

FOURIER DÖNÜŞÜMLÜ KIZILÖTESİ (FTIR) SPEKTROSKOPİSİ VE LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN TANISINDA KULLANILMASI

Gülden Başyığıt Kılıç^{1*}, Aynur Gül Karahan²

¹ Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Süt ve Ürünleri Teknolojisi Programı, Burdur

² Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi,
Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta

Geliş tarihi / *Received* : 08.06.2010

Düzeltilerek geliş tarihi / *Received in revised form* : 23.08.2010

Kabul tarihi / *Accepted* : 29.08.2010

Özet

Bu derlemede, FTIR (Fourier Transform Infrared) spektroskopisi ve laktik asit bakterilerinin (LAB) tanısında kullanımına yönelik bazı çalışmalara yer verilmiştir. FTIR spektroskopisinin temel prensibi ve organik maddelerin belirlenmesinde kullanılan orta infrared spektroskopisi açıklanmıştır. Bilimsel araştırmalar sonucu elde edilen bulguların değerlendirilmesinde yararlanılan çok değişkenli analiz yöntemleri kısaca anlatılmıştır. Bu temel bilgileri takiben FTIR spektroskopisinin farklı kullanım alanları, mikroorganizmaların ve LAB'nin tanısında yararlanma olanakları üzerinde durulmuştur. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, FTIR spektroskopisinin bakterilerin tanısında rutin olarak kullanılabileceği ortaya konmaktadır.

Anahtar kelimeler: FTIR, laktik asit bakterileri, parmak izi bölgesi

FOURIER TRANSFORM INFRARED (FTIR) SPECTROSCOPY AND ITS USAGE IN IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA

Abstract

In this review, FTIR (Fourier Transform Infrared) spectroscopy and some studies about use of FTIR for identification of lactic acid bacteria are described. The fundamental principles of FTIR and the mid-infrared spectroscopy used in determination of organic matters are explained. The multivariate analysis methods used for evaluation of the findings obtained by scientific researches are described briefly. Following this basic information, various applications of FTIR spectroscopy and its possible utilization in identification of microorganisms and LAB are reviewed. Previous studies indicated that FTIR spectroscopy can be used routinely in the identification of bacteria. Studies are examined, FTIR spectroscopy can be used routinely in the diagnosis of bacteria are exposed

Keywords: FTIR, lactic acid bacteria, fingerprint region

*Yazışmalardan sorumlu yazar: / *Corresponding author*;

✉ gklic@mehmetakif.edu.tr, ☎ (+90) 248 234 5600, 📠 (+90) 248 234 5604

GİRİŞ

Endüstriyel uygulamalarda LAB'nin tanısının yapılması, suşların genetik stabilitesinin izlenmesi, suşlar arası ilişkilerin belirlenebilmesi amacıyla kısa sürede sonuç verebilecek cihazlara veya yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Fourier Transform Infrared (FTIR) spektroskopisi bakterilerin incelenmesi amacıyla 1980'li yıllardan beri kullanılan fizikokimyasal bir yöntemdir. Bu yöntem, kızıl ötesi (IR) radyasyonun absorpsiyonu ile kimyasal bağların titreşiminin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Kızıl ötesi radyasyonu kimyasal bağların gerilme, büzülme ve bükülme gibi farklı titreşim hareketleri ile absorbe edilir. Kızıl ötesi bölgesinde kimyasal bağların titreşimindeki değişim ve absorpsiyon özellikleri spektral piklerin oluşmasını sağlar. Her fonksiyonel grup kendine özgü titreşim sıklığına sahiptir ve her kızıl ötesi ışık dizisi (spectrum) özgüdür. Bu sebeple çalışılan bakterinin kızıl ötesi ışık dizisi parmak izi olarak kabul edilir (1). Ancak elde edilen farklı mikroorganizmaların ışık dizileri arasındaki farklılığın ispatlanması için bilgisayar destekli istatistik uygulamalardan yararlanılması gerekmektedir.

Bu çalışmanın amacı, FTIR spektroskopisi ve bu yöntemin gıda alanında özellikle mikrobiyel analizlerde kullanımı üzerine yapılan çalışmalar hakkında bilgi vermektir. Derlemede, mikroorganizmaların tanısına yönelik olarak değinilen çalışmaların çoğu Fermantasyon Teknolojisi açısından önem taşıyan LAB'nin cins, tür ve hatta suş düzeyinde tanısı ve sayılarının belirlenmesine yöneliktir.

