

Çeşitli Kaynaklardan Probiyotik Mikroorganizmaların İzolasyonu

Manar İsmailoğlu¹

Prof. Dr. Ülküye Dudu Gül^{2*}

¹ Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Bilecik, Türkiye

² Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Biyoproses Mühendisliği Anabilim Dalı, Bilecik, Türkiye

*E-mail: ulkuyedudu.gul@bilecik.edu.tr

Özet

Probiyotikler sağlık üzerinde olumlu etkileri olan ve sindirim sistemini düzenleyen canlı mikroorganizmalardır. Bu çalışmanın amacı; hurma, kuru incir, kayısı, yoğurt, sirke ve turşu gibi çeşitli gıda maddelerinde bulunan probiyotik mikroorganizmaların izole edilmesidir. İzolasyon için MRS (De Man, Rogosa ve Sharpe) agar ve broth besiyerleri kullanılmıştır. Örnekler, 37 °C'de 24-48 saat inkübe edilerek farklı morfolojilere sahip koloniler seçilmiş ve saf kültürler elde edilmiştir. Toplamda 10 izolat saf kültür elde edilmiş, bunların gram boyama ve katalaz testleri yapılmıştır. Sonuç olarak, 10 izolat içinde bir tanesi gram negatif diğer dokuz tanesi gram pozitif olarak saptanmıştır. Katalaz testi sonuçlarına göre, 10 izolatın sekizinin katalaz pozitif ve iki tanesinin de katalaz negatif olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada farklı gıda maddelerinden elde edilen probiyotik mikroorganizmalar saflaştırılarak bazı özellikleri belirlenmiştir. Daha ileri çalışmalarda moleküler yöntemlerle tanımlamalarının yapılması planlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Probiyotik; İzolasyon; Mikroorganizma.

Isolation of Probiotic Microorganisms from Different Sources

Manar İsmailoğlu¹

Prof. Dr. Ülküye Dudu Gül^{2*}

¹ Bilecik Şeyh Edebali University, Institute of Graduate Education, Department of Biotechnology, Bilecik, Turkey

² Bilecik Şeyh Edebali University, Faculty of Engineering, Department of Bioengineering, Bioprocess Engineering, Bilecik, Turkey

*E-mail: ulkuyedudu.gul@bilecik.edu.tr

Abstract

Probiotics are live microorganisms that have positive effects on health and regulate the digestive system. The aim of this study is to isolate probiotic microorganisms present in various food items such as dates, dried figs, apricots, yogurt, vinegar, and pickles. For isolation, MRS (De Man, Rogosa, and Sharpe) agar and broth media were used. The samples were incubated at 37 °C for 24-48 hours, colonies with different morphologies were selected, and pure cultures were obtained. A total of 10 isolates were purified as pure cultures, and gram staining and catalase tests were performed on them. As a result, among the 10 isolates, one was determined to be gram-negative, while the remaining nine were gram-positive. According to the catalase test results, eight of the isolates were catalase-positive, and two were catalase-negative. In this study, probiotic microorganisms obtained from various food items were purified, and some of their characteristics were determined. It is planned to perform molecular identification in further studies.

Keywords: Probiotic; Isolation; Microorganism.

1. GİRİŞ

Probiyotik ürünler bağırsak mikrobiyotasını dengelemek, hastalıklara karşı direnç sağlamak ve genel sağlığı iyileştirmek amacıyla günlük olarak tüketilen gıda katkı maddeleridir (Yıldırım & Tuncer, 2022). Probiyotikler insan bağırsaklarında özellikle patojen bakterilerin kolonizasyonunu engelleyerek, bağırsak sağlığının korunmasında önemli rol oynar. Ayrıca, patojen mikroorganizmaların büyümesini engelleyen inhibitör antimikrobiyal maddeler üreterek doğrudan antagonistik etki göstermektedirler (Kütük, 2015).

Probiyotikler, yalnızca sindirim sistemi sağlığını desteklemekle kalmaz, aynı zamanda bağışıklık sistemini güçlendirir, bazı alerjik reaksiyonları hafifletir ve cilt sağlığı üzerinde olumlu etkiler sunar. Özellikle bağışıklık sistemini iyileştirerek enfeksiyonlara karşı korunmaya katkıda bulunurlar. Son dönemlerde yapılan araştırmalar, probiyotiklerin ruh sağlığı üzerindeki olumlu etkilerini de vurgulamaktadır (Fijan, 2023).

