

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

EKŞİ HAMUR MAYASINDAN İZOLE EDİLEN *LACTOBACILLUS*
TÜRLERİNİN KLASİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
TANIMLANMASI

Mehmet Metin ÇİFCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman

Doç. Dr. Emrah TORLAK

Konya-2017



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



EKŞİ HAMUR MAYASINDAN İZOLE EDİLEN
LACTOBACILLUS TÜRLERİNİN KLASİK VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANIMLANMASI

Mehmet Metin ÇİFCİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı

Aralık-2017

KONYA

Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Mehmet Metin ÇİFCİ tarafından hazırlanan “Ekşi Hamur Mayasından İzole Edilen *Lactobacillus* Türlerinin Klasik ve Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması” adlı tez çalışması 27/12/2017 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan- Danışman

Doç. Dr. Emrah TORLAK

.....

Üye

Doç. Dr. Mustafa Onur ALADAĞ

.....

Üye

Yrd. Doç. Dr. Ali Tefik UNCU

.....

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

Prof. Dr. Ahmet COŞKUN
FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Mehmet Metin ÇİFCİ

Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EKŞİ HAMUR MAYASINDAN İZOLE EDİLEN *LACTOBACİLLUS* TÜRLERİNİN KLASİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANIMLANMASI

Mehmet Metin ÇİFCİ

**Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

Danışman: Doç. Dr. Emrah TORLAK

2017, 39+xi Sayfa

Jüri

Doç. Dr. Emrah TORLAK

Doç. Dr. Mustafa Onur ALADAĞ

Yrd. Doç. Dr. Ali Tefvik UNCU

Ekşi hamur mayası su ile çavdar unu veya buğday unu karışımının mayalar ve laktik asit bakterileri tarafından fermente edilmesi ile elde edilmektedir. Bu süreç laktik asit fermentasyonu ile proteoliz ve uçucu ve küf gelişimini önleyici maddelerin sentezi ile sonuçlanmaktadır. Ekşi hamur mayası ekmeğin yapısal ve duyuşal özelliklerini iyileştirmesinin yanı sıra; ekmeği küf gelişimine bağılı bozulmadan korumaktadır. Ekşi hamur mayasının laktik asit bakteri florasını çoğunlukla *Lactobacillus* türlerinin hetero ve homofermentatif suşları oluşturmaktadır. *Lactobacillus* suşlarının karbonhidrat fermentasyon testleri gibi geleneksel fenotipik tanımlama metotları düşük tekrarüretilebilirlik ve düşük taksonomik ayırım yeteneğine sahiptir. Bu nedenle doğru bir tanımlama için biyokimyasal profile dayalı geleneksel tanımlama ile moleküler yöntemler birlikte kullanılmıştır.

Bu çalışmada Bursa ilinden temin edilen ekşi hamur mayalarından izole edilen *Lactobacillus* suşları biyokimyasal ve moleküler identifikasyon teknikleri ile tanımlanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu ile toplam 68 izolat tür düzeyinde tanımlanabilmiştir. Bununla birlikte bu izolatların 9 tanesi biyokimyasal temelli fenotipik identifikasyon ile tanımlanamamıştır. Her iki teknik ile tanımlanabilen 59 izolat için aynı tanımlama sonucu elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Lactobacillus*, Ekşi Hamur, İdentifikasyon, PZR.

ABSTRACT

MSc THESIS

IDENTIFICATION OF *LACTOBACILLUS* SPECIES ISOLATED FROM SOURDOUGH WITH CLASSICAL AND MOLECULAR METHODS

Mehmet Metin CIFCI

The Graduate School Of Natural And Applied Science Of Necmettin Erbakan
University

The Degree Of Master Of Science
In Molecular Biology And Genetics

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Emrah TORLAK

2017, 39+xi Pages

Jury

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Emrah TORLAK

Assoc. Prof. Dr. Mustafa Onur ALADAG

Asts. Prof. Ali Tevfik UNCU

Sourdough yeast is obtained by the fermentation of a mixture of water and wheat or rye flour by yeasts and lactic acid bacteria. This process ends with lactic acid fermentation, proteolysis and synthesis of volatile compounds and mold growth inhibitors. Sour dough yeast improves the structural and sensory properties of the bread, and also protects the bread from spoilage due to mold formation. The lactic acid bacteria flora of sourdough yeast is mostly hetero- and homofermentative strains of *Lactobacillus* species. Traditional phenotypic identification methods of *Lactobacillus* strains, such as carbohydrate fermentation tests, have low reproducibility and low taxonomic distinction. For this reason, conventional identification based on biochemical profiles and molecular methods have been used together in order to get accurate identification.

In this study, *Lactobacillus* strains isolated from sourdough obtained from Bursa province were defined by biochemical and molecular identification techniques. A total of 68 isolates were identified at the species level by polymerase chain reaction. However, 9 of these isolates were not identified by biochemical based phenotypic identification. The same identification result was obtained for the 59 isolates identified by both techniques.

Keywords: *Lactobacillus*, Sourdough, Identification, PCR.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans tezimin planlanması ve yürütülmesi konularında yardımlarını esirgemeyen, çalışmalarım boyunca her konuda bana sabırla yol gösteren kendisinden gerçekten çok fazla şey öğrendiğim değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Emrah TORLAK'a içtenlikle teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında yanımda olan, her zaman maddi ve manevi desteklerini hissettiğim en büyük motivasyon kaynağım sevgili eşim ve bana her zaman destek olan moral kaynağım çocuklarıma sonsuz teşekkür ediyorum.

Mehmet Metin ÇİFCİ
KONYA-2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	2
2.1. Ekmeğin Tarihçesi	2
2.2. Ekşi Hamur Ekmeği	2
2.3. Ekşi Hamur Yönteminin Esası.....	3
2.4. Laktik Asit Bakterileri	4
2.4.1. Geleneksel Fermente Gıdalarda Bulunan Laktik Asit Bakterileri	5
2.4.2. Laktobasiller	7
2.4.2.1. Ekşi Hamurdan Sık İzole edilen Laktobasiller	7
2.5. Laktik Asit Bakterilerinin Tanılanması.	10
2.5.1. Fenotik Tanımlama	10
2.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	14
2.5.2.1. Gerçek Zamanlı PZR	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1. Ekşi Hamur Mayası Örnekleri	16
3.2. Laktobasillerin İzolasyonu.....	17
3.2.1. Besiyerleri	17
3.2.1.1. Maximum Recovery Diluent (MRD).....	17
3.2.1.2. Tryptone Soy Agar (TSA)	17
3.2.1.3. DE MAN ROGOSA and SHARPE (MRS) AGAR.....	18
3.2.1.4. Brain Heart Infusion Broth	18
3.3. İzolasyon	19
3.4. Stok Kültürler	19
3.5. DNA İzolasyonu	20
3.6. Gerçek Zamanlı PZR Analizi	20
3.7. Fenotipik İdentifikasyon	22
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	23
4.1. Biyokimyasal ve Moleküler Tanımlama Sonuçları	23
4.2. Tartışma	28
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	31
KAYNAKLAR	32



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleotid trifosfat
cDNA	: Complementer deoksiribonükleik asit
HCl	: Hidroklorik asit
KCl	: Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
MnSO ₄	: Manganez sülfat
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
Na ₂ HPO ₄	: Disodyumhidrojen fosfat
°C	: Derece santigrat
FN	: Düşme Sayısı
K	: Potasyum

Kısaltmalar

KOB	: Koloni Oluşturan Birim
BHI	: Brain Heart Infusion
ISO	: International Organization for Standardization
ATCC	: American Type Culture Collection
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TE	: Tris-EDTA
Tm	: Temperature melting
TSA	: Tryptone Soy Agar
UV	: Ultraviyole
MRS	: De Man, Rogosa And Sharpe
EMP	: Embden Mayerhoff Parnas
HMP	: Hekzozmonofosfat

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2.1. Ekmek Starter Kültürü Olarak Kullanılan Üç Türe Ait Gelişme Ve Biyokimyasal Özellikler.....	8
Çizelge 2.2. Ekşi Hamurlardan Sık Olarak İzole Edilen <i>Lactobacillus</i> Türleri.....	10
Çizelge 2.3. Fakültatif Heterofermentatif Laktobasillerin K.hidrat Fermentasyonu.....	11
Çizelge 3.6.1. Kullanılan Gerçek Zamanlı PZR Kitleri (GEN-IAL) Ve Hedef <i>Lactobacillus</i> Türleri.....	21
Çizelge 3.6.2. Her Bir Örnek İçin PZR Karışımı Bileşenleri Ve Hacimleri.....	21
Çizelge 3.6.3. PZR Termal Döngü Programı.....	22
Çizelge 4.1. Biyokimyasal Temelli Fenotipik İdentifikasyon Ve Gerçek Zamanlı PZR Sonuçları.....	23
Çizelge 4.2. API Sonuçlarına Göre Tanımlanan İzolatlar ve Kullandıkları K.hidrat Kaynakları	27

RESİM DİZİNİ

Resim 3.1. MRS Agar Üzerinde Laktik Asit Bakterileri Kolonileri	19
Resim 4.1. API 50 CH Yazılımında Biyokimyasal Profil İle Elde Edilen İdentifikasyon Sonucu	26
Resim 4.2. API 50 CH İdentifikasyon Panelinde <i>Lactobacillus brevis</i> Suşu İle Elde Edilen Reaksiyon Sonuçları	26
Resim 4.3. Gerçek Zamanlı PZR Cihazı Yazılımı Ekran Görüntüsü	28



1. GİRİŞ

Günümüzde tüm dünyada farklı fermentasyon süreçleri ile farklı tipte un ve bileşenler kullanılarak üretilen çeşitli ekşi hamur mayası ekmekleri tüketilmektedir. Ekşi hamur mayası; su ile çavdar unu veya buğday unu karışımının mayalar ve laktik asit bakterileri tarafından fermente edilmesi ile elde edilmektedir. Bu süreç laktik asit fermentasyonu ile proteoliz ve uçucu ve küf gelişimini önleyici maddelerin sentezi ile sonuçlanmaktadır. Ekşi hamur mayası ekmeğin yapısal ve duyuşal özelliklerini iyileştirmesinin yanı sıra; ekmeği küf gelişimine bağılı bozulmadan korumaktadır. Ekşi hamur mayasının fermentasyon sürecinde kullanılan teknoloji laktik asit bakteri popülasyonunu doğrudan veya dolaylı olarak etkilemektedir. Ekşi hamur mayasının laktik asit bakteri florasını çoğunlukla *Lactobacillus* türlerinin hetero ve homofermentatif suşları oluşturmaktadır. *Laktobacillus* suşlarının karbonhidrat fermentasyon testleri gibi geleneksel fenotipik identifikasyon metotları düşük tekrarüretilebilirlik ve düşük taksonomik ayırım yeteneğine sahiptir. Bu nedenle doğru bir identifikasyon için biyokimyasal profile dayalı geleneksel identifikasyon metotları ile moleküler metotlar birlikte kullanılmalıdır. Bu çalışmanın amacı Bursa ilinden temin edilen ekşi hamur mayalarından mezofilik *Lactobacillus* suşlarının izole edilmesi ve biyokimyasal ve moleküler temelli metotlar ile identifikasyonudur.

Ekşi hamurun üretiminin zor olması, ekşi hamur yöntemi ile ekmek yapımının fazla işçilik ve zaman gerektirmesi, üreticilerin kısa sürede ve kapasitelerinin üzerinde ekmek üretmek amacıyla fermentasyon süresini kısaltmaları alışıl gelmiş ekmek lezzetinden uzak sünger yapıdaki ürünlerin tüketime sunulmasına yol açmaktadır. Standardize edilmiş bir ekşi hamur mayasının kullanımıyla, geleneksel aroma elde edilebilir, istenmeyen mikroorganizmaların etkileri ortadan kaldırılarak üretim güvencesi sağlanabilir, dolayısıyla tüketici sağılı korunabilir.

Bu çalışmada geleneksel ekşi hamur mayaları Bursa ili merkez ve Keles, Büyük Orhan, Harmancık, Orhaneli, Mustafa Kemal Paşa ve Karacabey ilçeleri köylerinden toplanmıştır. Ekşi hamur mayası örneklerinden izole edilen *Lactobacillus* türleri biyokimyasal ve moleküler yöntemler ile tanımlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Ekmeğin Tarihçesi

Ekmeğin geleneksel içeriği olarak buğday unu, tuz ve suyun maya ile belli oranlarda karıştırılıp yoğurulması, uygun bir teknikle işlenmesi ve hamurun fermentasyon sonrasında pişirilmesi ile oluşan temel bir gıda maddesidir (Elgün ve Ertugay, 1997). İnsanlığın ekmeği tanınması ve ekmeğin pişirilmesi çok eski çağlara uzanmaktadır. İlk zamanlar buğdayın ezilerek, su ile karıştırılmasıyla, kızgın taşlarda haşlanarak pişirilmesiyle başlayan ekmeğin yapımı; tarihin akışı içerisinde gelişme göstererek, çağımızda ileri tekniklerden faydalanan bir bilim dalı haline gelmiştir (Göçmen, 1996).

Yapılan tarihsel çalışmalarda, ekmeğin yapımının tarihini anlatan eserlerin bundan 7800 yıl öncesine kadar uzandığı belirlenmiştir. Asya kıtasının farklı farklı bölgelerinde ve Çatalhöyük’de M.Ö.5900-5700 yılları arasında topraktan ve taştan inşa edilmiş fırınlar bulunmuştur. M.Ö.3000-2700 tarihleri arasında ise Mısırlılar’ın ekmeğin pişirilmesi noktasında oldukça mesafe kaydettikleri ve M.Ö.2000’li yıllarda birbirinden farklı 16 türde ekmeğin pişirdikleri ortaya çıkarılmıştır (Talay, 1997).

