



**DOĞAL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN VE
PROBİYOTİK ÖZELLİĞİ BİLİNEREN *Lactococcus*
lactis, *Lactobacillus brevis*'İN FİTAZ ENZİM
AKTİVİTELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Merve KIZILKAYA

**Yüksek Lisans Tezi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ**

2018

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DOĞAL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN VE PROBİYOTİK
ÖZELLİĞİ BİLİNEREN *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis*'İN
FİTAZ ENZİM AKTİVİTELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Merve KIZILKAYA

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2018

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**DOĞAL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN VE PROBİYOTİK
ÖZELLİĞİ BİLİNER *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis*'İN FİTAZ ENZİM
AKTİVİTELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ danışmanlığında, Merve KIZILKAYA tarafından hazırlanan bu çalışma, 04/05/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı – Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak olarak oybirliği/oy çokluğu (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç.Dr. Emine ORHAN

İmza :

Üye : Prof.Dr. Neslihan DİKBAŞ

İmza :

Üye : Dr.Öğr.Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun 10.../ 05.../ 2018... tarih ve 19.../ 12... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DOĞAL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN VE PROBİYOTİK ÖZELLİĞİ BİLİNER *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis*'İN FİTAZ ENZİM AKTİVİTELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Merve KIZILKAYA

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Bakterilerin biyoteknolojide kullanım alanları son on yılda giderek artmaktadır. Bitkilerden, hayvanlardan farklı olarak bakteriler hızlı çoğalır ve biyokimyasal etkileri bakımından canlılar aleminin ve ekosisteminin dengesini sağlayan en önemli organizmalardır. Bakterilerin günümüzdeki insan yaşamını etkileyen çok önemli bir özelliği biyoteknolojideki yaptığı katkılardır. Biyoteknolojik olarak bakteriler üzerinde çeşitli çalışmalar yapılarak fayda ve ürün eldesi mümkündür. Bu nedenle bakterilerden elde edilen ve endüstriyel boyutu çok yüksek olan enzim üretimi güncelliğini giderek artırmaktadır. Bu enzimlerden en önemlilerinden bir tanesi fitazdır. Fitaz aynı zamanda kimyasal adıyla myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase olarakta bilinmektedir.

Çalışmamızda kullanılan bakterilerin fitaz enzimi üretme ve probiyotik özelliklerinin araştırılması yapılmıştır. Bu sebeple doğal kaynaklardan izole edilen *Lactococcus lactis* ve *Lactobacillus brevis* suşlarının 16S rRNA ile moleküler tanımlanması, bakterilerin fitaz enzim üretme aktivitelerinin test edilmesi, probiyotik özelliklerinin literatür çalışması yapılarak endüstriye uygunluğunun araştırılması amaçlanmıştır. Mevcut bakteriler 16S rRNA yöntemi ile tanımlanmıştır. %99 oranında tanımlanan *Lactococcus lactis*'ten üretilen ekstraselüler fitaz enzimi optimum pH'sı 8.0, optimum sıcaklığı 60°C olarak bulunurken; *Lactobacillus brevis*'ten üretilen ekstraselüler fitaz enziminin optimum pH'sı 3.0, optimum sıcaklığı 50°C olarak bulunmuştur. *L.lactis* ve *L.brevis*'in pH aralığının çok geniş olması ve optimum sıcaklıklarının endüstriyel uygulamalara uyumlu aynı zamanda probiyotik özelliklerinin üstünlüğünden dolayı endüstriye sunulabileceği yapılan çalışmayla teyit edilmiştir.

2018, 55 sayfa

Anahtar Kelimeler: 16S rRNA, Fitaz, *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis*, Probiyotik

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

A STUDY ON THE COMPARISON BETWEEN THE PHYTASE ENZYME ACTIVITIES OF *Lactococcus lactis* AND *Lactobacillus brevis* WHICH ARE OBTAINED THROUGH NATURAL RESOURCES AND HAVE PROBIOTIC NATURES

Merve KIZILKAYA

Ataturk University
Institute of Science and Technology
Department of Agricultural Biotechnology
Department of Enzyme and Microbial Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

The use of bacteria in biotechnology has been increasing in the last decade. Unlike plants and animals, bacteria are the most important organisms that provide a balance in the living organisms and ecosystems due to their fast-growing biochemical effects. A very important characteristic of bacteria that affects human life today is their contributions to biotechnology. A variety of biotechnological studies on the bacteria can be made and benefits and products can be obtained from these studies. Therefore, the enzyme production, which is obtained from bacteria and has a very high industrial size, is increasingly becoming popular. One of the most important enzymes is phytase. The phytase is also known as myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase, with its chemical name.

The phytase enzyme production and probiotic properties of bacteria used in our study were investigated. Therefore, it was aimed to investigate the molecular identification of 16 strains of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus brevis* strains isolated from natural resources, respectively, by 16S rRNA, to test phytase enzyme production activities of bacteria and to investigate the industrial suitability of their probiotic properties. The identification of the bacteria was performed using the 16S rRNA method. The optimum pH of the extracellular phytase enzyme produced from *Lactococcus lactis* identified at 99% level was 8.0, while the optimum temperature was 60°C. The optimum pH of the extracellular phytase enzyme produced from *Lactobacillus brevis* was 3.0, while the optimum temperature was 50°C. Due to the wide pH range of *L.lactis* and *L.brevis*, the suitability of their optimum temperatures to industrial applications and their superior probiotic properties, this study confirmed its suitable use in industry.

2018, 55 pages

Keywords: 16S rRNA, Phytase, Probiotic, *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis*

TEŞEKKÜR

Çalışma sürecimde göstermiş olduğu her türlü yardım ve katkılarından dolayı danışman hocam sayın Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ'a teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Ayrıca her zaman yanımda olan yüksek lisans arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca yanımda olan ve maddi manevi desteklerini esirgemeyen, beni bugünlere getiren değerli aileme minnettar olduğumu bildirmek isterim.

Merve KIZILKAYA

Nisan, 2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Biyoteknoloji	1
1.2. Laktik Asit Bakterileri.....	1
1.2.1. <i>Lactococcus</i> cinsi	3
1.2.2. <i>Lactobacillus</i> cinsi.....	4
1.3. Enzimler	5
1.3.1. Fitaz enzimi	6
1.4. Fitaz Enziminin Ticari Kullanım Alanları.....	7
1.4.1. Gıda endüstrisi.....	7
1.4.2. Yem sanayi	8
1.4.3. Myo- inositol fosfat eldesi.....	8
1.4.4. Toprak zenginleştirme	9
1.4.5. Biyoteknoloji	9
1.5. Probiyotikler.....	10
2. KAYNAK ÖZETLERİ	12
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar	20
3.1.2. Kullanılan kimyasallar	21
3.1.3. Kullanılan kitler.....	21
3.1.4. Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı	21
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Mikroorganizma izolasyonu ve identifikasyonu	25

3.2.2. Morfolojik özelliklerin belirlenmesi	26
3.2.3. Çalışmada kullanılan bakteri kültürlerinin muhafazası.....	26
3.2.4. Mikroorganizmanın moleküler tanılanması	27
3.2.4.a. Bakteri izolatlarının DNA izolasyonu	27
3.2.4.b. 16S rRNA bölgesinin PCR yardımı ile çoğaltılması.....	28
3.2.4.c. DNA dizi analizlerinin alınması ve sonuçların değerlendirilmesi.....	29
3.2.5. Bakterilerin inokülasyonu	29
3.2.6. Enzim aktivitesinin ölçülmesi	29
3.2.6.a. Enzimin optimum pH değerinin saptanması	30
3.2.6.b. Enzimin optimum sıcaklık değerinin saptanması.....	30
4. ARAŞTIRMA BULGULAR.....	31
4.1. Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi	31
4.2. Moleküler Yöntem ile Bakterilerin Tanınması.....	32
4.2.1. PCR sonuçlarının jel görüntüsü.....	32
4.2.2. Dizi analiz sonuçları	32
4.3. Fitaz Aktivitesi Sonuçları	35
4.3.1. Fitaz enziminin optimum pH sonuçları	35
4.3.2. Fitaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları	37
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	40
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	56

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat
ATP	Adenozin Trifosfat
DMSO	Dimetilsülfoksit
EC	Enzim Komisyonu
IUBMB	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Menten sabiti
L	Litre
LAB	Laktik Asit Bakterileri
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
nm	Nanometre
rpm	Dakikada devir sayısı
sp.	Tür, tekil (species)
TCA	Trikloroasetik asit
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
U/mg	Unit/miligram
unit/μl	Unit/mikrolitre
v/v	Hacim/Hacim (volüme/volüme)
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Homofermantatif ve heterofermantatif yollar.....	2
Şekil 1.2. Homofermantatif ve heterofermantatif bakteriler.....	2
Şekil 1.3. Laktik asit bakterileri.....	3
Şekil 1.4. Fitik asitin ve fitik asit şelatının (fitat'ın) yapısı	6
Şekil 4.1. <i>Lactococcus lactis</i> 'in saflaştırılmış koloni(A) ve Gram boyama (B) görüntüsü.....	31
Şekil 4.2. <i>Lactobacillus brevis</i> 'in saflaştırılmış koloni (A) ve Gram boyama (B) görüntüsü.....	31
Şekil 4.3. <i>Lactococcus lactis</i> (NL-1) ve <i>Lactobacillus brevis</i> (NL-2)'in PCR sonucu jel görüntüsü	32
Şekil 4.4. <i>Lactococcus lactis</i> izolatının 16S rRNA gen bölgesine ait dizi analizi sonucu.....	33
Şekil 4.5. <i>Lactococcus lactis</i> 'in NCBI'daki BLAST sonucu	33
Şekil 4.6. <i>Lactobacillus brevis</i> izolatının 16S rRNA gen bölgesine ait dizi analizi sonucu.....	34
Şekil 4.7. <i>Lactobacillus brevis</i> 'in NCBI'daki BLAST sonucu	34
Şekil 4.8. <i>Lactococcus lactis</i> 'ten elde edilen ekstraselüler fitaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	36
Şekil 4.9. <i>Lactobacillus brevis</i> 'ten elde edilen ekstraselüler fitaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	37
Şekil 4.10. <i>Lactococcus lactis</i> 'ten elde edilen ekstraselüler fitaz enzimin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	38
Şekil 4.11. <i>Lactobacillus brevis</i> 'ten elde edilen ekstraselüler fitaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. <i>Lactococcus lactis</i> 'in optimum pH absorbans (A) değerleri	35
Çizelge 4.2. <i>Lactobacillus brevis</i> 'in optimum pH absorbans (A) değerleri	36
Çizelge 4.3. <i>Lactococcus lactis</i> 'in optimum sıcaklık absorbans (A) değeri.....	38
Çizelge 4.4. <i>Lactobacillus brevis</i> 'in optimum sıcaklık absorbans (A) değerleri.....	39



1. GİRİŞ

1.1. Biyoteknoloji

Biyoteknoloji; genlerin bulunması amacıyla mikroorganizma, hücre, doku kültürlerinden ve mikrobiyal metabolitlerden karakterize edilmesi, izolasyonu ve hedef hücrelere aktarılması aşamalarının tamamının gerçekleştirildiği bilim dalıdır (Özgen vd 2005).

İlk kez Karl Erkey tarafından kullanılan biyoteknoloji kavramı kelime anlamı biyoloji ve teknoloji olarak 1919 yılında ortaya çıkmıştır. Tanım olarak “ alınan besinlerin yeni ürünlere dönüştürülmesi ve biyolojik sistemlere yararlı hale getirilme işlemidir.” şeklinde yapılmıştır (Fari ve Kralovanszky 2006). Biyoteknolojinin amacı; daha iyi bir dünya oluşturarak insanları daha iyi şartlarda yaşatabilmektir (Tokalak 2011).

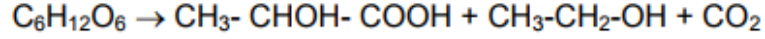
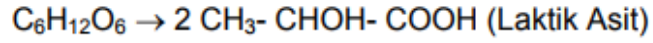
1.2. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri endüstriyel açıdan önem arz eden başlıca bakterilerdir (Pfeiler and Klaenhammer 2007). Laktozdan laktik asit fermentasyonu sonucu laktik asit oluştururlar (Salminen and Wright 1993; Tekinşen ve Atasever 1994).

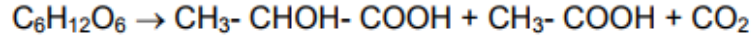
Genel olarak laktik asit bakterileri; *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* vs. cinslerini içeren dokuz temel gruptur (Gheytanci *et al.* 2010).

Laktik asit bakterileri, hekzosları fermente ederken laktik asitin %50'sinde etanol ve/veya asetat, CO₂ meydana getiriyorlarsa heterofermantatif, %90 oranında laktik asit oluşturuyorsa homofermantatif laktik asit bakterileri olarak iki gruba ayrılır (Tunail 2009).

Homofermentatif yol:



Heterofermentatif yol:



Şekil 1.1. Homofermantatif ve heterofermantatif yollar (Yüksekdağ ve Beyatlı 2003)

Laktik asit bakterileri genellikle mezofilik olmakla birlikte 5°C gibi düşük, 45°C gibi yüksek sıcaklıklarda gelişebilirler. Optimum 30°C'de faaliyet gösterirler (Rees 1997). Aynı şekilde suşların çoğu pH 4.0-4.5'de gelişirken bazıları pH 9.6'da bazıları ise pH 3.2'de aktiftirler. Suşlar genellikle zayıf proteolitik ve lipolitik aktivite gösterirler (Caplice and Fitzgerald 1999).

Homofermantatifler: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CH_3-CHOH-COOH$		Heterofermantatifler: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3-CHOH-COOH + CH_3-CH_2-OH + CO_2$	
Cocci		ve/veya $\rightarrow CH_3-CHOH-COOH + CH_3-COOH + CO_2$	
Lactobacilli		Lactobacillus	
Lactococcus	Streptobakteriler	Leuconostoc	Lactobacillus
<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Opt. 30-37 °C ve 15 °C'de gelişirler.	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	<i>L. bifermentas</i>
<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	<i>L. casei</i>	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	<i>L. brevis</i>
<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>L. alimentaris</i>	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>L. fermentum</i>
Enterococcus	<i>L. coryniformis</i>	<i>Leu. lactis</i>	<i>L. kandleri</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>L. plantarum</i>		<i>L. viridescens</i>
Streptococcus	Termobakteriler		
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	Opt. 40 °C'de gelişirler 15 °C'de gelişmezler		
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>		
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>		
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>		
	<i>L. acidophilus</i>		
	<i>L. helveticus</i>		
	<i>L. salivarius</i>		

Şekil 1.2. Homofermantatif ve heterofermantatif bakteriler (Tunail 2009)

Cins	Tür/ Alt tür/ Varyete (son isimlendirme)	Grup	Laktik asit Formu	Geleneksel isimlendirme
<i>Lactococcus</i>	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	LAB	L(+)	<i>Lac. lactis</i>
	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	LAB	L(+)	<i>Lac. cremoris</i>
	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	LAB	L(+)	<i>Lac. diacetylactis</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	LAB	L(+)	<i>S. thermophilus</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	LAB	D(-)	<i>Leu. cremoris</i>
	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	LAB	D(-)	<i>Leu. dextranicum</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	LAB	D(-)	<i>L. bulgaricus</i>
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	LAB	D(-)	<i>L. lactis</i>
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>helveticus</i>	LAB	DL	<i>L. helveticus</i>
	<i>L. acidophilus</i>	LAB	DL ve L(+)	<i>L. acidophilus</i>
	<i>L. casei</i>	LAB	DL ve L(+)	<i>L. casei</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	LAB	L(+)	<i>Bifid. bifidum</i>

Şekil 1.3. Laktik asit bakterileri (Tunail 2009)

1.2.1. *Lactococcus* cinsi

Lactococcus, önceden *Streptococcus* N1 grubuna dahil olan laktik asit bakterilerinin bir türüdür (Schleifer *et al.* 1985). Homofermantörler olarak bilindikleri için tek bir ürün üretirler, bu durumda laktik asit glikoz fermantasyonunun büyük veya tek ürünüdür. Homofermentatif karakteri; glikoz konsantrasyonu, pH ve besin kısıtlaması gibi çevresel koşulları ayarlayarak değiştirebilirler. Bunlar tekli, çiftli veya zincirli bulunan gram (+), katalaz (-), hareketsiz koklardır (James 1992). Bu organizmalar gıda endüstrisinde peynir gibi fermente süt ürünlerinin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tek starter kültürlerde veya *Streptococcus* ve *Lactobacillus* gibi diğer laktik asit bakterileri ile karışık strain kültürlerde kullanılabilir. *L. lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* endüstriyel süt fermantasyonlarında başlangıç kültürleri olarak kullanılan suşlardır (Vos 1994). Bakteriler nihai ürünün lezzetinde de rol oynar (Eds *et al.* 1991).

Lactococcus şu anda biyoteknoloji endüstrisinde kullanılmaktadır. Gıda sınıfı bakterilerdir ve gıda endüstrisine uygulanan yabancı proteinlerin üretiminde kullanılırlar.

Lactococcus lactis, peynir ve ayran üretiminde yaygın olarak kullanılan bir gram (+) bakteridir fakat aynı zamanda insan hastalıklarının tedavisinde canlı olarak kullanılmak üzere ilk genetik olarak modifiye edilmiş organizmadır (Braat *et al.* 2006).