Probiyotik olarak en yaygın kullanılan mikroorganizmalar arasında *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerine ait türler bulunmaktadır (Keskin ve ark., 2023). *Lactobacillus* cinsine ait türler, genellikle Gram-pozitif ve fakültatif anaerob bakterilerdir (Dempsey ve Corr, 2022). *Lactobacillus* türleri, 30-40°C aralığındaki optimal sıcaklıkta gelişmekte ve asidik ortamlara dayanıklılık göstererek pH 4.0-6.5 aralığında iyi bir büyüme göstermektedir (Koçak ve ark., 2016). *Bifidobacterium* cinsine ait türler ise Gram-pozitif ve anaerobik bakteriler olarak bilinmektedir (Pyclik ve ark. 2020). Optimal büyüme sıcaklıkları 36-38°C olup, pH 7'den düşük (yaklaşık 4.5-7.0) ortamlarında gelişim göstermektedir (Kütük, 2015). Probiyotik mikroorganizmaların düşük pH seviyelerine dayanıklılığı ve mide asidinde hayatta kalabilmesi, sindirim sistemi sağlığı açısından büyük bir avantaj sunmaktadır. Asidik ortamlara adaptasyonları, bu bakterilerin bağırsaklarda rekabetçi bir şekilde yerleşmesini ve patojen mikroorganizmaların çoğalmasını engellemesini mümkün kılmaktadır (Başdoğan & Şengün, 2022).

Patojen mikroorganizmaların çoğalmasını engelleme mekanizması probiyotiklerin bağırsaklardaki etkileşimleri ve işlevleri ile doğrudan ilişkilidir. Probiyotik mikroorganizmalar, bağırsak mikrobiyotasını dengeleyerek patojenlerin kolonizasyonunu önlemekte önemli bir rol oynamaktadır. Bu durum, probiyotiklerin patojen bakterilerin büyümesini inhibe eden antimikrobiyal bileşikler üretme yeteneği ile sağlanmaktadır. Ayrıca, probiyotikler bağırsak epiteline bağlanarak patojenlerin yapışmasını engellemekte olup, bu mikroorganizmaların bağırsaklara tutunarak, kolonizasyonu önlenmektedir. Bunun yanı sıra, probiyotiklerin oluşturduğu asidik ortam, patojen mikroorganizmaların büyüme koşullarını olumsuz yönde etkileyerek çoğalmalarını zorlaştırmaktadır (Doğan & Cebeci, 2021)

Probiyotikler, gıda endüstrisinde yaygın olarak fermente süt ürünleri, probiyotik yoğurtlar ve besin takviyelerinde bulunmaktadır. Bu ürünler, bağırsak sağlığını desteklemek için düzenli olarak tüketilmekte ve tüketici sağlığına olumlu katkılarda bulunmaktadır. Probiyotik içeren fonksiyonel gıdalar artan tüketici bilinci ile birlikte daha fazla talep görmekte ve sağlık açısından yararları nedeniyle önem kazanmaktadır (İspirli & Dertli, 2023).

Probiyotikler bağırsakta canlı kalabilen *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* ve *Enterococcus spp.* gibi bakterilerdir. Bu bakteriler, insan sindirim sisteminde doğal olarak bulunur ve temel olarak laktik asit bakterileri (LAB) grubuna aittir (Aladeboyeje, 2019). Bu çalışmanın amacı; yoğurt, turşu, sirke ve bazı kuru meyveler gibi besin maddelerinde bulunan probiyotik mikroorganizmaların izole edilerek, bazı özelliklerinin belirlenmesidir.

2. MATERYAL VE METOT

İzolasyon Çalışmaları

Bu çalışmada probiyotik mikroorganizmalarının izolasyonu için hurma, kuru incir, gün kurusu kayısı, hazır yoğurt, ev yoğurdu, ev sirkesi, ev yapımı turşu ve hazır turşu suyu gıda örnekleri kaynak olarak kullanılmıştır. İzolasyon çalışmalarında, bu kaynaklardan 1 gram örnek alıp steril ortamda steril serum fizyolojik tuzlu su kullanılarak homojenize edilip seyreltme işlemi yapılacaktır (Akbal ve Vural, 2018). Besin örnekleri MRS (De Man, Rogosa ve Sharpe) agar ve MRS broth besiyerlerine eklenmiştir. Örnekler içindeki probiyotik mikroorganizmalar besiyerlerinde inkübatörde 37 °C'de 24-48 saat inkübe edilerek geliştirilmiştir. Daha sonrasında petri yüzeyinde farklı morfolojilere sahip koloniler seçilerek arka arkaya ekimler yapılmıştır ve saf kültür mikroorganizmalar elde edilmiştir. Saf kültür olarak elde edilmiş izolatlar gram boyama ve katalaz testi uygulanmıştır (Pehlivan & Onuk, 2020).