Türkiye’de ekmeğin her gün taze olarak üretilir ve tüketime sunulur. Bu taze tüketim alışkanlığı yapım tekniklerinden dolayı çabuk bayatlama niteliğinde olan ekmeğin uzun süre korunabilmesi açısından birçok sorunu da beraberinde getirmektedir. Türkiye’de pişirilen ekmeğin %10’unun bayatladığı için çöpe atıldığı ve dolayısıyla israf olduğu bilinmektedir. Bayatlama kaynaklı bu israfın önlenmesi için yeni teknikler geliştirilerek uygulanmaya çalışılmaktadır (Anon, 1990).

2.2. Ekşi Hamur Ekmeği

Geleneksel ekmeğin çeşitlerine son yıllarda yabancı ekmeğin çeşitlerinin de ilavesiyle, çok farklı sayıda ekmeğin çeşidinden bahsedilmeye başlanmıştır. Değişik tip ekmeğin yapımı doğal olarak çok çeşitli katkı maddelerinin kullanımını da gündeme getirmiştir. Ayrıca kalitenin iyileştirilmesi amacıyla bakterilerden oluşan kültürler ve mayalar kullanılarak yapılan mayalama teknikleri üzerinde de çalışmalar yapılmaktadır. Ekşi hamur tekniği, geçmiş zamanlardan bu yana kullanılan bir tekniktir. Ekşi hamurda bakteriler ve mayalar beraber etkin olduklarından dolayı bu yöntem doğal floraya

dayanmaktadır. Ekşi hamur ekmeği hacimce uygun olması, etkili aroma ve hoş bir ekmeğ içi yapıya sahip olması ve raf ömrünün uzunluğu ile tercih edilmektedir. Ekşi hamurun hakim florasında laktik asit bakterileri ve mayaların baskın olmasından dolayı, fermentasyonu kontrol etmek ve güvence altına alabilmek için sadece laktik asit bakterilerinden oluşan starter kültür kullanımına gidilmiştir. Ekşi hamurun ve laktik starterlerin ekmeğin karakteristikleri üzerinde pek çok iyileştirici etkisi olduğu tespit edilmiştir (Göçmen, 2001).

Maya katılmaksızın kendi kendine bırakılan hamur bir müddet sonra değişime uğrar, yapısında gaz kabarcıkları oluşur, yumuşar, kendini bırakır ve kokusu fenalaşır. Hamurda oluşan bu değişime hava, su ve unun bileşiminde bulunan mikroorganizmalar neden olur ve bunlar içinde en etkili olanları genel anlamda bakterilerdir. Kendiliğinden fermentasyonla oluşan hamur, mayaların yanında asetik asit ve laktik asit bakterilerini de içerdiği ve tadı ekşi olduğu için bu karışıma “ekşi maya” veya “ekşi hamur” adı verilmektedir (Tamerler, 1986).

2.3. Ekşi Hamur Yönteminin Esası

Ekşi hamur tekniğinin esası sıradan kültür mayalarının yanında havadan ve kullanılan hamur unsurlarından gelen doğal mayaların, sitrik asit ve laktik asit bakterilerinin etkinlik gösterdiği bir hamur parçasını, ondan sonra gelen hamurda maya olarak kullanmaktır (Göçmen, 2001). Ancak bu gün ölkemizde ticari ekmeğ üretiminde ekşi hamur tekniğinin uygulanması bırakılmıştır. Bunun sebebi işçiliğin çok olması ile işletmelerde mayalık hamur için ayrı bir ünite ve ekipman gerektirmesidir. Ayrıca üreticilerin kısa sürelerde oldukça fazla ekmeğ üretme hedefi tüketiciyi alışlagelmiş ekmeğ lezzetinden uzaklaştırmaktadır (Göçmen, 2001).

Son yıllarda, hamur hazırlamada kullanılan ekmeğ mayası miktarının %2-3'lerden %5-6 oranlarına çıkartılması, ekşi maya kullanımının tamamen terkedilmesi ve fermentasyon süreçlerinin sekteye uğratılması sonucunda alışılmış ekmeğ aromasından uzak, süngerimsi yapıda ve kek vari ürünlerin tüketime sunulmasına sebep olmaktadır. Oysa ekmeğin aroma açısından zengin olması için yeterli koşullarda bir fermentasyona gereksinim vardır. Bu sebeple tek başına maya ya da starter kültür kullanımı artmıştır. Ekşi hamur yönteminden etkilenen bazı ölkeler laktik starter uygulamasına ağırlık vermeye başlamışlardır. Bu uygulamada fermentasyonu kontrollü koşullarda devam

ettirmek ve ürün kalitesini güvence altına alabilmek için laktik asit bakterilerinden oluşan starter kültür kullanımı üzerinde durulmuştur (Göçmen ve Gürbüz, 2000).

Starter kültür, yalın bir tanım ile “kontrol altına alınan koşullarda standart kalitedeki bir ürünü meydana getirmek için gıda endüstrisinde kullanılan mikroorganizmalardır”. Bu tanımla birlikte yine yalın olarak “yoğurt mayası, ekmek mayası ve şarap mayası” starter kültürdür (Halkman ve Taşkın, 2001).

2.4. Laktik Asit Bakterileri

Geleneksel fermente gıdaların üretiminde yararlanılan laktik asit bakterileri; Gram pozitif, fakültatif (isteğe bağlı) anaerob, katalaz negatif, hareketsiz, sitokromdan yoksun ve spor oluşturmayan; *Eubacteriales* takımının, *Streptococcaceae* ve *Lactobacillaceae* familyaları içinde yer alan; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Tetragonococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Aerococcus*, *Oenococcus* ve *Pediococcus* cinsi bakterilerdir (Bulut, 2003; Yüksekdağ, 2005).

Laktik asit bakterileri çomak, kok, ovoid ve tetra formasyonda bulunabilirler. Laktik asit bakterileri gelişme sıcaklıkları bakımından termofil ve mezofil özellik göstermektedir. Yüksek tuz konsantrasyonlarında ve 10-45 °C arası sıcaklıklarda gelişme ve alkali veya asitli ortamları tolere etme kabiliyetindedirler (Etöz, 2006). Ayrıca bu bakteriler heterotrof beslenme şekli gösterirler (Şahin, 1995).

Genel olarak laktik asit bakterileri, süt ve süt ürünlerinde, bitkilerde ve bitki artıklarında, insan ve hayvan bağırsak mukozalarında bulunabilirler. Laktik asit bakterileri, glikozu homofermentatif ve heterofermentatif olmak üzere iki şekilde katabolize ederler. Heterofermantatif laktik asit bakterileri glikozu Hekzozmonofosfat (HMP) yoluyla parçalayarak laktik asit yanında etanol, asetik asit ve CO₂ gibi yan ürünler oluştururlar. Homofermantatif laktik asit bakterileri ise glikozu Embden Meyerhoff Parnas (EMP) yolunu kullanarak parçalaması sonucu, laktik asit ve CO₂ oluşturan bakterilerdir. Laktik asit bakterilerince üretilen laktik asidin miktarı türlere göre değişmektedir (Bulut, 2003; Etöz, 2006). Laktik asit bakterileri bu özelliklerinden dolayı geleneksel gıdalarda ve gıda endüstrisinde ürünün muhafazası, duyuusal özellikleri ve besin değerlerinin geliştirilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadırlar.

2.4.1. Geleneksel Fermente Gıdalarda Bulunan Laktik Asit Bakterileri

Süt ürünleri içindeki laktik asit bakterileri ürünlere kendine özgü koku, aroma ve yapı oluşturulmasında yardımcı olmaktadır. Örneğin tereyağında meydana getirdikleri metabolitler neticesinde bilhassa diasetil ile yayık yağı aromasının meydana gelmesini sağlamaktadırlar (Sagdıç ve ark., 2002). Bu bakterilerin oluşturduğu metabolitler ve bakteriosinler yardımıyla bazı patojenlerin inhibe edilmesini de sağlanmaktadır. Örneğin, kefir florasını oluşturan laktik asit bakterileri ve mayaların enterik ve bazı patojen bakteriler üzerine inhibe edici etkileri olduğu tespit edilmiştir (Mumcu, 1997; Sezer, 2003; Etöz, 2006). Laktik asit bakterileri ürettikleri laktik asitle pH'yı değiştirerek ürünün korunmasına yardımcı olurlar (Sagdıç, 2002). Yoğurttaki bulunan laktik asit bakterileri tarafından üretilen laktik asit ve yoğurdun sahip olduğu diğer antibakteriyel maddelerin kolesterol düşürücü, kalın bağırsakta skatol ve indol gibi fenolik bileşikler üreterek canlı dokuya zarar veren ve kanserin meydana gelmesine sebep olan bakterilere karşı inhibe edici, ümmün sistemi kuvvetlendirici, hastalıkları engelleyici, kadınlarda gebelik boyunca ve doğum sonrası kan basıncını düzenleyici özelliği olduğu belirtilmektedir (Canan ve ark., 2004).

Ülkemizde geleneksel yöntemlerle ve starter kültür kullanılmadan üretilen fermente et ürünlerinde hakim mikroflora *Lactobacillus brevis* (%53) olup, diğer mikroorganizmalar ise *Lactobacillus plantarum* (%33) *Pediococcus pentosaceus* (%6), *Lactobacillus pentosus* (%5) ve *Pediococcus acidilacti* (%1) olarak belirlenmiştir (Güleren, 2008). Fermente et ürünlerinde baskın flora laktik asit bakterileridir. Bunlarda en fazla *L. plantarum*, *Lactobacillus sake* ve *Lactobacillus curvatus* türleri bulunmaktadır (Özdemir, 1999; Kaban, 2007). Bu mikroorganizmalar meydana getirdikleri metabolitler ile et ürünlerine özgü özelliklerin oluşturulmasında etkilidirler. Et ürünlerinde laktik asit bakterileri şekerli bileşikler indirgeyerek aroma oluşumuna fayda sağlarlar. Laktik asit bakterilerinin pH düşürücü etkisiyle (>5.3) ürün daha hızlı kurur, nitritin parçalanması ve rengin meydana gelmesini hızlandırır. Daha çok şeker ilave edilmesi durumunda yüksek asitlik oluşmasına sebep olan homofementatif laktik asit bakterilerinin gelişim fazı durağanlaşırken, heterofermentatif laktik asit bakterileri ortamda baskın olurlar. Bu durum yüksek oranda gaz oluşumuna sebep olarak et ürününde gözenekli yapının oluşmasına sebep olabilir (Alperden, 1993).

L. plantarum'un sütte 0.61-0.88 µg/mL laktik asit ve 1.80-3.45 µg/mL hidrojen peroksit meydana getirerek *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*

ve *Staphylococcus aureus* üzerine inhibe edici etkisi tespit edilmiştir (Toksoy ve ark., 1999). Benzer şekilde, *Pediococcus pentosaceus* tarafından üretilen laktik asit ve hidrojen peroksitin *Bacillus megaterium*, *Bacillus brevis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *S. aureus*, *Mycobacterium smegmatis* ve *Yersinia enterocolitica* suşları üzerinde inhibitör etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Erdoğan, 2002). *L. sakei*, *P. pentosaceus* ve *L. plantarum*'un starter olarak kullanılan et ürünlerinde olgunlaşma ve depolama sırasında pH ve su aktivitesinin hızla düşmesi sonucunda *Listeria monocytogenes* sayısının azaldığı belirlenmiştir (Kaya, 2004).

Boza, az miktarda alkol içeren fermente bir üründür ve florasında pek çok laktik asit bakterisi bulunur. Bozada hakim flora olarak bulunan laktik asit bakterileri mayalarla ilişkilidirler (Zorba ve ark., 2003). Danova ve ark., (2005) kımızdan izole ettikleri suşları ticari biyokimyasal identifikasyon paneli kullanarak *L. plantarum*, *L. buchneri* ve *L. salivarius* olarak tanımlamışlardır. Tarhana üretiminde ise kullanılan maya (İlave edilen veya spontan olarak gelişen) ve yoğurt florasından kaynaklanan (*Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus*) mikroorganizmaların gelişmesi neticesinde üretilen etil alkol, CO₂ ve laktik asit ile ürüne has tat ve aroma oluşmaktadır. Tarhanada mikroorganizmalar tarafından en çok oluşturulan asit laktik asittir. Laktik asidin tarhananın pH'sını indirerek üründe arzu edilmeyen mikroorganizmaların gelişimini inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca tarhanada bulunan laktik asit bakterileri besin öğelerinin emiliminin daha kolay olmasına yardımcı olmaktadır (Soyyigit, 2004; Bozkurt ve ark., 2008).

