

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ KONUSU BİLDİRİM FORMU

Tarih: 31 / 08 / 2021

1. LİSANSÜSTÜ TEZ BİLGİLERİ

Anabilim Dalı	ZOOTEKNİ
Tez Programı (Yüksek Lisans / Doktora)	YÜKSEK LİSANS
Danışmanın Adı-Soyadı	Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN
Öğrencinin Adı-Soyadı	Merve AKSOY
Öğrencinin Numarası	2020911404
Teze Başlama Tarihi	Eylül 2021
Tezin Adı	Türkçe: Balarısı ve Balarısı Ürünlerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu
	İngilizce: Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Honeybee and Honeybee Products

2. TEZ ÖNERİSİNİN ÇUKUROVA TTO TARAFINDAN DEĞERLENDİRİLME BEYANI

Tez Önerisinin, Çukurova Teknoloji Transfer Ofisi (Çukurova TTO) tarafından, bilimsel araştırmalar neticesinde ortaya çıkan buluş ve yenilikçi ürünlerin ticarileşmesi; bunların toplumun, ülke ekonomisinin ve üniversitenin faydasına dönüştürülmesi amacıyla değerlendirmesini ~~onaylıyorum~~ / onaylamıyorum.

Not: Onay verilmesi durumunda Tez Program Özeti PDF formatında fenbilens@cu.edu.tr adresine gönderilmelidir.

Danışman Öğretim Üyesi

Adı-Soyadı:

İmza:

Öğrenci

Adı-Soyadı:

İmza:

3. ÇALIŞMANIN ÖNEMİ VE AMACI

Laktik asit bakterileri (LAB), gram pozitif, spor oluşturmayan, katalaz negatif, aerotolerant, karbonhidrat fermantasyonu sonucunda başlıca son ürün olarak laktik asit oluşturan mikroorganizmalardır. Taksonomik olarak Firmicetes şubesinin, Bacili takımının, *Lactobacillales* cinsine aittirler (Von Wright ve Axelsson, 2011). Laktik asit bakterilerinin en önemli cinsleri; *Bifidobacterium*, *Brevibacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, ve *Weissella*'dır. Bu bakteriler doğada yaygın olarak bulunmakta, aynı zamanda çeşitli fermente ürünlerin üretiminde başlatıcı kültür olarak kullanılmaktadırlar.

Lactobacillus'lar gram pozitif, katalaz negatif ve sporsuz mikroorganizmalardır. Belirli koşullar altında spiral veya kokobasil formlar oluşturabildikleri halde, genellikle düz çubuk şeklinde bir morfolojiye sahiptirler. Genellikle farklı uzunluktaki çiftler veya zincirlerde bulunurlar (Claverys ve ark., 2006). Genç bakteriler zincir oluşturmazlar. Optimum olarak 37-45 °C'de maksimum aktivite gösterirlerken, 70 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda canlılıklarını kaybederler.

Laktik asit bakterilerinin çoğu insan, hayvan ve bitki gibi doğal ortamlardan izole edilebilmekte ve gıda endüstrisinde önemli rol oynamaktadırlar. LAB'nin başlatıcı kültür olarak kullanılmasıyla fermente süt ürünleri, et ve bitki ürünleri ile fermantasyon sonucunda elde edilen aroma, tat ve tekstür açısından önem arz etmektedirler. Bu bakteri türlerinin bazılarının probiyotik oldukları belirlenmiş ve sağlık açısından birçok avantajlarının oldukları tespit edilmiştir (Kılıç, 2001; Gürsoy ve Kınık, 2005; Soomro ve Masud, 2007; Yüksekdağ ve Beyatlı, 2009). İnsanlarda hastalıklara neden olan patojen mikroorganizmalar üzerinde de ürettikleri bazı maddeler (bakteriosinler v.b.) nedeniyle antagonistik etkiye sahiptirler. Bu nedenle laktik asit bakterilerinin faaliyetiyle üretilen fermente gıdalar gıda zehirlenmeleri ve enfeksiyonları düşünüldüğünde insan sağlığı açısından güvenilir gıdalar olarak kabul edilebilir.

Lactobacillus kunkeei bakterileri fruktozu parçalayarak laktik asit üretiminde görev yaparlar. Laktik asit antibakteriyel ve antifungal özelliğinden dolayı koloni ortamında zararlı bakteri ve mantarların üremesine karşı olurlar. Bal arıları (*Apis mellifera*) sağlığının korunması için probiyotiklerin kullanılması konusunda en fazla ilgiyi *Lactobacillus kunkeei* görmüştür.

Lactobacillus kunkeei dış parazit olan ve arı sağlığına ciddi olumsuzluk yaratan Varroa'ya ve arılarda özellikle ilkbahar ve sonbaharda meydana geldiğinde ciddi kayıplara sebep olan *Nosema cerena*'ya karşı etkili olduğu; koloni ortamında sayılarını azalttığı çalışmalar ile bulunmuştur. Sağlıklı gelişen kolonilerde *Lactobacillus kunkeei* bakterileri yeteri kadar bulunmaktadırlar fakat tarımsal kirlilik, monokültür tarım uygulamaları, arıcılık alanında uygulanan bazı yanlış ürünler bu bakterilerin dengesini ve sayısını azaltması koloniyi salgınlara karşı açık hedef haline getirmektedir. Arılara probiyotik ile desteklemede *Lactobacillus kunkeei* bakterileri olması gereken bir bakteri türüdür.