Gram boyama

Petri üzerinde gelişen tek koloniden öze ile alınıp, 1 damla distile su damlatılmış lam üzerine sürülmüştür. Daha sonrasında oda sıcaklığında kuruması için beklenmiştir. Kuruyan örnekler alevden geçirilerek fikse edildikten sonra gram boyama prosedürüne göre boyanmıştır (Ayhan, 2021). Son olarak örnekler kurutma kağıdı ile kurulandıktan sonra üzerlerine lamel kapatılarak 4X, 10X ve 40X objektifte incelenmiştir. Mor renkli olan bakteriler Gram (+), pembe renkli olan bakteriler ise Gram (-) olarak değerlendirilmiştir (Kütük, 2015).

Katalaz testi

Katı besiyerinde gelişmiş örneklerden öze ile alınıp, lam üzerine sürüldükten sonra üzerine %3'lük hidrojen peroksit damlatılmıştır. Kabarcıkların görülmesi katalaz enziminin kimyasal olarak varlığına işaret etmektedir (Yurdakul ve ark., 2023).

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

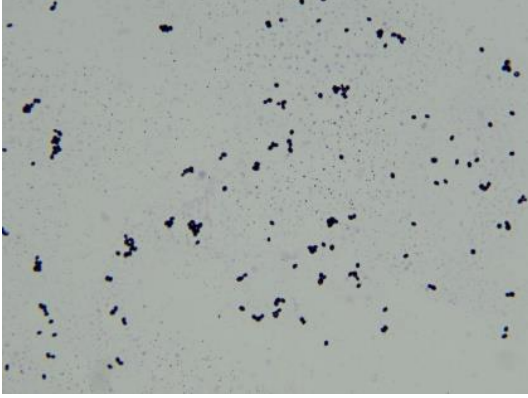
Bu çalışmada farklı gıda kaynaklarından alınan örneklerdeki probiyotik mikroorganizmalar izole edilmiştir. Onur ve Önlü (2021) yaptıkları çalışmada Muş ilinden temin edilen sucuk, inek peyniri, karışık sütlerden yapılan Muş kaşarı, inek sütünden yapılan Muş kaşarı ve manda peyniri numuneleri örnek olarak kullanılarak izolatlar saflaştırmıştır. Aynı çalışmada, gram boyama ve katalaz testi sonucunda 14 izolatın gram pozitif ve katalaz negatif olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada izole edilen 10 izolat içinde bir tanesi gram negatif diğer dokuz tanesi gram pozitif olarak belirlenmiştir (Tablo 1). Yapılan katalaz testi sonuçlarına göre, izolatların sekizinin katalaz pozitif olduğu görülmüştür. Diğer iki izolatın ise katalaz negatif olduğu tespit edilmiştir. İspirli ve Dertli (2023)

çalışmalarında, Türkiye'nin farklı illerinden toplanan 17 geleneksel turşu örneğinden 21 adet laktik asit suşu izole etmiş ve izolatların bazı özelliklerini belirlemiştir. Aladeboyeje (2019) çalışmasında, fermente geleneksel Türk içeceklerinden toplam 22 adet probiyotik özellikli izolat elde etmiştir. Aynı çalışmada, gram boyama ve katalaz testi sonucunda 8 izolatın gram pozitif ve katalaz negatif olduğu belirlenmiştir. *Lactotobacillus spp.* (Yakıt, 2019), *Bifidobacterium spp.* (Pyclik ve ark. 2020) ve *Enterococcus spp.* (Çiftçi ve Koçak, 2020) cinslerine ait türler gram pozitif ve katalaz negatif özelliktedir. Literatürdeki bu bilgiye göre bu çalışmada izole edilen izolat 3 ve 6 gram pozitif ve katalaz negatif olduğu için probiyotik olarak seçilmiştir.

