

Şanlıurfa'da Satışa Sunulan Yoğurtlarda *Lactobacillus* spp.'lerin qPCR Miktarlarının Belirlenmesi

Akın Yiğın¹, Mehmet Demirci², Serap Kılıç Altun³, Atila Yoldaş⁴

¹ Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı Şanlıurfa

² İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

³ Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni Anabilim Dalı Şanlıurfa

⁴ Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Kahramanmaraş

Geliş Tarihi / Received: 19.08.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 23.09.2016

Özet: Yoğurt; geleneksel süt fermentasyonunda büyük bir rol oynayan ve probiyotik etkinlikleri olan bakterileri içermesi nedeniyle hayatımıza sağlık katan en önemli besin maddelerinden biridir. Günümüzde oldukça fazla tüketilen probiyotiklerin; yoğurtlardaki miktarlarının artması veya azalması ve mikrobiyolojik kalitelerinin tespiti halk sağlığı açısından irdelenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, Şanlıurfa ili ve çevre ilçelerinde satışa sunulan yoğurtlarda; probiyotik olarak önemi sıkça bildirilen *Lactobacillus* spp.'lerin (LAB) qPCR metodu ile tanımlanarak, kantitatif olarak miktar analizinin yapılması amaçlanmıştır. Yoğurt örneklerinden direk izolasyon ile elde edilen DNA'lardan *Lactobacillus* spp.'nin qPCR ile tespiti için; *Lactobacillus* spp. 16S-23S ribosomal RNA Intergenic Spacer Region (ISR) gen bölgesine spesifik primerler kullanılmıştır. Real-time PCR ile yapılan analizler sonucunda, 14 ile 32 aralığında Ct saptanmıştır ve kantitatif analizin hassasiyetini korumak için, miktarları belli plazmid standart kullanarak 10^2 ile 10^8 CFU/g arasında standart eğri elde edildi ve real-time PCR analizlerinde kantitasyon bu eğri ile gerçekleştirilmiştir. Bu sayede alt limit olarak 10^2 CFU/g gibi hassas bir alt limit belirlenmiştir. Sonuçlar, *Lactobacillus* spp. insan sağlığı açısından değerli, probiyotik bakterilerin, bölgemizde satışa sunulan ev yapımı yoğurtlarda daha düşük düzeyde bulunduğunu, bölgemizdeki bu yoğurtların, tüketime olgunlaşma süreci tamamlanmadan sunuluyor olabileceğini, bu ürünlerin üretim sürecinde dikkat edilmesi gerektiği tespit edilmiştir. Ayrıca sonuçlar, ülkemizde ilk kez klasik mikrobiyolojik yöntemler yerine, real-time PCR yönteminin insan sağlığı açısından probiyotik önemleri olan *Lactobacillus* spp.'lerin miktar analizlerinde hızlı, hassas ve güvenilir olarak tespiti için kullanılabilir bir yöntem olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Kantitasyon, *Lactobacillus* spp., real-time PCR, yoğurt

Quantification of *Lactobacillus* spp in Yoghurt Marketing by Quantitative Real-time PCR in Şanlıurfa Province

Abstract: It has already known that the health and biological effects of yoghurt is based on the bacteria with probiotic efficacy which are responsible for the traditional milk fermentation. Thus, any possible increase or decrease on the amount of such bacteria is very critical in terms of human health. While the importance of the probiotics consumption is rising crucially, the microbiological quality detection of the yoghurt based on the probiotics should be considered carefully regarding the public health. We aimed to quantify the *Lactobacillus* spp. (LAB), recently reported as an important probiotic on the DNA molecules directly isolated from handmade yoghurt products marketing by local people in Şanlıurfa province and nearby cities with qPCR method. For the identification of the *Lactobacillus* spp. (LAB) from the DNA molecules isolated from the yoghurt products, specific primers for *Lactobacillus* spp. 16S-23S ribosomal RNA Intergenic Spacer Region (ISR) were utilized. The Ct range of qPCR analysis were detected between 14-32. In order to maintain the sensitivity of the quantitative analysis, a standard curve was plotted between 10^2 and 10^8 CFU/g by using a specific plasmid standard series. Thus we managed to determine a sensitive threshold of 10^2 CFU/g. Our results indicated that the amount of such important probiotic bacteria as *Lactobacillus* spp. was at lower levels in handmade yoghurt products offered in our region. The main reason of these levels can be caused from the maturation process of the product. The factors which are crucial for the production period and method should be considered vigilantly. Furthermore; instead of traditional microbiological methods, a novel real-time PCR method was used in *Lactobacillus* spp. quantification that have important probiotic role with regards to public health. Additionally it is confirmed that this rapid, sensitive and robust method can be employed for the identification.