FTIR SPEKTROSKOPİSİ

FTIR'ın Tanımı

FTIR matematiksel Fourier dönüşümü yöntemi ile ışığın infrared yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen bir kimyasal analitik yöntemdir. Elektromanyetik ışık dizisinin kızıl ötesi bölgesi 14000 cm^{-1} ile 10 cm^{-1} arasındadır ve yakın dalga boylu kızıl ötesi (NIR; 4000~14000 cm^{-1}), orta dalga boylu kızıl ötesi (MIR; 400~4000 cm^{-1}) ve uzak dalga boylu kızıl ötesi (FIR; 4~400 cm^{-1}) olmak üzere üç ana bölgeden oluşmaktadır (2).

MIR bölgesindeki bantlar ile hücre duvarı bileşenleri, proteinler ve nükleik asitler gibi bakteri hücrelerinin toplam bileşenleri belirlenebilir (5).

Orta Infrared Bölgesi Absorpsiyon Işık Dizisi

MIR spektroskopisi kimyasal olarak belirgin ve tekrarlanabilir biyokimyasal parmak izlerini oluşturan organik bileşenlerin tanımlanmasını sağlar (4). Bir organik maddenin ışık dizisinde 3600–1200 cm^{-1} aralığına, 'fonksiyonel gruplar bölgesi' denir. İkinci bölge parmak izi bölgesi olarak tanımlanan 1200–700 cm^{-1} bölgesidir. Bu bölge, özellikle moleküldeki küçük yapısal ve bileşim değişikliklerini incelemekte kullanılır (2, 5, 6). Molekülün yapısında ve bileşiminde meydana gelen küçük değişiklikler, bu bölgedeki absorpsiyon piklerinin büyük ölçüde yer değiştirmesine neden olur. Bundan dolayı, bu bölgede iki ışık dizisinin çakışması, bu iki ışık dizisinin aynı maddeye ait olduğuna bir işarettir. Tek bağların çok büyük bir kısmı bu bölge veya aralıkta absorpsiyon bantları verir. Bölgenin oldukça dar olması nedeniyle, bu bölgedeki titreşim frekansları, enerjilerinin birbirine çok yakın olması sebebiyle birbirlerini çok etkiler. Bu nedenle, maddelerin ışık dizilerinde görülen absorpsiyon bantları kompozit bantlardır, yani sadece bir bağ frekansından ileri gelen saf bir absorpsiyon bandı değildir. Bu bölge ışık dizisinin en karmaşık kısmıdır ve ancak diğer bölgelerden elde edilen bilgiler de dikkate alınarak bir sonuç varılabilir (2, 7). Ayrıca madde miktarlarıyla orantılı olarak kızıl ötesi ışık dizisindeki bantların yoğunluğu değişmekte ve bu özellikten kantitatif analizde yararlanılmaktadır (5).

FTIR Işık Dizisinin Değerlendirilmesinde İstatistik Yöntemler

Bakterilerin FTIR ışık dizisini belirlemek kolay olmakla birlikte, sonuçların gözlemlerle değerlendirilmesi ve kıyaslanması yanıltıcı olmaktadır. Bu nedenle çalışmanın amacına bağlı olarak çeşitli istatistik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Bu yöntemler kontrollü ve denetimsiz olarak iki grup altında toplanmaktadır. Kontrollü yöntemler, mikroorganizmalara ait ışık dizileri arasındaki benzerlikleri göstererek, hakkında herhangi bir bilgi bulunmayan mikroorganizmanın tanımlanmasını sağlamaktadır. Bu amaçla hiyerarşik kümeleme analizi (HCA) (8, 9), temel bileşen analizi (PCA) (10, 11), uyum analizi (CA) (12) ve aritmetik ortalamaya dayalı ağırlıksız eşleştirme yöntemi (UPGMA) gibi yöntemlerden yararlanılmaktadır. Denetimsiz yöntemlerde ise önce her ışık dizisi belirli bir sınıfa dahil edilir, böylece kantitatif veriler kantitatif spektral verilere eklenir. Daha sonra elde edilen spektral verilerle oluşturulan sınıf arasın-

daki ilişkinin aydınlatılmasına çalışılır. FTIR ışık dizilerine göre bakterilerin tanısında; spektral benzerliğin karşılaştırılmasına dayalı Pearson ürün moment korelasyon katsayısı (1), kanonik korelasyon (13), doğrusal ayırma (14) yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Bu klasik yöntemlerin yanı sıra yapay zeka uygulamaları gibi kontrollü kendini eğiten farklı analiz yöntemleri de kullanılmaktadır (15, 16).

