

**Doğal Turulardan İzole Edilen *Lactobacillus plantarum* Suçlarının İzolasyonu ve Tanımlanması\***Yusuf ALAN<sup>1</sup>, Metin DIŞAK<sup>2</sup><sup>1</sup>Muğla Sıhhiye Fakültesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Muğla<sup>2</sup>KSÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kahramanmaraş

Geliş Tarihi (Received) : 16.02.2012

Kabul Tarihi (Accepted) : 19.07.2012

**Özet:** Bu çalışmada doğal olarak hazırlanmış turu örneklerinden izole edilen *Lactobacillus plantarum* izolatlarının kimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanmaları yapılmıştır. Kimyasal tanımlama gram boyama, koloni morfolojisi ve katalaz testi ile belirlenmiştir. İzole edilen laktik asit bakterilerinin moleküler tanımlanması için *recA* gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile gerçekleştirilmiştir. *recA* primerleri ile gerçekleştirilen PZR işlemi sonucunda *L. plantarum* izolatlarından 318 bp uzunluğunda ürün elde edilmiştir. İzolasyon ve tanımlama sonucunda örneklerden 22 adet *L. plantarum* izolatı tespit edilmiş ve izolatlar potansiyel bağılçık kültürü kullanım imkanlarının araştırılması ve genetik içeriklerinin belirlenmesi amacıyla stoklanmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Laktik asit bakterileri, starter kültür, turu, *L. plantarum*, moleküler tanımlama.

**Isolation of *Lactobacillus plantarum* from Naturally Pickles and Their Isolation and Identification**

**Abstract:** *Lactobacillus plantarum* species isolated from naturally prepared pickles samples. Isolates were identified using both chemical and molecular methods. Chemical identification was made by gram staining, colony morphology and catalase test. Molecular identification was made by Polymerase Chain Reaction method using different Lactic acid bacteria for specialized primers. For the *recA* gene region of *L. plantarum* 318 bp fragments were amplified. Twenty-two *L. plantarum* isolates were obtained at the end of the isolation and identification. Isolated samples are stored in order to determine starter culture possibilities and genetic contents.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, starter culture, pickles, *L. plantarum*, molecular identification

**GİRİŞ**

Turu üretimi ülkemizde önceleri ev ölçekte iken daha sonra ticari amaçla üretilmeye başlanmıştır. Bugün ülkemiz dünyada önemli bir turu üreticisidir (Aktan ve ark., 1998). Turu genellikle yemeklerin yanında iştah açıcı olarak tüketilen, dejenere salata ve kanepelerin hazırlanmasında da sıklıkla kullanılan bir üründür. Laktik asit fermentasyonu ile dayanıklılığının artmasının yanında, ürünün tat ve renk bakımından da kendine özgü özelliğini kazanması sağlanmaktadır (Aydın ve Akbağcı, 2001).

Fermente gıdaların üretilmesinde laktik asit bakterilerinin yaptığı fermentasyonlardan yararlanılmaktadır. Çeşitli laktik asit bakterileri (LAB) cinslerinden salata, süt, et ve sebze ürünlerinde ürün yapısını ve tadını geliştirmek amacıyla kullanılmaktadır. Laktik asit bakterileri, gıdaların stabilitesi ve besinsel değerlerini, gıda ürünlerinde patojenik gelişimi ve mikrobiyal bozulmayı önleyici etki göstermektedir. Son zamanlarda laktik asit bakterileri tohumun çimlenmesinde, arap, alkolsüz biralar için asitlenmiş sulu bira mayası üretiminde kullanılmaya başlanmıştır (Niku-Paavola ve ark., 1999).

Laktik asit bakterileri, gıda ürünlerinin besin değerine ve besinlerin biyolojik yolla korunmasına olumlu katkıda bulunmaları nedeniyle yüzyıllardır önemini koruyan mikroorganizmalardır. Laktik asit bakterilerinin çoğu; insan, hayvan ve bitkinin bulunduğu doğal ortamlarda bulunan, bu ortamlardan izole edilebilen, biyoteknolojik

çalışmalarda ve endüstriyel birçok alanda kullanılan, insan beslenmesinde ve sağlığında oldukça önemli mikrobiyal ajanlardır. Ayrıca, süt, et, balık, tahıl ve sebze gibi çoğu ham gıda maddelerinin fermentasyonla korunmasında, üretilen fermente gıda ve yemlerin organoleptik, reolojik ve besinsel değerine katkıda bulunmada aktif rol üstlendikleri belirtilmektedir (Kılıç, 2001; Furet ve ark., 2004; Leroy ve Vuyst, 2004).