Key words: *Lactobacillus* spp., quantitation, real-time PCR, yoghurt.

Giriş

Lactobacillus cinsi üyeleri, düşük G+C içeriğine sahip, Gram pozitif, spor oluşturmeyen, hareketsiz, aerotolerant, fakültatif anaerob ve homofermentatif

bakterilerdir [14]. Bu bakteriler insanlar ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinin doğal florasında bulunmaktadır [6]. Ayrıca süt, et, meyve, sebze ve hububatların doğal florasında da bulunan *Lactobacillus* spp.'ler yüzyıllar boyunca gıda fermentasyon

işlemlerinde kullanılmaktadır [21]. Bazı türleri, süt ürünlerinde, gıda fermantasyon sürecini kontrol eden başlatıcı ya da yardımcı kültürler olarak bilinmektedir [1]. Son yıllarda, bu bakterilerin probiyotik özellikleri olduğuna inanılmasından dolayı, ticari olarak ürünlerde çok yoğun düzeyde kullanılmaktadırlar [10]. Probiyotik amaçlı en sık kullanılan türler ise *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei subsp. paracasei*, *L. delbrueckii* ve *L. johnsonii*'dir [20]. *L. rhamnosus*'da özellikle yeni tip yoğurtlarda bulunmaktadır [4]. Oluşturulan ticari ürünlerde kalitenin kontrolü ve üreticilerin uymaları gereken yerel ve Avrupa Sağlık Talep Yönetmeliği [3] gibi genel kurallar nedeniyle gıdalarda *Lactobacillus* spp.'lerin identifiye ve kantite edilmesine yönelik tanı araçlarının oluşturulmasına ihtiyaç doğurmuştur [15]. Ayrıca tür düzeyinde bu bakterilerin, genomik özellikleri temelli, hızlı ve güvenilir tanı araçları gereklidir [13].

Bu çalışmada, Şanlıurfa ili ve çevre ilçelerinden satışa sunulan yoğurtlardan direkt izolasyonla elde edilen DNA'larda, son yıllarda insan sağlığı açısından probiyotik olarak önemi sıkça bildirilen *Lactobacillus* spp.'lerin (LAB) qPCR metodu ile tanımlanarak, kantitatif olarak miktar analizinin yapılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Çalışmamızda Şanlıurfa ili ve çevresinde pazar ve marketlerde satışa sunulan 64 adet yoğurt numunesi steril numune kaplarına alınmış, laboratuvara soğuk zincir altında getirilen örnekler DNA izolasyon işlemine kadar -20°C'da saklanmıştır.

Metot

Standart bakteriyel kökenin plazmid oluşturulması için mikrobiyolojik olarak üretimi

Plazmid standart oluşturulmasında kullanılacak olan *L. paracasei* ATCC 25598 kökeninin üretimi

için selektif *Lactobacillus* Rogosa SL agar (pH 5,2; Difco, Detroit, USA) ve de Mann Rogosa Sharpe (MRS) agar (Difco, Detroit, USA) besiyerleri kullanıldı. Besiyerleri %10 CO₂ ortamda 37°C'da 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası Rogosa SL ve MRS besiyerlerindeki kolonilerin *Lactobacillus* spp. olduğunu konfirme etmek için Gram boyama, çomak morfolojisi ve katalaz reaksiyonu kontrol edildi. Bergey's Manual şeker fermantasyon şemalarına göre kontrolleri yapıldı [11].

DNA izolasyonu

Yoğurt numunelerinden direkt DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. 10 gr yoğurt numunesi 90 ml steril ¼ Ringer (Sigma, St. Louis, NO, USA) çözeltilisinde karıştırılır. Karışımın 200 µl'si DNA izolasyonu için kullanıldı [7]. DNA ekstraksiyonu DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak üretici direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi. Elde edilen DNA'ların konsantrasyonları, NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) spektrofotometri ile ölçüldü. qPCR işlemlerine kadar -20°C'da saklanmıştır.