Geleneksel Türk içeceği olan şalgam üretiminde kullanılan, laktik asit bakterilerini de (*L. sanfranciscensis*, *L. pontis*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. alimentarius*, *L. fructivorans*, *L. reuteri*, *L. fermentum*) bulunduran ekşi maya ile fermentasyon sonucu ürünün kırmızı renginin daha iyi oluştuğu belirtilmektedir (Uylaser ve ark., 2008). Turşularda en fazla rastlanılan mikroorganizma *L. plantarum*'dur. Bundan dolayı, turşu yapımında salamura konsantrasyonu bu mikroorganizmaya göre dizayn edilmektedir. Turşu üretiminde kontrollü koşullarda bir fermentasyon sağlanabilmesi için *L. plantarum*'un starter kültür olarak kullanılması gerekmektedir. Böylece daha yüksek konsantrasyonlarda laktik asit oluşumu mümkün olabilmektedir. Kullanılan *L. plantarum* suşu temel etken olmasa da hıyar turşusunda şişmeye neden olabilmektedir. Bu bozulmanın *L. plantarum*'un malik asidi dekarboksile ederek karbondioksit oluşturmasıyla meydana geldiği bildirilmiştir (Aktan ve ark., 1999).

2.4.2. Laktobasiller

Laktobasiller düzgün veya kıvrımlı uzun çubuk şeklinde, spor oluşturmayan, katalaz negatif, Gram pozitif olarak kabul görmekte beraber eski kültürlerde Gram negatif hücreler oluşturan bakterilerdir. Mikroskopik incelemede genellikle uzun zincirler oluşturarak veya tek tek de konumlanabilirler. Genel anlamda hareketsiz, çoğu mikroaerofilik veya anaerobik olup homofermentatif ve heterofermentatif türleri bulunmaktadır. Bitkisel ve hayvansal materyallerde ve değişik gıdalarda (Hububat, et ve süt ürünleri, bira, şarap meyve ve meyve suyu, hamur, turşu ve zeytin) yaygın olarak bulunurlar. Bazı türleri fermente süt ürünlerinin üretiminde önemlidir (Özdemir, 1996).

Lactobacillus cinsi içinde *Betabacterium*, *Streptobacterium* ve *Thermobacterium* olmak üzere 3 farklı alt cins bulunmaktadır. Zorunlu heterofermentatif laktobasiller (Örneğin *L. brevis*) *Betabacterium* alt cinsinde yer almaktadır. Homofermentatif ve fakültatif heterofermentatif *Lactobacillus* türleri ise *Streptobacterium* ve *Thermobacterium* alt cinsi içindedir. *L. acidophilus* ve *L. bulgaricus* *Thermobacterium* alt cinsi içinde yer alır, 40 °C'de optimum gelişirler ve uygun şartlarda sıvı kültürlerinde %3 veya daha yüksek miktarda laktik asit üretebilirler. *L. casei*, *Streptobacterium* alt cinsi içindedir, optimum gelişme sıcaklığı 30 °C'dir ve sıvı kütlelerinde %1,5 veya daha fazla miktarda laktik asit üretebilirler. Laktobasiller fermentasyon esnasında salgıladıkları metabolitler sayesinde fermente gıda ürünlerinin nihai karakteristiklerinin oluşmasında önemli rol oynamaktadırlar (Özdemir, 1996).

2.4.2.1. Ekşi Hamurdan Sık İzole Edilen Laktobasiller

Ekmek hamur fermentasyonunda laktik asit üreten *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* türleri çeşitli araştırmacılar tarafından izole edilmiş ve zamanla çeşitli türde ekmekçilik ürününün gelişimini sağlayan kuru-donmuş formda ticarileştirilmiş kültür preparatlarının üretiminde kullanılmıştır. Bunlardan *L. delbrueckii*, *L. brevis* ve *L. plantarum* starter kültürlerine ilişkin bilgiler Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

L. brevis her çeşit ekmek yapımında kullanılan heterofermantatif yani fermentasyon neticesinde laktik asitle beraber asetik asit, etanol ve diğer aromatik bileşikler üreten bir türdür. Asetik asit oluşumu aynı zamanda bu kültüre koruyucu özellik vermektedir. Kültürlerinde asetik asit:laktik asit oranı yaklaşık 1:4'dür (Dinçer

ve Çam, 1992). *L. plantarum* yumuşak lakin hafif ekşimsi tat istenen ekmek çeşitleri için uygundur. Hızlı asitlenme ile üründe iyi bir tekstür oluşturur. Bu kültür ile çeşitli bilimsel ve ticari kuruluşlar tarafından yapılan denemelerle, Türk tipi ekmekçilikte, Türk ağız tadına uygun tat ve aromayı sağladığı görülmüştür (Dinçerve Çam, 1992). *L. delbrueckii* ekmekte yumuşak ve hoş bir aroma oluşturur. Bu mikroorganizma beslenme açısından değerli olan L(+)-laktik asit oluşturmasıyla önemlidir ve düşük FN (düşme sayısı) değerli çavdar unlarında asitlendirme için uygun olduğu görülmüştür (Dinçer ve Çam, 1992).

Çizelge2.1. Ekmek starter kültürü olarak kullanılan üç türe ait gelişme ve biyokimyasal özellikler (Dinçer ve Çam, 1992).

Kültür	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Gelişme			
Min.sıc.	10 °C	10 °C	10 °C
Opt.sıc.	37 °C	37 °C	37 °C
Maks.sıc.	45 °C	45 °C	45 °C
pH aralığı	3.6-7.0	3.6-7.0	3.6-7.0
Tuz			
% 2.5	Hafif inhibisyon	Hafif inhibisyon	Hafif inhibisyon
% 5	Güçlü inhibisyon	Güçlü inhibisyon	Güçlü inhibisyon
Genel			
Glikoz	Heterofermentatif	Homofementatif	Homofementatif
Fruktoz	+	+	+
Maltoz	+	+	+
Laktoz	+	-	+
Sakaroz	-	-	+
Nişasta	-	-	+
Ana dönüşüm ürünleri	DL-laktik asit, asetik asit, etanol, CO ₂	L(+)-laktik asit	DL-laktik asit

Ekmek eldesinde starter kültür kullanımı ekşi hamur yapımı esasına dayanmaktadır. Ekşi hamur ekmeğin elde edilmesinden yirmi dört saat önce starter kültürle aşılansmış ve uygun koşullarda 16-20 saat bekletilerek bir gün sonraki üretime eklenen sulu bir hamurdur. Sulu hamur bakterilerin serbest hareket edebileceği ve hızla üreyebileceği uygun bir ortamdır. Elde edilmek istenen hamurda kullanılacak un miktarının %10'una yakın un, kendi ağırlığının 1,5 katı ve 25-30 °C sıcaklıkta suyla karıştırıldıktan sonra, sulandırılan una kültür ilave edilir. Hafifçe bir karıştırma

yapıldıktan sonra 25-30 °C’de 16 saat süre ile fermentasyona bırakılır. Bu süre bittikten sonra ekşi hamur için kullanılan un ve su miktarları düşürülerek hazırlanmış olan tuz ve maya içeren ana hamura ilave edilir ve ana hamur ekmek yapımının normal prosedürüne tabi tutulur (Dinçer ve Çam, 1992).

Laktik asit bakterileri peynir, sucuk, yoğurt, ekşi hamur ve ekşi lahana turşusu gibi fermentasyon süreçleri sonunda elde edilen gıdaların üretiminde kullanılan ve sanayi açısından değerli olan bir mikroorganizma grubudur. Ekmek gibi fermente tahıl ürünlerinin yapımında çok yaygın olarak alkol fermentasyonu yapan *Saccharomyces cerevisiae* türü mayalar kullanılmaktadır. Fakat günümüzde bilhassa Asya ve Avrupa ülkelerinde laktik asit bakterilerinin içinde olduğu ve ekşi hamur mayası olarak adlandırılan karışık kültürlerden git gide artan miktarlarda faydalanılmaktadır (Çonve Şimşek, 2003).

Ekşi hamur üretiminde kullanılan ilk starter kültür, Amerika’da kullanılan “San Francisco” starter kültürüdür. Ekşi maya ile buğday ekmeğinin hazırlanması ve ekşi maya mikroflorasının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada, kendiliğinden fermentasyona uğrayan San Francisco tipi ekşi hamur kullanılmıştır. San Francisco tipi ekşi hamurda *Saccharomyces inusitatus* ve *Saccharomyces exiguus* maya türleri teşhis edilmiştir. Aynı çalışmada, belirtilen ekşi hamur örneğinden elde edilen bakteriye *Lactobacillus sanfrancisco* ismi verilmiştir. Araştırmada bu bakteri izolatının undaki maltozun %56’sını kullandığını, *S. exiguus*’un ise maltozu kullanmadığı gözlenmiştir. Ayrıca ekşi maya kullanılarak yapılan ekmeklerde asit miktarının 10 kat daha fazla olduğu ve asetik asit miktarının toplam asidin yarısı kadar olduğu görülmüştür (Gül, 1999).

Ekşi hamurdan en sık izole edilmiş ve tanımlanmış Laktobasiller Çizelge 2.2’de verilmiştir. Ekşi hamur laktik asit bakterileri, metabolik özelliklerinden dolayı özellikle ekmek sektörü açısından birçok önemli özelliğe sahiptirler. Bunlar içinde en önemlileri *L. plantarum*, *L. sanfranciscensis* ve *L. fermentum* gibi türlerdir. Bu bakterilerin yanında *S. cerevisiae* ile *S. exigus*maya türleri yer almaktadır.

Ekşi hamur fermentasyonunda laktik asit bakterileri ve mayaların sürdürdükleri simbiyotik yaşam neticesinde mayalar ve heterofermantatif laktik asit bakterileri hamurun kabarmasından sorumlu olurken, laktik asit bakterileri ekmeğin lezzetini, asitliğini, elastisitesini etkilemektedir (Sıkılı ve Karapınar, 2002).

Çizelge 2.2. Ekşi hamurlardan sık olarak izole edilen *Lactobacillus* türleri

Fermentasyon tipi	Tür
Homofermentatif	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	<i>Lactobacillus casei</i>
	<i>Lactobacillus alimentarius</i>
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Lactobacillus farciminis</i>
Heterofermentatif	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	<i>Lactobacillus sanfrancisco</i>
	<i>Lactobacillus brevis var. lindneri</i>
	<i>Lactobacillus fructivorans</i>
	<i>Lactobacillus reuteri</i>
	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>

2.5. Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması

2.5.1. Fenotipik Tanımlama

Genellikle fenotipik mikroorganizma tanımlama metotları moleküler metotlara göre daha ekonomiktir. Fenotipik tekniklerin bazılarının laktik asit bakterileri için daha elverişli olduğu iddia edilsede, sonuçların yakın akraba türler arasında yeterli ayırım sağlayamadığı iddia edilmektedir. Günümüzde, otomatize fenotipik tanımlama sistemleri ile hızlı ve tekrarlanabilir tanımlama daha az iş gücü ile yapılabilmektedir. Bununla birlikte, bu sistemlerin maliyetli olması, mikroorganizma morfolojisine ilişkin ön bilginin toplanmasının gerekliliği, yeterli yoğunlukta bakteri süspansiyonu hazırlamanın zorunlu olması, biyokimyasal karakteri birbirine benzerlik gösteren türlerin birbirinden ayrılmasının zorluğu gibi dezavantajları da vardır. Bu sebeple, moleküler tanımlama metotlarının kullanılması daha iyi bir sınıflandırma ve ayırım elde etmek amacıyla uygun görülmektedir (McCartney, 2002).

Bilhassa endüstriyel ya da uygulamalı mikrobiyoloji laboratuvarlarında, gıda kaynaklı laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında fenotipik testler halen yaygın kullanılmaktadır. Bu metotlar fizyolojik ve morfolojik özelliklerin belirlenmesini, karbonhidrat fermentasyon testlerini ve protein profillerinin belirlenmesini kapsamaktadır. Gıda teknolojisinde geniş çaplı olarak kullanılan *Lactobacillus* türlerinin fenotipik özellikleri Çizelge 2.3.'te verilmiştir.

Çizelge 2.3.Fakültatif heterofermentatif Laktobasillerin karbonhidrat fermentasyonu (Güley, 2008)

	<i>L. agilis</i>	<i>L. alimentarius</i>	<i>L. bavaricus</i>	<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>	<i>L. casei</i> subsp. <i>pseudopalantatum</i>	<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	<i>L. casei</i> subsp. <i>tolerans</i>	<i>L. conyiformis</i> subsp. <i>conyiformis</i>	<i>L. conyiformis</i> subsp. <i>torquens</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. homohiochii</i>	<i>L. maltaromicus</i>	<i>L. murinus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. sake</i>
Amigdalın	+	o	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	d	+	+
Arabinoz	-	d	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	+	d	+
Sellobioz	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	d	+	+	+	+
Eskulin	+	+	+	+	+	+	-	d	-	+	o	o	+	+	+
Fruktoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galaktoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glukonat	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	o	-	+	+
Laktoz	+	-	+	d	+	+	+	d	+	d	-	+	+	+	+
Maltoz	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	d	+	-
Mannoz	+	+	+	+	+	+	-	+	d	+	+	+	+	+	+
Melezitoz	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	d	-
Melibioz	+	-	+	-	-	-	-	d	-	-	-	+	+	+	+
Rafinoz	+	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	+	+	+	+
Rhamnoz	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Riboz	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Salisin	+	+	+	+	+	+	-	d	-	+	d	+	d	+	+
Sorbitol	d	-	-	+	+	+	-	d	-	-	-	+	-	+	-
Sucroz	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Trehaloz	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	d	+	d	+	+
Ksiloz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-

d; Değişken

Gonzalez ve ark., (2000) balık ve tatlı su rezervlerinden izole edilen 249 adet laktik asit bakterisi suşunu 44 farklı morfolojik ve fizyolojik test ile tanımlamışlardır.