L.lactis hücreleri, kısa zincir ve çiftler halinde bulunan, büyüme koşullarına bağlı olarak 0.5 - 1.5 µm'lik tipik bir uzunlukta ovoid görünen koklardır. *L.lactis* spor oluşturmaz ve hareketsizdir. Homofermantatif bir metabolizmaları olduğu için L-(+)- laktik asit üretirler (Roissart and Luquet 1994). Bununla birlikte D-(-)- laktik asit düşük pH'da kültürlendiğinde üretebildiğini bildirmiştir. Laktik asit üretme kabiliyeti, *L.lactis*'in süt endüstrisinde önemli mikroorganizmalardan biri olmasının nedenlerinden biride budur.

L.lactis, gıda fermantasyonundaki geçmişine bakılarak, fırsatçı bir patojen olabileceğine dair birkaç vaka raporu ile genel olarak güvenli (GRAS) statüsü olarak kabul edilmiştir (Wessels *et al.* 2004).

1.2.2. *Lactobacillus* cinsi

Lactobacillus cinsi bakteriler *Lactobacillaceae* familyasına aittir ve LAB (Laktik Asit Bakterileri) grubundadırlar. Basil yapıda, gram (+), katalaz (-) ve spor oluşturmeyen bakterilerdir. Bu gruptaki bakteriler optimum 30-40°C gelişir, hafif asidik ortamda hızla çoğalarak asit oluştururlar (Kıran 2006).

Lactobacillus brevis, fermantasyon sırasında laktik asit ve CO₂ oluşturan, heterofermantatif, çubuk şeklinde ve gram pozitif bir laktik asit bakterisidir. Yaklaşık 16 farklı suşu vardır (Pavlova *et al.* 2002).

Normal mikrobiyal biyotada rastlanabildiği gibi fermente gıdalarda da bulunur. Genellikle turşu gibi yiyeceklerde rastlanır. *L. brevis*'in başlıca metabolitleri etanol ve laktik asittir (Pidoux 1989).

1.3. Enzimler

Enzimler biyokatalitik özelliğe sahip olan, çeşitli reaksiyonları katalizleyen genellikle protein yapıdaki biyomoleküllerdir. Canlı organizmaların hayati fonksiyonlarını gerçekleştirmelerinde önemli rol oynarlar (Aehle 2004).

Enzimlerin katalize ettiği bir tepkimede, enzim ve substratı kimyasal ve kimyasal olmayan bağlar aracılığıyla enzim-substrat ara kompleksi oluşturmakta ve reaksiyonun devamında ürün oluşurken enzim serbest hale gelerek tekrar aynı reaksiyon döngüsüne katılmaktadır (Bohn *et al.* 2008).

Enzimler kompleks organik polimerler olmakla birlikte yüksek moleküllü, genellikle stereo selektif biyokatalizörler olarak etki gösterirler. Bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal olmak üzere üç kaynaktan elde edilirler. En önemli grubu mikrobiyal enzimler olarak görülmektedir.

Mikrobiyal kaynaklı enzimlerin katalitik etkileri hayvansal ve bitkisel kaynaklı enzimlere kıyasla çok daha yüksektir. Mikroorganizma kaynaklı enzimler ucuz, kolay ve fazla miktarda üretilebilmektedir ve stabiliteleri daha yüksektir (Aygan 2008). Çeşitli olumsuzluklardan dolayı kimyasal katalizörler, mikrobiyal enzimlerin birçok endüstriyel uygulamada giderek artan bir hızla yaygın olarak kullanımı bulunmaktadır. Enzimler bunların arasında uygulama alanı olarak tıbbi uygulamalar, gıda üretimi, enerji üretimi ve çevre kirliliğinin eliminasyonu sayılabilir (Smith 2004; Caf 2012).

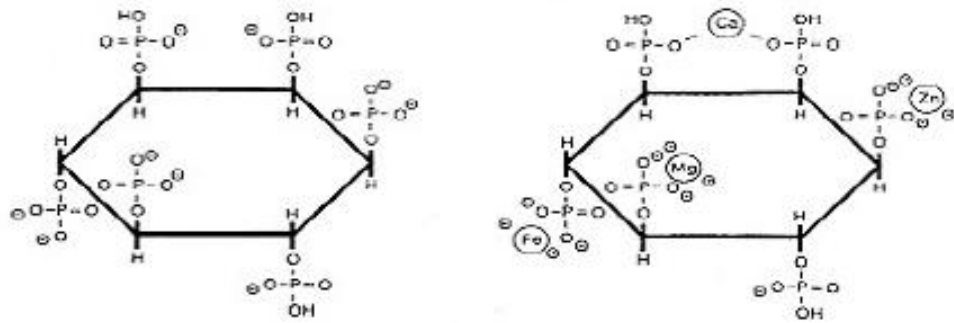
Deterjan, gıda ve nişasta endüstrileri endüstriyel enzim üretiminin %75'ini kullanmaktadır ve lipaz, amilaz, selülaz, pektinaz, proteaz gibi hidrolazlar en yaygın

kullanılan enzim gruplarındandır (Cowan 1996). Endüstride kullanılan bir diğer enzimde fitaz enzimidir.

1.3.1. Fitaz enzimi

Fitaz enzimi bazı hayvansal dokularda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunmasına rağmen yapılan son araştırmalar mikrobiyal fitazların biyoteknolojik çalışmalar için en ümit verici olduğunu göstermiştir (Pandey *et al.* 2001; Vohra and Satyanarayana 2003).

Fitik asit ilk olarak 1855 ve 1856 yıllarında Harting ve ark. tarafından, farklı bitki tohumlarından nişasta olmayan ve küçük partiküller halinde izole edilmiştir. İlerleyen zamanlarda, çeşitli araştırmacılar fitatı küresel ‘globoid’ formda izole ederek kimyasal yapısının fosfor, karbon ve metal iyonlarından oluştuğunu belirlemiştir. 1897 yılında Winterstein tarafından “inositol-fosforik asit” adı verilmiştir. 1968 yılında da IUPAC-IUB tarafından günümüzde de kullanılan ‘Myo-inositol 1,2,3,4,5,6 hekzakis dihidrojen fosfat’ olarak adlandırılmıştır (Fredrikson *et al.* 2001).



Şekil 1.4. Fitik asitin ve fitik asit şelatının (fitat'ın) yapısı (Anonim 2018)

Mikrobiyal fitaz kaynakları içine birçok fungus, maya ve bakteri türü girmektedir. Bakteriyel kaynaklı fitazlar *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Shigella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* gibi birçok bakteri türünden elde edilmiştir (Kumar *et al.* 2011). Fungal kaynaklı fitazların büyük bir kısmı *Aspergillus* sp.'den izole edilmiştir. Ayrıca *Mucor* ve *Penicillium* türlerinden izole

edilmiştir. Mayalardan ise, *Clavispora lusitaniae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida intermedia*, *Candida tropicalis* türlerinde izole edilmiştir (Zhang *et al.* 2013).

Fitazlar genellikle intraselüler veya ekstraselüler olmaktadır. Fungal fitazların birçoğu ekstraselülerdir. Bakteriyel fitazlar çoğunlukla intraselüler olmasına rağmen *Bacillus* türlerinde ekstraselüler fitaz aktivitesi de gözlenmiştir (Kumar *et al.* 2010).

Günümüzde ticari olarak kullanılan fitaz enzimleri çoğunlukla mikrobiyal kaynaklıdır. Yaygın olarak *Aspergillus fusarium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* kullanılmaktadır. Bakteriyel fitazlar proteolizize ve substrat spesifitesine karşı direnç gibi özellikleri ile fungal fitazlara farklı alternatifler oluşturmaktadır (Lonnerdal 2002).

Ticari fitaz enzimlerinin ısıya dayanıklılığının artırılması için rekombinant DNA teknolojileri kullanılmaktadır. Örneğin, *E. coli* fitazının, *Pichia pastoris* kullanılarak modifiye edilmiş ticari hali "Phytase Granular Feed Grade ®" ismiyle granüler ticari enzim olarak Winovazyme Biological Science & Technology Co. Ltd. tarafından satılmaktadır (Madigan *et al.* 1997).

1.4. Fitaz Enziminin Ticari Kullanım Alanları

1.4.1. Gıda endüstrisi

Fitik asitin divalent iyonlarla şelat yapma özelliği besinlerden alınan bakır, çinko, demir, magnezyum, kalsiyum gibi minerallerin alınımını olumsuz etkilemektedir. Şelat halindeki fitik asit-mineral kompleksi fizyolojik pH değerlerinde çözünmez haldedir. Bu durum, fitik asit içeriği yüksek diyetle beslenen toplumlarda düşük mineral Emilimi görülmesine neden olur. Gıda üretiminde fitaz enzimi kullanılması ile insanlarda mineral madde Emiliminde artış olması amaçlanmaktadır (Lei *et al.* 2012).

Gıda sanayinde bitkisel protein izolatlarının üretimi, gıdaların işlenmesi sırasında fitaz enzim ilavesi ile ekmek yapımı ve tahıl kepeklerini parçalamak amaçlı kullanılmaktadır (Quan *et al.* 2002). Gıda hazırlama ve işleme sırasında, fitat genel olarak mikroorganizma ve bitkilerde doğal olarak bulunan fitazlarla tamamen hidrolize olmamaktadır. Özellikle demir olmak üzere minerallerin yararlanımını artırmak için fitat en düşük seviyelere indirgenmelidir (Hurrell 2003).

1.4.2. Yem sanayi

Fosfor çok önemli fizyolojik ve yapısal işlevlere sahip olduğu için, hayvanlara mutlaka ihtiyaçları kadar verilmelidir. Ticari olarak yetiştirilen tüm kanatlı hayvanların karma yemlerinin hemen hemen tamamı bitkisel kaynaklı küspelerden ve dane yemlerden oluşmaktadır (Erkek *et al.* 1994).

Kanatlı karmalarında kullanılan bitkisel kaynaklı yan ürünler, küspeler ve dane yemlerdeki toplam fosforun yaklaşık 2/3'ü fitin fosforu formunda olup sindirim aktivesi yokluğu nedeniyle kanatlılar tarafından faydalanılamamaktadır ve çoğunluğu gübreye dışarı atılmaktadır (Gheisari *et al.* 2003; Aşan 2007b). Bu durum hayvan yetiştiriciliği yapılan alanlarda, toprakta var olan fosfor miktarında artışa neden olmaktadır. Yemlere yapılan fosfor ilavesi hem maliyeti hem de fosfat kirliliğini artırmaktadır. Hayvan yemlerine eklenen fitaz enzimi fosfatın yararlılığını artırmaktadır (Marlida *et al.* 2010).

1.4.3. Myo- inositol fosfat eldesi

Fosfolipidler ve inositol fosfatlar transmembran sinyalizasyonunda ve intraselüler kaynaklardan kalsiyum iletiminde görev almaktadır. Myo-inositol fosfat, fitaz enzimi tarafından parçalayarak serbest myo-inositol türevleri açığa çıkarmaktadır. Buradan yola çıkılarak fitaz enzimleri myo-inositol fosfat eldesi için farklı bir alternatif oluşturmaktadır (Quan *et al.* 2001). Çeşitli araştırmacılar bu amaçla *E.coli* ve *Saccharomyces cerevisiae* fitazı kullanarak fitik asitin enzimatik olarak hidrolizinden

myo-inositol fosfat türevleri hazırlamışlardır. Aynı araştırmacılar sonraki çalışmalarında inositol fosfat türevlerinin astım gibi solunum rahatsızlıkları ve eklem iltihabına karşı kullanıldığı bildirilmiştir (Raghavendra *et al.* 2010).

1.4.4. Toprak zenginleştirme

Çeşitli alanlardaki topraklarda fitik asit ve türevleri mevcut organik fosforun %50'sini oluşturabilmektedir (Rees 1997). Bu özelliği göz önüne alan araştırmacılar mısır bitkisi için fosforun kullanılabilmesinde fitazın etkisini araştırmışlardır (Richardson and Hadobas 1997).

Toprağa fitaz ilavesi yapıldığında fitik asitin parçalanma oranının yükseldiğini ve buna bağlı olarak büyümenin de uyarıldığını bildirmişlerdir. Bu çalışma aynı zamanda da bitki köklerinde fitaz geninin ekspresyonu ile transgenik bitkilerle topraktaki fosforun kullanılabileceği ile ilgili araştırmalara da yön vermektedir (Robinson *et al.* 1996).

1.4.5. Biyoteknoloji

Geçtiğimiz 20 yıl içerisinde fitaz enzimi, biyoteknoloji ve çevre koruma alanlarındaki bilim adamlarının dikkatini çekmektedir. Özellikle biyoteknolojik uygulamalarda fitazlar (bilhassa gıda ve yemlerdeki fitat içeriğini azaltmada) büyük önem taşımaktadır (Lei and Stahl 2001; Vohra and Satyanarayana 2003).

Peletlenmiş yemlerde fitaz enziminin aktivite kaybı olmaması için sonradan kimyasal olarak kaplanması veya spreyleneceği yöntemleri olsa bile yem katkısı olarak termostabil fitaz enzimlerinin kullanımı daha iyi bir yöntem olacaktır. *Aspergillus fumigatus*'un fitaz enzimi sıcaklığa dayanıklı olarak bulunmuş ve bu dayanıklılık büyük potansiyel oluşturmuştur (Rodriguez *et al.* 2000b). Bu enzimi daha fazla üretmek, proteaz enzimleri ve yüksek sıcaklıklara karşı tepkisini ölçmek, farklı substratlara karşı rekombinant enziminin reaksiyonunu belirlemek amaçları için *A. fumigatus*'un fitaz geni *Pichia pastoris*'de eksprese edilmiştir.

Günümüzde fosfatın sınırlı olduğu bölgelerde, bitki beslemede toprak fitatından fosfor kullanım öneminin anlaşılması ile bitki kökünde ekstraselüler olarak *Aspergillus* fitazının ekspresyonu ile fitatın bitkiler tarafından kullanımı sağlamıştır (Richardson *et al.* 2001a) ve ekstraselüler fitaz aktivitesine sahip toprak mikroorganizmalarının yanı sıra bitki kökü çevresine saflaştırılmış fitaz ilavesi de yapılmıştır (Richardson *et al.* 2001b; Idris *et al.* 2002).

1.5. Probiyotikler

Probiyotikler genel sağlık koşullarını iyileştirmek için hayvanlara veya insanlara yeterli miktarda uygulanan canlı mikroorganizmalardır (Monteagudo-Mera *et al.* 2012).

Probiyotikler aslında yetişkin insanların doğal bağırsak florasının üyeleridir. Bunların vücutta yeterli düzeyde bulunmaları, sindirim sistemindeki zararlı ve yararlı mikroorganizmalar arasındaki dengesinin korunmasını sağlar (Tunail 2009).

Probiyotik bakterilerin inkübasyon süreleri uzun olduğu için fermente ürün üretirken genellikle yoğurt bakterileriyle beraber kullanılırlar (Sağdıç vd 2004).

Probiyotik bakteriler, çeşitli süt ürünlerinde ikincil flora olarak katılabildiği gibi sakız, dondurma, cips vb. gıdalara da ve hatta kafes balıkçılığında balık yemlerine ve kümes hayvanlarının yemlerine katılmaktadır.

Probiyotik preparat ve kültür hazırlanmasında en fazla *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinden yararlanılır. Örnelemek gerekirse en yaygın kullanılanlar *Lactobacillus acidophilus*, *L.casei*, *L.brevis*, *L.plantarum*, *L.reuteri*, *Bifidobacterium bifidum*, *B.longum*, *B.infantis* 'tir (Tunail 2009).

Probiyotik suşları her şeyden önce vücuda alındığında sağlığa zarar vermeyen ve toksin üretmeyen GRAS (Generrally Regarded As Safe) statüsündeki mikroorganizmalarda

seçilmeleri gerekir. Seçilme kriterleri arasında; bakteriyosin, insan orjinli olma veya diğer antimikrobiyal maddeleri üretebilme ve bunlarla patojenleri inhibe etme, koloni oluşturma ve bağırsak epitelyum hücrelerine tutunma, mide asitlerine ve safra tuzlarına dirençli olma gibi özellikler bulunmalıdır (Tunail 2009).

Laktik asit bakterileri, rekombinant fitaz ekspresyonu çalışmalarında etkili bir şekilde kullanılabilir (Garcia-Fruitos 2012). Bunlar ekonomik, güvenli ve aynı zamanda yüksek saflıkta ve istikrarlı enzim üretirler. Aksine yönetim yolunda belirsizlik, yüksek tür çeşitliliği ve klinik deneme verilerinin bulunmaması nedeniyle rekombinant probiyotik fitazların kullanılmasında kritik zorluklar vardır (Wyszyn'ska *et al.* 2015).

Probiyotiklerdeki fitatlar, insan vücudunda fosfat kullanımı için bir çözüm sunar. Bu fitatlar ideal bir araç olan fermente gıda ürünlerini tüketerek elde edilebilir. Fermente edilmiş gıda ürünlerinde *B.subtilis* ve *L.brevis*'in daha yüksek miktarda fitaz ürettiği tespit edilmiştir. Probiyotik fitazların çoğu fitata karşı çok spesifik ve daha fazla etkili olması için Ca^{+2} iyonları tarafından uyarılırlar. Bunlardan farklı olarak rekombinant fitazlar bağırsaktaki fitat kullanımında da etkili olabilirler (Priyodip *et al.* 2017).