Lactobacillus spp. primer dizaynı ve seçimi

Yoğurt örneklerinden elde edilen DNA'lardan *Lactobacillus* spp.'nin qPCR ile tespiti için; *Lactobacillus* spp. 16S-23S ribosomal RNA Intergenic Spacer Region (ISR) gen bölgesine spesifik Tablo 1'deki primer seti kullanıldı [16]. 16S-23S ribosomal RNA Intergenic Spacer Region (ISR) gen bölgesinin *Lactobacillus* spp. için spesifikliği NCBI primer blast tool ile (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) kontrol edildikten sonra, primerler, Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, USA) firmasından tedarik edildi. Real-time PCR çalışmalarında, primerlerin final konsantrasyonu 0,5 µM olacak şekilde dilüsyonları yapıldı.

Tablo 1. *Lactobacillus* spp. qPCR çalışmalarında kullanılan oligonukleotid primer dizileri

Primer	Oligonukleotid dizi	Bağlanma ısısı (°C)	Amplicon uzunluğu (bp)	Ref.
LactF	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	58	341	[16]
LactR	CACCGCTACACATGGAG			

Klonlama ve Plazmid standartlarının oluşturulması

Lactobacillus spp. spesifik primerinin çoğaltılması için, *L. paracasei* ATCC 25598'den elde edilen DNA fragmanları çoğaltıldı. DNA fragmanlarının çoğaltılabilmesi için PCR protokolü olarak her bir PCR tüpüne; 6.0 µl 25 mM MgCl₂, 10.0 µl 10× reaksiyon buffer'ı (MgCl₂ ihtiva etmeyen), 2.0 µl PCR dNTP miks (her birinden 10 mM), her bir primer'den 2.5 µl (LactF ve LactR, herbirinden 20 µM), 0.5 µl Taq DNA polimeraz (5 U/µl), 2.0 µl kalıp DNA ve 24.5 µl nukleaz içermeyen steril su ilave edildi. 50 µl'lik bu karışım Tablo 2'deki PCR aşamaları ile GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, California) PCR sisteminde çoğaltıldı.

Tablo 2. Plazmid standartın oluşturulmasında kullanılan PCR protokolü

Aşama	Siklus Sayısı	Isı ve Süre
Denatürasyon	1	95°C - 120 sn
Amplifikasyon	40	95°C - 60 sn
		55°C - 90 sn
		58°C - 90 sn
Soğuma	1	4°C - sonsuz

PCR sonrasında, PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde standart metotlarla [17] görüntülenip, ayrıldıktan sonra Wizard SV Gel ve PCR Clean Up kit (Promega, Madison, WI, USA) kullanılarak saflaştırıldı. Aradığımız bölgeyi ihtiva eden bu saf PCR ürünleri, pGEM-T vektör sistemi (pGEM-T vector System II; Promega, Madison, WI) kullanılarak, üretici direktifleri doğrultusunda klonlandı. Plazmid DNA'ları, MaxiPrep Plazmid DNA izolasyon kiti (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak üretici direktifleri doğrultusunda saflaştırıldı. Saflaştırılan plazmidlerin dilüsyonları NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) spektrofotometri ile ölçüldü. Kantitatif analiz için miktarları ölçülmüş plazmid standartlardan 10 katlık seri dilüsyonlar yapıldı. 10² ile 10⁸ kopya arasında plazmid içeren standart seri elde edildi.

qPCR ile *Lactobacillus* spp. çoğaltılması ve kantitasyonu

qPCR işlemleri, LightCycler 480 II real-time PCR sisteminde, LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kullanılarak üretici direktifleri doğrultusunda yapıldı. Çalışmalarda PCR total hacmi 20 µl olarak gerçekleştirildi. Her bir reaksiyona 50 ng kalıp DNA'dan 2 µl, 10 µl Sybr green master miks ve 2 µl primerlerden (final konsantrasyonu 0.5 µM) ilave edildi. Tablo 3'deki real-time PCR protokolü ile çalışma gerçekleştirildi.