Kümeleme analizi; aynı grup içerisindeki nesnelere birbirine benzer veya ilişkili olmalarına, farklı gruptakilerin ise birbirinden farklı olması veya ilişkilerinin bulunmamasına göre kümelere ayırır. Bu analizde aynı gruptaki örneklerin birbirine benzeme oranı ya da farklı gruptaki örneklerin birbirinden farklı olma oranları kümelemenin ne kadar iyi olduğunun ya da kümelerin birbirlerinden ne kadar kesinlikle ayrıldıklarının göstergesidir. Regresyon analizi, bağımlı bir değişken ve bir ya da daha çok bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi düzenler. Adımsal tanımlama analizi ise, öncelikle kısmi korelasyon katsayısı en yüksek olan bağımsız değişkenden başlayarak değişkenlerin sırayla modele alındığı ve bazı anlamsız değişkenlerin modelden çıkarılarak, daha anlamlı bir model oluşturulmasına katkıda bulunan bir analiz yöntemidir (17-19).

FTIR'İN KULLANIM ALANLARI

Mikroorganizmaların titreşime dayalı spektroskopik yöntemlerle tanımlanmalarına artan bir ilgi vardır ve bu yöntemler kısa sürede güvenilir sonuçlar verdikleri için pek çok alanda kullanılmaktadır (14, 20, 21). W.W. Coblentz 1911'de biyolojik örneklerin analizinde kızıl ötesi spektroskopinin kullanılabilirliğini öne süren ilk bilim adamıdır (1). 1950'li ve 60'lı yıllarda mikroorganizmaların ayrılmasına yönelik çalışmalarda kızıl ötesi spektroskopisi kullanılmaya başlamıştır. Yaklaşık 20 yıllık bir duraklamadan sonra, modern kızıl ötesi yöntemleri, kullanımı kolay ve sınırsız veri girişine izin veren yüksek hızdaki bilgisayarlar, yeni geliştirilen çok değişkenli analiz teknikleri, faktör analizleri veya yapay sinir ağları gibi istatistik yöntemleri, araştırmaların tekrar bu alanda yoğunlaşmasını sağlamıştır (22). FTIR spektroskopisinin, gaz veya sıvı kromatografisi, kütle spektroskopisi gibi diğer analitik yöntemlere kıyasla daha başarılı olduğu ve endüstride çok iyi bir tanımlama aracı olarak kullanılabilirliği belirtilmiştir (23).

FTIR spektroskopisi ile çiğ sütte bulunan proteinler (24), β -laktoglobülinin yapısı (25) ve süt proteinlerinin ısı işlemlerle denatürasyonları (26), İsveç peynirinin farklı özelliklerinin tanımlanması (4, 27, 28), süt tozunda bulunan proteinlerin belirlenmesi (29), süt ürünlerinin nitrat ve nitrit düzeylerine göre sınıflandırılması (30) gibi pek çok araştırma bulunmaktadır. Gürdeniz ve ark. (31) FTIR spektroskopisi ile zeytinyağında yağışın belirlenmesine, Gerçekaslan ve ark. (32, 33) ekmekte bayatlama derecesinin ölçülmesine, Onsekizoğlu ve ark. (34) ise kuru kayıslarda kükürlü bileşenlerin varlığının belirlenmesine yönelik çalışmalar yapmıştır. Ayrıca dondurarak kurutulmuş laktozun kristalleştirilmesindeki ısasal geçişlerin incelenmesinde (35) ve antifungal metil selüloz filmlerin fiziksel özelliklerinin belirlenmesinde de FTIR'den yararlanılmıştır (36).

FTIR spektroskopisinin kullanıldığı bir diğer alan ise tıp bilimleridir. Hücrenin farklı biyomoleküler bileşenleri, yapısal ve işlevsel açılardan zengin, karakteristik kızıl ötesi ışık dizisi gösterirler (37). Bu nedenle, FTIR spektroskopisinin farklı kanser hücrelerinin tespitinde kullanılmasıyla ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (38).