Fakat araştırmacılar bu izolatların büyük kısmını (%90)'ını sadece cins düzeyinde tanımlayabilmiştir. Tuncer (2009) Türk tulum peynirlerinden 39 adet enterokok türü izole etmiş ve bunları geleneksel fenotipik yöntemlerle tanımlamıştır. Araştırma neticesinde elde edilen türler; *Enterococcus faecium* (%43.58), *Enterococcus durans* (%28.21) ve *Enterococcus faecalis* (%28.21) olarak saptamıştır. şanlıbaba ve Akçelik (2000) çiğ süt ve peynir altı suyundan izole ettikleri 73 adet izolatu tanımlamasını geleneksel yöntemler ile gerçekleştirmiştir. Çalışma neticesinde Laktokok izolatlarının 50 adedinin *L. lactis* subsp. *lactis*, 16 adedinin *L. lactis* subsp. *cremoris* ve 7 adedinin ise *L. lactis* subsp. *diacetylactis* olduğu tespit edilmiştir. Sağdıç ve ark., (2002) 20 farklı tereyağı numunesinden 55 adet laktik asit bakterisi izole etmişler ve yaptıkları geleneksel tanımlama çalışması neticesinde bu izolatları *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* (%21.2), *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (%20), *Lactobacillus casei* ssp. *casei* (%15.3), *Streptococcus* sp. (%4.7), *Enterococcus faecium* (%18.8), *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (%2.3), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*) (%7.1), *Leuconostoc gelidum* (*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*) (%4.7) ve *Weissella paramesenteroides* (*Leuconostoc paramesenteroides*) (%5.9) olarak tanımlamışlardır.

Laktik asit bakterilerinin cins ve tür seviyesinde tanımlanmasında kullanılan fenotipik ve biyokimyasal karakterlere dayalı metotların kullanımı yanlış identifikasyon sonuçlarının elde edilmesine sebep olabilmektedir (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011). Corsetti ve ark., (2001) ekşi maya numunelerinde elde ettiği 317 adet muhtemel laktik asit bakterisini ticari biyokimyasal identifikasyon paneli kullanarak tanımlamışlardır. Araştırmacılar bakterilerin sadece %38'inin tür düzeyinde tanımlanabildiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Uganda geleneksel fermente süt ieeğinden izole edilen 113 laktik asit bakterisinden yalnızca 14 tanesi fenotipik testler ile tür seviyesinde tanımlanamamıştır (Muyanja ve ark., 2003). Akpınar ve ark., (2011) çeşitli geleneksel Türk yoğurtlarından izole edilen 208 adet laktik asit bakterisi izolatu klasik fenotipik tanımlama testleri, ticari biyokimyasal identifikasyon paneli ve otomatize identifikasyon sistemi kombinasyonu kullanarak tanımladıkları çalışmaları yalnızca 41 izolatu tür düzeyinde tanımlayabilmiştir. Bu çalışmalar fenotipik tanımlama yöntemlerinin zayıf tekrar edilebilirlik ve düşük taksonomik ayırma özelliği nedeniyle daha çok cins seviyesinde tanımlama için uygun olduğunu göstermektedir.

SDS-PAGE (Sodyum dodesil sulfat-poliakrilamid jel elektroforezi) laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve karakterizasyonu maksadıyla saflaştırılmış

mikroorganizmalardan yararlanarak, toplam hücre proteinlerine ait parmak izinin elde edildiği alternatif bir metot olarak bilinmektedir (Busch ve ark., 1999). Laktik asit bakterilerinin moleküler ilişkisinin açığa çıkarılmasını hedefleyen bir çalışmada SDS-PAGE tekniği kullanılmıştır (Dicks ve ark., 1987). Bu çalışmada, protein profil neticeleri protein bantlarının varlığı/yokluğundan hareketle numerik analizle değerlendirilmeye tabi tutulmuştur. Toplanan veriler ile kümeleme analizi uygulanarak dendogramlar oluşturulmuştur. Dendogramlar irdelendiğinde *L. brevis*, *L. fermentum* ve *L. buchneri* suşlarının oluşturduğu 3 farklı küme elde edilmiştir. Bu çalışmada analiz edilen suşların kendi aralarında ve kendi içlerinde benzerlikleri belirlenebilmiştir. Neticede toplam hücre protein desenlerinden yola çıkılarak suşlar arası filogenetik ilişkilerin belirlenebileceği, fakat sonuçların DNA temelli moleküler metotlar ile desteklenmesi gerektiği belirtilmiştir.

Gıda kaynaklı laktik asit bakterilerinin tanımlanması için yeni moleküler tekniklerin geliştirilmesi önemli bir çalışma alanı haline gelmiştir. Özellikle microarray teknolojisi ve toplam genom sekanslamasının süratle gelişmesi tanımlama için yeni imkanlar sağlamaktadır. Kütle spektrumuna dayalı ve genomik temele dayanmayan tam hücre analizi etkin ayırım gücüne sahip bir diğer teknik olarak ortaya konmuştur. Kültürden bağımsız moleküler yaklaşımlar ile gıdaların mikroflorasının belirlenmesinde bazı tanımlama kısıtlamaları bulunmaktadır. Bu nedenle, bu tanımlama kısıtlamalarının ortadan kaldırılabilmesi için yeni çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Akpınar ve ark., 2011).

Collins ve ark. (1991) tarafından yapılan bir çalışmada 16S rDNA genlerinden yararlanarak toplam 55 adet *Lactobacillus* türünün 3 adet birbirinden farklı uzaklıkta genetik grup meydana getirdiği saptanmıştır. Birinci grupta *L. delbrueckii* ve alt türlerinin, ikinci grupta ise 32 adet *Lactobacillus* ve 5 adet *Pediococcus* türünün (*L. casei*, *L. ruminis*, *L. salivarius*, *Lactobacillus sharpeae* ve *Pediococcus damnosus* gibi), üçüncü grupta ise *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus minor*, *Lactobacillus viridescens*, *Lactobacillus confosus* ve *Leuconostoc paramesenteroides* gibi türlerin olduğu tespit edilmiştir. *Lactobacillus*'un moleküler tiplendirilmesi sonucunda saptanan 55 adet tür *Lactobacillus* cinsinin önemli düzeyde heterojen olduğu göstermektedir. *Lactobacillus* türlerinin moleküler tiplendirilmesi maksadıyla gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise, değişik kültür koleksiyon merkezlerinden tedarik edilen ve çeşitli hayvanların sindirim sistemlerinden izole edilen 34 adet *Lactobacillus* türü kullanılmıştır. Örnekler 16S rDNA genlerine yönelik primerler ile PZR'a tabi tutulmuş

ve sonrasında elde edilen ürünler restriksiyon enzimleri (Bcl I, Bgl II, EcoRI) ile belirli bölgelerden kesilmiştir. Agaroz jel elektroforezinden sağlanan sonuçlar değerlendirildiğinde, değişik genetik uzaklığı olan 4 grubun ortaya çıktığı görülmüştür (Rudtong ve ark.,1993). Laktobasillerin tanımlanması amacıyla yararlanılan bir diğer moleküler biyoloji tekniğinin kullanıldığı çalışmada ise, fermente süt ürünlerinin yapımında kullanılan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. casei* ve *L. helveticus* suşları kullanılmıştır. Çalışmada suşlar 23S rDNA problemleri kullanılarak tanımlanmıştır. SDS-PAGE ile protein profili analizleri de yapılan bu suşların istatistiksel analiz sonuçlarına göre kesin gruplar elde edilmiştir. Araştırma sonuçları bu bakterilerin hızlı ve güvenli bir şekilde tanımlanmasında her iki teknikten de yararlanılabileceğini göstermiştir (Hertel ve ark., 1993). *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri* ve *Lactobacillus johnsonii* türlerinin tanımlanması ve sınıflandırılması maksadıyla yapılan bir çalışmada, 23S rDNA oligonükleotidleri kullanılarak Dot Blot hibridizasyon ürünleri elde edilmiş ve bu mikroorganizmaların toplam hücre protein desenleri ortaya konmuştur. Her iki yöntemle elde edilen veriler kıyaslandığında; *L. johnsonii* ile *L. gasseri*'nin çok yakın bir ilişki içinde, *L. acidophilus*'un ise belli bir genetik uzaklığa sahip olduğu ortaya konmuştur (Pot ve ark.,1993). Yine benzer bir çalışma Tannock ve ark., (1999) tarafından yapılmıştır. Gastrointestinal sistem, silaj ve yoğurt örneklerinden izole edilen laktobasil suşlarının tanımlaması maksadıyla 16S-23S rDNA intergenik spacer bölgelerine özel primerler ile PZR yapılmış ve araştırmada uygulanan metodun bütün izolatlar için kullanılabileceği neticesine varılmıştır. Senini ve ark., (1997) tipik bir İtalyan peyniri olan Fontina'nın mikrobiyotasını belirlemek; Drake ve ark., (1996) süt ürünlerinden elde edilen çeşitli Laktobasilleri tanımlamak; Chen ve ark., (2000) *Lactobacillus casei*, *L. paracasei* ve *L. rhamnosus* arasındaki genetik farklılıkları ortaya koymak; Sohier ve ark., (1999) ise *Lactobacillus hilgardii* ve *Lactobacillus brevis* arasındaki genetik uzaklığı saptamak maksadıyla rDNA oligonükleotid primerleri ile PZR kullanımı yoluna gitmişlerdir.

2.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Başarılı bir PZR temelli moleküler teknik için öncelikle toplam DNA'nın örnekten etkili bir şekilde izolasyonu gereklidir. Toplam DNA izolasyonu ve saflaştırılması pek çok farklı prosedüre başvurulmuş ve gerçekleştirilmektedir. Ancak,

karmaşık matrislerde bulunan tüm bakterilerin DNA'sı her zaman izole edilemeyebilir veya örnekte bulunan tüm mikroorganizmaların DNA'larının izolasyonu aynı seviyede verimli olmayabilir. Bu sebeple, PZR amplifikasyonu materyalde bulunan bütün laktik asit bakterinin amplikonlarının elde edilememesiyle sonuçlanabilmektedir. Bu sonuç incelenen materyalin yeteri kadar homojenize edilememesi, eksik kalmış hücre ekstraktı ve nükleik asit izolasyonu veya PZR ürünlerinin inhibe olması sebebiyle oluşabilmektedir (Justé ve ark., 2008).

Çok çeşitli organizmaların ayırt edilmesinde PZR'de amplifikasyon için kullanılacak bir gen veya genetik markörün seçimi moleküler tanımlama için kritik bir aşamadır. Günümüzde, bakteriyel 16S rRNA ve 23S rRNA genleri mikrobiyal ekoloji araştırmalarında moleküler markör olarak oldukça sık kullanılmaktadır (Justé ve ark., 2008). Bununla birlikte, 16S rRNA geni ile yakın ilişkili türlerin tanımlanmasında zorluklar yaşanmaktadır. Bu nedenle, laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında elongasyon faktörü, rpoB, rpoA, Tu geni, pheS ve RecA genleri benzeri öteki hedef genlerden de yararlanılmaktadır (Justé ve ark., 2008).

Gıdalarda bulunan laktik asit bakterilerinin cins, tür veya serotip seviyesinde tespit edilmesinde kullanılan en hızlı PZR yaklaşımı örnekten ekstrakte edilen toplam bakteriyel DNA'nın takson spesifik primerler ile PZR'ye tabi tutulmasıdır. Bu yöntemin en önemli dezavantajı ise sadece örnekte bulunması ihtimali olan türlerin tespit edilebilmesidir. Bu sebeple, takson spesifik PZR analizleri yöresel peynirler gibi karmaşık mikrobiyal ekosistemlerin analizinde yetersiz kalmaktadır. Her bir bakteri türü için özel primer gerektiğinden dolayı bu yaklaşım süt ürünleri gibi karışık bir mikrofloraya sahip gıdalarda çok tercih edilmemektedir (El-Baradei ve ark., 2007). Geleneksel Mısır Domiati peynirinde bakteriyel mikrobiyotanın biyoçeşitliliği kalıp DNA olarak peynirden doğrudan izole edilen DNA ve türe özel PZR kullanımıyla incelenmiştir. Peynirdeki bakteriyel türlerin tanımlanmasında 31 farklı türe özel primere başvurulmuştur. Araştırmada, türe özel PZR tekniği kullanılarak pek çok *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Leuconostoc* ve *Lactococcus* cinsi mikroorganizma tespit edilebilmiştir (El-Baradei ve ark., 2007).

2.5.2.1. Gerçek Zamanlı PZR

Geleneksel PZR'da, amplifiye edilmiş DNA ürünü analizin son aşamasında tespit edilebilir. Gerçek zamanlı PZR ise, reaksiyon sırasında hedeflenen DNA

molekölünün amplifikasyonunun izlenmesine imkan tanır. Bu sayede veriler jel elektroforezi ve DNA bantlarının mor ötesi ışıktaki görüntülenmesi gibi ilave uygulamalara gerek olmadan değerlendirilebilir (Bogovič ve Matijašič, 2009).

Gerçek zamanlı PZR ürünlerinin analizlerinde, herhangi bir çift sarmallı DNA ile interkalasyon yapabilen spesifik olmayan floresan boyalar veya diziyeye özgü DNA problemlerine etiketlenmiş floresan reporterlardan yararlanılmaktadır. Gerçek zamanlı PZR, reaksiyon esnasında her bir PZR döngüsünde ürünün verdiği ışımaya göre oluşan ürünü tespit edebilen bir sistemdir (Aydın, 2005). Bogovič ve Matijašič, (2009) probiyotik ürünlerde bulunan *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus gasseri* ve *Bifidobacterium infantis*'in selektif ve spesifik tespiti için 16S rRNA gen parçalarının amplifikasyonuna dayalı gerçek zamanlı PZR yönteminin elverişli bir teknik olduğunu kanıtlamışlardır.