Tablo 3. *Lactobacillus* spp. için kullanılan qPCR protokolü

Aşama	Siklus sayısı	Isı, süre ve okuma
Denatürasyon	1	95°C-300s - yok
Amplifikasyon	40	95°C-10s - yok
		58°C-15s - yok
		72°C-20s-tekli okuma
Melting	1 siklus	95°C-5 s - yok
		65°C-60s - yok
		97°C- sürekli okuma
Soğuma	1 siklus	40°C-30s - yok

Bulgular

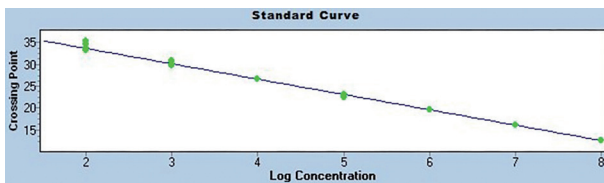
Çalışmamız sonucunda 64 yoğurt örneğinin tamamında *Lactobacillus* spp. qPCR ile tespit edilmiştir. Numunelerimizin ortalama log₁₀ CFU/gr konsantrasyonları ve standart sapmaları tablo 4 ve tablo 5'de görülmektedir. Şekil 1'de qPCR çalışmasında standartlarla oluşturulan eğrinin görüntüsü verilmiştir.

Tablo 4. qPCR ile yoğurt numunelerinde belirlenen *Lactobacillus* spp. ortalama miktarı (log₁₀CFU/gr)

<i>Lactobacillus</i> spp.	Ortalama	SD	Min.	Max.
log ₁₀ CFU/gr	6,38	0,44	5,68	7,10

Tablo 5. qPCR ile analiz edilen yoğurt numunelerinde belirlenen *Lactobacillus* spp. miktarı (CFU/gr ve log₁₀ CFU/gr)

Numune No	CFU/gr	Log ₁₀ CFU/gr	Numune No	CFU/gr	Log ₁₀ CFU/gr
1	8.016.400	6,90	33	494.000	5,69
2	12.450.000	7,10	34	503.000	5,70
3	1.320.000	6,12	35	718.000	5,86
4	4.038.900	6,61	36	623.000	5,79
5	1.018.000	6,01	37	499.000	5,70
6	7.800.000	6,89	38	696.000	5,84
7	9.960.000	7,00	39	1.201.000	6,08
8	9.420.000	6,97	40	582.000	5,76
9	5.370.000	6,73	41	8.016.400	6,90
10	7.280.000	6,86	42	12.450.000	7,10
11	2.300.000	6,36	43	1.320.000	6,12
12	3.620.000	6,56	44	4.038.900	6,61
13	7.170.000	6,86	45	1.018.000	6,01
14	3.200.000	6,51	46	7.800.000	6,89
15	5.120.000	6,71	47	9.960.000	7,00
16	1.150.000	6,06	48	9.420.000	6,97
17	2.460.000	6,39	49	5.370.000	6,73
18	490.000	5,69	50	7.280.000	6,86
19	484.000	5,68	51	2.300.000	6,36
20	2.490.000	6,40	52	3.620.000	6,56
21	7.450.000	6,87	53	7.170.000	6,86
22	1.820.000	6,26	54	3.200.000	6,51
23	1.540.000	6,19	55	5.120.000	6,71
24	2.480.000	6,39	56	1.150.000	6,06
25	990.000	6,00	57	2.460.000	6,39
26	985.000	5,99	58	490.000	5,69
27	3.200.000	6,51	59	484.000	5,68
28	984.000	5,99	60	2.490.000	6,40
29	982.000	5,99	61	7.450.000	6,87
30	10.590.000	7,02	62	1.820.000	6,26
31	1.074.000	6,03	63	1.540.000	6,19
32	961.000	5,98	64	2.480.000	6,39



Şekil 1. *Lactobacillus* spp. için plazmid standartlarla oluşturulan standart eğri

Tartışma ve Sonuç

Yoğurt; geleneksel süt fermentasyonunda büyük bir rol oynayan ve probiyotik etkinlikleri olan bakterileri içermesi nedeniyle hayatımıza sağlık katan önemli besin maddelerinden biridir. Günümüzde oldukça fazla tüketilen probiyotiklerin; yoğurtlardaki miktarlarının artması veya azalması ve mikrobiyo-

lojik kalitelerinin tespiti halk sağlığı açısından zorunlu bir durum oluşturmuştur.