Doğal kaynaklardan (yoğurt ve taze kaşar) fitaz üretme yeteneğinde olan mikroorganizmaların izolasyonu (LAB), saf kültürlerinin hazırlanması, identifikasyonu, en yüksek fitaz üretme yeteğine sahip olan suşlarda (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis*) üretilen fitaz enziminin karakterizasyonu ve bu bakterilerin bilinen probiyotik özelliklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Feng *et al.* (2017) çalışmalarında 60 günlük sağlıklı domuz yavrularının bağırsak mukozasından izolasyonu gerçekleştirilen laktik asit bakteri suşlarındaki probiyotik özellikleri potansiyel uygulama probiyotikleri üretmek için *in vitro* araştırmışlardır. Bağırsak mukozasının safra tuzu ve asidik direnci göz önünde bulundurularak *Lactobacillus brevis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus rhamnosus* ve *Lactobacillus plantarum*'un 16S rRNA gen dizilimi doğrultusunda suşlar seçilmiştir. Seçilen bu suşlar *Salmonella pullorum* AS1.1859, *Staphylococcus aureus* CVCC1882 ve *E. coli* CVCC1570'e karşı güçlü bir antimikrobiyal etki sergilemiştir. Bunlara ek olarak *L. plantarum* ve *E. faecium*'un *Escherichia coli*'ye karşı göstermiş olduğu yüksek agregasyon sebebi ile hayvan yemi takviyelerinde potansiyel probiyotik kullanımı için gerekli olan probiyotik özelliklere sahip oldukları sonucuna ulaşmışlardır.

Kumar *et al.* (2017), Himachal Pradesh'in kırsal ve kentsel bölgelerindeki geleneksel turşulardan toplam 15 tane laktik asit bakterisi izole etmiştir. Bu izolatlar biyokimyasal, morfolojik ve 16S rDNA sekansı analizi sonucunda *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides* ve *Enterococcus* sp. olarak bulmuştur. Test edilen 15 izolattan sadece 6'sının fitaz aktivitesi gösterdiğini gözlemlemiştir. Bu LAB *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* ve *Shigella dysenteriae*'ye karşı antimikrobiyal aktivite sergilediğinden dolayı Himachal Pradesh'in geleneksel turşularındaki LAB'ların probiyotik olarak kullanılması için yüksek potansiyele sahip olduğunu söylemiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak elde edilen LAB izolatlarının probiyotik olarak kullanılması için potansiyele sahip olduğunu söylemiştir.

Kimchi'den (Kore'ye ait bir yemek) izole edilen ve potansiyel probiyotik fonksiyonlara sahip olan *Lactobacillus curvatus* KCCM 200173, *Lactobacillus brevis* G1 ve *Lactobacillus brevis* KU15006 suşları 16S rRNA sekansı analizi ile tanımlanmıştır. *L. brevis* KU15006 suşu gıda kaynaklı patojenler olan *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli*'ye karşı önleyici etkinlik göstermiştir. Gösterdiği önleyici etki

sonucunda, bu suşun probiyotik ürünler için patojen antagonistik ve antidiyabetik özelliğe sahip olduğu saptanmıştır (Son *et al.* 2017).

Hirimuthugoda *et al.* (2006) tarafından yapılan bir çalışmada farklı habitatlardan denizel maya suşları izole etmişler ve fitaz üreten deniz mayalarını araştırmışlardır. İzole edilen maya suşlarından 10 tanesinde yüksek fitaz aktivitesi saptanmıştır. Bu 10 suşun biyokimyasal ve fizyolojik karakterleri ile ürettikleri basit fitazın optimum sıcaklık ve pH değerleri incelenmiş, 18S rDNA'nın kısmi sekansları analiz edilmiştir. İnceleme sonunda fitaz üreten deniz mayalarının, deniz fosfor kirliliğinin biyoremediasyonunda kullanılmak için yeterli olduğunu ileri sürmüştür.

Zuo *et al.* (2010) *Aspergillus ficuum*'un fitaz enzimi kodlayan 1.4kb'lık gen bölgesini pIA88 plazmidine aktararak elektroporasyon yöntemi ile bu gen bölgesi *Lactobacillus casei*'ye transfer edilmiştir. Gen transferi tamamlanan *L.casei* anaerobik sıvı besiyerinde geliştirilerek fitaz aktivitesi incelenmiştir. Gelişimin 4.gününde en yüksek intraselüler ve ekstraselüler fitaz aktiviteleri 4.49 ve 22.12 U ml⁻¹ olarak saptanmıştır. Fitazın optimum sıcaklığı 40-80°C ve optimum pH'sı 5.0 olup inkübasyonun 3.gününde anaerobik ortamda en düşük pH değerinin 3.35 olduğu ve tanımlanmış fitazın moleküler ağırlığı 39.2 kDa olarak bulunmuştur.

Miao *et al.* (2013) yaptığı çalışmada *Bacillus subtilis* GYPB04'ün fitaz genini (phyC) *Lactococcus lactis*'te ekspresyon için pMG36e plazmitine klonlanmıştır. M17 broth içerisinde plazmittedeki fitaz geni *Lactococcus lactis*'e aktarmıştır. Sonuç olarak süt endüstrisinde tüketiciye aktif fitaz ve probiyotik sağlayan fonksiyonel, sağlıklı yoğurtların ve diğer fermente süt ürünlerinin geliştirilmesi için kullanılabileceğini savunmuştur.

Kerovuo and Tynkkynen (2000) yılında yaptıkları çalışmada *Bacillus subtilis* VTT E-68013'ten fitaz (phyC) genini, *Lactobacillus amylovorus* a-amilaz salınım siyallerini kullanarak 755 *Lactobacillus plantarum* suşu içine eksprese etmişlerdir. Çalışma

sonucunda rekombinant fitazın *Lactobacillus plantarum* 755'in doğal fitazına kıyasla daha yavaş bir oranda salgılandığını gözlemlenmiştir.

Aspergillus niger ATCC 9142'den üretilmiş ekstraselüler fitazı; ilk olarak ultrafiltrasyon, sonrasında ise jel filtrasyon, kromatofokuslama ve iyon değişim kromatografisi adımları izlenerek izole edilmiştir. Saflaştırılan enzimin 84 kDa moleküler ağırlığına sahip monomerik bir protein olduğu bulunmuştur. Optimum pH'sı 5.0, optimum sıcaklığı 65°C, Vmax değeri 7 nmol/s ve Km değeri 100 µM olarak saptanmış olup, bu değerler mikrobiyal fitazlar için önceden bildirilen değerlerin aralığında düşüş olduğunu göstermiştir. Enzim ticari fitaz ürünlerinden 80°C'de daha yüksek termostabilite göstermiştir. Bu çalışma sonunda enzimin hayvan yemi katkı maddesi olarak kullanılabilirliği açısından potansiyel aday olabileceğini ileri sürülmüştür (Casey and Walsh 2003).

Sudar *et al.* (2014), *Lactococcus lactis* NAD + rejenerasyonu için kullanılan bir enzim olan NADH oksidaz üretmek üzere bir biyoreaktörde aerobik olarak üretilmiştir. Enzim, büyümenin üstel fazının sonunda gelişen kolonilerden izole edilerek saflaştırılmıştır. Oksijen, sıcaklık ve pH'nın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. NADH oksidazı, *Rhodococcus* sp.'den l-fenilalanin dehidrojenaz ile katalize edilen l-metiyonin oksidasyon model sisteminde rejenerasyon yapan bir enzim olarak bulunmuştur. NAD + yenilemesi için *L. lactis*'ten NADH oksidazı kullanıldığında %100 oranında l-metiyonin dönüşümü gözlenirken, NAD+ yenilenmesi olmadan yaklaşık %28 olduğu görüldü.

Avall-Jaaskelainen and Palva (2006), yaptığı çalışmada *Lactococcus lactis* ile iki fonksiyonel rekombinant domuz interlökin-2 (rIL-2) proteininin salgılanması incelenmiştir. İnceleme sonunda CTLL-2 hücre hattını kullanan bir hücre proliferatif tahliline göre; saflaştırılmış rIL-2 proteinlerinin spesifik biyolojik aktivitelerinin *Lactococcus lactis* ile benzer seviyelerde olduğu gözlenmiştir.

Holz *et al.* (2017) bu çalışmada insan keratinositlerinde in vitro olarak anti-enflamatuar etkisinde ve *Staphylococcus epidermis*'in büyümesinde katkısı olan *Lactobacillus*

brevis DSM17250'yi tanımlanmıştır. *L.brevis* DSM17250'nin sulu hali bir krem formülasyonunda gönüllü kuru ciltli insanlara uygulanmıştır. Uygulama işlemi 4hafta devam etmiş ve uygulanan bakteri özütünün cildin yeniden kolonize edilmesine yardımcı olduğunu söylemiş, ciltteki su kaybını önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. *L.brevis* DSM17250 özütünün topikal bir üründe uygulanmasının, *S. epidermidis* gibi koruyucu ve düzenleyici özelliklerini teşvik ederek doğal cilt mikrobiyotunun iyileştirilmesi ve stabilize edilmesinin insanın doğal hayatını tehdit eden deri hastalıklarını yönetmek için yeni ve önemli bir kavram olduğunu önermiştir.

Bounouala *et al.* (2017), sığır ve koyun sütünden elde edilen kazein, *Lactococcus lactis* ve *Lactobacillus brevis*'ten iki hücre dışı proteaz preparatı hidrolize edilmiştir. Hidrolizatlar, peptidin tanımlanması için HPLC-MS / MS ile saptanmıştır. C-terminal bölgesinde lösin, tirozin veya fenilalanin üreten bölünme deseni hem *L.brevis* hem de *L.lactis* hidrolizatlarında gözlenmiştir. Ancak C-terminalinin lizine bölünmesinde *L.brevis* proteazı seçilmiştir. Opioid ve antihipertansif peptidler, sığır ve koyun kazein hidrolizatlarında tespit edilmiş ve kantitatif ilişki ve yapısına (QSAR) dayanan dizilerin antihipertansif aktivitesinin tahmini olarak gerçekleştirilmiştir. Bu yaklaşım, daha fazla saflaştırmadan önce sağlıkla ilgili özelliklerle yararlı bir sınıflandırma aracı yapılabilir.

Ashwar *et al.* (2018) araştırmalarında; nişastanın çapraz bağlanmasının, probiyotiklerin sindirimini değiştirerek hedeflenen şekilde iletilmesi için potansiyel bir bağırsak duvar malzemesi olabileceği hipotezini sunmuştur. Üç probiyotik suş *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei* ve *Lactobacillus plantarum* dirençli bir nişasta ile mikrokapsüllenmiştir. Mikrokapsüllü probiyotikler gastrointestinal sistemde kararlı bir şekilde varlığını korumuştur. Çalışma sonucunda ise mikrokapsüllenen probiyotiğin ağız yoluyla verilmesi için yeni bir taşıyıcı olduğunu ortaya koymuştur.

Suzuki *et al.* (2017) yaptıkları çalışmada probiyotik alımını sıçanın ince bağırsağında gen ekspresyonu üzerindeki suşa spesifik etkilerini araştırmışlardır. İki farklı laktik asit bakteri türü olan *Lactococcus lactis subsp. lactis* ve *Lactobacillus rhamnosus* BALB/c farelerine günlük olarak 2 hafta boyunca oral yoldan uygulanmıştır. Uygulama sonunda

toplam RNA, ince bağırsaktan izole edilmiş ve gen ekspresyonu mikrodizi analizi ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak bağırsaktaki probiyotik bakteri suşlarının sağlığa yararlı etkilerinin bağırsak hücreleri ile olan etkileşimlerinin nasıl olduğunu araştırmışlardır.

Gomaa (2017) yaptığı çalışmada ticari olan 6 prebiyotik maddenin, *Lactobacillus brevis* NM101-1'in büyüme, yağ asidi profili, asidifiye edici aktivite ve probiyotik özellikleri üzerindeki etkisi, in vitro olarak sinbiyotik preparatların gelişimi için araştırmıştır. Sonuçlar prebiyotiklerin, probiyotik bakteri türü tarafından seçici olarak fermente edilebilirliğini ve her bir prebiyotik için ayrı ayrı probiyotik bakteri seçilmesi gerektiğini söylemiştir.

Probiyotik özellikleri olduğu bilinen ve doğal özellikleri korunmuş bazı gıdalar olan peynir, boza, çiğ süt ve kefir mikrobiyolojik olarak incelenmiştir. İnceleme sonucunda *Lactobacillus brevis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus para-plantarum* olmak üzere probiyotik etki gösteren bakteriler kütle spektrofotometresinde tanımlanmıştır. Çalışma sonunda boza ve kefir gibi doğal gıdalardan izole edilen transgenik olmayan probiyotik bakterilerin endüstriyel probiyotiklere alternatif olarak üretilebileceği sonucuna varılmıştır (Dogan and Ozpinar 2017).

Han *et al.* (2017) yaptıkları çalışmada Harbin'deki sosislerden izole edilen laktik ait bakterileri; *Lactobacillus brevis* R4, *Pediococcus pentosaceus* R1, *Lactobacillus curvatus* R5 ve *Lactobacillus fermentum* R6'nın probiyotik özellikleri, in vitro olarak *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosaceus* da dahil fermente süt ürünlerinden seçilen probiyotiklerle karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda sosisten izole edilen laktik asit bakterilerinin güçlü probiyotik özelliklere sahip olduğu ve gıda işlemede potansiyel probiyotikler olarak kullanılabileceği kanaatine varılmıştır.

Nabi *et al.* (2016), probiyotik içeren peynir altı suyunun hem lezzetli bir süt ürünü hem de kardiyovasküler hastalıklara karşı bir ilaç, özellikle Kazaklar arasında kanın lipid düzenleyicisi olduğunu söylemişlerdir. Bu yüzden damar sertleşmesi görülen tavşanlarda peynir altı suyunun damar sertliğine etkileri araştırılmış ve bu araştırma sonucunda peynir altı suyunda bulunan laktik asit bakterileri ve mayaların hastalık üzerine olumlu etki yaptığını ileri sürmüşlerdir.

Milanova *et al.* (2016), antibiyotikler ve probiyotikler kanatlılarda yaygın olarak kullanılmaktadır ve bağırsakta ATP üreten taşıyıcıların ekspresyonunu etkileyerek ilaç biyolojisinin kullanılabilirliğini değiştirir. Bu nedenle yapılan bu araştırmanın amacı doksisilin ile kombine edilmiş ya da tek başına uygulanan *Lactobacillus*’lu probiyotiklerin ABCB1 (gen, kodlayıcı Piglikoprotein), ABCC2 (gen, kodlayıcı çoklu ilaç direnci proteini 2, MRP2) ve ABCG2(gen, kodlama meme kanseri direnci proteini)'nin RT-PCR kullanarak tavuklarda mRNA’ların ekspresyonu üzerine etkisinin incelenmesidir. Bir günlük civcivler 4 gruba ayrılarak; antibiyotik uygulanan grup, probiyotik destekli grup, tedavi edilmemiş kontrol, probiyotikler ve doksisisiklin ile tedavi edilen grup şeklinde uygulama yapılmıştır. ABCC2 mRNA'sının ekspresyonu doksisisiklin ve *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus bulgaricus*'un kombinasyonu bağırsaktaki antibiyotikten etkilenmiştir. Uygulama sonunda doksisisiklin ve *Lactobacillus* probiyotiklerinin kombinasyonu kümes hayvanlarına uygulandığında toksinlerin emiliminin sınırlandırılması ve ksenobiyotiklerin ve endojen maddelerin akmasının iyileştirilmesine yönelik yararlı etkiyi ispatlamak için yapılacak olan çalışmalara ışık tutacak niteliktedir.

Davoodi *et al.* (2016) yaptıkları çalışmada farklı glikoz, sükroz, steviosid ve stevia yaprağı konsantrasyonlarında üç probiyotik bakteri suşu tarafından bakteri üremesi ve laktik asit üretimini optimize etmeyi amaçlamışlardır. Bu üç suş *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus casei*'dir. Bakteri gelişimi ve laktik asit üretimi sırasıyla koloni oluşturu birimler (CFU) ve gaz kromatografisi analizi kullanılarak saptanmıştır. Adı geçen üç suşun en yüksek laktik asit üretimi ve bakteri gelişimi yüksek sükroz konsantrasyonu ile elde edilmiştir. Bakteriler arasında *L.brevis*

ve *L.casei*, *L.plantarum*'a göre daha fazla laktik asit üretmiştir. Tüm suşlar doza bağlı olarak glikoz, sükroz veya stevia yaprağı ekstratının varlığında laktik asit üretmiştir. Düşük veya yüksek steviosid varlığında da diğer üç ekstratın varlığında gösterdiği etkiyle hemen hemen aynı etkiyi göstermiştir. Yapılan araştırma sonucunda sükrozun bakteri üremesi ve laktik asit üretimini için en iyi karbon kaynağı olduğuna işaret etmiştir. Stevia yaprağı ve steviosid aynı zamanda uygulamada kullanılan suşların laktik asit üretimini artırmak için iyi bir potansiyele sahip olduğunu saptamışlardır.

Kumari *et al.* (2016), probiyotik potansiyellerini araştırmak üzere Kuzeybatı Himalayalar'daki geleneksel fermente içecek ve yiyeceklerden laktik asit bakterileri izole etmişlerdir. Probiyotik özelliklerin değerlendirilmesine, teknolojik karakterizasyona ve yapışma kabiliyetine odaklanan adım adım bir yaklaşım uygulamışlardır. 16S rRNA gen dizilimi kullanılarak izole edilen laktik asit bakterileri; *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus buchneri* ve *Lactobacillus* sp.'dir. Belirlenen izolatlar gastrointestinal sistemde antibiyotik duyarlılığı, antimikrobiyal aktivite, hayatta kalma, hücre yüzeyi özellikleri, hemolitik aktivite ve ekzopolisakkarit üretimi dahil olan in vitro yöntemlerle değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonunda üç izolat (*L.brevis* PLA2, *L.brevis* PLA16 ve *L.paracasei* PLA8) ticari probiyotik suşlara kıyasla en umut verici ve en teknolojik probiyotik aday olarak bulunmuştur. *L. brevis* PLA2, insan bağırsak HT-29 hücre hattına in vitro yapışarak probiyotik potansiyeli olan en iyi izolat olarak değerlendirilmiştir.