Etchells ve ark. (1975), kontrollü fermentasyon koşullarında yaptıkları çalışmada, starter kültür olarak eklenen *L. plantarum* kültürünün ortama hakim olduğunu belirtmiştir. Fleming ve ark. (1975) ise, kontrollü fermentasyon koşullarında yaptıkları çalışmada, bu uygulamanın ticari salamura salatalıklarının stok kalitesini önemli ölçüde artırdığını bildirmiştir. Etchells ve ark., 1976, laktik asit bakterileri ile fermente salatalıkların sertlik, renk ve kokunun normal, iştah zararının oldukça az olduğunu ve yüksek kalitede salamura stokları elde edilmiştir.

*Lactobacillus* cinsinin genetik açıdan heterojen suçları olduğu, fiziksel ve biyokimyasal testlerle sınıflandırılması oldukça kompleks ve zordur (Collins ve ark., 1991).

*L. plantarum* suçlarının tanımlanması oldukça zordur, bunun nedeni ise *L. plantarum*'lar genotipik olarak kapalı ve fenotipik olarak *L. pentosus* ve *L. paraplantarum*'a büyük ölçüde benzerlik gösterdiğini belirtmiştir (Çuruk ve ark., 1996).

\*Bu makale Yüksek Lisans tez çalışmasından özetlenmiştir.

Sorumlu Yazar: Alan, Y., y.alan@alparslan.edu.tr

Abdelgadir ve ark. (2001), laktik asit bakterilerinin biyolojik sınıflandırılmasında öncelikle morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerin yapıldığını, taksonomik çalışmalarda ise genetik yöntemler ve filogenetik analizlerin son zamanlarda geliştiğini bildirmişlerdir.

Randazzo ve ark. (2004), Sicilya'nın farklı bölgelerinden toplanan domates fermente edilmiş zeytinlerdeki laktik asit bakterilerinin fenotipik ve genotipik özelliklerini araştırmışlardır. Biyokimyasal ve PZR gibi moleküler metodlarla 16S rRNA kullanılarak izolatların karakterizasyonunu yapmışlardır.

Bu çalışmada domates olarak üretilmiş turulardan laktik asit bakteri izolasyonu yapılarak biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanması yapılmıştır. İzolatların turu endüstrisinde kullanılabilme imkanlarının araştırılması amacıyla muhafaza edilmiştir.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Turu Örnekleri

Domates, biber, havuç, lahana ve salatalıklar iyice yıkanıp ayrı ayrı 5 lt pet şişelere konularak %5 tuz ve %5 sirke içeren sulu çözeltileri ilave edilmiştir. Hazırlanan karışımların olgunlaşması için 18-20°C arasında 20 gün boyunca fermente edilmiştir (Özçelik, 1998).

### İzolasyon

Turu örneklerinden 5'er gram tartularak 5 ml fizyolojik su içerisinde 3500 devir/dk. 2 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Oluşturulan süpernatant kısmından 1 ml alınarak 10 000 devir/dk. 30 sn süre ile tekrar santrifüj edilmiştir. Oluşturulan süpernatanttan 1 ml alınarak 10000 devir/dk. 15 dk. santrifüjlenmiştir. Süre sonunda tüp içerisinde kalan çökelti 1 ml fizyolojik su ile çözülerek 10<sup>-5</sup>'e kadar seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan laktik asit bakteri izolasyonu için MRS ve M17 katı besi ortamlarına ekimi yapılmıştır. Ekimi yapılan plaklar 30 ve 42 °C'de inkübe edilmiş ve süre sonunda oluşan üpheli laktik asit bakteri kolonileri alınıp tanımlama için -20°C'de stoklanmıştır (Mandel ve ark., 1970).