FTIR ile Mikroorganizma Tanısı

FTIR spektroskopisinin mikroorganizmaların sınıflandırılmalarında, bakterilerin tanısında ve çeşitli özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmasıyla ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (15, 39, 40). Helm ve ark. (8) 14 türe ait 139 suşu tanımlamış ve *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Legionella* ve *Escherichia coli*'yi başarıyla ayırt etmiştir. Kirschner ve ark. (41) yaptıkları araştırmada antibiyotik dirençlerine göre *Enterococcus faecium* ve *S. aureus* suşlarını FTIR kullanarak gruplandırmıştır. Udelhoven ve ark. (42) *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* ve *Candida*'nın, Winder ve ark. (43) *Mycobacterium bovis*'in tanısında FTIR'ın başarıyla kullanılabilirliğini belirtmiştir.

Mikroorganizmaların analizinde FTIR spektroskopisinin kullanılmasının üstünlükleri şöyle özetlenebilir (1, 15, 44). Materyalin temel moleküler özelliği hakkında bilgi verir. Diğer yöntemlere göre daha hızlıdır ve uygulanması kolaydır. Örneğin taranması ve ışık dizisi analizleri 5 dakikadan daha kısa sürer ve maliyeti düşüktür. Oldukça az örneğe (ng- μ g düzeyinde) gereksinim vardır. Işık dizisinin yorumlanması için çok değişkenli istatistik analizleri kullanılmaktadır. Mikrobiyoloji alanında; bakteri kompozisyonu ve hücre bileşen-

lerinin belirlenmesi, taksonomik sınıflandırma, mikroorganizmaların miktarının belirlenmesi, proses kontrolü, mikrobiyolojik kalite kontrolü hakkında bilgi verir, epidemiyolojik çalışmalar ve hijyen kontrolünde kullanılabilir. Bu tekniğin sakıncaları ise; spektral analizlerin oldukça özgül bölgelere dayanması ve ortamda bulunan suyun bu bölgeleri baskılayabilmesidir. Verilerin kemotaksonomik sınıflandırılması için ön eğitim gereklidir. FTIR sadece kimyasal bağ bilgilerini tespit edebilir, elementleri veya N₂ gibi diatomik molekülleri tespit edemez. Farklı bileşenlerin spektral bölgeleri üst üste gelebilir, bu durum da sonuçların yanlış değerlendirilmesine sebep olabilir. FTIR cihazının etrafındaki atmosferik şartlar spektral sonuçları etkileyebilir. Çalışılan bakterinin saf olması gerekmektedir, karışık kültürlerden tanımlama yapmak oldukça zordur. Besiyeri, inkübasyon süresi ve inkübasyon sıcaklığı gibi etkenler ışık dizilerinde farklılıklara sebep olabilir.

Mikroorganizmaların ışık dizisi arasındaki farklılıkları belirleyen yöntemler, öncelikle bakteri şuşlarını veya gruplarını incelenen mikroorganizma hakkında ön bilgiye sahip olunmaksızın ayırt eder (45). FTIR spektroskopisi bütünlüğü bozulmamış bakteri hücrelerinin incelenmesi, farklı türlerdeki veya aynı türe ait mikroorganizmaların ayırt edilmesi (8, 12, 46) veya sadece belirli bakteri bileşenlerinin kıyaslanması amacıyla kullanılabilir (12, 47). FTIR ışık dizisinin orta dalga boylu kızıl ötesi bölgesi, tek bir şuşun karmaşık yapısını yansıtabilmesinden dolayı, bu bölgede bütünlüğü bozulmamış bakterilerin bileşenlerinin absorpsiyon özellikleri, bakterinin tanımlanmasını sağlayabilir (12). Bakterinin FTIR ışık dizisi, hücrede bulunan yağ asitleri, proteinler, polisakkaritler ve nükleik asitler gibi bütün bileşenlerin titreşim özellikleri tarafından belirlenir (23). Bakterilerin tanısı amacıyla kullanılan önemli spektral pencereler 5 ana gruba ayrılmıştır. Çizelge 1'de 5 spektral pencerenin dalga sayısı aralığı ve bu aralıkta belirlenen baskın bileşenler verilmiştir.