Geçek zamanlı PZR mikrobiyal tanımlamanın yanı sıra örnekteki mikroorganizma sayısının belirlenmesi amacıyla da kullanılabilir. İtalyan peynirlerinde hedef gen olarak fenilalanil-tRNA sentaz (PheS) kültürden bağımsız gerçek zamanlı PZR kullanımı *Enterococcus gilvus*'un varlığını ve miktarını belirlemek amacıyla standardize edilmiştir. *Enterococcus gilvus*'un diğer laktik asit bakterilerinden kesin olarak ayırt edilmesi sağlanmış ve böylelikle gerçek zamanlı PZR yönteminin özgünlüğü ispatlanmıştır (Zago ve ark., 2009). Akpınar ve ark., (2011) yoğurt ve meyveli yoğurtlardaki *Streptococcus thermophilus* sayısını gerçek zamanlı PZR metoduyla belirlemişlerdir. *Streptococcus thermophilus*'un kültürel yöntemle sayım sonuçları ve gerçek zamanlı PZR ile elde edilen sayım sonuçları arasında yüksek benzerlik olduğu ortaya konmuştur. *Lactococcus lactis ssp. cremoris* ATCC 19257 suşunun karışık kültürle fermente edilen süt ürünündeki sayısı gerçek zamanlı PZR tekniği kullanılarak başarılı bir şekilde belirlenmiştir. Karışık kültürde bulunan *Lactococcus lactis ssp. cremoris* ATCC 19257 suşunun tespit sınırı 200 kob/mL olarak saptanmıştır (Grattepanche ve ark., 2005).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Ekşi Hamur Mayası Örnekleri

Laktobasillerin izole edildiği ekşi hamur mayaları Bursa ili merkez ve Keles, Büyük Orhan, Harmancık, Orhaneli, Mustafa Kemal Paşa ve Karacabey ilçeleri

köylerinden toplanmış ve mobil soğutucular içinde Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü'ne taşınmıştır. Ekşi hamur mayalarından izole edilen Laktobasiller biyokimyasal ve moleküler yöntemler ile tanımlanmıştır.

3.2. Laktobasillerin İzolasyonu

3.2.1. Besiyerleri

3.2.1.1. Maximum Recovery Diluent (MRD)

Pepton	1,0 g/L
NaCl	8,5 g/L

Toz besiyeri (Merck, Darmstadt, Almanya) distile su içinde 9,5 g/L olacak şekilde çözündürülmüştür. Besiyeri şişelere (90 mL) ve tüplere (9 mL) taksim edildikten sonra otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilizasyona tabi tutulmuştur. Dilüsyon işlemlerinde kullanılmak üzere +4°C ortama kaldırılmıştır.

3.2.1.2. Tryptone Soy Agar (TSA)

Tripton	15 g/L
Soya pepton	5 g/L
NaCl	5 g/L
Agar	12 g/L

Toz besiyeri (Lab M, Bury, İngiltere) distile su içinde 37 g/L olacak şekilde çözündürülmüştür. Karışımın homojen hale gelmesiyle birlikte otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilizasyona tabi tutulmuştur. Sterilizasyon sonrası 48 °C'ye soğutulan besiyeri, 90 mm çaplı petrilere yaklaşık 15 mL olacak şekilde dökülmüştür.

3.2.1.3. DE MAN, ROGOSA and SHARPE (MRS) Agar

Kazein pepton	10,0 g/L
Et ekstraktı	10,0 g/L
Maya ekstraktı	4,0 g/L
D(+) Glikoz	20,0 g/L
K ₂ HPO ₄	2,0 g/L
Tween 80	1,0 g/L
di-Amonyum hidrogen sitrat	2,0 g/L
Sodyum asetat	5,0 g/L
MgSO ₄	0,2 g/L
MnSO ₄	0,04 g/L
Agar	14,0 g/L

Toz besiyeri (Merck) distile su içinde 68,2 g/L olacak şekilde çözündürülmüştür. Karışımın homojen hale gelmesiyle birlikte otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilizasyona tabi tutulmuştur. Sterilizasyon sonrası 48 °C'ye soğutulan besiyeri, 90 mm çaplı petrilere yaklaşık 15 mL olacak şekilde dökülmüştür. İnokülasyon işlemlerinde kullanılmak üzere +4°C ortama kaldırılmıştır.

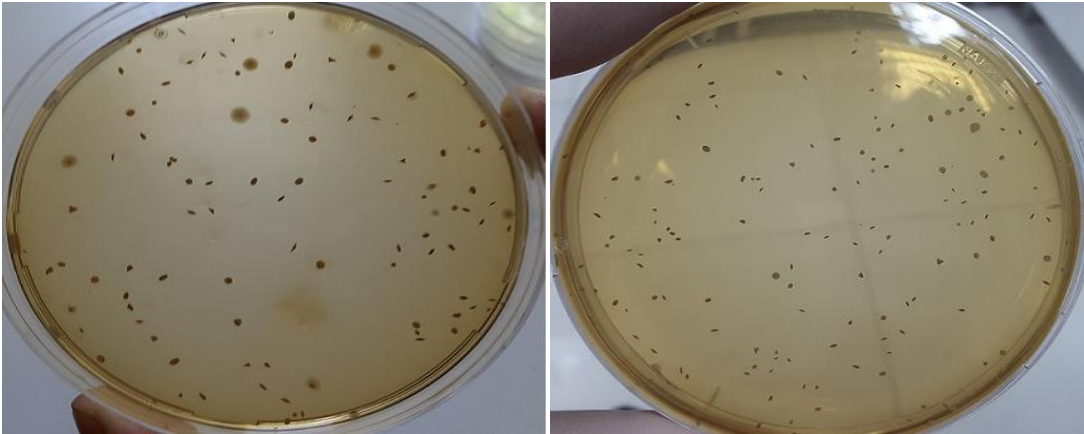
3.2.1.4. Brain Heart Infusion (BHI) Broth

Pepton	27,5 g/L
D(+) Glikoz	2,0 g/L
NaCl	5 g/L
di- Sodyum Hidrogen Fosfat	2,5 g/L

Toz besiyeri (Merck) distile su içinde 37 g/L olacak şekilde çözündürülmüştür ve tüplere (10 mL) taksim edilmiştir. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilizasyona tabi tutulmuştur. Canlandırma işlemlerinde kullanılmak üzere +4°C ortama kaldırılmıştır.

3.3. İzolasyon

Ekşi hamur mayası örneklerinden Laktobasillerin izolasyonu ISO 15214, (1998) standardına göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla aseptik şartlar altında ve steril ekipman ile 10 g örnek 90 mL steril MRD içinde stomacher (Merck, Darmstadt, Almanya) ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrasında MRD içinde ilave ondalık dilüsyonlar hazırlanmıştır. Başlangıç süspansiyonu ve ilave ondalık dilüsyonlardan MRS agara inokülasyon yapılmıştır. İnokülasyon sonrası izolasyon besiyerleri jar içinde ve mikroaerofilik ortamda (BioMérieux, Marcy l'etoile, Fransa) 37 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında izolasyon besiyerleri üzerindeki morfolojik açıdan farklılık arz eden tüm koloni tipleri TSA üzerinde saflaştırılmıştır. İnkübasyon sonrasında TSA üzerindeki kültürler katalaz testi yapılmıştır. Bu amaçla TSA üzerindeki koloniler bir lam üzerine alınmıştır ve üzerine bir kaç damla %3'lük hidrojen peroksit damlatılarak gaz kabarcıklarının oluşup oluşmadığı gözlemlenmiştir. Gaz oluşturan örnekler katalaz pozitif, oluşturmayanlar ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Harrigan ve McCance, 1976). Yalnızca katalaz negatif izolatlar biyokimyasal ve moleküler identifikasyona tabi tutulmuştur.



Resim 3.1. MRS Agar üzerinde laktik asit bakterileri kolonileri

3.4. Stok Kültürler

Katalaz negatif izolatların stok kültürleri biyokimyasal ve moleküler tanımlamada kullanılmak üzere %20 oranında gliserol içeren BHI broth içinde -20

°C'de muhafaza edilmiştir. Stoklanan izolatlar belli aralıklarla tekrar canlandırılarak stabiliteleri kontrol edilmiştir.

3.5. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için ticari bakteriyal genomik DNA izolasyon kiti (ISOLATE II, Bionline, Londra, İngiltere) kullanılmıştır. Stok kültürler oda sıcaklığına getirilerek çözümleri sağlanmıştır. Çözünen kültürler BHI broth içine aktararak 37 °C'de 24 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonunda BHI broth içindeki kültürlerden TSA'ya inokülasyon yapılmıştır. 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonrasında bir kaç koloni alınarak steril ultra saf su içinde homojenize edilmiştir. Homojenize edilen bakteri süspansiyonlarından 1 mL alınarak mikrosantrifüj tüplerine aktararak 10.000 g'de 1 dakika santrifüj (Hettich, Tuttlingen, Almanya) edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılmıştır ve tüplere 400 µL lizis tamponu ve 25 µL Proteinaz K ilave edilerek 65 °C de 2 saat çalkalamalı termomikserde (Eppendorf, Hamburg, Almanya) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüplere 210 µL etanol ilave edilmiştir. Tüp içerikleri içinde spin filtre bulunan toplama tüplerine aktararak 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra silika membranların yıkanması amacıyla tüplere kit ile birlikte sağlanan yıkama tamponları ilave edilerek 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Yıkama sonrasında kurutma amacıyla tüpler 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir ve spin filtreler yeni toplama tüplerine aktarılmıştır. DNA elüsyonu için tüplere kit ile birlikte sağlanan elüsyon tamponu ilave edilerek 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Elüsyon işlemi sonrasında izole edilen DNA örneklerinin saflığı ve miktarı mikro hacim spektrofotometre (Thermo, Waltham, ABD) ile kontrol edilmiştir. Kontrol edilen DNA örnekleri gerçek zamanlı PZR analizlerinde kullanılmak üzere -20 °C'da muhafaza edilmiştir.

3.6. Gerçek Zamanlı PZR Analizi

İzolatlar hotstart PZR ve sekans spesifik çift boya işaretli prob (TagMan) prensiblerine dayalı gerçek zamanlı PZR kitleri (GEN-IAL, Troisdorf, Almanya) ile tanımlanmıştır. Kullanılan kitler ve hedef *Lactobacillus* türleri Çizelge 3.6.1'de verilmiştir. Amplifikasyon esnasında hidroliz ile raportör boyanın probtan ayrılması sonucu floresan sinyaldeki artış 518 nm'de FAM kanalında ölçülmüştür.

Çizelge 3.6.1. Kullanılan gerçek zamanlı PZR kitleri (GEN-IAL) ve hedef *Lactobacillus* türleri

Hedef Türler	Ürün Kodu
<i>L. brevis</i> / <i>L. brevisimilis</i>	TPLB 0050
<i>L. casei</i> / <i>L. paracasei</i> / <i>L. rhamnosus</i> / <i>L. zae</i>	TPLCR 0050
<i>L. plantarum</i> / <i>L. paraplantarum</i> / <i>L. pentosus</i>	TPLP 0050
<i>L. buchneri</i> / <i>L. parabuchner</i>	TPLBU 0050
<i>L. collinoides</i> / <i>L. paracollinoides</i>	TPLC 0050
<i>L. lindneri</i>	TPLL 0050

PZR için reaksiyon karışımları kitler ile birlikte sağlanan premiks (Tag DNA polimeraz, dNTP, MgCl₂ ve tampon) ve ultra saf su içinde çözündürülmüş primer ve prob karışımına DNA örneklerinin ilavesi ile hazırlanmıştır. Negatif kontrol amacıyla DNA örneği yerine saf su ilave edilmiş PZR karışımı, pozitif kontrol amacıyla kitler ile birlikte sağlanan hedef türe ait kontrol DNA'sı ilave edilmiş PZR karışımı kullanılmıştır. PZR karışımı bileşenleri ve hacimleri Çizelge 3.6.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.6.2. PZR karışımı bileşenleri ve hacimleri

PZR karışımı	Hacim (µL)
Premix	13,5
Primer ve prob (Ultra saf su içinde)	1,5
Örnek DNA	5
Ultra saf su	5
Toplam hacim	20

PZR tüpleri içinde hazırlanan PZR karışımları amplifikasyon için gerçek zamanlı PZR cihazına (Light Cycler, Roche, Mannheim, Almanya) yerleştirilmiştir. Çizelge 3.6.3.'te verilen PZR termal döngü programı ile amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonucunda FAM kanalında tespit edilebilir düzeyde floresan sinyal artışı, identifikasyon için test edilen izolat için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.6.3. PZR termal döngü programı

Reaksiyon basamağı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	15 dakika	-
Denatürasyon	95	15 saniye	35
Bağlanma/uzama	60	60 saniye	
Soğutma	40	15 saniye	-