Probiyotiklerin antitümör aktivitesi olduğu bilinmesine karşın, bakteri türü antitümör moleküller azdır. Sakatani *et al.* (2016) bu çalışmalarında *Lactobacillus brevis* SBL8803 (*L.brevis* 8803)'den üretilen bir molekülü ve bu molekülün etki mekanizmalarını fareler üzerinde araştırmışlardır. Apoptoz ve hücre yaşayabilirliği sırasıyla terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP boyaması ve sülfuro-deamin B tahlili ile analiz edilmiştir. *L. brevis* 8803'ün koşullandırılmış ortamı, SW620 hücrelerinin canlılığını baskılanırken, ortamdaki polifosfatın (poli P) parçalanmasıyla

azaltıldı. Sonuç olarak probiyotik türevli poliP'nin, konvansiyonel ilaçlara kıyasla daha az yan etki gösteren bir antitümör ilaç olabileceği beklenmektedir.

Yonejima *et al.* (2015), probiyotik bakterilerin asit toleransını artırmak için bağırsak kanalındaki probiyotik etkilerin artırılmasına yönelik yöntemin bir değerlendirmesini yapmışlardır. Sindirim sıvısına benzetilmiş in vitro tolerans testinde, çikolata ile işlenmiş canlı *Lactobacillus brevis subsp. coagulans* (Labre) oranı, kurutulmuş Labre tozu ve Labre içeceği içerenlere kıyasla yaklaşık yüz kat daha fazla artış göstermiştir. Bu koruyucu etki, probiyotik işleme için çikolata suyunun içeriğine bağlıdır. Sonuç olarak çikolata işlemenin probiyotiklerin canlı bir araçla bağırsağa verilmesini ve konakçı sağlığı için etkin olmasını sağlayan etkili bir yöntem olduğu ispatlanmıştır.

Vieira *et al.* (2013), deniz karideslerinin (*Litopenaeus vannamei*) sindirim sisteminden probiyotik potansiyeli olan laktik asit bakterilerini izole etmiş ve birden fazla karaktere göre in vitro seçim yapmıştır. İzole edilen bakteriler *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Weissella confusa* ve *Lactobacillus delbrueckii* olarak tanımlanmıştır. *L.plantarum* suşları, yüksek büyüme oranına, patojenlere ve değerlendirilen parametrelere karşı toleransı en geniş inhibisyon halelerine sahip olduğu görülmüştür. Analiz sonunda *L.plantarum*'un deniz karidesleri için en yüksek probiyotik potansiyele sahip olduğu saptanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada yoğurt ve taze kaşar peynirinden örnekler alınmıştır. Bakteri izolasyonu için gereken özel ve genel besiyeri, bakterilerin tanılanması ve enzim aktivitesi işlemlerinde kimyasallar ve kitler kullanılmıştır.

3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar:

Mikroskop	Bresser, GERMANY
Steril Kabin	Safefast Classic 212 359, SINGAPORE
İnkübatör	Wisecube, KOREA
Otoklav	Wiseclave Wac-47, KOREA
Çalkalayıcı	Shimadzu, PHILIPPINES
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph, GERMANY
Hassas Terazı	Shimadzu, JAPAN
pH Metre	Ohaus Starter3000, USA
Su Banyosu	Memmert WNB14, GERMANY
Derin Dondurucu	Nuaire -86 Ultralow Freezer, NU6613W37, U. S. A.
Buzdolabı	Arçelik, TÜRKİYE
Saf Su Cihazı	GFL 2004, GERMANY
Mikrodalga Fırın	Arçelik, TÜRKİYE
Vorteks	Wisemix Vm-10, KOREA
Spektrofotometre	UV-1201V
Elektroforez Tankı	OWL B2, U.S.A.
Elektroforez Akım Sağlayıcı	Biometra Pack P25, GERMANY
Santrifüj	Therma Mr23 İ, GERMANY

Jel Görüntüleme Sistemi	Biorad Gel Doc 2000, ITALY
DNA İzolasyon Robotu	Qiacube, GERMANY
PCR Cihazı	Thermo Cycler Block, GERMANY

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

M17 Broth (Merck), M17 Agar (Merck), Nutrient Agar (Oxoid), Tris - HCl (Merck), Proteinaz K (Merck), Ethanol (Merck), NaCl (Merck), 1XTBE (Sigma), 1XTAE (Sigma), 10X PCR tamponu: (Sigma), 20X Dimetil sülfoksit (Sigma), *Taq* DNA polimeraz (Sigma), dNTPs (Sigma), Jel Red (Sigma), Agaroz (Sigma).

3.1.3. Kullanılan kitleler

Bakteri DNA izolasyonu kiti (QIAGEN).

3.1.4. Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı

M17 Agar: Hassas terazide tartılan 55 g/L M17 Agar karışımı, hazır haldeki 1 L dH₂O içerisine ilave edilerek elde edilen besiyeri ısıtılarak manyetik karıştırıcıda karıştırılır. Otoklavda 121°C’de 15 dk steril hale getirilir. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 45-50°C’a kadar soğutulup, steril petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri kahverengi ve şeffaf olup, 25°C’da pH’sı 7,2±0,2’dir (Terzaghi and Sandine 1975).

M17 Broth: Hassas terazide tartılan 42,5 g/L M17 Broth karışımı, hazır haldeki 1 L dH₂O içerisine ilave edilerek elde edilen besiyeri uygun kaplara dağıtılarak (erlen,tüp) otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri kahverengi ve şeffaf olup, 25°C’da pH’sı 7,2±0,2’dir (Terzaghi and Sandine 1975).

Nutrient Agar: Hassas terazide tartılan 28g/L Nutrient Agar karışımı hazır haldeki 1 L dH₂O içerisine ilave edip manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanan besiyeri

otoklavda 121°C'de 15 dk steril hale getirilip soğumaya bırakılmıştır. Besiyeri 45°C'ye soğutulduktan sonra steril halde bulunan petrilere dağıtılarak katılaşması için bekletilmiştir (Lelliot and Stead 1987).

Stok Besiyeri: 0,65g Nutrient Broth karışımına 36 ml gliserol ilave edildikten sonra toplam hacim 100 ml olacak şekilde saf su ile tamamlandı. Tam çözünme olması için manyetik karıştırıcıda karıştırılan besiyeri otoklavda steril edildi. Aseptik olarak 2 ml'lik steril eppendorf tüplere 1,2 ml eklenerek hazırlandı (Saygılı vd 2006).

%70'lik Etil alkol: 70 ml saf etil alkolün üzeri saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak -20°C'de muhafaza edildi.

1XTAE Tamponu: 100 ml 10XTAE'nin (Sigma) hacmi sdH₂O ile 1000 mL'ye tamamlandı.

1XTBE Tamponu: 100 ml 10XTBE'nin (Sigma) hacmi sdH₂O ile 1000 mL'ye tamamlandı.

Proteinaz K: İzolasyon kiti içerisinde hazır bir şekilde gelen proteinaz K'dan 200 µl alınarak steril eppendorf tüplere aktararak kullanılmak üzere oda sıcaklığında bekletildi.

20X Dimetil sülfoksit (DMSO): 2ml'lik steril eppendorf tüplere alınan, %100'lük DMSO (Sigma) kullanılıncaya kadar 25°C'de bekletildi.

6X yükleme tamponu: 100 ml yükleme tamponu için %100'lük gliserolden (Sigma-G9012) 40 ml alınarak, 0,1 g bromfenol blue (Sigma) ile karıştırıldı ve hacmi 1x TAE 100 ml'ye saf su ile tamamlandı. Hazırlanan tampon amber şişe içinde güneş alması engellenerek, +4°C'de korundu.

10 x PCR tamponu: (Sigma) (15 mM MgCl₂, 100 mM Tris – HCl, 500 mM KCl, %0,01 jelatin pH: 8.3) *Taq* DNA polimeraz ile birlikte gelmektedir.

Primerler: 27F - 1492R primer seti MgCl₂ (Sigma-M1028): 1M olan hazır çözelti 25 mM olacak şekilde steril saf su ile sulandırılarak hazırlandı.

dNTPs (Sigma): (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP – 10 mM) - 20°C’de muhafaza edildi.

Primer çalışma konsantrasyonu: Ticari olarak liyofilize halde alınan primerler kullanma kılavuzunda yazılan talimatlar doğrultusunda çözülerek ($C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$) formülü uygulandı ve son konsantrasyonu 50 µM olacak şekilde hazırlandı.

Enzim aktivitesi için kullanılan çözeltiler

Substratın hazırlanışı

İçerisine 2 mM Na-fitat eklenen 100 mL 0,1 M asetat tamponu (pH 5.5) hazır hale getirilmiştir (Raghavendra and Halami 2009).

1. 2 mM Sodyum fitat çözeltisi

Sodyum asetat tamponu üzerine 0,132 g sodyum fitat ilave edilmiştir.

2. 0,1 M Sodyum asetat tamponu

0,82 g sodyum asetat 100 mL distile su (dH₂O)’da tamamen çözündürülerek HCl ile pH 5.5’e ayarlanmıştır.

Reaksiyonu durdurucu çözeltinin hazırlanışı

Reaksiyonu durdurabilmek için %10'luk TCA (Trikloroasetik asit) kullanılmıştır. 10 g TCA distile su (dH_2O)'da çözülerek 100 ml'ye tamamlanmıştır (Raghavendra and Halami 2009).

Renklendirme çözeltisinin hazırlanışı

Çözelti A: 5,73 mL sülfirik asit (%96'lık) 93,7 mL distile su içerisine eklenerek %5,5 (v/v) sülfirik asit çözeltisi hazır hale getirilmiştir.

Çözelti B: Çözelti A'da uygun bir oranda çözünmüş ve son hacim çözelti A ile 100 mL'ye sabitlenmiş ve 2,5 g amonyum molibdat hazırlanmıştır.

Çözelti C: Uygun oranda distile suda, 2,5 g demir sülfat çözünmüş ve son hacim distile su (dH_2O) ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. İçerisine 1-2 damla sülfirik asit eklenmiştir.

Renklendirme çözeltisi: Bir hacim çözelti C, dört hacim çözelti B ile karıştırılarak renklendirme çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltinin uzun süre bekletilmemesi gerekir (Choi *et al.* 2001; De Angelis *et al.* 2003).

pH aktivitesi için kullanılan tamponlar

1. Sodyum asetat tamponu

pH 2.0-3.0 aralığındaki fitazın aktivitesini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. 0,82 g sodyum asetat 0,1 M asetat tamponu için tartılmış ve dH_2O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. İstenen pH değerlerini saptamak için 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCl kullanılmıştır.

2.Sodyum sitrat tamponu

pH 4.0-6.0 aralığındaki fitazın aktivitesini belirlemek için kullanılmıştır. Tampon 0.1 M olacak şekilde 2.8 g sodyum sitrat tartılıp dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. İstenen pH değerlerini saptayabilmek için 0,1 M'lık HCl ve/veya NaOH kullanılmıştır.

3. Tris-HCl tamponu

pH 7.0-9.0 aralığındaki fitazın aktivitesini belirlenmesi için kullanılmıştır. 0,121 g Trizma base 10 mM Tris-HCl tamponu için tartılmış ve dH₂O ile çözerek 100 ml'ye tamamlanmıştır. İstenen pH değerlerini saptamak için konsantre HCl ve/veya NaOH çözeltisi kullanılmıştır.

4. Sodyum karbonat tamponu

pH 10.0-11.0 Aralığındaki fitazın aktivitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. 0,105 g sodyum karbonat 10 mM Karbonat tamponu için tartılmış ve dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. İstenen pH değerlerini ayarlamak üzere 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCl kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Mikroorganizma izolasyonu ve identifikasyonu

Yoğurt ve taze kaşar peynirinden ayrı ayrı 10'ar g tartılıp 100 ml serum fizyolojik tuzlu su içerisinde vorteks ile homojenize edilmiştir. Dilüsyon işlemi ile örneklerden 1'er ml alınarak içerisinde 9 ml fizyolojik tuzlu su bulunan cam tüplere aktarım yapılmıştır. Vorteksleme işlemi yapıldıktan sonra 10⁻⁶'dan 0,1 ml alınarak bakterinin nutrient agara yayma yöntemi ile aktarımı yapılmıştır. 35°C'de 24-48 saat boyunca inkübe edildikten sonra tek kolonilerden çizim usulü ekim yapılarak bakteriler saflaştırılmıştır.

3.2.2. Morfolojik özelliklerin belirlenmesi

Bakterilerin morfolojileri boyutları çok küçük olduklarından dolayı bireysel yapıları sadece mikroskoplarla belirlenebilir. Bu nedenle, katı ya da sıvı besiyerlerinde saf bir şekilde geliştirilen hazırlanmış bakteri preparatları spesifik boyalar aracılığıyla işlem yapılarak inceleme gerçekleştirilir. Mikroskoptaki incelemelerde, spor durumu, bakterilerin boyutları, boyanma özelliği (Gram (+) veya (-) vb.) gibi özelliklerinin varlığı incelenir (Arda 2000; Harley and Prescott 2002).

a. Hücre morfolojisinin belirlenmesi: Her bir izolattan örnek hazırlanarak kristal violet ile basit boyama yapılmış ve mikroskop altında görüntülerine bakılarak sonuçlara ulaşılmıştır (Temiz 2000; Harley and Prescott 2002). Bakteri izolatlarının hücre duvarlarındaki farklılığın belirlenmesi için gram boyama testi yapılmıştır (Tarakçıoğlu 2016). Bu testte aşağıdaki yöntem kullanılmıştır.

- a) Lam üzerine bir damla saf su aktarılır ve daha sonra üzerine besiyerinde 24 saat geliştirilen bakterilerden bir öze dolusu alınarak iyice yayılır.
- b) Ateşten geçirilerek fikse edilir.
- c) İlk olarak kristal viyolet boyası ile 1 dk muamele edilir ve saf su ile 30 sn yıkanır.
- d) Lügol ile 1 dk muamele edilir ve %96'lık etil alkol ile yıkanır.
- e) Tekrar saf sudan geçirilerek son kez safranin boyası uygulanır.
- f) Preparat yıkanıp kurutulur.
- g) Mikroskop altında incelenir.

3.2.3. Çalışmada kullanılan bakteri kültürlerinin muhafazası

Her bakterinin 24 saatlik saf kültüründen bir lop alınarak, içerisinde %30'luk 500 µl gliserol ve 500 µl LB Broth (1 L dH₂O'ya 10 g NaCl, 10 g tryptone, ve 5 g yeast extract ilave edilerek hazırlanacaktır.) bulunan eppendorf tüplere aktarılaraq etiketlenir. Vortekslenerek sonraki çalışmalar için -80°C'de muhafaza edilir.

3.2.4. Mikroorganizmanın moleküler tanılanması

3.2.4.a. Bakteri izolatlarının DNA izolasyonu

İzolatların DNA'ları bakteri DNA izolasyon kiti (Qiagen'den uyarlanan protokol) kullanılarak yapılmıştır.

Bu aşamalar;

- I. M17 agarlarda geliştirilen bakterilerden bir öze dolusu toplanarak steril eppendorf tüplerine alındı.
- II. Toplanan tüplere 200µl Lizozim + trisHCL çözeltisi eklendi.
- III. Bu karışım güzelce vorteks edilerek homojen bir çözünme olması sağlandı.
- IV. Vorteks'lenen karışımlar 45 dakika 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Bu sürede her 15 dakikada bir vorteks yapıldı.
- V. İnkübasyon sonunda örnekler 12000rpm'de 5 dakika 24°C'de santrifüj edildi.
- VI. Santrifüjlenen örnekler sıvı kısmı dökülerek cidara yapışan pelet kısım bırakıldı.
- VII. Örnekler robotun bölümlerine dizilerek izolasyon başlatıldı.

0,6 g agaroz, 1XTBE tamponuna aktarıldı. Mikrodalgada elde edilen karışım şeffaf bir görünüm alıncaya kadar kaynatıldı. El yakmayacak kadar soğutulan agaroz jele 0,6 µl red kimyasalı eklenerek, içerisine tarakların yerleştirildiği elektroforez jel tankına döküldü ve donmaya bırakıldı. 15-20 dk sonra jelden taraklar dikkatli bir şekilde çıkarıldı. 1XTBE tamponu jel yüzeyini tamamen kaplayacak şekilde tankın içine yerleştirildi. DNA ve marker yüklemesi yapıldıktan sonra %1'lik konsantrasyona sahip agaroz jelde DNA yürütüldü.

3.2.4.b. 16S rRNA bölgesinin PCR yardımı ile çoğaltılması

Bakterilerin sistematigi açısından önemli bir yere sahip olan 16S rRNA'nın sentezlendiği bölge seçilmiş ve evrensel primerler (27F forward 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'; 1492R reverse 5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3') kullanılarak laboratuvar ortamında çoğaltılmıştır.

PCR reaksiyonun hazırlanması: 30 µl'lik reaksiyonda; aşağıdaki karışım hazırlanmıştır.

0,3 µl 50 µM Forward primer, 0,3 µl 50 µM Reverse primer, 3 µl 10 x PCR tamponu, 1,8 µl MgCl₂, 0,6 µl dNTPs, 0,3 µl 5 unit/µl Taq DNA polimeraz, 1,2 µl DMSO, 21,5 µl steril saf su. Son olarak karışıma 1 µl kalıp DNA eklenerek son hacim 30 µl'ye tamamlanmıştır (Barış 2009).

PCR programı: PCR reaksiyonu hazırlanan örnek materyal ile aşağıdaki safhalar olacak şekilde bir programda çalışılmıştır.