FTIR ile Laktik Asit Bakterilerinin Tanısı

Heterojen bir mikroorganizma grubu olan LAB'nin tanısı oldukça güçtür. Bunun nedenleri arasında zengin bir tür çeşitliliğine sahip olmaları ve türler arasında önemli ölçüde farklılıklar bulunması önemli yer tutmaktadır. Örneğin laktobasillerin bilinen 100'den fazla türü bulunmaktadır. Ayrıca *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Enterococcus*'un içerdiği çok yakın akraba olan türler nedeniyle de tanıda sorun yaşanmaktadır (48). Güvenilirlik ve patent almak gibi özel sebeplerin yanı sıra, LAB'nin gıda endüstrisinde fermentasyon işlemlerinde başlatıcı kültür olarak kullanılmaları ve sağlık üzerindeki etkilerine olan ilginin artmasıyla yeni izole edilmiş türlerin tanısının yapılması için güvenilir ve hızlı yöntemlerin kullanılması daha fazla önem kazanmıştır (49). Gıda endüstrisinde, ticari API test kitleri (bioMerieux, MO, USA) gibi fenotipik yöntemler LAB'nin tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin en önemli sakıncaları bilinmeyen bir bakteriye uygulandıklarında yanlış sonuç verebilmeleri ve zaman alıcı olmalarıdır. LAB'nin tür hatta şuş düzeyinde tanısı için farklı genetik parmak izi yöntemlerinden yararlanılmaktadır (3). Ayrıca gıdalar ve yemlerde tanısı yapılmış mikroorganizmaların probiyotik olarak kullanılmasının yanı sıra bu mikroorganizmaların sayısı da büyük önem taşımaktadır. Mikroorganizma sayılarının belirlenmesinde şuş tiplendirmeye yönelik Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD-PCR) ya da Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) gibi moleküler yöntemlerden yararlanılmaktadır, fakat bu yöntemlerin zahmetli olmaları ve uygulanmaları sırasında tecrübeye gereksinim duyulmasından dolayı endüstride kullanımları sınırlıdır (3, 48). Buna karşılık LAB'nin tanı ve sayım işlemlerini kolaylaştırma ve hızlandırma niteliğine sahip FTIR spektroskopisi ile yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmalar tek bir cinsin tanısına

Çizelge 1. Bakterilerin tanısı amacıyla kullanılan önemli spektral pencereler

Spektral pencere	Dalga sayısı aralığı/ cm ⁻¹	Baskın bileşenler
P1	3000–2800	Yağ asitleri
P2	1700–1500	Amid bölgesi; amid I ve amid II bantları (proteinler ve peptitler)
P3	1500–1200	Karma bölge; proteinlerin karboksilik grupları, serbest aminoasitler, polisakkaritler, yağ asitleri ve fosfat taşıyan bileşenler
	1250–1200	RNA/DNA, fosfolipitler
P4	1200–900	Polisakkarit bölge; hücre duvarında bulunan karbohidratların parmak izi benzeri absorpsiyon bantları
P5	<900	Doğru parmak izi bölgesi; bazı belirli spektral desenleri ifade eden, henüz tam tanımlanmamış hücre bileşenleri veya fonksiyonel gruplar

yönelebildiği gibi çeşitli gıda maddelerini de konu almaktadır. Ayrıca tanı amacıyla uygun spektral bölgenin belirlenmesi ve elde edilen değerlerin tanıda kullanılabilmesi için uygun istatistik yöntem seçimi üzerinde durulmuştur. Bazı çalışmalarda ise FTIR spektroskopisi ve genotipik tanı sonuçları kıyaslanmıştır.

Curk ve ark. (23) Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi ile laktobasillerin tanısı konusunda yaptıkları çalışmada P4-P5 (1200–900 ve <900), P3-P5 (1500–1200 ve <900) ve P3-P4 (1500–1200 ve 1200–900) bileşiminin iyi sonuçlar verdiğini belirtmiştir. Weinrichter ve ark. (50) ise *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. delbrückii* ve *L. helveticus*'un FTIR ile tanısı amacıyla, 2974–2857 ve 1800–1580 cm^{-1} aralığındaki iki spektral pencereye ait verileri kütüphanedeki verilerle kıyaslamıştır. Bu işlem sonucunda *plantarum* suşları %100, *L. rhamnosus* suşları %91 ve *L. casei* suşları ise %87 doğrulukla tespit edilmiştir. Ancak *L. casei* suşlarının %7'si *L. rhamnosus* olarak belirlenirken, diğer %6'sı teşhis edilememiştir.