Tablo 1. Farklı Gıda Örneklerinden İzole Edilen Mikroorganizmaların Test Sonuçları

Örnek No	Örnek Kaynağı	Mikroskop Görüntüsü (Şekil)	Gram Boyama Sonucu	Katalaz Test Sonucu
İzolat 1	Hurma (Marketten alınmış)	Kok	Pozitif	Pozitif
İzolat 2	Kuru incir (Marketten alınmış)	Kok	Negatif	Pozitif
İzolat 3	Gün kurusu kayısı (Marketten alınmış)	Kok	Pozitif	Negatif
İzolat 4	Hazır yoğurt	Basil	Pozitif	Pozitif
İzolat 5	Ev yoğurdu	Kok	Pozitif	Pozitif
İzolat 6	Ev yapımı elma sirkesi	Basil	Pozitif	Negatif
İzolat 7	Ev yapımı turşu suyu	Kok	Pozitif	Pozitif
İzolat 8	Hazır biber turşusu suyu	Kok	Pozitif	Pozitif
İzolat 9	Hazır salatalık turşusu suyu (izolat1)	Kok	Pozitif	Pozitif

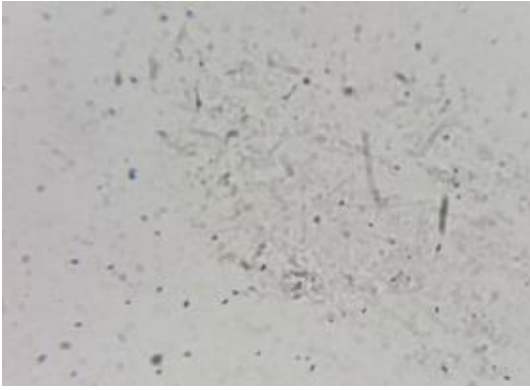
İzolat 10	Hazır salatalık turşusu suyu (izolat 2)	Basil	Pozitif	Pozitif
-----------	---	-------	---------	---------