- ❖ 95°C'de 120 saniye denatürasyon sonrasında
- ❖ 40 döngü olacak şekilde 94°C'de 60 saniye denatürasyon
- ❖ 53°C'de 60 saniye bağlanma
- ❖ 2°C'de 120 saniye uzama basamakları ve sonrasında
- ❖ 72°C'de 5 dakika uzama (Barış 2009).

16S rRNA PCR ürünlerinin elektroforezi: 1,8 gr agaroz üzerine 120 ml 1XTAE tamponu eklendi. Mikrodalga fırınında elde edilen karışım şeffaf bir görünüm alıncaya kadar kaynatıldı. 50°C'ye ya da el yakmayacak kadar soğutulan agaroz jele 0,6 µl jel red kimyasalı eklenerek, içerisine tarakların yerleştirildiği elektroforez jel tankına döküldü. Belli bir süre beklenerek donduğu anlaşılan jelden taraklar dikkatli bir şekilde çıkarıldı. 1XTAE tamponu jel yüzeyini tamamen kaplayacak şekilde elektroforez tankının içine yerleştirildi. Jeldeki ilk kuyucuğa, DNA markerından [50-100-200-300-

400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma D7058) 8 µl yüklendi. Diğer kuyucuğa örnek yüklendi. PCR örneği %1,5'lik agaroz jelde yürütüldü.

Elektroforez jel düzeneği; 60 dakika 90 volt akımda yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel, UV ışık sistemi altında görüntülendi ve bilgisayar ortamında analiz edildi (Barış 2009).

3.2.4.c. DNA dizi analizlerinin alınması ve sonuçların değerlendirilmesi

Sekans analizi sonuçları BioEdit ile analiz edilerek Fasta formatına çevrildi. Primerler bulunup ve öncesindeki kısımlar çıkarıldı. Daha sonra aradaki her iki taraftan okunan kısım kontrol edilerek düzenlendi NCBI veri bankasında sekans sonuçları karşılaştırıldı.

3.2.5. Bakterilerin inokülasyonu

M17 Agar'da gelişme gösteren bakteriler, M17 Broth'a inoküle edilerek bakterilerin sıvı kültür ortamına aktarılması sağlanacaktır. 35°C'de 120 saat etüvde inkübasyona bırakılacaktır.

3.2.6. Enzim aktivitesinin ölçülmesi

Fitaz aktivitesi ölçülürken her basamakta elde edilen süpernatantlardan aktivite tayini yapılmıştır. Fitaz enziminin aktivite gösterdiği aralıklar tespit edilmiştir. Aktivite tayini hesaplanırken 100 µL enzim çözeltisi üzerine 250 µL substrat eklendikten sonra vorteks ile karıştırılır daha sonra 10 dakika 50°C'ye ayarlanmış su banyosunda reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyonu durdurmak için 500 µL %10'luk TCA eklenmiştir. 15 dk oda sıcaklığında bekletme işlemi yapıldıktan sonra tüplere 500 µL renklendirme çözeltisi ilave edildi. 15 dakika inkübasyondan sonra 3200 devir/dakikada 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra örnekler kör kullanılarak 700 nm'de spektrofotometre cihazında ölçüm işlemi yapılmıştır.

3.2.6.a. Enzimin optimum pH değerinin saptanması

Elde edilen fitaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin saptanması için karbonat (pH 10.0-11.0), Tris (pH 7.0-9.0), sodyum sitrat (pH 4.0-6.0), ve asetat (pH 2.0-3.0), tampon çözeltileri kullanılarak farklı pH değerlerinde olan (pH 2.0-11.0) ve içerisinde 2 mM sodyum fitat ihtiva eden substrat çözeltisi hazırlanmıştır. Aktivite tayini yapmak için 100 µL enzim ve 250 µL substrat 2 ml'lik tüpte vorteks ile karıştırılmıştır. Ardından 50°C'ye ayarlanmış su banyosunda 10 dakika reaksiyona girmesi beklenmiştir. Reaksiyonu durdurmak amacıyla 500 µL %10'luk TCA ilave edilmiştir. Su banyosundan alınan tüplere 500 µL renklendirme çözeltisi ilave edildikten sonra 15 dakika beklenmiş ve sonrasında örnekler 3200 devir/dakikada 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj yapıldıktan sonra örnekler köre karşı 700 nm'de spektrofotometrede ölçümü yapılmıştır.

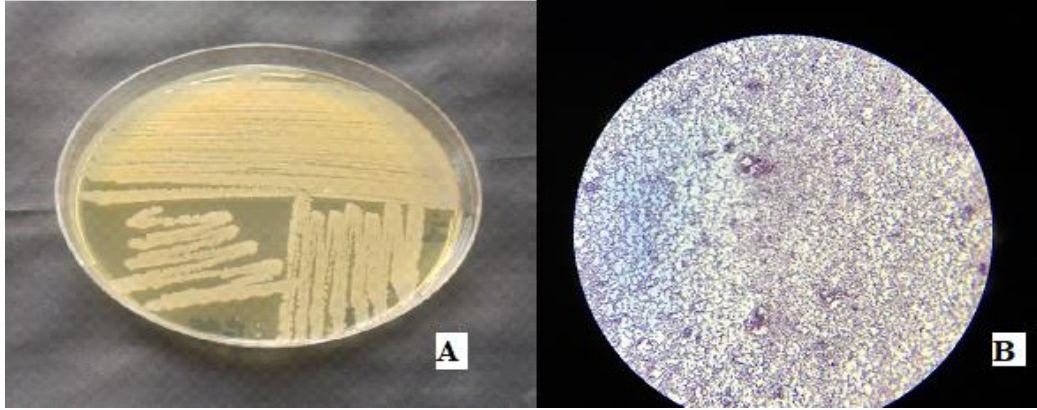
3.2.6.b. Enzimin optimum sıcaklık değerinin saptanması

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi için 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C'lik sıcaklıklar seçilmiştir. Sıcaklık ölçümlerinin saptanması için su banyosu kullanılmıştır. Aktivite tayininin yapılabilmesi için 100 µL enzim ve 250 µL substrat karıştırılarak standart aktivite ölçümü yapılmıştır.

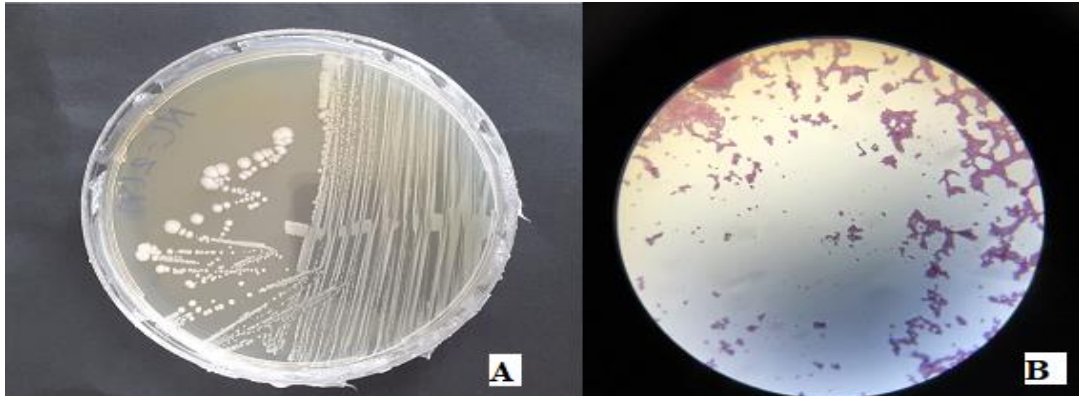
4. ARAŞTIRMA BULGULAR

4.1. Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakterilerin kültür özellikleri incelenirken, bunların katı besiyerinde (M17 Agar) ve her bir izolatın olgun koloni oluşturduğu sürede sonuçlar elde edilmiş ve bu sonuçların koloni görüntüsü Şekil 4,1 ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Kültüre alınan bakteriler çizgi ekim yöntemi ile öze yardımıyla çizilmiştir. Burada saf koloni yapıları incelenmiş ve yapılan bu çalışma saflaştırılan kolonilerden devam etmiştir.



Şekil 4.1. *Lactococcus lactis*’in saflaştırılmış koloni(A) ve Gram boyama (B) görüntüsü

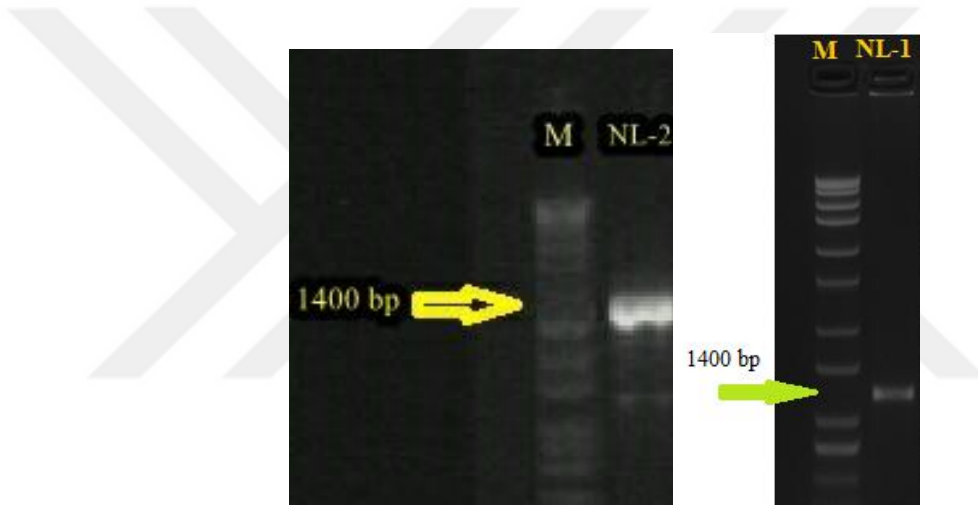


Şekil 4.2. *Lactobacillus brevis*’in saflaştırılmış koloni (A) ve Gram boyama (B) görüntüsü (Malkoç 2017)

4.2. Moleküler Yöntem ile Bakterilerin Tanılanması

4.2.1. PCR sonuçlarının jel görüntüsü

Lactococcus lactis ve *Lactobacillus brevis* izolatlarından elde edilen DNA'lar kullanılarak hazırlanan PCR reaksiyonları sonucu beklenen büyüklükler olan 1400-1500 bp büyüklüğünde olup Şekil 4.3'te gösterilmiştir. İşaretli olan bölge yaklaşık 1400 bp'dir.



Şekil 4.3. *Lactococcus lactis* (NL-1) ve *Lactobacillus brevis* (NL-2)'in PCR sonucu jel görüntüsü

4.2.2. Dizi analiz sonuçları

PCR sonucunda 16S rRNA gen bölgesinin belirlenmesini sağlamak için dizi analizi (sekanslama) yapan şirkete örnekler gönderilmiştir. Şirketten gelen veriler doğrultusunda blastlama işlemi yapılmış elde edilen sonuçlar NCBI'da karşılaştırılarak *Lactococcus lactis* ve *Lactobacillus brevis* için %99 oranında benzerlik gözlemlenmiştir (Şekil 4.5, Şekil 4.7).

>*Lactococcus lactis*

TGCAGTTGAGCGATGAAGATTGGTGCTTGACCAATTTGAAGAGCAGCGAACGGGTGAGTAACGCGT
GGGGAATCTGCCTTTGAGCGGGGGACAACATTTGGAAACGAATGCTAATACCGCATAATAACTTTAAA
CATAAGTTTTAAGTTTGAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCGTTGTATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGA
CTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTG
ACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTT
GGTGAGAGTGGAAGCTCATCAAGTGACGGTAACACCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTT
TATTAAGTCTGGTGTAAGGAGCAGTGCTCAACCATTGTATGCATTGGAACTGGTAGACTTGAGTGCA
GGAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCG
AAAGCGGCTCTCTGGCCTGTAACCTGACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGATGTAGGGAGCTATAAGTTCTCTGTATCGCAGCT
AACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATA
CTCGTGCTATTCTAGAGATAGGAAGTTCCTTCGGGACACGGGATACAGGTGGTGATGTTGTCGTC
AGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTGCCATCATT
AAGTTGGGCACTCTAACGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATC
ATGCCCCCTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCGAGACAGTGATG
TTAGCTAATCTCTTAAACATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAAT
CGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACA
CCACGGGAGTTGGGAGTACCCGAAGTAGGTTG

Şekil 4.4. *Lactococcus lactis* izolatının 16S rRNA gen bölgesine ait dizi analizi sonucu

26.04.2016 NCBI Blast:Nucleotide Sequence (1391 letters)

Descriptions
Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Uncultured <i>Lactococcus</i> sp. gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: CLZX63	2564	2564	100%	0.0	99%	LC055575.1
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> strain D14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2564	2564	100%	0.0	99%	KJ702499.1
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> strain K-24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2564	2564	100%	0.0	99%	KF234767.1
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> strain DR2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2564	2564	100%	0.0	99%	JQ680418.1
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> culture-collection IMAU:80703 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2564	2564	100%	0.0	99%	HM058883.1
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NZ9000, complete genome	2564	15385	100%	0.0	99%	CP002094.1
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> culture-collection IMAU:80707 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2564	2564	100%	0.0	99%	HM058887.1
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> culture-collection IMAU:80645 16S ribosomal	2564	2564	100%	0.0	99%	HM058831.1

Şekil 4.5. *Lactococcus lactis*'in NCBI'daki BLAST sonucu

> *Lactobacillus brevis*

GAATGACGTGCTTGCCTGACTGATTTCAACAATGAAGCGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAAT
CTGCCCAGAAGCAGGGGATAACACTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAAATCCGCATGG
ATTTTGTGTTGAAAGGTGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGATCCCGCGGCGTATTAGTTAGTTGGTGAG
GTAAAGGCCCAACAGACGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAG
ACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGA
GCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACACCTTTGA
GAGTAACTGTTCAAGGGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAG
TCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAG
AGGACAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACAGTGGCGATGG
AAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTGTATAGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAG
CGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCG
CCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCA
AAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACC
TTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTTAGAGATAAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGT
GGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAT
TATCAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG
GATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAG
TTGCGAAGTCGTGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGC
CTACATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT
ACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAA

Şekil 4.6. *Lactobacillus brevis* izolatının 16S rRNA gen bölgesine ait dizi analizi sonucu (Malkoç 2017)

19.02.2016 NCBİ Blast:Nucleotide Sequence (1400 letters)

Descriptions
Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Lactobacillus brevis</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: 174A	2451	2451	100%	0.0	99%	LC062086.1
<i>Lactobacillus brevis</i> strain AT1-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2451	2451	100%	0.0	99%	KM392069.1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain HZ179 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2451	2451	100%	0.0	99%	KP638726.1
<i>Lactobacillus brevis</i> strain LOCK 0983 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2451	2451	100%	0.0	99%	KP773479.1
<i>Lactobacillus brevis</i> strain LOCK 0984 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2451	2451	100%	0.0	99%	KP773466.1
Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone 99 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2451	2451	100%	0.0	99%	KM819173.1
Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone 10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2446	2446	100%	0.0	98%	KM819111.1
<i>Lactobacillus brevis</i> strain gp71 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2446	2446	100%	0.0	98%	KM495920.1
<i>Lactobacillus brevis</i> strain gp33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2446	2446	100%	0.0	98%	KM495905.1
<i>Lactobacillus brevis</i> strain E24-174 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2442	2442	99%	0.0	98%	KP221640.1

Şekil 4.7. *Lactobacillus brevis*'in NCBI'daki BLAST sonucu

4.3. Fitaz Aktivitesi Sonuçları

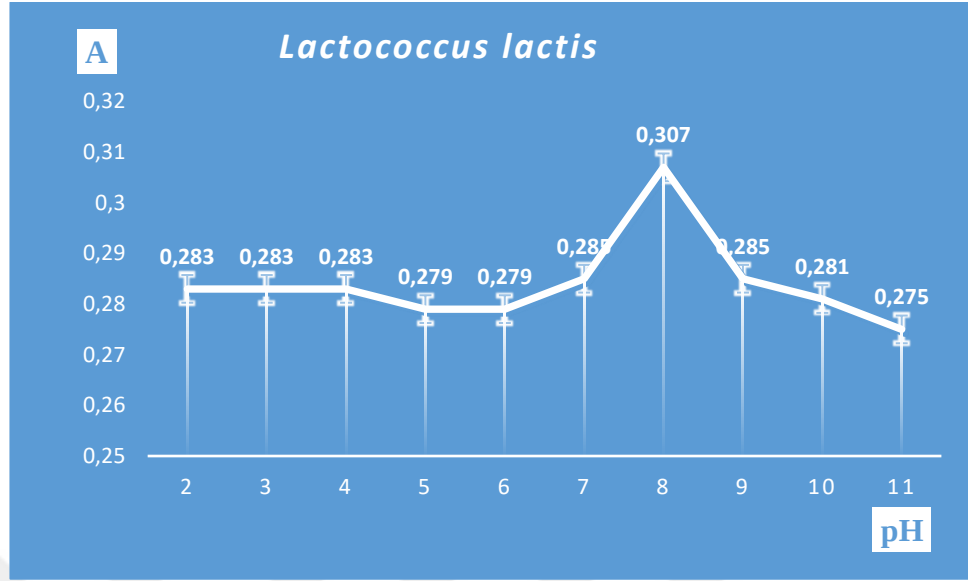
İzolasyonları ve tanımlamaları yapılan *Lactococcus lactis* ve *Lactobacillus brevis*'in absorbans değerleri spektrofotometrede sırasıyla 0,323 ve 0,318 olarak bulunmuştur. Optimum pH ve sıcaklık değerleri için farklı sıcaklık ve pH değerlerinde aktiviteleri ölçülmüş, sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir.