Yoğurdun hayatımıza kattığı sağlığın ve biyolojik etkilerin içerdiği geleneksel süt fermentasyonundan sorumlu canlı probiyotik etkinlikleri olan bakterilerden geldiği bilinmektedir. Bu yüzden, bu bakterilerin miktarlarının artması veya azalması insan sağlığı açısından çok önemlidir. Yoğurtların probiyotikler açısından mikrobiyolojik kalitesinin tespiti, özellikle probiyotiklerin tüketimlerinin ve insan sağlığı açısından önemini gittikçe arttığı günümüzde halk sağlığı açısından irdelenmesi gerekmektedir.

Bu amaç doğrultusunda, ülkemizde yapılan çalışmalar incelendiğinde Keleş [12] yaptığı tez çalışmasında, Konya yöresinde ev yapımı yoğurtlarda LAB yükü ortalama $1,89 \times 10^8$ CFU/gr olarak tespit etmiştir. Demirkaya ve arkadaşları [2] yaptıkları çalışmada ise Bilecik ilinde tüketilen yoğurtlarda, LAB sayısını ortalama $5.08-7.98 \log_{10}$ CFU/gr olarak bildirmişlerdir. Sömer [19] yaptığı araştırmada, Afyon, Isparta, Aydın, Muğla ve Burdur illerinde satışa sunulan ev yapımı süzme yoğurtlarda LAB yükünün ortalama \pm standart hata (SH) değerini $7,11 (\log_{10}$ CFU/gr) minimum $5,25 (\log_{10}$ CFU/gr), maksimum $8,92 (\log_{10}$ CFU/gr) olarak belirlenmiştir. Ertaş ve ark.'nın [5] Kayseri ilinde satışa sunulan manda yoğurtları ile yaptıkları çalışmada *Lactobacillus spp.* (LAB) yükü ortalama \pm SH değerini $6,58 \pm 0,18 (\log_{10}$ CFU/gr) olarak bulmuşlardır. Minimum $4,30 (\log_{10}$ CFU/gr) maksimum $8,85 (\log_{10}$ CFU/gr)dir. Bu çalışmada Ertaş ve ark.'ı [5] LAB yükünün diğer çalışmalara göre daha düşük bulunmasını, ürünün satıştan önce uzun süre bekletildiği, taze olarak satışa sunulmadığı şeklinde yorumlamışlardır. Bizde çalışmamızda, LAB yükünü ortalama \pm SH değerini, $6,38 \pm 0,44 (\log_{10}$ CFU/gr), minimum $5,68 (\log_{10}$ CFU/gr), maksimum $7,10 (\log_{10}$ CFU/gr) olarak saptadık. Değerlerimiz, Ertaş ve ark [5] verilerine benzer görülürken, diğer çalışmalara göre verilerimizin daha düşük olduğu görülmektedir. Bunun nedenini, bölgemizde hazırlanan bu yoğurtların taze oluşu, bakteri yükü tam olgunlaşmadan ürünlerin çok hızlı tüketilme sunulması kaynaklı olabileceği, ayrıca yoğurt starter kültürlerinin hazırlanışı sırasında *Lactobacillus spp.* türleri yanında, *Streptococcus thermophilus* ağırlığının daha fazla olabileceğini ve geleneksel ev yapımı

yoğurt yapımında bu orana dikkat edilmiyor olabileceğini bize düşündürmüştür.