### Kimyasal Tanımlama

Turudan izole edilen laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında, izolatların biyokimyasal, fizyolojik (15- 45°C, % 4 NaCl'de gelişme vb.), morfolojik ve kültürel özellikleri incelenerek kolonilerin tanımlanması yapıldı (Gobbetti ve ark., 2005; Harrigan ve McCance, 1976).

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

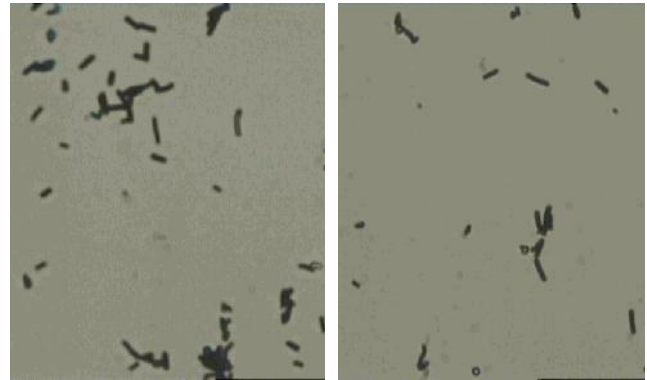
*L. plantarum* tanımlanması *recA* geninin amplifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada ileri primer olarak *recA* gen planF (5'-CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA-3') ve geri primer olarak pREV (5'-TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC-3') kullanılmıştır (Torriani ve ark., 2001). PZR amplifikasyonu 40 µl PZR

karışımında 20 ng genomik DNA, 1 U Taq DNA polimeraz, 0.25 mM dNTP karışımı, 0.2 µM ileri ve geri primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR için sıcaklık koşulları: 94 °C'de 4 dk ilk denatürasyonu takiben 40 döngü 94 °C'de 30 sn, 46 °C'de 30 sn ve 72 °C'de 30 sn olarak gerçekleştirilmiştir. PZR, 72 °C'de 5 dk bekletildikten sonra 4 °C'ye soğutulmuş ve saklanmıştır.

## BULGULAR ve TARTI MA

### Laktik Asit Bakteri İzolasyonu

Çalışmada hazırlanan turu örneklerinden toplam 40 adet bakteri izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen izolatların tanımlanması için gram boyama, katalaz, morfolojik özellikler, biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri test edilmiştir. Tanımlanması yapılan izolatlardan 40 tanesinin *Lactobacillus* cinsine ait olduğu tespit edilmiş ve Gram pozitif, katalaz negatif ve çubuk ekinde olan izolatlar moleküler tanımlama yapılmışa kadar -20°C'de saklanmıştır (ekil 1).



ekil 1. *L. plantarum*'a (5-36 nolu izolat) Ait Mikroskopik Görüntüler (10x100 büyütme).

Gardner ve ark. (2000), lahana ve havuç turu sularından 15 adet laktik asit bakterisi izole etmiş ve tanımlamışlardır. Laktik asit bakterileri depolanan yiyeceklerin daha iyi ve uzun süre muhafaza edilmesinde, bakteriler tarafından üretilen laktik asidin önemli etken olduğu belirtilmiştir.

Laktik asit bakterilerinin tanımlanmalarında geleneksel olarak kullanılan taksonomik sınıflandırmanın temeli, fizyolojik, morfolojik ve farklı sıcaklıklarda, pH değerlerinde, tuz konsantrasyonlarında gelişim, arjinin degradasyonu ve karbonhidrat katabolizması gibi metabolik/biyokimyasal özelliklerin incelenmesini içeren fenotipik özelliklere dayanmaktadır (Kandler ve Weiss, 1986; Gobbetti ve ark., 2005). Çalışmaya göre "gerçek laktik asit bakterileri" karbonhidrat fermentasyonu neticesinde son ürün olarak laktik asit oluşturulan, çubuk ya da kok ekinde, hareketsiz, spor oluşturmayan, katalaz negatif ve Gram-pozitif domates bir grup olduğu bildirilmektedir.