L. acidophilus grubundan 7 farklı türe ait 102 suşun FTIR ile tanısı için ise 3000–2700 ve 1800–750 cm^{-1} aralığındaki bölgelerden yararlanılmıştır. Sonuçlar temel bileşen analizi ve doğrusal ayırma analizine (LDA) göre yorumlanmıştır. Seçilmiş dalga boylarında (LDA)'nın en güvenilir sonucu verdiği belirlenmiştir. Bu yöntemle *L. acidophilus* suşları %95, *L. amylovorus* %95, *L. crispatus* %69, *L. gallinarum* %100, *L. gasseri* %88, *L. helveticus* %100 ve *L. johnsonii* %91 doğrulukla tanılanmıştır. Bunun yanı sıra *L. gallinarum* ve *L. helveticus*'un birbirine çok uzak gruplar olduğu, *L. crispatus* ile *L. amylovorus* ve *L. gasseri* ile *L. johnsonii* arasındaki farklılığın belirlenmesinin ise çok zor olduğu belirtilmiştir (49). Oust ve ark. (3) ise yakın akraba laktobasil türleri olan *L. sakei*, *L. plantarum*, *L. curvatus* ve *L. paracasei*'nin tanısı amacıyla FTIR ile elde edilen verileri dört farklı çok değişkenli istatistik analiz ile değerlendirmiştir. HCA, kısmi en küçük kareler regresyon analizi (PLSR), sınıf analoji yumuşak bağımsız modelleme (SIMCA) ve K-en yakın komşu (KNN) analizlerinden HCA bakterilerin tanısında başarılı bulunmamıştır. Diğer 3 yöntemin laktobasillerin tür düzeyinde tanısına son derece uygun olduğu bildirilmiştir.

FTIR ile homofermentatif ve heterofermentatif laktobasillerin farkını belirlemeyi hedefleyen çalışmada ise kefir danelerinden izole edilen suşlar kullanılmıştır. Denemeler 12 adet referans suş ve biyokimyasal testlerle tür düzeyinde tanısı yapılmış

42 laktobasil izolatu ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ışık dizileri HCA ve Pearson ürün moment korelasyon katsayısı ve Ward algoritması ile analiz edilmiştir. Heterofermentatif laktobasillerden *L. kefir*, *L. parakefir* ve *L. brevis*'in tanısı için 1780–1750, 1500–1200, 2950–2930 ve 900–700 cm^{-1} pencerelerinden yararlanılmıştır. Çalışmada, gelişme sıcaklığı, süresi ve kullanılan besiyerinde meydana gelen ufak değişimlerin bile heterofermentatif laktobasillerin tür düzeyinde tanısını etkilediği belirlenmiştir. Homofermentatif laktobasiller *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. kefirgranum*, *L. kefiranofaciens* ve *L. casei*'nin tanısında ise 1230–900, 1777–1690, 1357–1240 ve 2960–2870 cm^{-1} spektral pencereleri kullanılmıştır. Elde edilen bulgular, klasik biyokimyasal yöntemlerle tür düzeyinde yapılan tanı ile uyum göstermiştir (51).

Laktobasillerin tanısına ilaveten diğer LAB'nin tanısının FTIR ile yapıldığı çalışmalar da bulunmaktadır. Amiel ve ark. (45) süt endüstrisinde kullanılan LAB'nin tanısını bu yöntemle gerçekleştirmiştir. Bu amaçla yumuşak peynir endüstrisinde kullanılan *Lactobacillus* (12 tür, 3 alttür), *Lactococcus* (4 tür, 3 alttür), *Leuconostoc* (3 tür, 3 alttür), *Weissella* (1 tür) ve *Streptococcus* (2 tür) hedef bakteriler olarak seçilmiştir. İstatistik analizle oluşturulan kütüphaneden bakterilere ait verilerin değerlendirilmesinde yararlanılmıştır. Cins ve tür düzeyinde tanı %100, alttür düzeyinde ise %86 doğrulukla başarılmıştır. İzolatların (48 adet) çalışma öncesinde biyokimyasal testler ve RAPD ile de tanısı konmuştur. FTIR ve diğer yöntemler arasındaki korelasyon cins düzeyinde %100, tür düzeyinde %69 bulunmuştur. Suşlara ait veriler farklı laboratuvarlarda da incelendiğinde tür düzeyinde tanı benzerliği %41'e düşmüştür. Bu bulgular nedeniyle araştırmacılar veri tabanının geliştirilmesi gerekliliği üzerinde durmuştur.