Uluslararası çalışmalar incelendiğinde, Furet ve ark. [6] real-time PCR ile yaptıkları kantitatif analizlerde ticari olarak fermente edilmiş süt ürünlerinde LAB yükünün ml'de 10^3 hücre olarak tespit etmişlerdir. Garcia ve ark [8] DGGE (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis) ile ticari yoğurtlarda yaptıkları çalışmada LAB bakterilerini yüksek bir yoğunlukta tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada bu yoğurtlardaki mikrobiyota yoğunlukları incelendiğinde taze yoğurtlarda, ısıl işlem görmüş yoğurtlara göre LAB'lerin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Kwao ve ark. [13] probiyotik ürünlerde yaptıkları çalışmada real-time PCR ile daha hızlı ve basit şekilde *Lactobacillus spp.*'nin tespit edilebileceğini göstermişlerdir. Udo ve ark [18] yaptıkları çalışmada LAB, hem kantitatif real-time PCR, hem de FLOW-FISH metodunu kullanmışlar ve iki metodunda hassasiyet yönünden benzer olduğunu, kantitatif real-time PCR'ın bakteri kolonilerinin değişikliklerini iki katı yüksek çözünürlükte belirleyebildiğini tespit etmişlerdir. Bunun yanında aynı çalışmacılar %100, %50, %29,4, %19,6, %15,1, ve %13,7 seri DNA dilüsyon miktarlarında, 18 ile 30 arasında Ct değeri saptadıkları çoğalma eğrileri elde etmişlerdir. Bizde çalışmamızda kantitatif analizin hassasiyetini korumak için miktarları belli, plazmid standartı kullandık. Hazırladığımız plasmid standartın, 10 katlık seri dilüsyonları yapılarak, 10^2 ile 10^8 CFU/g arasında değerleri olan standartlar ile eğri elde ettik. Bu kantitasyon standartlarımızdan 14 ile 32 aralığında Ct saptandı ve real-time PCR analizlerinde kantitasyon için elde edilen bu standart eğri kullanıldı. Bu sayede alt limit olarak 10^2 CFU/g gibi hassas bir alt limit belirlemeyi başardık. Real-time PCR ile yapılan optimizasyon çalışmalarında, bu yöntem ile bakterileri sırasıyla saf kültürde 10 CFU/ml, yapay olarak kontamine yoğurtlarda 10^3 CFU/ml ve pastörize meyve türevi ürünlerde ise 10^2 CFU/ml hassasiyette tespit edebildiklerini bildirilmiştir. Ayrıca bu metodun özgüllük ve hızının, güvenilirlik ve tekniğin duyarlılığının, gıda bakteri, mantar ve küf canlılığını değerlendirmekte rutin analiz olarak kullanılabileceğini vurgulamışlardır [9]. Herbel ve ark. [10] *Lactobacillus spp.*'lerin günlük kullanılan yoğurtlarda ki probiyotik etkilerini real-time PCR ile incelemişler ve heat shock protein 60 geni (hsp60)

ile sadece 5 *Lactobacillus* türünü tespit edebilecek bir dizayn yapmışlardır (*L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. reuteri*). Bu çalışmada direkt yoğurtlardan yaptıkları izolasyonla 10^5 CFU/ml'nin altında *Lactobacillus spp.*'leri tespit edilemeyi başarmışlardır. Bu çalışmalar bu yüzden bizim çalışmamız ile aslında benzerlik göstermektedir. Bu bakterilerin tespitinde real-time PCR yöntemi, hızlı, çok daha hassas ve güvenilir olması yanında, kültüre edilebilen *Lactobacillus spp.*'ler yanında, kültüre edilemeyen ve saptanamayan *Lactobacillus spp.*'lerinde saptanabilmesine imkan sağlaması nedeniyle önemli olduğu konusunda diğer çalışmalarını destekler bir tecrübe sağlanmıştı.

Sonuç olarak çalışmamızda elde ettiğimiz veriler; *Lactobacillus spp.* gibi insan sağlığı açısından değerli, probiyotik etkinlikleri bilinen bakterilerin, bölgemizde satışa sunulan ev yapımı yoğurtlarda daha düşük düzeyde olduğunu, bölgemizdeki bu yoğurtların, tüketime olgunlaşma süreci tamamlanmadan sunuluyor olabileceğini, veya üretim sürecinde dikkat edilmesi gereken hususların olabileceğini ve bunlara özen gösterilmesi gerektiğini bize düşündürmüştür. Ayrıca ülkemizde ilk kez klasik mikrobiyolojik yöntemler yerine, real-time PCR ile insan sağlığı açısından probiyotik önemleri olan *Lactobacillus spp.*'lerin miktar analizleri yapılarak, hızlı, hassas ve güvenilir olan bu yöntemin, tespit için kullanılabileceğini bize göstermiştir.