4.3.1. Fitaz enziminin optimum pH sonuçları

Lactococcus lactis ve *Lactobacillus brevis*'den üretilip saflaştırılan fitaz enzimleri optimum pH'larını belirlemek için 3 kez ölçüm yapılmıştır. Sonuçlar sırasıyla Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'de verilmiştir. Optimum pH için, 2.0-11.0 arasındaki pH değerlerinde çalışılmıştır. pH 2.0-3.0 arası sodyum asetat, pH 4.0-6.0 arası sodyum sitrat, pH 7.0-9.0 arası Tris-HCl ve 10.0-11.0 arasında ise sodyum karbonat tamponları kullanılmıştır. Saptanan sonuçlar ile aktivitesi hesaplanmış ve 'Aktivite-pH' grafikleri çizilmiş, sonuçlar Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda *Lactococcus lactis* için optimum pH 8 olarak bulunurken *Lactobacillus brevis* için optimum pH 3 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.1. *Lactococcus lactis*'in optimum pH absorbans (A) değerleri

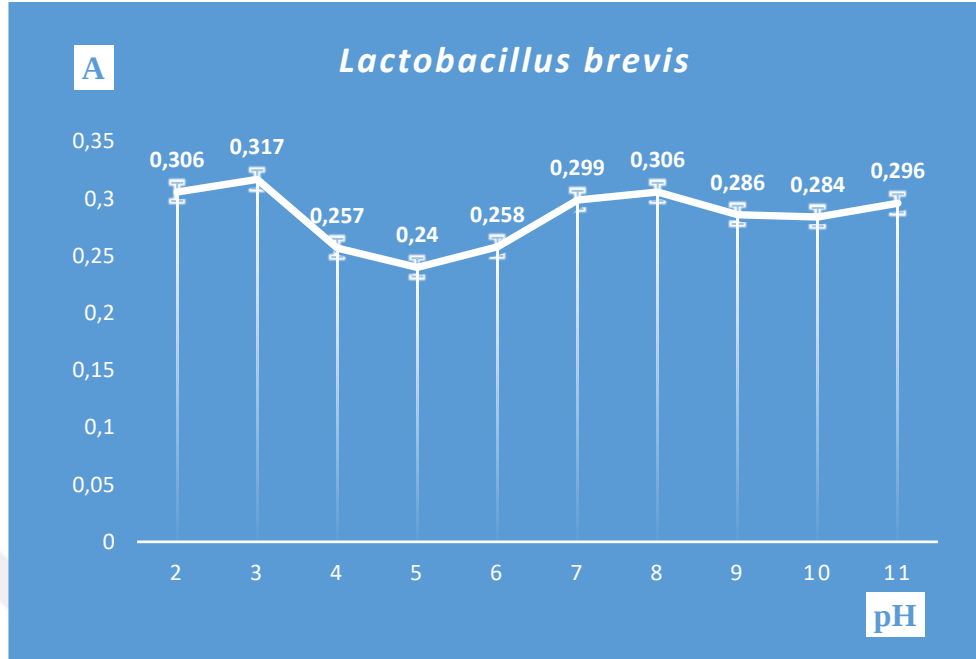
pH	1. DENEME (A)	2. DENEME(A)	3. DENEME(A)	ORTALAMA
2	0,278	0,286	0,285	0,283
3	0,288	0,284	0,279	0,283
4	0,28	0,283	0,287	0,283
5	0,282	0,278	0,279	0,279
6	0,275	0,281	0,282	0,279
7	0,279	0,286	0,29	0,285
8	0,304	0,307	0,31	0,307
9	0,28	0,285	0,292	0,285
10	0,283	0,265	0,297	0,281
11	0,272	0,275	0,28	0,275



Şekil 4.8. *Lactococcus lactis*'ten elde edilen ekstraselüler fitaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Çizelge 4.2. *Lactobacillus brevis*'in optimum pH absorbans (A) değerleri (Malkoç 2017)

pH	1. DENEME (A)	2. DENEME(A)	3. DENEME(A)	ORTALAMA
2	0,304	0,308	0,306	0,306
3	0,322	0,325	0,305	0,317
4	0,26	0,262	0,251	0,257
5	0,238	0,227	0,255	0,24
6	0,258	0,26	0,258	0,258
7	0,291	0,312	0,294	0,299
8	0,305	0,309	0,304	0,306
9	0,275	0,318	0,266	0,286
10	0,286	0,283	0,283	0,284
11	0,299	0,303	0,287	0,296



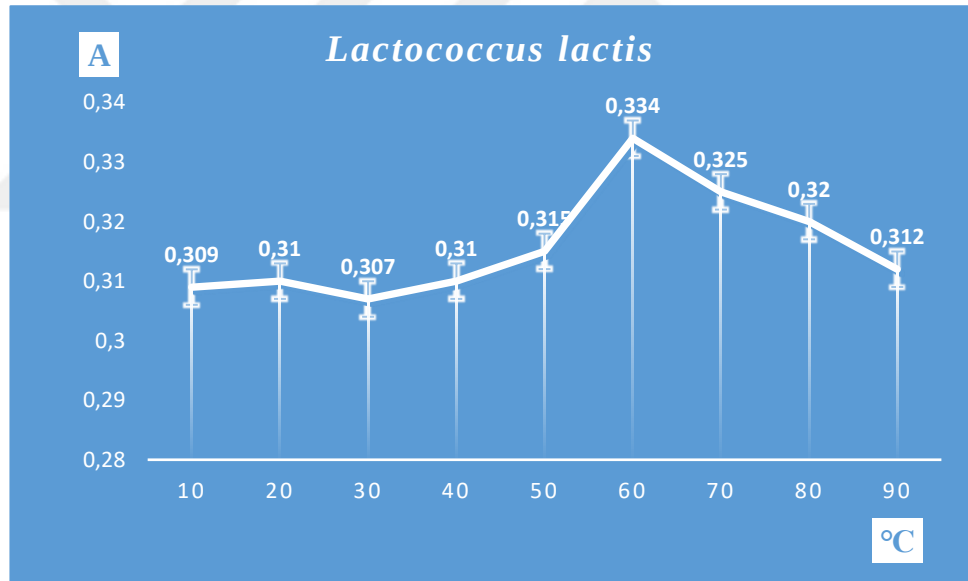
Şekil 4.9. *Lactobacillus brevis*'ten elde edilen ekstraselüler fitaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi (Malkoç 2017)

4.3.2. Fitaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları

Lactococcus lactis ve *Lactobacillus brevis*'ten elde edilip saflaştırılan fitaz enzimlerinin optimum sıcaklıkları gerekli ölçümlerle belirlenmiştir ve sırasıyla Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'te gösterilmiştir. Elde edilen bulgulara göre *Lactococcus lactis*'e ait optimum sıcaklık 60°C olarak bulunurken *Lactobacillus brevis* için bu değer 50°C olarak bulunmuştur. Bulunan fitaz enzimi optimum sıcaklıkları sırasıyla Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. *Lactococcus lactis*'in optimum sıcaklık absorbans (A) değeri

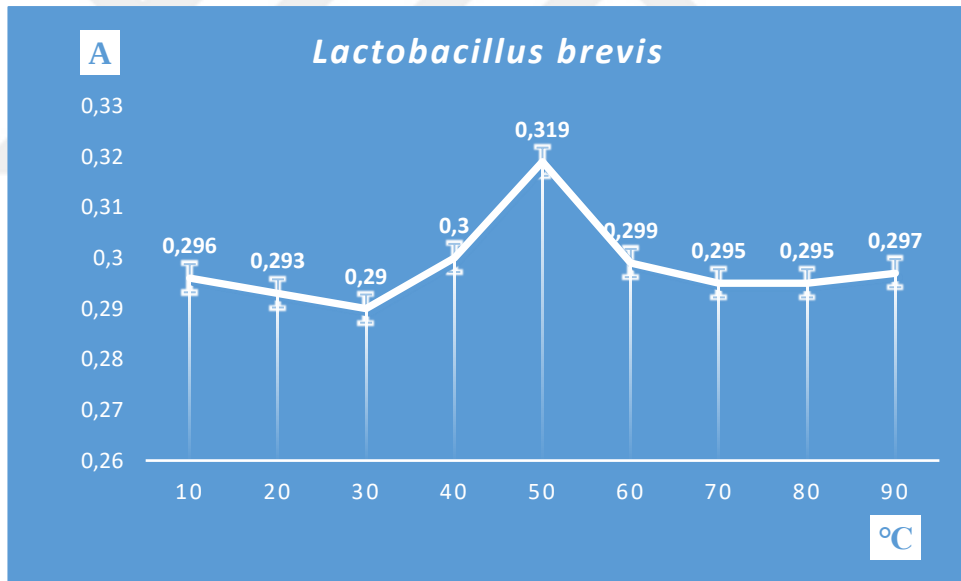
SICAKLIK	1. DENEME (A)	2. DENEME(A)	3. DENEME(A)	ORTALAMA
10	0,307	0,305	0,315	0,309
20	0,262	0,275	0,317	0,31
30	0,266	0,278	0,3	0,307
40	0,299	0,3	0,32	0,31
50	0,316	0,31	0,32	0,315
60	0,33	0,335	0,337	0,334
70	0,291	0,3	0,31	0,325
80	0,327	0,325	0,33	0,32
90	0,321	0,315	0,3	0,312



Şekil 4.10. *Lactococcus lactis*'ten elde edilen ekstraselüler fitaz enzimin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Çizelge 4.4. *Lactobacillus brevis*'in optimum sıcaklık absorbans (A) değerleri (Malkoç 2017)

SICAKLIK	1. DENEME (A)	2. DENEME(A)	3. DENEME(A)	ORTALAMA
10	0,293	0,289	0,305	0,296
20	0,285	0,299	0,296	0,293
30	0,296	0,285	0,289	0,29
40	0,303	0,3	0,297	0,3
50	0,32	0,322	0,317	0,319
60	0,301	0,299	0,297	0,299
70	0,297	0,295	0,295	0,295
80	0,296	0,296	0,294	0,295
90	0,298	0,299	0,295	0,297



Şekil 4.11. *Lactobacillus brevis*'ten elde edilen ekstraselüler fitaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi (Malkoç 2017)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji laboratuvarlarında yaptığımız tez sırasında tanımlanan ve Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji kültür koleksiyonuna eklediğimiz *Lactococcus lactis* ve *Lactobacillus brevis* bakterileri kullanılmıştır.

Lactococcus lactis ve *Lactobacillus brevis* bakterilerini elde edebilmek için öncelikle doğal kaynaklardan alınan örneklerden dilüsyon yöntemi ile seyreltmeler yapılmıştır. Daha sonra M17 (Merck) ve MRS (Merck) agara yayma plak yöntemi ile her iki bakteri için ayrı ayrı ekim yapılmıştır. 35°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmış saflaştırma basamakları takip edilerek bakteriler (20 bakteri) izole edilmiştir.

Büyükyörük ve Soyutemiz (2010) yaptıkları çalışmada İzmir tulum peynirinden aldıkları örneklerden *Lactococcus lactis* izolasyonu için bizim yöntemimize benzer şekilde; %0,85’lik dilüsyon sıvılarında sulandırma işlemi yaparak 10^{-6} ve 10^{-7} den M17 agara ekim yapmıştır. Corroler’in yöntemine göre 30°C’de 48 saat inkübasyonun ardından petrideki kremsi tek tip kolonilerden seçip M17 agar ve M17 brotha saflaştırma işlemleri yapmıştır. Saflaştırdığı kolonilerden Gram boyama ile *Lactococcus lactis*’i saptamıştır. *Lactococcus lactis*’in koloni özelliklerine bakıldığında benzer şekilde; sarımtırak renkli, yuvarlak ve mat yapıda olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan Gram boyama ile *Lactococcus lactis*’in mor renkte olduğu tespit edilmiş ve Gram (+) bir bakteri olduğu belirlenmiştir.

Yaptığımız çalışmaya benzer olarak Rezzukoğlu (2011) yaptığı çalışmasında *Lactococcus sp.*’lerin Gram boyama sonucu mikroskop incelemesinde kok şekilli ve mor renkte olduğunu gözlemleyip Gram (+) olduklarını söyleyerek bizim çalışmamızla benzer sonuçlar elde etmiştir. Zamfir ve ark. (2006) Romanya’da fermente edilmiş ve ham peynir, süt gibi kaynaklardan aldığı izotlardan Gram boyama ve ardından

mikroskop incelemesi yapmış ve bakterinin *Lactococcus lactis* olduğunu saptayarak çalışmamızı desteklemiştir.

Lactobacillus brevis'in koloni özelliklerine bakıldığında ise; krem renkli, küçük yuvarlak yapılı, pigment içermeyen opak ve pürüzsüz parlak yapıda olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan Gram boyama ile *Lactobacillus brevis*'in mor renkte olduğu görülmüş ve Gram (+) bir bakteri olduğu belirlenmiştir.

Sümengen (2012) yaptığı çalışmada *Lactobacillus* sp. olarak tanımladığı bakterilerin Gram boyama sonucu mikroskop incelemesinde basil şekilde ve Gram (+) olduğunu gözlemlemiştir.

Barış (2009) yaptığı çalışmada bakterilerden DNA izolasyonu yaparken Wilson'un protokolüne uymuş ve manuel izolasyon yapmıştır. Biz ise yaptığımız bu çalışmada *Lactococcus lactis* ve *Lactobacillus brevis*'i moleküler olarak tanımlarken QIAGEN'in bakteri izolasyon kiti kullanılmış ve ilgili protokol doğrultusunda DNA izolasyonu işlemi yapılmıştır. Bakterilerin sistematığı açısından 16S rRNA'nın sentezlendiği bölge seçilerek evrensel primerler aracılığıyla PCR protokolü ile bölgeler çoğaltılmıştır.

Büyükyörük ve Soyutemiz (2010) bakteriden DNA izolasyonu yaparken DNA ayırma kiti (Fermentas, FE-K0512) protokolüne göre izolasyonu tamamlamış ve *Lactococcus lactis*'i İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nden aldığı referans suslarla karşılaştırarak identifiye etmiştir.

Doğadaki çeşitli ekosistemlerden endüstriyel önemi olan enzimleri üreten mikroorganizmaların izolasyonu ve tanımlanması ulusal ve uluslararası bir boyut kazanmıştır. Teknolojik gelişmelerin genomik, proteomik ve yönlendirilmiş mutageniz teknikleri kullanılarak enzimlerde yapı ve işlevlerin aydınlatılması, endüstriyel boyutta üretilmesi önem kazanmıştır.

Ticari öneme sahip enzimlerin kullanım alanlarının çeşitliliği, ekonomik değerlerinin yüksek olması nedeniyle biyoteknolojik olarak araştırılmaları, üretilmeleri son yıllarda stratejik olarak değerlendirilmektedir. Rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve giderek yaygınlaşmıştır. Ancak son yıllardaki doğal kaynaklardan elde edilen endüstriyel boyuttaki materyaller büyük destek görmektedir. Bu pozitif etki devam ederken endüstriyel mikroorganizmaların tamamen doğadan eldesi ve izole edilmeleri gerekmektedir. Biyoteknolojik elemeler yapıldıktan sonra en fazla enzim üreten suşların geliştirilmesi ya da verimlerinin artırılması için kullanılan klasik mikrobiyal biyoteknolojik yöntemlerden ‘mutasyon ve seleksiyon’ oldukça sık kullanılmaktadır. Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle, biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar, daha da önem kazanmaktadır. Biyoteknoloji ile yeni tür enzimlerin büyük ölçeklerde ve ekonomik olarak üretilmesi mümkün olmuştur (Kıran vd 2006). Günümüzde endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenlidir ve endüstriyel enzimlerin üretiminde mikroorganizma kullanımı artmış (Demain and Solomon 1981) ve daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri nedeniyle tercih edilmişlerdir (Zeman and McCrea 1985; Wiseman 1987).

Yaptığımız çalışmada seleksiyon yöntemi kullanılarak endüstriyel boyut kazandırılacağına inandığımız iki suş ele alınmıştır.

Lactococcus lactis ve *Lactobacillus brevis* bakterilerinin fitaz enzim aktiviteleri ve aktiviteleri etkileyen pH ve sıcaklık değerleri farklı değerlerde ölçülmüş, optimum sıcaklık ve optimum pH değerleri çalışılmıştır. Her iki bakteriden saflaştırılan fitaz enzimlerinin ayrı ayrı optimum pH’larını saptamak amacıyla pH 2.0-11.0 aralığında aktivite ölçümleri yapılmıştır. pH 2.0-3.0 aralığı için 0.1M sodyum asetat tamponu, pH 4.0-6.0 aralığı için 0.1M sodyum sitrat tamponu, pH 7.0-9.0 aralığı için 10mM’lık Tris-HCl tamponu ve pH 10.0-11.0 aralığı için 10mM’lık sodyum karbonat tamponları ile enzimlerin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrede ölçülmüştür (Sarıbuğa 2013).

Sümengen (2012), *Lactobacillus* sp. için fitaz enzimi aktiviteleri saptamada; Sitrat (pH 3.0-5.8), Tris-Maleat (pH 6.2-7.4), Tris (pH 7.6-9.0), Karbonat-Bikarbonat (pH 9.2-10.7) tamponlarını kullanarak 50°C’de 15 dk inkübasyona bırakarak aktivite değeri saptanmıştır.

İzole ettiğimiz *Lactococcus lactis*’ten ekstraselüler olarak üretilen fitaz enziminin optimum pH’sı 8.0 olarak bulunmuştur. Miao *et al.* (2013) yaptığı çalışmada *Lactococcus lactis*’ten ifade edilen fitaz enziminin pH aralığı için 2.0-9.0, optimum değerin pH 5.5-6.5 olduğunu tespit ederek çalışmamızla paralellik göstermiştir.