Lactobacillus, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediacoccus* ve *Streptococcus* suşlarını cins düzeyinde ve *Lactobacillus* suşlarını tür düzeyinde tanısı amacıyla yapılan diğer bir çalışmada ise elde edilen ışık dizileri, 1500 ışık dizisinden oluşturulmuş veri tabanı ile kıyaslanmıştır. Seçilen mikroorganizmaların tanısı için polisakarit bölge (1200–900 cm^{-1}) ve parmak izi bölgesinin (<900 cm^{-1}), karma bölge (1500–1200 cm^{-1}) ışık dizileri ve ilk türevleri ile beraber değerlendirilmesinin en doğru sonucu verdiği belirtilmiştir (22).

Başıyıt Kılıç (52) ise 21 adet *L. plantarum*, 15 adet *L. fermentum*, 25 adet *E. faecium* suşunun tanısı

nı 16S rDNA dizi analizi ve FTIR spektroskopisi ile gerçekleştirmiştir. 4000–450 cm^{-1} bölgelerinde gerçekleştirilen FTIR okumalarından sonra absorbans değerleri 4000-450, 3000-2700 ve 1600-800 cm^{-1} olmak üzere üç farklı gruba ayrılarak, varyans, kümeleme ve adımsal tanımlama analizi ile değerlendirilmiştir. Yapılan varyans analizleri genel olarak değerlendirildiğinde, 4000–450 cm^{-1} bölgesinde 1723–1711 cm^{-1} bölgesinin, 1600-800 cm^{-1} bölgesinde ise 878-872, 954-938, 1202-1188, 1488-1486, 1500-1498 cm^{-1} bölgelerinin üç grup bakterinin, absorbans değerleri ortalamasına göre istatistik önemle ayırt edildiği bölgeler olduğu ortaya konmuştur. Araştırma sonucunda, FTIR spektroskopisinin *L. plantarum*, *L. fermentum* ve *E. faecium*'un tanısında başarı ile kullanılabilceği bildirilmiştir.

FTIR ışık dizilerinin değerlendirilmesinde yapay sinir ağlarının daha başarılı sonuçlar verdiğini ileri süren çalışmalar da bulunmaktadır. Bu alandaki ilk çalışmada bir hastaneden izole edilen 19 LAB'nin önce klasik yöntemle *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Streptococcus bovis*, *S. mitis*, *S. pneumoniae* ve *S. pyogenes* olarak tanısı konmuş, daha sonra FTIR ışık dizisi elde edilmiştir. Işık dizisine ait verilerin PCA ile değerlendirilmesi sonucunda bakterilerin tanısında başarı sağlanamazken, yapay sinir ağları ile tam başarı sağlandığı ileri sürülmüştür. Bu nedenle FTIR ile bakteri tanısında yapay sinir ağlarının kullanılması önerilmiştir (53).

Daha sonra yapılan çeşitli araştırmalarda da yapay sinir ağları tanı sırasında ortaya çıkan karmaşık sorunların çözümünde ve mikroorganizmaların tür düzeyinde tanısında başarıyla kullanılmıştır. Bu konuda yayınlanan en son çalışmada da FTIR ve yapay sinir ağları birlikte kullanılmıştır. Dokuz cinsten 92 LAB'nin tür düzeyinde ve hayvan yemleri için katkı olarak kullanılan çevre ve probiyotik kökenli *Enterococcus faecium*'un suş düzeyinde tanısı yapılmıştır. Veri tabanından yararlanılarak, LAB'nin tür düzeyinde %93,2, *E. faecium*'un suş düzeyinde %97,1 doğrulukla tanısı yapılmıştır. *E. faecium*'un her suşu için 1450–700 cm^{-1} bölgesinde birbirinden farklı 10 ışık dizisi elde edilmiştir (48). FTIR spektroskopisi ile yapılan sınıflama taksonomik açıdan da değer taşımakta ve genotipik yöntemlerle elde edilen verilerin çoğunluğuyla uyum göstermektedir. Ancak bazı çalışmalarda FTIR spektroskopisi ile cins düzeyinde yapılan tanı, taksonomik açıdan anlamlı bulunmamıştır. Buna karşılık mikrobiyel türler arasındaki taksonomik veya evrimsel ilişkiler, DNA profilinden

elde edilen sonuçlarla da her zaman uyum içerisinde olmayabilmektedir (44).