Kaynaklar

- Coeuret V, Dubernet S, Bernardeau, M, Gueguen M, Vernoux J.P, (2003). Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. Le Lait, INRA Editions. 83, 269-306.
- Demirkaya AK, Gökalp Z (2013). Bilecik'te Tüketim Sunulan Yoğurtların Kimyasal ve Mikrobiyolojik Kalitesinin Araştırılması. Atatürk Üniv Vet. Bil. Derg. 8(3), 202-209.
- EC (2007) Corrigendum to Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods (Official Journal of the European Union L 404 of 30 December 2006). Off J Eur Union L12, 3-18.
- Erdoğan Ö, Erbilir F, (2006). Isolation and Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from Various Foods. Turk J Biol. 30, 39-44.
- Ertas N, Serhat A, Karadal F, Gönülalan Z, (2014). Kayseri İlinde Satışa Sunulan Manda Yoğurtlarının Mikrobiyolojik Kalitesi. İstanbul Üniv Vet Fak Derg. 40 (1), 83-89.
- Furet JP, Quennee P, Tailliez PP, (2004). Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. Int J Food Microbiol. 97, 197-207.
- Galanis A, Kourkoutas Y, Tassou CC, Chorianopoulos N, (2015). Detection and Identification of Probiotic *Lactobacillus plantarum* Strains by Multiplex PCR Using RAPD-Derived Primers. Int J Mol Sci. 16(10), 25141-53.
- García-Albiach R, María J, Pozuelo D, Santiago A, María-Isabel M, Daniel B, Fernando B, Rosa C, (2008). Molecular analysis of yogurt containing *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in human intestinal microbiota. Am J Clin Nutr 87-91-6.
- Gianluca B, Lucia R, Franco D, Sandra T, (2003). Development of Reverse Transcription (RT)-PCR and Real-Time RT-PCR Assays for Rapid Detection and Quantification of Viable Yeasts and Molds Contaminating Yogurts and Pasteurized Food Products. Appl Environ Microbiol. Jul;69(7):4116-22.
- Herbel SR, Lauzat B, Von Nickisch-Roseneck M, Kuhn M, Murugaiyan J, Wieler LH, Guenther S, (2013). Species-specific quantification of probiotic lactobacilli in yogurt by quantitative real-time PCR. J Appl Microbiol. 115, (6) 1402-1410.
- Kandler O, Weiss N, (1984). Genus *Lactobacillus*, in: Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt JG, (Eds.), Bergey's Manual of Systematics Bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore M.D., USA, pp. 1209-1234.
- Keleş F, (2003). Konya yöresi taze ev yapımı yoğurtların mikrobiyolojik özelliklerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, SÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Kwon HS, Yang EH, Yeon SW, Kang BH, Kim TY, (2004). Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. FEMS Microbiol Lett, 239, 267-275.
- Maier S, Olek A, (2002). Diabetes: a candidate disease for efficient DNA methylation profiling. J Nutr 132, 2440-2443.
- Margolles A, Mayo B, Ruas-Madiedo P, (2009). Screening, identification, and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. In Handbook of probiotics and prebiotics ed. Nomoto, K., Salminen, S. and Lee, Y.K. p. 15. Hoboken, NJ: John, Wiley & Sons, Inc.
- Rintilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L, Palva A, (2004). Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. J Appl Microbiol. 97(6), 1166-77.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Udo F, Jan L, (2006). Improved Enumeration of Lactic Acid Bacteria in Mesophilic Dairy Starter Cultures by Using Multiplex Quantitative Real-Time PCR and Flow Cytometry-Fluorescence In Situ Hybridization. Appl Environ Microbiol., 72(6), 4163-4171
- Sömer VS, (2010). Dayanıklı Yoğurtların Mikrobiyolojik Fizikokimyasal Özelliklerinin ve Biyojen amin içeriklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, MAE Üniv. Fen bilimleri Enstitüsü, Burdur.
- 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. Syst Appl Microbiol, 29(6):487-95.
- Zhang ZG, Ye ZQ, Yu L, Shi P, (2011). Phylogenomic reconstruction of lactic acid bacteria: an update. BMC Evol B