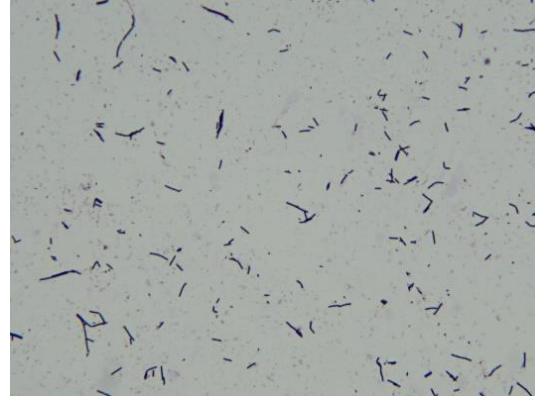
a



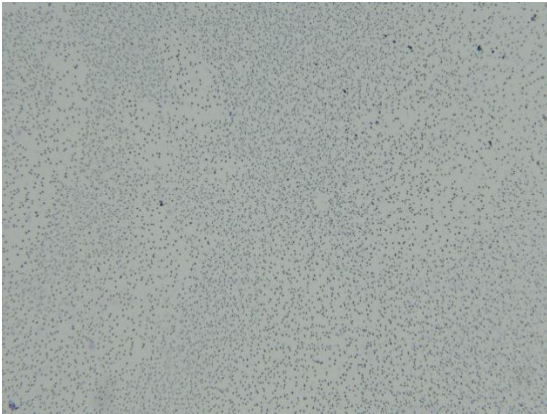
b



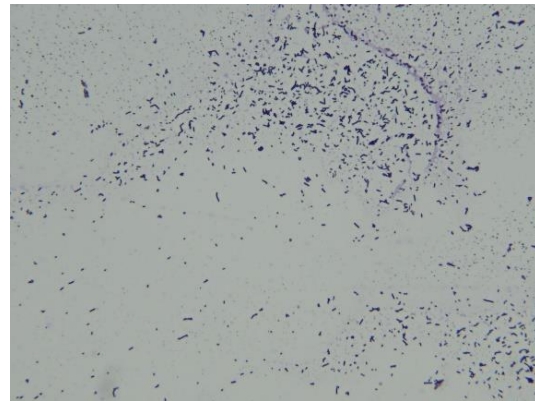
c



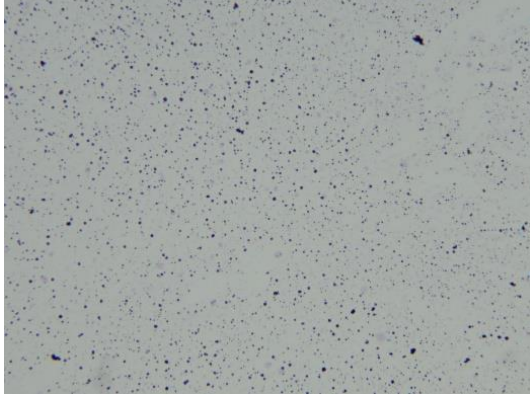
d



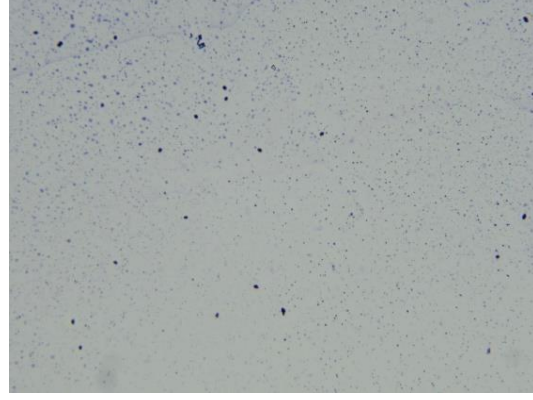
e



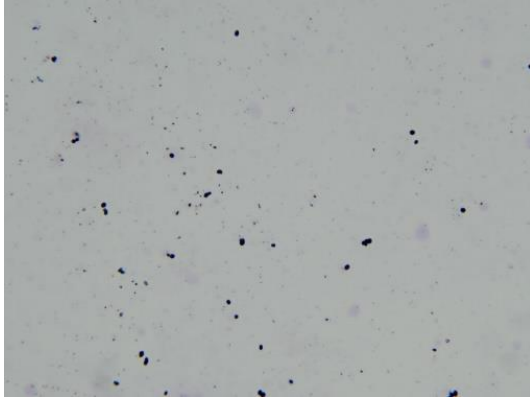
f



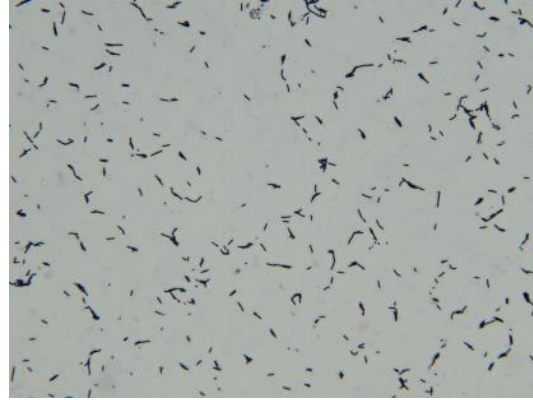
g



h



i



j

Şekil 1. Bu çalışmada elde edilen 10 izolatın Gram boyama ile elde edilen mikroskopik görünümü (Mikroskopta x40 görüntüsü) (a: izolat 1; b: izolat 2; c: izolat 3; d: izolat 4; e: izolat 5; f: izolat 6; g: izolat 7; h: izolat 8; i: izolat 9; j: izolat 10).

Bu çalışmada izole edilen 10 izolata ait mikroskopik görüntüler Şekil 1'de verilmiştir. Şekil 1'e göre izolatların üçü basil formunda, geri kalanları ise kok şeklinde gözlemlenmiştir. Testlerin sonuçları, izolatların morfolojik özellikleri açısından farklılıklar gösterdiğini ortaya koymaktadır. *Lactobacillus spp.*'nin morfolojisi basil şeklindedir (Yakıt, 2019), *Bifidobacterium spp.* çubuk şeklinde (Pyclik ve ark., 2020) ve *Enterococcus spp.* kok şeklindedir (Ayhan, 2021). Bu bilgilere dayanarak, bu çalışmada izole edilen kok şekilli, gram pozitif ve katalaz negatif özellikte olan izolat 3'ün *Enterococcus spp.*'ye, gram pozitif, katalaz negatif ve basil şeklinde olan izolat 6'nın ise *Lactobacillus spp.* veya *Bifidobacterium spp.*'ye ait türler olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışma sonuçlarının yanı sıra yapılması planlanan moleküler tanımlama sonuçlarına göre izolatların tür tanımlama süreçleri tamamlanmış olacaktır.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma farklı gıda kaynaklarındaki mikrobiyal izolatların morfolojik ve bazı biyokimyasal özelliklerini ortaya koymuştur. Çalışma kapsamında kullanılan hurma, kuru incir, gün kurusu kayısı, yoğurt, sirke ve turşu gibi gıda örneklerinden toplam on izolat saf kültür olarak elde edilmiştir. Bu on izolattan ikisinin probiyotik özellikteki cinslere ait olduğu düşünülmektedir. İlerideki çalışmalarda ise bu izolatların moleküler tanımlama yöntemleriyle cins veya tür bazında tanımlanması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

Akbal, N. & Vural, A. (2018). **Kurutulmuş Meyve Örneklerinde Mikrobiyolojik Kalite Özelliklerinin Araştırılması.** *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 11(2):93-97.