3.7. Fenotipik İdentifikasyon

Fenotipik identifikasyon dehidre formda 1 adet kontrol ve 49 adet karbohidrat (D-arabinoz, L-arabinoz, Gliserol, riboz, D-ksiloz, eritritol, L-ksiloz, inositol, galaktoz, fruktoz, adonitol, mannoz, sorboz, D-turanoz, D-lyxose, glikoz, rhamnoz, salisin, sellobioz, maltoz, laktoz, melibioz, sukroz, trehaloz, inulin, dulsitol, melezitose, nisasta, ksilitol, gentiobiose, glikojen, rafinoz, D-tagatoz, eskulin, α -metil-D-mannosid, α -metil-Dglikozid, N-asetil-glikozamin, amigidalin, arbutin, D-arabitol, L-arabitol, glukonat, 2-keto-glukonat, 5-keto glukonat, mannitol, sorbitol, D-fukoz, L-fukoz, b-metil-D-ksilosid) fermentasyon besiyeri içeren minyatürize API 50 CH (BioMérieux) identifikasyon paneli ile gerçekleştirilmiştir. MRS Agar ortamına mikrobiyolojik analiz yöntemlerine uygun bir şekilde yeterli düzeyde dilüsyonlar yapılarak ekimi yapılan ve ekim sonucu elde edilen izolatlardan katalaz reaksiyonu negatif olanlar, identifikasyon paneli ile birlikte sağlanan süspansiyon besiyeri (API 50 CHL) içinde süspanse edilmiştir. Yoğunluğu 2 McFarland olarak ayarlanan süspansiyon inokülüm olarak kullanılmıştır. Panel üzerindeki kontrol ve test kuyucukları steril bir pastör pipeti kullanılarak inokülüm ile doldurulmuştur ve üzerleri mineral yağ ile kapatılmıştır. 37 °C'da 24 saat inkübasyon sonunda kuyucuklardaki renk değişimlerine göre sonuçlar değerlendirilmiştir. pH indikatörü içeren kuyucuklarda besiyeri renginin şeker fermentasyonu ile sarıya dönmesi durumunda test sonucunun pozitif, rengin aynı kalması neticesinde ise sonuç negatif olarak kaydedilmiştir. Bu sonuçlar ile elde edilen nümerik profil apiweb (BioMérieux) isimli yazılıma aktarılarak izolatlar tür düzeyinde tanımlanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Biyokimyasal ve Moleküler Tanımlama Sonuçları

Bursa ili merkez ve ilçeleri köylerinden toplanan ekşi hamur mayalarından elde edilen izolatların gerçek zamanlı PZR ile identifikasyonu sonucunda izolatların 54 adedi *Lactobacillus plantarum*, 11 adedi *Lactobacillus brevis*, ve 3 adedi *Lactobacillus paracasei* olarak tanımlanmıştır. Aynı izolatların API 50 CH ile biyokimyasal identifikasyonu ile 47 adedi *L. plantarum*, 9 adedi *L. brevis*, ve 3 adedi *L. paracasei* olarak tanımlanmıştır.

API 50 CH ile elde edilen biyokimyasal identifikasyon sonuçları ve gerçek zamanlı PZR ile elde edilen moleküler identifikasyon sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Gerçek zamanlı PZR ile tanımlanabilen 68 adet izolatın 59 tanesi API 50 CH ile de tanımlanabilmiştir.

Çizelge 4.1. Biyokimyasal temelli fenotipik identifikasyon ve gerçek zamanlı PZR sonuçları

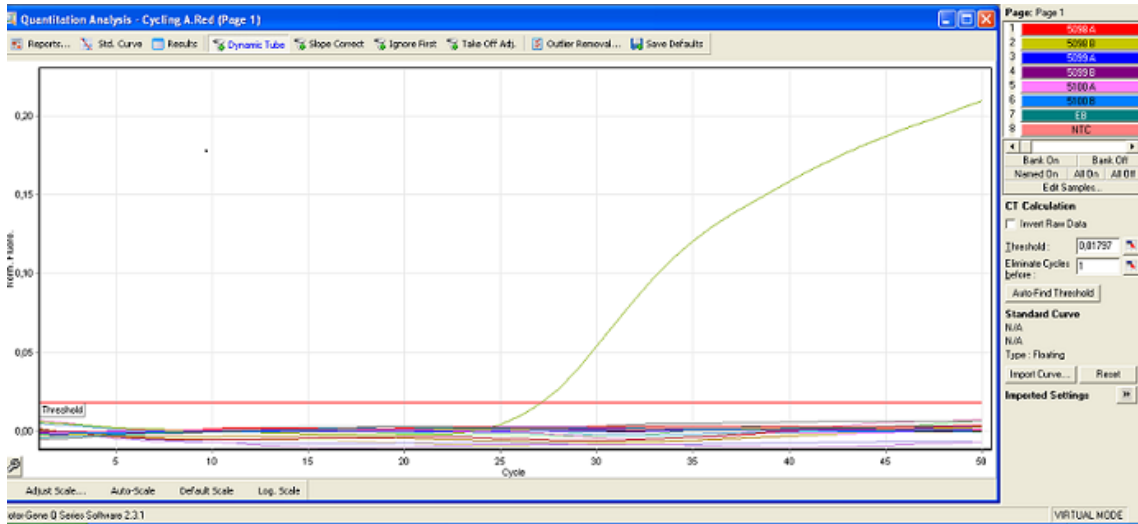
İzolat	Lokasyon	Gerçek Zamanlı PZR (GEN-IAL)	Fenotipik Tanımlama (API 50 CH)
1	Bursa	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
2	Bursa	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
3	Bursa	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
4	Bursa	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
5	Bursa	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
6	Bursa	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
7	Bursa	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
8	Bursa	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
9	Bursa	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
10	Bursa	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
11	Bursa	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
12	Bursa	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>

13	Bursa	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	Tanımlanamadı
14	Bursa	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	Tanımlanamadı
15	Bursa	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
16	Bursa	<i>Lactobacillus brevis/ Lactobacillus brevisimilis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
17	Bursa	<i>Lactobacillus brevis/ Lactobacillus brevisimilis</i>	Tanımlanamadı
18	Bursa	<i>Lactobacillus casei/ Lactobacillus paracasei/ Lactobacillus rhamnosus/ Lactobacillus zeae</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
19	Keles	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
20	Keles	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
21	Keles	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
22	Keles	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
23	Keles	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	Tanımlanamadı
24	Keles	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
25	Keles	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
26	Keles	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
27	Keles	<i>Lactobacillus brevis/ Lactobacillus brevisimilis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
28	Keles	<i>Lactobacillus brevis/ Lactobacillus brevisimilis</i>	Tanımlanamadı
29	Keles	<i>Lactobacillus brevis/ Lactobacillus brevisimilis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
30	Keles	<i>Lactobacillus casei/ Lactobacillus paracasei/ Lactobacillus rhamnosus/ Lactobacillus zeae</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
31	Harmancık	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
32	Harmancık	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
33	Harmancık	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
34	Harmancık	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
35	Harmancık	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
36	Harmancık	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
37	Harmancık	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
38	Harmancık	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	Tanımlanamadı
39	Harmancık	<i>Lactobacillus brevis/ Lactobacillus brevisimilis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>

40	Harmancık	<i>Lactobacillus brevis/ Lactobacillus brevisimilis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
41	Harmancık	<i>Lactobacillus brevis/ Lactobacillus brevisimilis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
42	Harmancık	<i>Lactobacillus casei/ Lactobacillus paracasei/ Lactobacillus rhamnosus/ Lactobacillus zeae</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
43	B.Orhan	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
44	B.Orhan	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
45	B.Orhan	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
46	B.Orhan	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
47	B.Orhan	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
48	B.Orhan	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	Tanımlanamadı
49	B.Orhan	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
50	B.Orhan	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
51	B.Orhan	<i>Lactobacillus brevis/ Lactobacillus brevisimilis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
52	Orhaneli	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
53	Orhaneli	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
54	Orhaneli	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
55	Orhaneli	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
56	Orhaneli	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
57	Orhaneli	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
58	Orhaneli	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
59	Orhaneli	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
60	Orhaneli	<i>Lactobacillus brevis/ Lactobacillus brevisimilis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
61	M. K. Paşa	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	Tanımlanamadı
62	M. K. Paşa	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	Tanımlanamadı
63	M. K. Paşa	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
64	Karacabey	<i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum /Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>

Çizelge 4.2. API Sonuçlarına Göre Tanımlanan İzolatlar ve Kullandıkları Karbohidrat Kaynakları

Karbohidrat	<i>L. plantarum</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. brevis</i>	Karbohidrat	<i>L. plantarum</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. brevis</i>
Kontrol				Kontrol			
Glycerol				Salisin	✓	✓	✓
Erythritol				Sellobioz	✓	✓	✓
D-Arabinoz				Maltoz	✓	✓	✓
L-Arabinoz				Laktoz	✓	✓	
Riboz	✓	✓		Melibioz	✓		
D-Ksiloz				Sakkaroz	✓	✓	✓
L-Ksiloz				Trehaloz	✓	✓	✓
Adonitol				Inulin			✓
Metil-Ksilosit				Melezitoz	✓	✓	✓
Galaktoz		✓	✓	D-Raffinoz			
D-Glikoz	✓	✓	✓	Amidon			
D-Fruktoz	✓	✓	✓	Glikojen			
D-Mannoz	✓	✓	✓	Ksilitol			
L-Sorboz				Gentiobioz	✓		✓
Rhamnoz				D-Turanoz			✓
Dulcitol				D-Liksoz			✓
Inositol				D-Tagatoz			✓
Mannitol	✓	✓		D-Fukoz			
Sorbitol	✓	✓		L-Fukoz			
Metil-D-mannosit				D-Arabitol			
Metil-D-glukosit				Arabitol			
N-Asetil glikozamin	✓		✓	Glukonat		✓	✓
Amigdalin	✓		✓	2 seto-glukonat			
Arbutin	✓		✓	5 seto-glukonat			
Eskulin	✓	✓	✓				



Resim 4.3. Gerçek zamanlı PZR cihazı yazılımı ekran görüntüsü

4.2. Tartışma

Laktik asit bakterileri, yoğurt, peynir, sucuk, ekşi lahana turşusu ve ekşi hamur gibi fermente gıdaların üretiminde kullanılan ve endüstriyel açıdan önem arz eden mikroorganizmalar grubudur. Ekmek benzeri fermente tahıl ürünlerinin yapımında pek yaygın bir şekilde alkol fermentasyonu yapan *S. cerevisiae* türü mayalar kullanılmaktadır. Fakat günümüzde Asya ve Avrupa ülkelerinde laktik asit bakterilerini de içeren ve ekşi hamur mayası olarak adlandırılan karışık kültürlerden git gide artan miktarlarda faydalanılmaktadır (Çon ve Şimşek, 2003).

Ekşi hamurda bakteri ve mayalar beraber faaliyet gösterdiğinden dolayı bu uygulama doğal floraya dayanmaktadır ve ekşi hamur ekmeği uygun hacim, güçlü aroma, iyi bir ekmek içi yapısı ve uzun raf ömrüne sahip olması nedeniyle tercih edilmektedir. Ekşi hamurun hakim florasında maya ve laktik asit bakterilerinin hakim olmasından yola çıkılarak, fermentasyonu kontrol etmek ve güvence altına alabilmek için, saf laktik asit bakterilerinden oluşan starter kültür kullanımına gidilmiştir. Ekşi hamurun ve laktik starterlerin ekmeğin kalite parametreleri üzerine pek çok iyileştirici etkisi olduğu tespit edilmiştir (Göçmen, 2001).

Günümüzde fermente gıdalara olan ilgi ve gereksinim oldukça artmış durumdadır. Bu nedenle fermente gıdaların mikrobiyolojik florasının ve insan sağlığı üzerine olan etkilerinin araştırılması önemli bir çalışma alanı haline gelmiştir. Laktik asit bakterilerinin klasik mikrobiyolojik yöntemlerle identifikasyonu genelde çok zaman almaktadır ve elde edilen test sonuçları ile çoğunlukla net bir tanımlama

yapılamamaktadır. Bunun yanısıra tür düzeyinde bir tanımlama için çok sayıda biyokimyasal teste olan ihtiyaç tanımlama maliyetlerini arttırmaktadır. Bu sebeplerden dolayı, endüstriyel bakımdan önem arz eden laktik asit bakterilerinin güvenilir ve hızlı olarak tanımlanması ve karakterize edilmesi maksadıyla farklı bazı moleküler metotların geliştirilmesi ve uygulamaya aktarılmasına yönelik çalışmalar artmıştır. Laktik asit bakterilerinin yüksek doğrulukta tanımlanmaları gıda güvenliği ve teknolojisi ve mikrobiyal ekoloji bakımından büyük önem arz etmektedir. Son yıllarda moleküler biyolojik tekniklerin mikrobiyoloji alanında kullanımının ivme kazanması ile birlikte, fermente ürünlerdeki doğal laktik asit bakterilerinin moleküler metotlar kullanılarak tanımlanmasına yönelik çalışmalardan ümit verici neticeler elde edilmiştir (Hertel ve ark., 1993). Uygulanan koşulları standart hale getirilen bu moleküler yöntemler, laktik asit bakterilerinin tanımlaması, türler arası karşılaştırma ve karakterizasyonu açısından geniş bir yelpazede kullanım sahası bulmaktadır (Pot ve ark., 1993). DNA temelli metotların yanı sıra toplam hücre proteinlerine dayalı metotların kullanımının da klasik metotlara nazaran daha basit ve yüksek duyarlılıkta bir uygulama olduğu bildirilmektedir (Tsakalidou ve ark., 1992).

Gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin tanımlanması, karakterize edilmesi ve taksonomik olarak sınıflandırılmasında birçok moleküler biyolojik teknik değerlendirilmiştir. Fermente gıda ürünlerinin mikrobiyal floransında bulunan laktik asit bakterilerinin cins, tür veya serotip seviyesinde tanımlanmasında kullanılan en hızlı moleküler biyolojik yöntem hedef taksona spesifik primerlerin kullanıldığı gerçek zamanlı PZR tekniğidir. Gerçek zamanlı PZR ile eser miktarda DNA veya RNA'nın belirlenen bir bölgesinin çok kısa bir süre zarfında milyarlarca kez çoğaltılabilmektedir. Hızlı sonuç elde edilmesinin yanı sıra teknik aynı zamanda yüksek duyarlılığa sahiptir ve hedef mikroorganizma için yüksek özgüllükte sonuçlar verebilmektedir. Gerçek zamanlı PZR analizi ile elde edilen sonuçlardaki hata oranı biyokimyasal ve serolojik yöntemler ile kıyaslandığında oldukça düşük düzeyde kalmaktadır. (Kıran ve ark., 2006).

Daha önce yapılan çalışmalar gerçek zamanlı PZR başta olmak üzere moleküler biyolojik tekniklerin gıda kaynaklı laktik asit bakterisi izolatlarının tanımlanmasındaki yeterliliğini teyit etmiştir. Yapılan bir araştırmada, farklı kültür merkezlerinden sağlanan ve bu merkezlerce süt ürünlerinden izole edildiği bildirilen toplam 31 adet *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* suşunun toplam hücre protein

profili, DNA parmak izi ve rDNA genlerinin gerçek zamanlı PZR ile analizi ile karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar kullanılan metotların izolatlar arasında farklılıkların ve benzerliklerin ortaya çıkarılmasında başarılı ve yeterli olduğunu göstermiştir (Moschetti ve ark., 1997). Falsen ve ark., (1999) 'larının gerçekleştirdiği bir çalışmada ise insanlardan izole edilen muhtemel *Lactobacillus* türlerinin fenotipik ve genotipik bakımdan karakterizasyonu hedeflenmiştir. Bu amaçla katalaz negatif, Gram-pozitif ve basil formuna sahip 11 adet izolat sırasıyla API test prosedürü uygulanarak biyokimyasal testlere, toplam hücre protein analizine, hücre duvarı yapısında bulunan murein miktarı analizine, ve gerçek zamanlı PZR ile çoğaltılan 16S rDNA genlerinin dizi analizine tabi tutulmuştur. Biyokimyasal testler ve protein profili analizleri 11 adet izolatın *Lactobacillus* cinsine ait olduğunu ortaya koymakta yeterli olmuştur. Ancak tüm izolatların tür düzeyinde tanımlanabilmesi ancak 16S rDNA genlerinin dizi analizi ile mümkün olmuştur. Elde edilen analiz sonuçları ile izolatların *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus johnsonii* veya *Lactobacillus gasseri* olduğu saptanmıştır. Çalışmada tanımlanan türler arasında genetik uzaklıklar da hesaplanmıştır. *Lactobacillus gasseri* ile *Lactobacillus johnsonii*'nin birbirleriyle oldukça yakın, *Lactobacillus delbrueckii* ile *Lactobacillus iners*'in ise birbirlerine ve diğer türlere uzak oldukları belirlenmiştir. İtalya'da gerçekleştirilen bir çalışmada ekşi hamurdan izole edilen mayalar ve laktik asit bakterileri klasik ve moleküler biyolojik metotlardan faydalanılarak tanımlanmıştır. Farklı coğrafi bölgelerden alınan 25 ekşi hamur örneklerinden izole edilen 317 izolatın %38'inin biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçlarına göre laktik asit bakterisi olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç 16S-23S rDNA primerleri kullanılarak gerçek zamanlı PZR ile doğrulanmıştır. Örneklerden izole edilen maya suşları beklendiği gibi aynı zamanda ekmek mayası olarak da bilinen *Saccharomyces cerevisiae* türü olarak tanımlanmıştır. Çalışmada moleküler yöntemler ile laktik asit bakterileri tür düzeyinde tanımlanabildiği bildirilmiştir (Corsetti ve ark., 2001).

Fenotipik tekniklerin bazı laktik asit bakterileri için daha elverişli olduğu iddia edilse de, yapılan çalışmalar biyokimyasal profile dayalı karşılaştırmanın birbirleriyle genotipik benzerlik arzeden türler arasında güvenilir olmayan sonuçlar verdiğini ortaya koymuştur. Günümüzde biyokimyasal profile dayalı otomatize tanımlama sistemleri ile hızlı ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebilmektedir. Ancak otomasyon biyokimyasal identifikasyonun ayırım gücüne bir katkı sağlamamaktadır. Bu çalışmada elde edilen veriler değerlendirildiğinde *Lactobacillus* suşlarının karbonhidrat fermentasyon testleri

gibi geleneksel fenotipik identifikasyon metotları ile tanımlanmasında düşük taksonomik ayırım yeteneği gösterdiği görülmektedir. Moleküler tanımlama metotlarının ayırım gücünün ise fenotipik metotlara göre daha üstün olduğu görülmüştür. Doğru bir identifikasyon için biyokimyasal profile dayalı geleneksel identifikasyon metotları ile moleküler metotlar birlikte kullanılmalıdır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Ekmek üretiminde ekşi hamur metodunu kullanan fırınlardan alınan hamur örneklerinden izole edilen *Lactobacillus* suşlarının ticari biyokimyasal identifikasyon paneli ve gerçek zamanlı PZR metotları ile elde edilen identifikasyon sonuçlarının karşılaştırıldığı bu çalışmada gerçek zamanlı PZR ile tanımlanan 68 adet *Lactobacillus* suşunun %13'ü (9 adet) biyokimyasal identifikasyon paneli ile tanımlanamamıştır. Bu sonuç biyokimyasal profile dayalı tanımlama yöntemlerinin moleküler biyolojik yöntemlere nazaran laktik asit bakterilerinin identifikasyonunda daha düşük bir ayırım gücünün olduğunu göstermiştir.

Türkiye'de ekmeğin sofralarımızda en çok bulunan temel gıdalarımızın başında gelmektedir. Tüketim miktarı toplumun sosyo-ekonomik yapısı ve beslenme alışkanlıkları ile doğru orantılı olarak oldukça yüksektir. Toplum sağlığının korunması ve daha sağlıklı bir ekmeğin üretimini gerçekleştirebilmesinin bir yolu da ekşi hamur yönteminin kullanılmasıdır. Ekşi hamura ait mevcut mikrobiyal floranın araştırılarak elde edilecek laktik asit bakterilerinin endüstriyel kullanım potansiyellerinin belirlenmesi ve sektöre kazandırılması önem arz etmektedir. Elde edilen laktik asit bakterilerinin farklı kombinasyonlarının fermente gıdalar için starter kültür olarak kullanılması ve ülkemize özgü yeni türlerin tanımlanarak ülke gen kaynaklarının korunması sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR

- Akpınar, A., Yerlikaya, O. and Kılıç, S., 2011, Antimicrobial activity and antibiotic resistance of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Turkish homemade yoghurts. *African Journal of Microbiology Research*, 5(6): 675-682.
- Aktan, N., Kalkan, H. ve Yücel, U., 1999, Turşu Teknolojisi. *Ege Üniversitesi Ege Meslek Yüksek Okulu Yayınları*, No:23, 148 s, İzmir.
- Alperden, İ., 1993, Et ve su ürünleri mikrobiyolojisi. Gıda Sanayiinde Mikrobiyoloji ve Uygulamaları, *Marmara Araştırma Merkezi Gıda ve Soğutma Teknolojileri Bölümü*, Yayın No:124, s101, Kocaeli.
- Anon, 1990, Ekmekçilik Semineri. İstanbul Ticaret Odası Yayınları No: 26, İstanbul.
- Anon, 1995, The Manuel of HunterLab-XEC Hunterlab Cooperation, 11491 Sunset Hills Road, Reston, VA 22090, U.S.A.
- Atatürk Üniversitesi Yayınları, No:867, Ziraat Fakültesi Yayın No: 335, Ders Kitapları Serisi No: 82, Erzurum, 245s.
- Aydın, M., 2005, Hematolojide real-time PCR. Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi, *Temel Moleküler Hematoloji Kursu*, 12-13 Mart, Mersin.
- Bogovič-Matijašič, B., Obermajer, T. and Rogelj, I., 2009, Quantification of *Lactobacillus gasseri*, *Enterococcus faecium* and *Bifidobacterium infantis* in a probiotic OTC drug by real-time PCR. *Food Control*, 21: 419-425.
- Bozkurt, O. ve Gürbüz, O., 2008, Comparison of lactic acid contents between dried and frozen tarhana. *Food Chemistry*, 108, 198-204
- Bulut, Ç., 2003, Isolation and characterization of lactic acid bacteria from cheese. Yüksek Lisans Tezi, *İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı*, 112s, İzmir.
- Busch, U., Nitschko, H., 1999, Methods for the differentiation of microorganisms, *Journal of Chromatography B*. 722,263-278
- Canan, E., Neslihan, Ö., Tamer, C.E., Karaman, B., Aydoğan, N., Çopur, Ö.U., 2004, Bazı geleneksel fermente gıdalarımız ve sağlık üzerindeki etkileri. *Geleneksel Gıdalar Sempozyumu*, Van 23-24.
- Ceylan, E., Fung, D.Y.C., 2000, Destruction of *Yersinia enterocolitica* by *Lactobacillus sake* and *Pediococcus acidilactici* during low-temperature fermentation of Turkish dry sausage (sucuk). *Journal of Food Science*, 65 (5), 876-879.
- Chen, D., Coulan, J., Funel, A. L., Chan, Y. N., 2000, Comparative analysis of the genes encoding 23S-5S Rna intergenic spacer regions of *Lactobacillus casei* I-related strains, *Int. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50,471-478
- Collins, M. D., Rodriuges, U., Ash, C., Aquirre, M., Farrow, J. A. E., Martinez, M. A., Phillips, B. A., Williams, A. M., Wallbanks, S., 1991, Phylogenetic analysis of the

genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse tranacriptase sequencing of 16S Rrna, *FEMS Microbiology Letters*. 77,5-12

- Con, A. H. ve Şimşek, Ö., 2003, Ekşi Hamur Laktik Asit Bakterileri ve Ekmeğin Teknolojik Özellikleri Üzerine Etkisi. *Unlu Mamüller Teknolojisi Dergisi*, 58: 44-55.
- Corsetti, A., Lovermicocca, P., Morea, M., Baruzzi, F., Tosti, N., Gobbetti, M., 2001, Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of southern Italy, *Int. Journal of Food Microbiology*.64,95-104
- Danova, S., Petrov, K., Pavlov, P. and Petrova, P., 2005, Isolation and characterization of *Lactobacillus* strains involved in koumiss fermentation. *International Journal of Dairy Technology*, 58(2): 100-106.
- Dicks, L. M. T., van Vuuren, H. J. J., 1987, Relatedness of heterofermentative *Lactobacillus* species revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns, *Int. Journal of Systematic Bacteriology*. 37 (4),437-440
- Dinçer, B., Mutluer, B., Erol, İ., Özdemir, H., Yağlı, Ö., Akgün, S., 1995, Türk fermente sucuğuna özgü starter kültür üretimi. *Ankara Ün. Vet.Fak. Dergisi*, 42 (3).
- Drake, M., Small, C. L., Spence, K. D., Swanson, B. G., 1996, Rapid detection and identification of *Lactobacillus* spp. in dairy products by using the polymerase chain reaction, *Journal of Food Protection*. 59 (10) 1031-1036.
- El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A. and Ogier, J. C., 2007, Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian Domiati cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 1248–1255.
- Elgün, A., Ertugay, Z., Certel, M., Kotancılar, H. G., 2002. Tahıl ve Ürünlerinde Analitik Kalite Kontrolü ve Laboratuvar Uygulama Klavuzu,
- Erdoğrul, Ö. T., 2002, Fermente sucuklardan izole edilen *Pediococcus pentosaceus* suşlarının bazı metabolik ve antimikrobiyal aktiviteleri üzerine çalışmalar. *İstanbul Üni. Vet. Fak. Dergisi*, 28 (1) 249-254.
- Etöz, D., 2006, “Kefirden izole edilen maya ve bakterilerin bazı patojen mikroorganizmalar üzerine inhibitör etkisi” Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı*, 91 s, Ankara.
- Falsen, E., Pascual, C., Sjöden, B., Ohlen, M., Collins, M. D.,1999, Phenotyping and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources : description of *Lactobacillus iners* sp. nov., *Int. Journal of Systematic Bacteriology*. 49, 217-221.
- Gonzlez, C. J., Encinas, J. P., Garcia-Lopez, M. L. and Otero, A., 2000, Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. *Food Microbiology*, 17: 383–391.
- Göçmen, D. 2001, Ekşi Hamur ve Laktik Starter Kullanımının Ekmekte Aroma Oluşumu Üzerine Etkileri. *Gıda*, 26:13-16.