### Moleküler Tanımlama

zolatların moleküler tanımlamasında kullanılan *recA* geninin, yalnızca *L. plantarum* için özel olan 318 bp uzunluğundaki bölgeyi çoğalttı mı belirtmi lerdir (Spano ve ark., 2002). Çalı mada izole etti imiz *Lactobacillus* su larının moleküler olarak tanımlanması sonucunda, 22 izolatın *L. plantarum* oldu u tespit edildi ( ekil 2).

Singh ve Ramesh (2008) yaptıkları çalı mada, PZR metodu ile salatalıkların fermente olmasında büyük rol oynayan laktik asit bakterilerini belirlemi lerdir. Direk olarak uygulanan bu metodu iyi bir ekilde geli tirmi lerdir. PZR ile belirlenen *Leuconostoc* ve *Lactobacillus* su larının fermentasyonu kısa sürede gerçeğe tirdiklerini tespit etmi lerdir.

Farklı *Lactobacillus* türlerinin moleküler olarak te hisinde *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. paraplantarum* için *recA* geni bölgesini primerler moleküler olarak *L. plantarum* için 318 bp uzunluğundaki bölgeyi kopyalarken, *L. pentosus* için 218 bp, *L. paraplantarum* da ise bu gen 107 bp'lik bir bölgeyi kopyalamaktadır (Torriani ve ark., 2001).

Sánchez ve ark. (2005) yaptıkları çalı mada, 8 mandıradaki 18 spanyol keçi peynirinden laktik asit bakterilerini izole etmi lerdir. zole edilen 136 izolatı fenotipik ve DNA (RAPD-PZR) analiz yöntemiyle sınıflandırmı lardır. Bunların 10 tanesinin baskın ekilde *Lactobacillus paracasei* oldu unu belirlemi lerdir. Ayrıca, spanyol keçi peynirinde *L. curvatus*, *L. pentosus*, *L. cellobiosus* ve *L. rhamnosus* türlerinin olmadı nı, genetiksel farklılıkları yüksek olan *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. curvatus* ve *L. plantarum* türlerinin varlı nı tespit etmi lerdir.

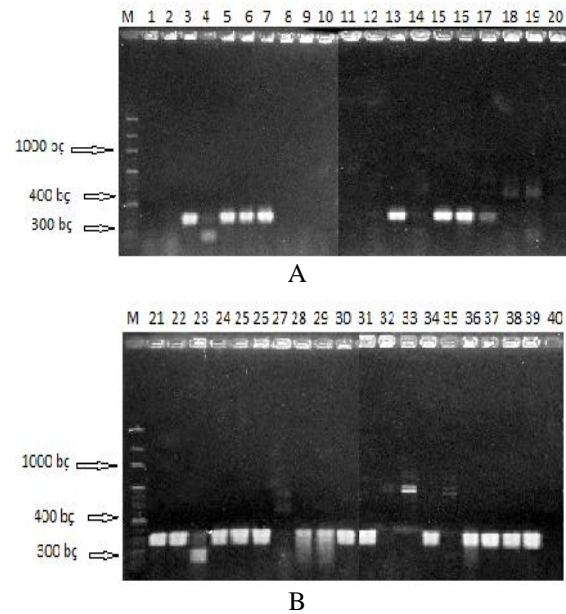
Essid ve ark. (2009), Tunus'un geleneksel olarak tuzlanmı etlerinde 17 adet *Lactobacillus plantarum* su unu izole ederek biyokimyasal ve moleküler metodlarla karakterizasyonunu yapmı lardır.

Ghotbi ve ark. (2011) yaptıkları çalı mada, *recA* gen dizisini kullanarak *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus paraplantarum* ve *Lactobacillus plantarum* ayırt etmeyi ba armı lardır. Amplikon boyutları *L. plantarum* için 318 bp, *L. pentosus* için 218 bp ve *L. paraplantarum* için 107 bp kullanmı lardır. Elde edilen sonuçlara göre laktobasil izolatlarının % 86'sını *L. pentosus* ve % 14'nü *L. plantarum* olarak sınıflandırmı lardır.