Aladeboyeje, O. T. (2019). **Türkiye'deki bazı geleneksel probiyotik içeceklerin antimikrobiyal etkisinin araştırılması.** Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Ayhan, Ş. (2021). **Aksaray'da üretilen tulum peynirlerinde Enterococcus cinsi bakterilerinin izolasyonu, PZR yöntemi ile tanımlanması ve antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi.** Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aksaray Üniversitesi.

Başdoğan, M. G. B., & Şengün, İ. Y. (2022). **Susuz lahana turşusundan izole edilen laktik asit bakterilerinin probiyotik potansiyeli.** *Biological Diversity and Conservation*, 15(1), 38-49.

Çiftci, A. & Koçak, Y. (2020). **Tavuk Kökenli Enterococcus faecium ve Lactobacillus Türlerinin Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması.** *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(3), 356-365.

Dempsey, E., & Corr, S. C. (2022). **Lactobacillus spp. for gastrointestinal health: Current and future perspectives.** *Frontiers in Immunology*, 13, 840245.

Doğan, O., & Cebeci, A. (2021). **Bazı geleneksel Türk gıdalarından laktik asit bakterilerinin izolasyonu.** *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 58(1), 87-95.

Fijan, S. (2023). **Probiotics and Their Antimicrobial Effect.** *Microorganisms*, 11(2), 528.

İspirli, H., & Dertli, E. (2023). **Geleneksel yollarla üretilmiş turşu örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanması ve bazı fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi.** *GIDA*, 48(2), 360-380.

Keskin, P., Kılıç Kanak, E. ve Öztürk Yılmaz, S. (2023). **Zeytin ve zeytinyağında bulunan mayalar, faydaları, probiyotik aktiviteleri ve etki mekanizmaları.** *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2683-2691.

Khushboo, Karnwal, A., & Malik, T. (2023). **Characterization and selection of probiotic lactic acid bacteria from different dietary sources for development of functional foods.** *Frontiers in Microbiology*, 14, 1170725.

Koçak, Y., Fındık, A., & Çiftçi, A. (2016). **Probiyotikler: Genel Özellikleri ve Güvenilirlikleri.** *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 27(2), 118-122.

Kütük, A. G. (2015). **Probiyotik olarak kullanılabilir bifidobakterilerin izolasyonu ve tanımlanması.** Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.

Onur, M., & Onlu, H. (2021). **Farklı Gıda Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi.** *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 32, 562-572.

Pehlivan, D., & Onuk, E. E. (2020). **Gökkuşuğu Alabalığı Bağırsaklarından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Lactococcus garvieae'ye Karşı Probiyotik Potansiyelinin in vitro Olarak Belirlenmesi.** *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Dergisi*, 5(4), 647-654.

Pyclik, M., Srutkova, D., Schwarzer, M., & Górska, S. (2020). **Bifidobacteria cell wall-derived exopolysaccharides, lipoteichoic acids, peptidoglycans, polar lipids, and proteins – Their chemical structure and biological attributes.** *International Journal of Biological Macromolecules*, 147, 333-349.

Yakıt, S. (2019). **Antimikrobiyel aktiviteye sahip laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve antimikrobiyel aktivitenin kısmi karakterizasyonu.** Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara

Yiğit, T. (2009). **Süt ve süt ürünlerinden probiyotik bakterilerinin izolasyonu ve tanımlanması.** Yüksek Lisans Tezi. Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

Yıldırım, N., & Özden Tuncer, B. (2022). **Antimikrobiyel aktiviteye sahip Pediococcus acidilactici ve Pediococcus pentosaceus suşlarının probiyotik özelliklerinin belirlenmesi.** *GIDA*, 47(3), 434-446.

Yurdakul, İ., & Ark., A. (2023). **Tüketilen bazı probiyotik preparatların içerdiği bakteri seviyelerinin belirlenerek PZR ile doğrulanması.** *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 12(1), 59-65.

Żukiewicz-Sobczak, W., Wróblewska, P., Adamczuk, P., & Silny, W. (2014). **Probiotic lactic acid bacteria and their potential in the prevention and treatment of allergic diseases.** *Central European Journal of Immunology*, 39(1), 104–108.