–260.
- Kesenkaş H., Ö., Kınık, K., Seçkin, P., Günç Ergönül, E., Akan E. 2016. Keçi Sütünden Üretilen Sinbiyotik Beyaz Peynirde *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium longum* ve *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* Sayılarının Değişimi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 53 (1): 75-81.
- Leroy, F. and L. De Vuyst. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15 (2): 67–78.
- Pauer, H., T. Glatthardt, N.V. Ferreira, R.B.R. Ferreira, and L.C.M. Antunes. 2019. Bioactive Molecules of the Human Microbiome. *Microbiome and Metabolome in Diagnosis, Therapy, and Other Strategic Applications*, 115–125.
- Ruiz, A., M. Poblet, A. Mas, and J. M. Guillamon. 2000. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S--23S rDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 (6): 1981–1987.
- Sağdıç O., Şimşek B., and Küçüköner E. 2003. Microbiological and physicochemical characteristics of Van herby cheese, a traditional Turkish dairy product. *Milchwissenschaft* 58 (7): 382-385.
- Santos K.M.O., A.D.S. Vieira, H.O. Salles, J.S. Oliveira, C.R.C. Rocha, M.F. Borges and S.D. Todorov. 2015. Safety, beneficial and technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from Brazilian cheeses. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46 (1): 237–249.
- Sengun, I.Y., D.S. Nielsen, M. Karapinar, and M. Jakobsen. 2009. Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. *International Journal of Food Microbiology*, 135 (2): 105–111.
- Taghi-Zadeh, A. and F. Nejati. 2017. Screening of Lactic Acid Bacteria Isolated from Iranian sourdoughs for Antifungal Activity: *Enterococcus faecium* showed the Most Potent Antifungal Activity in Bread. *Applied Food Biotechnology*, 4 (4): 219-227.
- Takata, K., M. Kinoshita, T. Okuno, M. Moriya, T. Kohda, J.A. Honorat and Y. Nakatsuji. 2011. The Lactic Acid Bacterium *Pediococcus acidilactici* Suppresses Autoimmune Encephalomyelitis by Inducing IL-10-Producing Regulatory T Cells. *PLoS ONE*, 6 (11): e27644.
- Tekinsen K.K. and Ozdemir Z. 2006. Prevalence of foodborne pathogens in Turkish Van otlı (Herb) cheese. *Food Control*, 17 (9): 707-711.
- Tan, Q., H. Xu, Z.P. Aguilar, S. Peng, S. Dong, B. Wang and H. Wei. 2013. Safety Assessment and Probiotic Evaluation of *Enterococcus faecium* YF5 Isolated from Sourdough. *Journal of Food Science*, 78 (4): M587–M593.