Pang ve ark. (2012), Tibet Platosunda yeti tirilen mısır, Hint goosegrass, korunga ve yoncadan yapılmı silajlardan 140 laktik asit bakteri (LAB) su u izole etmi lerdir. Bu izolatların fenotipik , kemo-taksonomik özelliklerine, 16S rDNA dizisine ve *recA* gen PCR metoduna göre be cins ve dokuz türe ait oldu unu belirlemi lerdir.

Bu çalı mada; ekil 2'de görüldü ü gibi 1'den 20' a kadar olan A grubundaki 3, 5, 6, 7, 13, 15, 16 ve 17 nolu izolatlar 318 bp uzunluğundaki bölgeyi kopyaladıklarından dolayı *L. plantarum* oldu u belirlenmi tir. Aynı ekilde 21-40 nolu izolatları gösteren B grubundaki 23, 27, 32, 33, 35 ve 40 no'lu

izolatlarda 318 bp uzunluğundaki bölgeyi kopyalamadıklarından dolayı *L. plantarum* olmadı ı tespit edilmi tir. *L. plantarum* olarak tespit edilen 22 izolatın, 318 bp uzunluğundaki bölgeyi kopyaladıkları görülmü tür.



ekil 2. Tur udan Elde Etti imiz zolatları *recA* geni Primeri Kullanılarak Elde Edilen Jel Görüntüleri

### SONUÇ

Sebze ve meyvelerin laktik asit fermentasyonu ile dayanıklı hale getirilmesi çe itli avantajlara sahip bir uygulamadır. Öncelikle, sebze ve meyveler fermentasyon tamamlandıktan sonra lezzet ve yapı bakımından ho a giden bir özellik kazanmaktadır. Olu an laktik asit sayesinde ürünün bozulması önlenerek besin de erinde önemli kayıplar olmadan uzun süre saklanabilmekte, içerdi i vitamin ve mineraller korunarak sindirilmesi güç olan maddeler kolay sindirilebilir hale gelmekte, ayrıca hastalık yapıcı mikroorganizmaların geli mi de engellenmektedir. Bunlara ilaveten, ürünün bol ve ucuz oldu u dönemlerde alınıp i lenmesiyle ekonomik bir kazanç da sa lanmaktadır. Fermentasyon esnasındaki fiziksel ve kimyasal faktörler ile tur u hammaddesinin özellikleri etkili olmaktadır. Tur uda bulunan *L. plantarum* ve di er mikroorganizmaların üretmi oldukları bakteriyosinlerden dolayı insan florasına zarar verici patojenlerin geli mesi engellenerek insan sa lı na katkıda bulunacaktır.

### KAYNAKLAR

- Abdelgadir, W.S., Hamad, S.H., Møller, P.L., Jakobsen, M. 2001. Characterization of the dominant microbiota of sudanese fermented milk rob. International Dairy Journal 11:63-70.
- Aktan, N., Yücel, U., Kalkan, H. 1998. Tur u Teknolojisi. Ege Üniv. Ege MYO. Yayınları No: 23. 132s.