Bu çalışmada bal arısı ve bal arısı ürünlerinden tercihen *Lactobacillus kunkeei* olmak üzere laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Tez çalışması kapsamında kullanılacak olan kimyasallar ve diğer sarf malzemeler, bu tez çalışması için üniversitemiz Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından sağlanacak olan proje desteği ile temin edilecektir. İzolasyonda kullanılacak olan bakteriler Çukurova ve çevresinde arı kolonilerinden ve/veya marketlerden temin edilecek olan arı ürünlerinden (bal, polen vb.) izole edilecektir. Bu tez çalışması kapsamında kullanılacak olan cihaz, alet ve ekipmanlar Ç.Ü.Z.F. Zootekni Bölümü Hayvansal Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Laboratuvarı'nda mevcut bulunmaktadır. İhtiyaç duyulması durumunda Ç.Ü. Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi imkanlarından da faydalanılacaktır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin toplanması

Bal arısı örnekleri farklı yetiştiricilerden ve her bir yetiştiriciye ati farklı kovanlardan rastgele olarak seçilerek alınacak ve %0.1 Pepton-NaCl çözeltisi içeren steril 20 ml'lik tüplerde laboratuvara getirilecektir. Bal arısı ürünleri ise farklı marketlerden ve farklı markalardan ürünler olacak şekilde seçilerek alınacak ve ambalajı açılmadan laboratuvara taşınacaktır. Toplanan numunelerden laktik asit bakterisi izolasyonu gerçekleşmemesi durumundan farklı yetiştiriciler, farklı kovanlar ve farklı markalardan örnekler toplanacaktır.

2.2.2. Bakterilerin İzolasyonu:

Yüze sterilizasyonundan sonra, arı örneklerinin bal mideleri steril bir şekilde çıkarılacak ve örnekler MRS agar üzerine yayılacaktır. Petri kapları 30-37 °C'de 24-48 saat inkübe edilecek, sonrasında saf kültürler koloni morfolojileri ve mikroskopik görünüm dikkate alınarak seçilecektir. İzolatlar %30-gliserol MRS broth içinde -20 °C'de saklanacaktır.

Balarısı ürünleri (arı poleni, arı balı) 10 gr tartılarak alınacak ve üzerine 40 ml peptonlu su (%0.1), ile dilüsyonları yapılacaktır. Sonrasında örnekler MRS agar + L-sistein besiyerine aktarılacak 37 °C'de 48 saat süreyle inkübe edilecektir. MRS besi yerinin içeriği Çizelge 1'de verilmiştir. İnkübasyon bitiminde besi yerinde üreyen bakteri kolonilerden seleksiyonlar yapıp, MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) Broth besi yerinde 37°C de 48 saat aktifleştirilecektir. Laktobasillusların izolasyon ve tüm probiyotik özelliklerinin araştırılmasında anaerobik jar kullanılacaktır (Diker, 2019).

Çizelge 1. MRS besiyerinin içeriği

Maddeler	g/L veya mL/L
Pepton	10,0 g
Beef Ekstraktı	8,0 g
Yeast Ekstraktı	4,0 g
Glukoz	20,0 g
Tween-80	1,0 mL
K ₂ HPO ₄	2,0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
MnO ₄ S · 4 H ₂ O	0,05 g
Amonyum Sitrata	2,0 g
Sodyum Asetat. 4 H ₂ O	5,0 g

Agar	15,0 g
L-sistein	0,5 gram

2.2.3. Laktik asit bakterilerinin tanımlanması

İzolatların tür tanımlanması 16S rDNA sekans karşılaştırması ve VITEC II kullanılarak yapılacaktır.

2.2.3. Laktobacillus kunkeei Bakterilerinin Muhafazası:

Bakteri izolatları, MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) Broth besiyerinde üst üste iki kez aktifleştirilecektir. Sonrasında aktif kütlülerden 900 µL alınıp, 2 mL' lik ağzı kapaklı 900 µL gliserol içeren steril cryo tüplere (1:1 v/v) ilave edilip, -80 °C'de muhafaza edilecektir.

5. ÇALIŞMA PLANI

Yapılacak İş	Aylar											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Balarısı ve balarısı örneklerinin toplanması	x											
Laktik asit bakterilerinin izolasyonu		x	x									
Biyokimyasal analizler				x	x							
İzolatların bazı enzim aktivitelerinin belirlenmesi						x						
İzolatların tür tanımlanması							x	x	x			
SDS-PAGE çalışmaları										x		
Tez yazımı ve sunumu											x	x

6. KAYNAKLAR

- Claverys, J.P., Prudhomme, M., and Martin, B. (2006) Induction of competence regulons as general stress responses in Gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* 60: 451– 475.
- Diker, E., 2019. Baldan izole edilen Lactobacillus cinsi bakterilerin bazı probiyotik özelliklerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Gürsoy O., Kınık Ö. (2005). Laktobasiller ve Probiyotik Peynir Üretiminde Kullanım Potansiyelleri. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 3, 11, 361-371.
- Kılıç S. 2001. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi*, Yayın no 542, 451 sayfa. İzmir.
- Soomro A.H., Masud T. (2007). Protein Pattern and Plasmid Profile of Lactic Acid Bacteria Isolated from Dahi, A Traditional Fermented Milk Product of Pakistan. *Food Technology and Biotechnology*, 45, 447-453.

Von Wright, A. and Axelsson, L. (2011) Lactic Acid Bacteria: An Introduction. In: Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S. and Von Wright, A., Eds., Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Fourth Edition. CRC Press, Boca Raton, 1-15.
<https://doi.org/10.1201/b11503>

Yüksekdağ Z.N., Beyatlı Y. (2009). Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Fizyolojik, Biyokimyasal, Plazmit DNA ve Protein Profil Özelliklerinin İncelenmesi. Gıda, 34, 2, 91-98.