- Göçmen, D., ve Gürbüz, O., 2000, Fırıncılık Ürünlerinde Sünme Küf Oluşumunun Önlenmesinde Kimyasal Koruyucu ve Laktik Starter Kullanımı. *Dünya Gıda*, 6:84-87.
- Grattepanche, F., Lacroix, C., Audet, P. and Lapointe, G., 2005, Quantification by real-time PCR of *Lactococcus lactis subsp. cremoris* in milk fermented by a mixed culture. *Applied and Environmental Microbiology* 66:414–421.
- Gül, H., 1999, Isparta Yöresinde Kullanılan Ekşi Mayanın Bileşimi ve Fizyolojik Özelliklerinin Araştırılması ve Ekmek Yapımında Kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Isparta, 65s.
- Güleren, A., 2008, Et ve Fermente Et Ürünlerinden İzole Edilen *Lactobacillus Sake* ve *Lactobacillus Curvatus* Suşlarının Moleküler ve Biyokimyasal İdentifikasyonu ve Bazı Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, *Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi A.B.*, Bursa.
- Güley, Z., 2008, Doğal üretilen küflü peynirden izole edilen bazı laktik asit bakterilerinin aflatoksin b1 ve aflatoksin m1 üzerine etkisinin araştırılması, Doktora Tezi, *Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Süt Teknolojisi A.B.*, Bornova, İzmir.
- Halkman, K., ve Taşkın, Y., 2001, Süt Ürünleri Endüstrisinde Starter Kültür. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 5(10). 45-52.
- Harrigan, W. F., Mccance, M. E., 1976, Laboratory Methots in Food and Dairy Microbiolgy. London, Academic Press, pp.66-81.
- Herdem, A., 2006, Farklı yörelerden toplanan geleneksel yöntemle üretilen yoğurt örneklerinin bazı niteliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı*, 98 s, Konya.
- Hertel, C., Ludwig, W., Pot, B., Kersters, K., Schleifer, K. H., 1993, Differentiation of Lactobacilli occurring in fermented milk products by using oligonucleotide probes and electrophoretic protein profiles, System. Appl. M.16
- ISO 15214:1998, Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria -- Colony-count technique at 30 degrees C.
- Justé, A., Thomma, B. P. H. J. and Lievens, B., 2008, Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology*, 25: 745–761.
- Kaban, G., 2007, Geleneksel olarak üretilen sucuklardan laktik asit bakterileri ile katalaz pozitif kokların izolasyonu-identifikasyonu, üretimde kullanılabilme imkanları ve uçucu bileşikler üzerine etkileri. Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı*, 116 S, Erzurum.
- Karapınar, M., Hancıoğlu, O., 1997, Microflora of boza, a traditional fermented Turkish beverage. *International Journal of Food Microbiology*, 35, 271-274.

- Karapınar, M. G., Zorba, M., Hancıoğlu, Ö., Genç, M., Ova, G., 2003, The use of starter cultures in the fermentation of boza, a traditional Turkish beverage. *Process Biochemistry*, 38, 1405-1411.
- Kaya, M., Gökalp, H. G., 2004, Farklı laktik starter kültürler kullanılarak üretilen sucuklarda *Listeria monocytogenes*'in davranışı. *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, 28, 1113-1120.
- Kıran, F. ve Osmanağaoğlu, Ö., 2011, Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) identifikasyonunda tiplendirmesinde kullanılan moleküler yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 27(1): 62-74.
- Kunz, J. S. K., 1995, Preparation and Function of Sourdough. Pratical Course Cereal and Baking Technology, *Institut Für Lebensmitteltechnologie der Universität*, Part C, Bonn. 26p.
- McCartney, A. L., 2002, Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88: 29–37.
- Monnet, C., Ulvé, V., Sarthou, A. S. and Irlinger, F., 2008, Extraction of RNA from cheese without prior separation of microbial cells. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 5724–5730.
- Moschetti, G., Blaiotta, G., Aponte, M., Mauirello, G., Villani, F., Coppola, S., 1997, Genotyping of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* an determination of the number and forms of *rrn* operons in *Lactobacillus delbrueckii* and its subspecies, *Research Microbiology*.148,501-510
- Mumcu, Z. N., 1997, Kefirden izole edilen bazı laktik asit bakterilerinin metabolik, antimikrobiyal ve plasmid DNA'larının incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı*, 144 s, Ankara.
- Muyanja, C. M. B. K., Narvhus, J. A., Treimo, J., Langsrud, T., 2003, Isolation, Characterization and Identification of Lactic Acid Bacteria from Bushera: a Ugandan Traditional Fermented Beverage. *International Journal of Food Microbiology*, 80:201-210.
- Özdemir, H., 1996, Türk fermente sucuğundan izole edilen laktobasillerin Hidrojen Peroksit ve Hidrojen Sülfür oluşturma özelliklerinin saptanması, *Gıda*, 27(4)311-314.
- Özdemir, H., 1999, Türk fermente sucuğunun florasındaki dominant laktobasil türlerinin sucuğun organoleptik nitelikleri ile ilişkisi. *Ankara Üni. Vet Fak Derg.*, 46, 189-198.
- Pot, B., Hertel, C., Ludwig, W., Descheemaeker, P., Kersters, K., Schleifer, K. H., 1993, Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasserii* and *Lactobacillus johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotid probe hybridization, *Journal of General Microbiology*. 139,513-517
- Powel, S., Ferguson, S., Bowman, J. and Snape, I., 2006, Using real--time PCR to asses changes in the hydrocarbon- degrading microbial community in Antarctic soil during bioremediation. *Microbial Ecology*, 52: 523–532.

- Rudtong, S., Tannock, G. W., 1993, *Differentiation of Lactobacillus strains by ribotyping, Applied and Environmental Microbiology*. 59 (10), 3480-3484
- Sagdıç, O., Arıcı, M., Simsek, O., 2002, Selection of starters for a traditional Turkish yayık butter made from yoghurt. *Food Microbiology*, 19, 303-312.
- Sánchez, J. I., Rossetti, L., Martínez, B., Rodríguez, A. and Giraffa, G., 2006, Application of reverse transcriptase PCR-based T-RFLP to perform semi-quantitative analysis of metabolically active bacteria in dairy fermentations. *Journal Microbiological Methods*, 65: 268–277.
- Senini, L., Coppa, F., Cocconcelli, P. S., 1997, Use of rRNA – targeted oligonucleotide probes for the characterization of the microflora from fermentation of Fontina cheese, *Food Microbiology*. 14, 469-476
- Sezer, Ç., 2003, Kefirde laktik asit bakterilerinin tür düzeyinde araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, *Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Ana Bilim Dalı*, 144 s, Kars.
- Sıklı, Ö. H. ve Karapınar, M., 2002, “Ekşi Maya Ekmeğinin Mikroflorası ve Aromatik Karakteristikleri”, *Hububat Ürünleri Teknolojisi Kongre ve Sergisi*, İzmir, s.165-175.
- Sohier, D., Coulan, J., Funel, A. L., 1999, Molecular identification of *Lactobacillus hilgardii* and genetic relatedness with *Lactobacillus brevis*, *Int. Journal of Systematic Bacteriology*. 49, 1075-1081.
- Soyyigit, H., 2004, Isparta ve yöresinde üretilen ev yapımı tarhanaların mikrobiyolojik ve teknolojik özellikleri. Yüksek Lisans Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı*, 71 S, Isparta.
- Şahin, İ., 1995, Endüstriyel Mikrobiyoloji. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi*, 151s, Bursa.
- Şanlıbaba, P. ve Akçelik, M., 2000, Çiğ süt ve peyniraltı sularından izole edilen laktokokların faj duyarlılıkları. *Turkish Journal of Biology*, 24: 425–435.
- Şimşek, Ö., 2003, Uşak Yöresi Ekşi Hamurlarından İzole Edilen Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması ve Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi., Yüksek Lisans Tezi, *Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Denizli, 60s.
- Talay, M., 1997, Ekmek Bilimi ve Teknolojisi. Ekin Yayıncılık ve Pazarlama, İstanbul 70s.
- Tamerler, T., 1986, Ekşi Maya ile Buğday Ekmeğinin Hazırlanması ve Ekşi Maya Mikroorganizmaları. *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, Seri: B. 4:145-154.
- Tannock, G. W., Tilsala, T. A., Radtong, S., Ng, J., Munro, K., Alatossava, T., 1999, Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacerregion sequence comparisons, *Applied and Environmental microbiology*. 65,4264-4267

- Toksoy, A., Beyatlı, Y., Aslım, B., 1999, Sucuk ve sosislerden izole edilen *Lactobacillus plantarum* suslarının bazı metabolik ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi. *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences*, 23, 533-540.
- Topuz, K. O., 2005, Farklı starter kültürler ve geleneksel kıyma mayası ile üretilen kıymaların özellikleri üzerine araştırma. Yüksek Lisans Tezi, *Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı*, 97 s, Antalya.
- Tsakalidou, E., Zoidou, E., Kalantzopoulos, G., 1992, SDS-polyacrilamide gel electrophoresis of cell proteins from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* strains isolated from yoghurt and cheese, *Milchwissenschaft*. 47 (5), 296-298.
- Tuncer, Y., 2009, Some technological properties of phenotypically identified enterococci strains isolated from Turkish tulum cheese. *African Journal of Biotechnology*, 8(24): 7008-7016.
- Turantaş, F., Ünlütürk, A., 1998, Gıda Mikrobiyolojisi. *Ege Ün. Mengi Tan Basımevi*, Çınarlı İzmir, 158-250.
- Uylaser V., İncedayı B., Çopur Ö. U. 2008, “A traditional turkish beverage shalgam: manufacturing technique and nutritional value” *Journal of Food, Agriculture & Environment*, (3, 4), 31-34
- Verdier-Metz, I., Michel, V., Delbès, C. and Montel, M. C., 2009, Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk, *Food Microbiology*, 26: 305–310.
- Yurtyeri, A., Erol, İ., Çelik, T.H., 1983, Starter kültürlerin gıdalarımızda ve özellikle et ürünlerinde kullanılma olanakları. *Et ve Balık Endüstrisi Dergisi*, 9 (53) 7-24.
- Yüksekdağ, Z. N., 2005, Bazı laktik asit bakterilerinin fizyolojik, biyokimyasal plazmid DNA ve protein profil özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim*, 179s, Ankara.
- Zago, M., Bonvini, B., Carminati, D. and Giraffa, G., 2009, Detection and quantification of *Enterococcus gilvus* in cheese by real-time PCR. *Systematic and Applied Microbiology*, 32: 514–521.
- Zago, M., Lazzi, C., Rossetti, L., Neviani, E. and Giraffa, G., 2004, Evaluation of bacterial communities belonging to natural whey starters for Grana Padano cheese by length heterogeneity—PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 481–490.
- Zorba, M., Hancıoğlu, O., Genc, M., Karapınar, M. ve Ova, G., 2003, The use of starter cultures in the fermentation of boza, a traditional Turkish beverage. *Process Biochemistry*, 38, 1405-1411.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mehmet Metin ÇİFCİ
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Erciş 15.06.1980
Telefon : 05054572374
e-mail : mehmetmetin.cifci@tarim.gov.tr

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Laborant Meslek Lisesi, Erzincan	1997
Üniversite	: Uludağ Üniversitesi, Bursa	2009
Yüksek Lisans	: Necmettin Erbakan Üniversitesi, Konya	--

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
Kasım 1998-Halen	Bursa Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Mikrobiyoloji Bölüm Başkanlığı	Araştırmacı-Biyolog

PROJELER

TÜBİTAK - 1007 Ülkemize Özgü Yoğurt ve Peynir Kültürü Geliştirilmesi ve Pilot Ölçekte Üretimi 2017-

TÜBİTAK - 1003 Kanatlı Hayvanlardan ve Gıdalardan *Salmonella* İzlenmesi ve Kontrol Programlarının Geliştirilmesi. 2014-2017.

KALKINMA BAKANLIĞI - Ulusal Gıda Starter Kültür Gen Bankasının kurulması. 2014-2017.

TAGEM- Hazır Yemek Fabrikalarında Üretilen Bazı Yemeklerin Staphylococcal Enterotoksin Varlığı Yönünden İncelenmesi. 2011-2012.

TAGEM- Elma Sularında *Alycyclobacillus acidoterrestris* İnhibisyonunda Sıcaklık Ve Lizozim Kombine Uygulamalarının Etkinliğinin Araştırılması. 2012-2013.

TAGEM- Bursa İlinde Üretilen Çiğ Sütün, *Staphylococcus aureus* Enterotoksini Ve Bazı Parametrelere Göre Kalitesinin Belirlenerek İzole Edilecek *Staphylococcus aureus*, *E.coli* Ve *Streptococcus* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Tespit Edilmesi. 2015-2016.

TAGEM- Hazır Yemek Sektöründe Üretilen, Pişmiş Spagetti Tipi Makarnalarda *Bacillus cereus* ve Enterotoksinlerinin Risk Durumunun Değerlendirilmesi. 2016-2017.

TAGEM- Bursa İlinde Geleneksel Olarak Üretilen Ekşi Hamurdan *Lactobacillus* Türlerinin İzolasyonu Tanımlanması ve Bazı Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi. 2016-2017.

TAGEM- Geleneksel Mihaliç Peynirlerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Elde Edilen Suşların Starter Kültür Olarak Kullanılma Olanaklarının Araştırılması. 2017/-

TAGEM- Organik, Geleneksel ve Serbest Gezen Tavuk Yumurtalarında *Campylobacter* spp.'nin Tespiti ve İzolatların Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi. 2017/-

TAGEM-ARGE Farklı Doğal Kaynaklardan Elde Edilen Biyoaktif Ekstraktların Enkapsüle Edilerek Margarinde Antifungal Etkilerinin İncelenmesi. 2017-

TAGEM-ARGE 'Ulusal Veteriner Antibiyotik Direnç İzleme Projesi. 2017-

YABANCI DİLLER

İngilizce - İntermediate