- Caldwell, G., Champagne, A.C.P. 2000. Food Research and Development Center, Agriculture and Agri-Food Canada, 3600 Casavant Blvd W., Saint-Hyacinthe, Que., Canada J2S 8E3. *BioLacto*, Compton, Que., Canada.
- Collins, M.D., Rodrigues, U.M., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J.A.E., Martinez-Murcia, A., Phillips, B.A., Williams, A.M., Wallbanks, S. 1991. Phylogenetic Analysis of the Genus *Lactobacillus* and Related Lactic Acid Bacteria as Determined by Reverse Transcriptase Sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 77:5-12.
- Curk, M.C., Hubert, J.C., Bringel, F. 1996. *Lactobacillus paraplantarum* sp. nov., a new species related to *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46:595–598.
- Etchells, J.L., Bell, T.A., Fleming, H.P. 1975. Factors Influencing the Growth of Lactic Acid Bacteria During the Fermentation of Brined Cucumbers. J.G. Carr C.V. Whiting, Ed., *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*. Academic Press, New York. 281-305.
- Etchells, J.L., Bell, T.A., Fleming, H.P., Thompson, R.L. 1976. The Controlled Fermentation Process Compared with a Salt-Free Method for Preservation and Storage of Pickling Cucumbers. U.S. Food Fermentation Laboratory Publications Advisory Statements, 7s.
- Essid, I., Medini, M., Hassouna, M. 2009. Technological and Safety Properties of *Lactobacillus Plantarum* Strains Isolated from a Tunisian Traditional Salted Meat. *Meat Science*, 81(1): 203-208.
- Fleming, H.P., Thompson, R.L., Etchells, J.L., Bell, T.A. 1975. Purging of Carbon Dioxide From Cucumber Brine to Reduce Bloat Damage. *Journal of Food Science*. 40, 1304-1310.
- Furet, J-P., Quenee, P., Tailliez, P. 2004. Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *Int. Journal of Food Microbiology*. 97: 197-207.
- Ghotbi, M., Soleimani-Zad, S., Sheikh-Zeinoddin, M. 2011. Identification of *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus paraplantarum* and *Lactobacillus plantarum* in Lighvan cheese with 4 month ripening period by means of *recA* gene sequence analysis. *African Journal of Biotechnology*, 10(10): 1902-1906.
- Gobbetti, M., Angelis, M., Corsetti, A., Cagno, R. 2005. Biochemistry and Physiology of Sourdough Lactic Acid Bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 16:1-13.
- Harrigan, W.F., Mccance, M.E. 1976. *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. London, Academic Press, pp.66-81.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. 1994. Genus *Aeromonas*. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9. Edition. Williams. Baltimore, USA. Williams and Wilkins, pp. 190-191.
- Kandler, O., Weiss, N. 1986. Section 14. Regular Nonsporing Gram Positive Rods. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2: 1208-1234.
- Kılıç, S. 2001. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Yay. No: 542*, 421s.
- Leroy, F., De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15: 67-68.
- Mandel, M., Higa, A. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53: 159-162.
- Niku-Paavola, M.L., Laitila, A., Mattila Sandholm, T., Haikara, A. 1999. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* 86: 29-35.
- Özçelik, S. 1994. Gıda Mikrobiyolojisi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, Yayın No:6, Ders Kitapları No:6 Isparta, 206 s.
- Pang, H., Tan, Z., Qin, G., Wang, Y., Li, Z, Jin, Q., Cai, Y. 2012. Phenotypic and Phylogenetic Analysis of Lactic Acid Bacteria Isolated from Forage Crops and Grasses in the Tibetan Plateau. *Journal of Microbiology*, 50(1):63-71.
- Randazzo, C.L., Restuccia, C., Romano, A.D., Caggia, C. 2004. *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 1, 9-14.
- Sanchez, I., Seseña, S., Poveda, J.M., Cabezas, L., Palop, L. 2005. Phenotypic and genotypic characterization of lactobacilli isolated from Spanish goat cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 102(25):355-362.
- Singh, A.K., Ramesh, A. 2008. Succession of dominant and antagonistic lactic acid bacteria in fermented cucumber: Insights from a PCR-based approach. *Food Microbiology*, 25(2): 278-287.
- Spano, G., Beneduce, L., Tarantino, D., Zapparoli, G., Massa, S. 2002. Characterization of *Lactobacillus plantarum* from wine must by PCR species-specific and RAPD-PCR. *American Society for Microbiology* 67(8):3450–3454.
- Ahın, ., Akba, H. 2001. Hıyar Turularında Yumuamanın Önlenmesi ve Kullanılabilecek Kalsiyum Klorür (CaCl<sub>2</sub>) Miktarının Belirlenmesi. *Gıda*, 26 (5) : 333-338.
- Tabasco, T., Paarup, C., Janer, C., Peláez and T.R. 2007. Selective Enumeration and Identification of Mixed Cultures of *Streptococcus Thermophilus*, *Lactobacillus Delbrueckii* Subsp. *Bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *Paracasei* and *Bifidobacterium Lactis* in Fermented Milk, 1107–1114.
- Torriani, S., Felis, G.E., Dellaglio, F. 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene derived primers. *Applied and Environmental Microbiology* 67:3450–3454.