Lactobacillus brevis’in ekstraselüler olarak üretilen fitaz enziminin optimum pH’sı 3.0 olarak tarafımızdan bulunmuştur. Literatürde bugüne kadar fitaz enzimi ile yapılan çalışmalarda farklı optimum pH sonuçları kaydedilmiştir. Sümengen (2012) yapmış olduğumuz çalışmaya benzer olarak *L.brevis*’in ekstraselüler fitaz enziminin optimum pH’sını 3.4 olarak bulmuştur. Haros *et al.* (2008) *Lactobacillus plantarum*’un fitaz enziminin optimum pH’sını 6.0-6.5 olduğunu söylerken; yine aynı çalışmada *Lactobacillus casei*’nin optimum fitaz pH’sının 5.5-7.0 olduğunu söylemiştir. De Angelis *et al.* (2003) yaptığı çalışmaya göre *Lactobacillus sanfranciscensis*’in optimum pH’sının 4.0 olduğunu bildirmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada *Lactobacillus pentosus*’un optimum pH’sı 5.0 olarak bulunmuştur (Palacios *et al.* 2005). Zamudio *et al.* (2001), *Lactobacillus plantarum*’un optimum fitaz pH’sını 5.5 olduğunu yaptığı çalışmada ortaya koymuştur.

Lactococcus lactis ve *Lactobacillus brevis*’in fitaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 10-90°C aralığında spektrofotometrede ölçümler yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda *Lactococcus lactis*’in optimum sıcaklığı 60°C, *Lactobacillus brevis*’in optimum sıcaklığı 50°C olarak bulunmuştur.

Palacios *et al.* (2005), *Lactobacillus pentosus*’un optimum sıcaklığını 50°C olarak bulurken, De Angelis *et al.* (2003) *Lactobacillus sanfranciscensis*’in optimum

sıcaklığını 35°C olarak bulmuştur. Zamudio *et al.* (2001), *Lactobacillus plantarum*'un optimum sıcaklığını 65°C olarak bularak bizim çalışmamızla paralellik göstermiştir.

Probiyotikler uygun miktarda tüketildiğinde insan sağlığını olumlu yönde etkileyen mikroorganizmalardır. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsleri yaygın kullanılan bakterilerdir. Biyoteknolojik olarak üretilen probiyotik bakteriler önemli bir pazara sahiptir. Son yıllarda ülkemizde mevcut probiyotik üreten şirketlerin geçmişi beş yıl kadar kısadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, bu bakterilerin büyüyen pazarlarda yerini alabilmesi içindir. İnsan probiyotik içecekleri veya katkı ilaçları tamamen yurt dışı menşelidir.

İnsanların ve hayvanların kaliteli bir hayat sürebilmeleri için sağlıklı bir gastrointestinal sisteme sahip olmaları gerekir. Bunun içinde probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotikler gibi gıda katkı maddeleriyle bağırsağın yararlı mikroflorasını güçlendirmek gerekir.

Probiyotik bakteriler gıdaların sindirilebilirliğini artırır, patojen mikroorganizmaların inhibisyonunu sağlar, kan kolesterol seviyesini düşürür, immün sistemi güçlendirir ve prebiyotiklerin emilimini artırır. Probiyotiklerin prebiyotiklerle kombine halde gıdalarda bulunması durumuna sinbiyotik adı verilir. Bu şekildeki uygulama ile probiyotik bakterilerin yaşam süreleri uzar ve bağırsakta daha iyi kolonize olurlar.

Sindirilemeyen fakat fermente edilebilir oligosakkarit olarak bilinen karbonhidratların yani prebiyotiklerin hayvan ve insan sağlığı üzerine olumlu etkileri vardır. Probiyotik bakterilerin patojen mikroorganizmalara karşı antibakteriyel etkileri olduğu ve ayrıca bağışıklık sistemi ve alerjik hastalıklar üzerine olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir.

Bu durumda ülkenin ulusal bir probiyotik kaynağına sahip olması gerekmektedir. Çalışmamızdaki temel amaçlardan biride budur.

Oligosakkaritler ince bağırsakta absorbe veya hidrolize edilemezken kolon bölgesinde *Bifidobacterium* spp. ve *Lactobacillus* spp. tarafından fermente edilerek probiyotik özellik göstermektedir.

Suzuki *et al.* (2017) yaptıkları çalışmada *Lactococcus lactis*'li probiyotiğin fare bağırsağı üzerinde bağırsak hücreleri ile olan etkileşimlerini, bağırsakta kolonize olma açısından araştırmış ve sağlık açısından olumlu sonuçlarını görerek bizim çalışmamıza da öncülük etmiştir.

Son yıllarda probiyotik bakteriler kapsül olarak, tablet şeklinde, dondurarak kurutma yöntemiyle marketlerde tüketime sunulmuştur. Probiyotik mikroorganizmalar insan sağlığına katkıda bulunduğu en önemli etkiler; immün sistemin uyarılması, antikanserojen ve antitümör, çeşitli tip diyarelerin önlenmesi ve tedavisinde, laktoz intoleransı ve kabızlık semptomlarını hafifletmesi olarak sayılabilir (Salminen *et al.* 1998; Kınık ve Gürsoy 2006).

Laktik asit bakterileri gıda endüstrisinde probiyotikler olarak korunma ve bazı patojenlere karşı mücadelede başvurulan araçlardan biridir. Christine *et al.* (2016) yaptığı çalışmada geleneksel biradan izole ettiği beş laktik asit bakterisinin; asit ve safra toleransı, antimikrobiyal aktivite ve antibiyotiklere direnç, gastrointestinal bölgede kolonizasyon ve sağkalım, bağırsak epitel hücrelerine yapışma kabiliyeti gibi probiyotik özellikleri açısından test etmiştir. *Streptococcus thermophilus*'un inhibisyon çapları 9.5 ± 0.7 mm'den 22 ± 4.76 mm'ye kadar değişen test edilen patojenik suşların en fazla aktif olduğunu göstermiştir. Tüm laktik asit bakterileri, türüne göre farklı mide koşullarına (pH 2.0 pH 2.5) ve değişken canlılık oranlarına (%99-105) direnç gösterdiğini söylemiştir. Bunlara ek olarak tüm türlerin ince ve kalın bağırsak epiteline iyi yapıştığını gözlemlemiştir *Lactobacillus casei* ve *Streptococcus thermophilus*'un hücre yüzeyi kolonileşme kabiliyeti yüksekti (hidrofobiklik), *Lactobacillus fermentum*'da ise bu kolonileşme kabiliyeti düşüktü.

Lactococcus ve *Lactobacillus* cinsi bakterilerle ilgili oldukça fazla probiyotik çalışma vardır. Miao *et al.* (2013) yaptığı çalışmada *Bacillus subtilis* GYPB04'ün fitaz genini (phyC) *Lactococcus lactis*'te ekspresyon için pMG36e plazmitine klonlanmıştır. M17 broth içerisinde plazmittedeki fitaz geni *Lactococcus lactis*'e aktarmıştır. Aktif fitaz ve probiyotik sağlayan fonksiyonel, sağlıklı yoğurtların üretilebileceğini vurgulamıştır.

Vieira *et al.* (2013), deniz karideslerinin (*Litopenaeus vannamei*) sindirim sisteminden probiyotik potansiyeli olan laktik asit bakterilerini izole etmişlerdir. İzole edilen bakteriler *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Weissella confusa* ve *Lactobacillus delbrueckii* olarak tanımlanmıştır. *L. plantarum* suşları, yüksek büyüme oranına, patojenlere ve değerlendirilen parametrelere karşı toleransı en geniş inhibisyon halelerine sahip olduğu görülmüştür.

Gomaa (2017) yaptığı çalışmada ticari olan 6 probiyotik maddenin, *Lactobacillus brevis* NM101-1'in büyüme, yağ asidi profili, asidifiye edici aktivite ve probiyotik özellikleri üzerindeki etkisi, in vitro olarak sinbiyotik preparatların gelişimi için araştırmıştır. Her bir probiyotik için ayrı ayrı probiyotik bakteri seçilmesi gerektiğini belirtmişlerdir.

Yonejima *et al.* (2015), probiyotik bakterilerin asit toleransını artırmak için bağırsak kanalındaki probiyotik etkilerin artırılmasına yönelik yöntemin bir değerlendirmesini yapmışlardır. *Lactobacillus brevis subsp. coagulans* (Labre) oranı, kurutulmuş Labre tozu ve Labre içeceği içerenlere kıyasla yaklaşık yüz kat daha fazla artış göstermiştir. Bu koruyucu etki, probiyotik işleme için çikolata suyunun içeriğine bağlıdır. Sonuç olarak çikolata işlemenin probiyotiklerin canlı bir araçla bağırsağa verilmesini ve konakçı sağlığı için etkin olmasını sağlayan etkili bir yöntem olduğu ispatlanmıştır.

Kimchi'den (Kore'ye ait bir yemek) izole edilen ve potansiyel probiyotik fonksiyonlara sahip olan *Lactobacillus curvatus* KCCM 200173, *Lactobacillus brevis* G1 ve *Lactobacillus brevis* KU15006 suşları 16S rRNA sekansı analizi ile tanımlanmıştır. *L. brevis* KU15006 suşu gıda kaynaklı patojenler olan *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli*'ye karşı önleyici etkinlik göstermiştir. Gösterdiği önleyici etki

sonucunda, bu suşun probiyotik ürünler için patojen antagonistik ve antidiyabetik özelliğe sahip olduğu saptanmıştır (Son *et al.* 2017).

Han *et al.* (2017) yaptıkları çalışmada Harbin'deki sosislerden izole edilen laktik ait bakterileri; *Lactobacillus brevis* R4, *Pediococcus pentosaceus* R1, *Lactobacillus curvatus* R5 ve *Lactobacillus fermentum* R6'nın probiyotik özellikleri, in vitro olarak *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosaceus* da dahil fermente süt ürünlerinden seçilen probiyotiklerle karşılaştırılmıştır. Potansiyel probiyotikler olarak kullanılabileceği kanaatine varılmıştır.

Kumar *et al.* (2017), Himachal Pradesh'in kırsal ve kentsel bölgelerindeki geleneksel turşulardan toplam 15 tane laktik asit bakterisi izole etmiştir. Bu izolatlar biyokimyasal, morfolojik ve 16S rDNA sekansı analizi sonucunda *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides* ve *Enterococcus* sp. olarak bulmuştur. Bu LAB *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* ve *Shigella dysenteriae*'ye karşı antimikrobiyal aktivite sergilediğinden dolayı Himachal Pradesh'in geleneksel turşularındaki LAB'ların probiyotik olarak kullanılması için yüksek potansiyele sahip olduğunu söylemiştir. LAB izolatlarının probiyotik olarak kullanılması için potansiyele sahip olduğunu söylemiştir.

Holz *et al.* (2017) bu çalışmada insan keratinositlerinde in vitro olarak anti-enflamatuar etkisinde ve *Staphylococcus epidermis*'in büyümesinde katkısı olan *Lactobacillus brevis* DSM17250'yi tanımlanmıştır. *L.brevis* DSM17250'nin sulu hali bir krem formülasyonunda gönüllü kuru ciltli insanlara uygulanmıştır. Uygulama işlemi 4hafta devam etmiş ve uygulanan bakteri özütünün cildin yeniden kolonize edilmesine yardımcı olduğunu söylemiş, ciltteki su kaybını önemli ölçüde azalttığını göstermiştir.

Ashwar *et al.* (2018) araştırmalarında; nişastanın çapraz bağlanmasının, probiyotiklerin sindirimini değiştirerek hedeflenen şekilde iletilmesi için potansiyel bir bağırsak duvar malzemesi olabileceği hipotezini sunmuştur. Üç probiyotik suş *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei* ve *Lactobacillus plantarum* dirençli bir nişasta ile

mikrokapsüllenmiştir. Mikrokapsüllü probiyotikler gastrointestinal sistemde kararlı bir şekilde varlığını korumuştur. Çalışma sonucunda ise mikrokapsüllenen probiyotiğin ağız yoluyla verilmesi için yeni bir taşıyıcı olduğunu ortaya koymuştur.

Christine *et al.* (2016), biradan izole ettiği tüm laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliğe sahip olduğu ve probiyotik özellikteki gıda bileşenlerini odaklamak için kullanılabileceğini yaptığı çalışmayla göstermiştir. Bizde buradan yola çıkarak *L.lactis* ve *L.bacillus*'un optimum pH'larını göz önünde bulundurduğumuzda gıda endüstrisinde probiyotik olarak kullanılan yiyecek ve içeceklerin insan sağlığı ve özellikle gastrointestinal sistem için, yapılan diğer tüm çalışmalar ışığında uygun olduğu kanaatindeyiz.

Canlı organizmaları ve onların ürünlerini kullanarak çeşit geliştirme, dayanıklılık, ürün eldesi, ekstrem koşullara direnç, kalitenin artırılması ve raf ömrünün uzatılması gibi özelliklerin araştırılmasının yanısıra bir model organizma olan mikroorganizmalardan enzim eldesi de biyoteknolojik yaklaşımlarda oldukça önemlidir. Fitaz enziminin biyolojik önemi gereği; bu tarz çalışmaların planlanması, devam etmesi, çeşitli endüstriyel sahalarda kullanımı, bir ve birden fazla özelliğinin değerlendirilmesi organik materyalden elde edilen fitaz enzimi çalışmalarının detaylandırılması gerekmektedir. Yaptığımız bu çalışmayla spesifik özellikleri probiyotik olan, GRASS listesine girmiş iki suşun endüstriyel boyutta kullanılması amacıyla karşılaştırılması yapılmış sonuçta bu suşların endüstride kullanılabileceği ve önerilebileceği belirlenmiştir. Bu alanda yapılacak çalışmalara öncülük edeceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aehle, W., 2004. Enzymes in Industry Production and Application. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 484s.
- Anonim 2018. <http://www.ansc.purdue.edu/courses/ansc443/Classnotes/Nutrition.html> (08.01.2018).
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi No: 46, 548s.
- Ashwar, B. A., Gani, A., Gani, A., Shah, A., and Masoodi, F. A., 2018. Production of RS4 from rice starch and its utilization as an encapsulating agent for targeted delivery of probiotics. Food chemistry, 239, 287-294.
- Aşan, M., 2007b. Yem Değerini Artırıcı Enzim Genlerinin Probiyotik Etkili Laktik AsitBakterilerinde Klonlanarak Üretimi. ÇÜ. FBE. Doktora Tezi.
- Åvall-Jääskeläinen, S., and Palva, A., 2006. Secretion of biologically active porcine interleukin 2 by *Lactococcus lactis*. Veterinary microbiology, 115(1), 278-283.
- Aygan, A., 2008. Haloalkalofil *Bacillus* sp. İzolasyonu, Amilaz, Selülaz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği. Ç.Ü. FBE. Doktora Tezi.
- Barış, Ö., 2009. Erzurum İlindeki Mağaralarda Damlatası Oluşumunda Etkili Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı. Doktora Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Atatürk Üniversitesi.
- Bohn, L., Meyer, A.S., and Rasmussen, S.K., 2008. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. Journal of Zhejiang Univ. Sci. B, 9(3):165 191.
- Bounouala, F. Z., Roudj, S., Karam, N. E., Recio, I., and Miralles, B., 2017. Casein Hydrolysates by *Lactobacillus brevis* and *Lactococcus lactis* Proteases: Peptide Profile Discriminates Strain Dependent Enzyme Specificity. Journal of agricultural and food chemistry, 65(42), 9324 9332.
- Braat H, Rottiers P, Hommes DW, Huyghebaert N, Remaut E, Remon JP, van Deventer SJ, Neirynck S, Peppelenbosch MP, Steidler L., 2006. "Crohn hastalığında interlökin-10 eksprese eden transjenik bakterilerle yapılan bir faz I çalışması". Clin Gastroenterol Hepatol . 4 (6): 754 759. doi: 10.1016/j.cgh.2006.03.028. PMID 16716759
- Büyükyörük, S., Soyutemiz, G.E., 2010. Geleneksel Olarak Üretilmiş İzmir Tulum Peynirinden *Lactococcus lactis* (*Lactococcus lactis* alttür *lactis* ve alttür *cremoris*) Suşlarının İzolasyonu, Fenotipik ve Moleküler Teknikler ile İdentifikasyonu. Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 7(2),81-87.
- Caplice, E., and Fitzgerald, G.F., 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology, 50, 131–149.
- Casey, A., and Walsh, G., 2003. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. Bioresource Technology 86, 183–188.
- Choi, Y. M., Suh, H. J., and Kim, J. M., 2001. Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. Journal of Protein Chemistry, 20(4), 287-292.

- Christine, N., Sina, H., Pelagie A., Generose V.D., Bawa, B., Jean T, C.C., Polycarpe AP, K., Lamine B.M., 2016. Probiotic Properties Of Lactic Acid Bacteria Isolated From A Beninese Traditional Beer's Ferment. *International Journal Of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 7(2),.
- Davoodi, S., Behbahani, M., Shirani, E., and Mohabatkar, H., 2016. Influence of Sucrose, Glucose, Stevia Leaf and Stevioside on the Growth and Lactic Acid Production by *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus casei*. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 40(4), 275-279.
- De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M. R., McSweeney, P. L., Faccia, M., Giovine, M., and Gobbetti, M., 2003. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 259-270.
- Demain, A.L., and Solomon, N.A., 1981. In *Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering*, pp. 3-14. Scientific American, Freeman & Comp., San Francisco.
- Dogan, M., and Ozpinar, H., 2017. Investigation of Probiotic Features of Bacteria Isolated from Some Food Products. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 23(4).
- Erkek, R., Kirkpinar, F., Taluğ, A.M., 1994. Kümes hayvanlarında fitin fosforundan yararlanmanın artırılması. *E.Ü.Z.F. Dergisi*. 31 (2-3) : 303-311.
- Fari, M. G., Kralovansky, U.P., 2006. The Founding Father of Biotechnology: Karoly(Karl) Ereky. *International Journal of Horticultural Science*. 12(1):9-12.
- Feng, Y., Qiao, L., Liu, R., Yao, H., and Gao, C., 2017. Potential probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from the intestinal mucosa of healthy piglets. *Annals of Microbiology*, 67(3), 239-253.
- Fredrikson, M., Biot, P., Larsson Alminger, M., Carlsson, N.G., and Sandberg, A.S., 2001. Production process for high-quality pea protein isolate with low content of oligosaccharides and phytate, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 1208-1212.
- Garcia-Fruitos E., 2012. Lactic acid bacteria: a promising alternative for recombinant protein production. *Microb Cell Fact* 11:157. doi:10.1186/1475-2859-11-157
- Gheisari, A., Bahadorani, R., Pourreza, J., 2003. The effects of supplemental microbial phytase on the performance and phytate phosphorus availability of corn wheat-soybean meal diet in broiler chicks. 14th Eur. Symp. Poultry Nutrition. August Lillehammer, Norway: 42-44.
- Gheytanchi, E., Heshmati, F., Shargh, B. K., Nowroozi, J., & Movahedzadeh, F. (2010). Study on β galactosidase enzyme produced by isolated lactobacilli from milk and cheese. *African Journal of Microbiology Research*, 4(6), 454-458.
- Gomaa, E. Z., 2017. Effect of prebiotic substances on growth, fatty acid profile and probiotic characteristics of *Lactobacillus brevis* NM101-1. *Microbiology*, 86(5), 618-628.
- Han, Q., Kong, B., Chen, Q., Sun, F., and Zhang, H., 2017. In vitro comparison of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Harbin dry sausages and selected probiotics. *Journal of Functional Foods*, 32, 391-400.

- Harley, J.P. and Prescott, L.M., 2002. Laboratory exercises in microbiology. Fifth Edition New York: The McGraw–Hill Companies, 466p.
- Haros, M., Bielecka, M., Honke, J., and Sanz, Y., 2008. Phytate-degrading activity in Lactic Acid Bacteria. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, Vol.58, No.1, pp.33-40.
- Hirimuthugoda, N.Y., Chi, Z., Li, X., Wang, L., and Wu, L., 2006. Diversity of phytase producing marine yeasts. Ciencias Marinas, 32, 673–682.
- Holz, C., Benning, J., Schaudt, M., Heilmann, A., Schultchen, J., Goelling, D., and Lang, C., 2017. Novel bioactive from *Lactobacillus brevis* DSM17250 to stimulate the growth of *Staphylococcus epidermidis*: a pilot study. Beneficial microbes, 8(1), 121-131.
- Hurrell, R.F., 2003. Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability. J. Nutr., 133(suppl.): 2973-2977.
- Idris, E.E., A. Farouk, R. Greiner, H. Bochow and R. Borris., 2002. Extracellular phytase activity of several *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effects. Microbiol., 148: 2097-2109.
- James, M., 1992. Modern Gıda Mikrobiyolojisi, 4. baskı. Van Nostrand Reinhold,
- Kerovuo, J., and Tynkkynen, S., 2000. Expression of *Bacillus subtilis* phytase in *Lactobacillus plantarum* 755. Letters in applied microbiology, 30(4), 325-329.
- Kınık Ö., Gürsoy O., 2006. Probiyotik bakterilerin klinik uygulamalarında yeni gelişmeler-I, Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg., 43, 181-188.
- Kıran, Ö. E., Çömlekçioglu, U., and Dostbil, N. (2006). Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(1), 12-19.
- Kok, J., Eds Dunny, Gary M., Cleary, P., Patrick. McKay, Larry L., 1991. Streptococci, Lactococci ve Enterococcus'un genetiği ve moleküler biyolojisi Lactococci için Özel Amaçlı Vektörler. Amerikan Mikrobiyoloji Derneği, s 97.
- Kumar, D.j.M., Balakumaran, M.D. P.T., Pandey, A., Singh, A., Raja, R.B., 2011. Isolation, Production and Application Of Extracellular Phytase By *Serratia Marcescens* Asian Journal of Experimental Biological Sciences, 2(4), 663-666.
- Kumar, V., Kumari, A., Angmo, K., and Bhalla, T. C., 2017. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional pickles of Himachal Pradesh, India. Journal of food science and technology, 54(7), 1945-1952.
- Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P.S., and Becker, K., 2010. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition. Food Chemistry 120, 945-959.
- Kumari, A., Angmo, K., and Bhalla, T. C., 2016. Probiotic attributes of indigenous *Lactobacillus*. Journal of food science and technology, 53(5), 2463-2475.
- Lei, G., X., Weamer, J., D., Mullaney, E., Ullah, A., H., Azain, M., J., 2012. Phytase, a New Life for an "Old" Enzyme, The Annual Review of Animal Biosciences, s 13.
- Lei, X.G., and C.H. Stahl., 2001. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. Appl. Microbiol. Biotechnol., 57: 474-481.
- Lelliott, R. A. and Stead D. E., 1987. Methods for The Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Blackwell Scientific Publications. p216.
- Lonnerdal, B., 2002. Phytic acid-trace element (Zn, Cu, Mn) interactions. International Journal of Food Science and Technology, 37, 749–758.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J., 1997. Biology of Microorganisms, Eighth Ed., Prentice-Hall, Inc., USA, 986.

- Malkoç, O., 2017. Doğal Kaynaklardan İzole Edilen *Lactobacillus Brevis*'in 16s rRNA İle Moleküler Tanımlanması, Fitaz Enzimi Aktivitesi, Endüstriye Kazandırılabilirliğinin Araştırılması. Y.Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Marlida, Y., Delfita, R., Adnadi, P., and Ciptaan, G., 2010. Isolation, Characterization and Production of Phytase from Endophytic Fungus its Application for Feed, Pakistan Journal of Nutrition,9 Marlida, Y., Delfita, R., Adnadi, P., and Ciptaan, G., Isolation, Characterization and Production of Phytase from Endophytic Fungus its Application for Feed, Pakistan Journal of Nutrition,9,471-474,2010.,471-474.
- Miao, Y., Xu, H., Fei, B., Qiao, D., and Cao, Y., 2013. Expression of food-grade phytase in *Lactococcus lactis* from optimized conditions in milk broth. Journal of bioscience and bioengineering, 116(1), 34-38.
- Milanova, A., Pavlova, I., Yordanova, V., and Danova, S., 2016. Effect of doxycycline and *Lactobacillus* probiotics on mRNA expression of ABCG2 in small intestines of chickens. Iranian Journal of Veterinary Research, 17(4), 265.
- Monteagudo-Mera, A., Rodríguez-Aparicio, L., Rúa, J., Martínez-Blanco, H., Navasa, N., García Armesto, M. R., and Ferrero, M. Á. (2012). In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. Journal of functional foods, 4(2), 531-541.
- Nabi, X. H., Ma, C. Y., Manaer, T., Heizati, M., Wulazibieke, B., and Aierken, L., 2016. Anti atherosclerotic effect of traditional fermented cheese whey in atherosclerotic rabbits and identification of probiotics. BMC complementary and alternative medicine, 16(1), 309.
- Özgen, M., Ertunç, F., Kınacı, G., Yıldız, M., Birsin, M., Ulukan, H., Emiroğlu, H., Koyuncu, N., ve Sancak, C., 2005. "Tarım teknolojilerinde yeni yaklaşımlar ve uygulamalar: bitki biyoteknolojisi", TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongresi, Ankara, 315-346.
- Palacios, M.C., Haros, M., Rosell, C.M., Sanz, Y., 2005. Characterization of an acid phosphatase from *Lactobacillus pentosus*: regulation and biochemical properties. J. Appl. Microbiol., 98, 229-237.
- Pandey, A., G. Szakacs, C.R. Soccol, J.A. Rodriguez-Leon, and Soccol, A.T., 2001. Production, purification and properties of microbial phytases. Bioresource Technol., 7: 203-217.
- Pavlova, S. I., Kilic, A. O., Kilic, S. S., So, J. S., Nader-Macias, M. E., Simoes, J. A., and Tao, L., 2002. Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. Journal of Applied Microbiology, 92(3), 451-459.
- Pfeiler EA., Klaenhammer TR., 2007. The genomics of lactic acid bacteria. Trends in Microbiol., 15, 546-553.
- Pidoux, M., 1989. The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 5(2), 223-238.

- Priyodip P., Prakash PY., Balaji S., 2017. Phytases of Probiotic Bacteria: Characteristics and Beneficial Aspects. *Indian J Microbiol* (Apr–June 2017) 57(2):148–154 DOI 10.1007/s12088017-0647-3.
- Quan, C., Zhang, L., Wang, Y., and Ohta, Y., 2001. Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(2), 154–160.
- Quan, C-S., Fan, S.,D., Zhang, L.,H., Wang, Y.,J., and Ohta, Y., 2002. Purification and Properties of a Phytase from *Candida krusei* WZ-001. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(5), 419-425.
- Raghavendra, P., and Halami, P. M., 2009. Screening, selection and characterization of phytic acid degrading lactic acid bacteria from chicken intestine. *International journal of food microbiology*, 133(1), 129-134.
- Raghavendra, P., Rao, T.S.C., and Halami, P.M., 2010. Evaluation of beneficial attributes for phytate degrading *Pediococcus pentosaceus* CFR R123, *Beneficial Microbes*, 1, 259-264.
- Rees, T.J., 1997. The development of a Novel Antifungal Silage Inoculant, Doctoral Research Thesis, Cranfield University Biotechnology Centre, UK.
- Rezzokoğlu İ., 2011. Laktik Asit Bakterilerinden α -Amilaz İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Richardson, A.E., and Hadobas, P. A., 1997. Soil isolates of *Pseudomonas* spp. That utilise inositol phosphates, *Canadian Journal of Microbiology*, 43, 509–516.
- Richardson, A.E., Hadobas, P.A., and Hayes, J.E., 2001a. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *The Plant J.*, 25: 641–649.
- Richardson, A.E., Hadobas, P.A., Hayes, J.E., O’ Hara, C.P., and Simpson, R.J., 2001b. Utilization of phosphorus by pasture plants supplied with myo-inositol hexakisphosphate is enhanced by the presence of soil microorganisms. *Plant and Soil*, 229: 47-56.
- Robinson, E.H., Jackson, S., and Li, M.H., 1996. Supplemental phytase in catfish diets., *Aquaculture Magazine*, 22, 80-82.
- Rodriguez, E., Mullaney, E.J., and Lei, X.G., 2000b. Expression of the *Aspergillus fumigatus* phytase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268(2): 373-378.
- Roissart, H. ve Luquet FM., 1994. Bactéries laktikleri: fondamento ve etekolojik teknikler. Uriage, Lorica, Fransa, cilt. 1, s. 605. ISBN 2-9507477-0-1
- Sağdıç O., Küçüköner E., Özçelik S., 2004. Probiyotik ve Prebiyotiklerin Fonksiyonel Özellikleri. *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.* 35 (3-4), 221-228.
- Sakatani, A., Fujiya, M., Ueno, N., Kashima, S., Sasajima, J., Moriichi, K., and Kohgo, Y., 2016. Polyphosphate Derived from *Lactobacillus brevis* Inhibits Colon Cancer Progression Through Induction of Cell Apoptosis. *Anticancer research*, 36(2), 591–598.
- Salminen S., Wright von A., 1993. *Lactic Acid Bacteria*, 270 Madison Avenue, New York 1001, USA.
- Salminen, S., Deighton, M.A., Benno, Y. & Gorbach, S.L. 1998. Lactic acid bacteria in health and disease. In *Lactic Acid Bacteria* ed. Salminen, S. and von Wright, A., 211–253. New York: Marcel Dekker.

- Sarıbuğa, E., 2013. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus acidophilus* Bakterilerinden Fitaz Enziminin Kısmen Saflaştırılması Ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Saygılı, H., Şahin, F., ve Aysan, Y., 2006. "Fitobakteriyoloji." Meta Basım Matbaacılık, İzmir, Türkiye.
- Schleifer, KH., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Balz, R., Collins, M. D., Fischer, W., 1985. "Streptococcus lactis ve ilgili streptokokların *Lactococcus* gen. nov'a aktarılması". Sist. Baş. Microbiol . 6 : 183-195. doi : 10.1016 / s0723-2020 (85) 80052 7 . ISSN 0723-2020 .
- Son, S. H., Jeon, H. L., Yang, S. J., Lee, N. K., and Paik, H. D., 2017. In vitro characterization of *Lactobacillus brevis* KU15006, an isolate from kimchi, reveals anti-adhesion activity against foodborne pathogens and antidiabetic properties. Microbial pathogenesis, 112, 135-141.
- Sudar, M., Findrik, Z., Domanovac, M. V., and Vasić-Rački, Đ., 2014. Coenzyme regeneration catalyzed by NADH oxidase from *Lactococcus lactis*. Biochemical engineering journal, 88, 1218.
- Suzuki, C., Aoki-Yoshida, A., Aoki, R., Sasaki, K., Takayama, Y., and Mizumachi, K., 2017. The distinct effects of orally administered *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C59 on gene expression in the murine small intestine. PloS one, 12(12), e0188985.
- Sümengen, M., Dincer, S., and Kaya, A., 2012. Phytase production from *Lactobacillus brevis*. Turkish Journal of Biology, 36(5), 533-541.
- Tarakçıoğlu, S., 2016. Erzurum Ilıca Kaplıcalarından Alınan Su Örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve *Bacillus Thermoamylovorans* ST-10 İzolatından Lipaz Enziminin Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü Atatürk Üniversitesi.
- Tekinşen OC., Atasever M., 1994. Süt Ürünleri Üretiminde Starter Kültür, S.Ü. Vet. Fak. Yayın Ünitesi, Konya.
- Temiz, A., 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
- Terzaghi, B. E., and Sandine, W. E., 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Applied microbiology, 29(6), 807-813.
- Tokalak, İ. 2011. Küreselleşme Kısakında Türk Tarımı. Türk Tarımının Sorunları, Çözüm Önerileri ve Yatırım Fırsatları. Gülerboy Yayıncılık, 479.
- Tunail N., 2009. Mikrobiyoloji. Pelin Ofset, 448, Ankara.
- Vieira, F. D. N., Jatobá, A., Mourinho, J. L. P., Vieira, E. A., Soares, M., Silva, B. C. D., and Vinatea, L. A., 2013. In vitro selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 48(8), 998-1004.
- Vohra, A. and T. Satyanarayana., 2003. Phytases: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. Critical Reviews in Biotechnology, 23(1): 29-60.
- Vos, W. M., Simons, G. F. M., 1994. Lactic Acid Bacteria Genetiği ve Biyoteknolojisi. der. Gasson, MJ de Vos, WC Gen Klonlama ve

- Laktokoklarda Ekspresyon Sistemleri. Blackie Akademik ve Profesyonel, s 52 - 53.
- Wessels, S., Axelsson, L., Hansen, E. B., De Vuyst, L., Laulund, S., L  htenm  ki, L., and von Wright, A., 2004. The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends in food science and technology*, 15(10), 498-505.
- Wiseman, A., 1987. *Handbook of Enzymes Biotechnology*. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry p. 274-373.
- Wyszyn  ska, A., Kobierecka, P., Bardowski, J., Jagusztyn-Krynicka, E.K., 2015. Lactic acid bacteria 20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:2967–2977.doi:10.1007/s00253-015-6498-0
- Yonejima, Y., Hisa, K., Kawaguchi, M., Ashitani, H., Koyama, T., Usamikrank, Y., and Ogawa, J., 2015. Lactic acid bacteria-containing chocolate as a practical probiotic product with increased acid tolerance. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 773-777.
- Y  ksekda  , Z.N., Beyatlı, Y., 2003. Kefir Mikroflorası ile Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik, Antimikrobiyal ve Genetik   zellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 01 (02), 49 69.
- Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B., Swings, J., De Vuyst, L. 2006. Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic and Applied Microbiology*, 29:487–495.
- Zamudio, M., Gonzales, A., and Medina, J.A., 2001. *Lactobacillus plantarum* phytase activity is due to non-specific acid phosphatase. *Letters in Applied Microbiology*, 32, 181-184.
- Zeman, N.W., and McCrea, J.M., 1985. Alpha-amylase Production Using a Recombinant DNA Organism. *Cereal Foods World*. 30(1) : 777-780.
- Zhang G.Q., Wu Y.Y., Ng B.T., Chen Q.J., Wang H.X., 2013. A,Phytase Characterized by Relatively High pH Tolerance and Thermostability from the Shiitake Mushroom *Lentinus edodes*, *Biomed Research International*.
- Zuo, R., Chang, J., Oingqiang, Y., Chen, L., Chen, Q., Yang, X., Zheng, Q., Ren, G., Feng, H., 2010. Phytase gene expression in *Lactobacillus* and analysis of its Biochemical characteristics. *Microbiological Research* 165, 329-335.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı: Merve

Soyadı: KIZILKAYA

Doğum Tarihi: 10.05.1993

Doğum Yeri: Tortum/Erzurum

Medeni Hali: Bekar

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lise : Yıldızkent İMKB Anadolu Lisesi (2007)

Lisans : Atatürk Üniversitesi
Ziraat Fakültesi (2011-2015)

Yüksek Lisans: Atatürk Üniversitesi
Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü (2015-2017)

İŞ TECRÜBESİ

Su Arıtma Tesisleri (2014) – Stajyer – Erzurum