Saf kültürlerin tanısına yönelik çalışmalara ilaveten karışım halindeki mikroorganizmaların oranlarını tespit etmek üzere de FTIR spektroskopisinden yararlanılmıştır. Gıda kökenli 2 maya türü (*Saccharomyces cerevisiae*/*Hanseniaspora uvarum*) ve 2 yoğurt bakterisi (*Lactobacillus acidophilus*/*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) üzerinde çalışılmıştır. Elde edilen bulgular değerlendirilerek, 2 farklı mikroorganizmanın karışımından oluşan sistemlerde hücre oranlarını tespit etmek açısından FTIR spektroskopisi hızlı bir yöntem olarak önerilmiştir (54).

SONUÇ

Bakterilerin FTIR spektroskopisi ile tanısında, tanıyı kolaylaştıracak farklı spektral pencereler bulmak, analiz edilen tür ve suşların sayısını artırarak daha güvenilir veri tabanları oluşturmak, daha doğru ve güvenilir sonuçlara ulaşılmasını sağlayacaktır. Okunan ışık dizisinin doğru olarak değerlendirilmesinde, çok değişkenli kemometrik yöntemlerin kullanılması önem kazanmaktadır. Yapay sinir ağları gibi çok daha güvenilir ve sağlıklı yöntemlerin kullanılmasının; ışık dizisine yapılan ön işlemlerde, ışık dizisi pencerelerinin seçilmesinde ve algoritmaların tanımlanmasında FTIR spektroskopisi kullanımının yaygınlaştıracağı düşünülmektedir. Ayrıca bakterilerin tanısında kullanılabilen hızlı ve ucuz bir yöntem olması, çalışma için besiyeri ve KBr dışında herhangi bir kimyasala ihtiyaç duyulmaması ve toksik bir atığın çıkmaması da bu yöntemin rutin olarak kullanımını teşvik eden özellikleridir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen 1268-D-06 No'lu projeden hazırlanmıştır. Desteklerinden dolayı SDÜ, BAP Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Naumann D, Helm D, Labischinski H, Giesbrecht P. 1991. The characterization of microorganisms by Fourier-transform infrared spectroscopy. In: Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis, Nelson WH (chief ed.) VCH, New York, pp. 43–96.

2. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. 1998. Principles of Instrumental Analysis. 5th Edition. Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H (çeviri ed) Bilim Yayıncılık, Ankara, s. 850.
3. Oust A, Møretø T, Kirschner C, Narvhus JA, Kohler A. 2004. FT-IR spectroscopy for identification of closely related lactobacilli. *J Microbiol Meth*, 59, 149–162.
4. Koca N, Rodriguez-Saona LE, Harper WJ, Alvarez VB. 2007. Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for monitoring short-chain free fatty acids in Swiss Cheese. *J Dairy Sci*, 90, 3596–3603.
5. De Voort FR. 1992. Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. *Food Res Int*, 25, 397–403.
6. Erkahveci A, Karaali A. 1996. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektroskopisinin gıda analizlerine uygulanması, *GIDA*, 21 (5):337-345.
7. Gündüz T. 2002. İnrümental Analiz. 6. Baskı, Gazi Kitabevi, Ankara, s. 1357.
8. Helm D, Labischinski H, Schallehn G, Naumann D. 1991. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Gen Microbiol*, 131, 69-79.
9. Handi J, Knowles J, Kell, DG. 2005. Computational cluster validation in post-genomic data analysis. *Bioinformatics*, 21 (15):3201–3212.
10. Al-Qadiri HM, Lin M, Al-Holy MA, Cavinato AG, Rasco BA. 2007. Monitoring quality loss of pasteurized skim milk using visible and short wavelength near-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *J Dairy Sci*, 91, 950–958.
11. Kansiz M, Heraud P, Wood B, Burden F, Beardall J, McNaughton D. 1999. Fourier transform infrared microspectroscopy and chemometrics as a tool for the discrimination of cyanobacterial strains. *Phytochemistry*, 52, 407–417.
12. Naumann D, Fijala V, Labischinski H, Giebrecht P. 1988. The rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using Fourier Transform infrared spectroscopic and multivariate statistical analysis. *J Mol Struct*, 174, 165–170.
13. Lefier D, Hirst D, Holt C, Williams AG. 1997. Effect of sampling procedure and strain variation in *Listeria monocytogenes* on the discrimination of species in the genus *Listeria* by Fourier transform infrared spectroscopy and canonical variates analysis. *Fems Microbiol Lett*, 147, 45–50.
14. Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, Ngo-Thi NA, van Vreeswijk T, Stammler M, Endtz HP, Bruining HA, Naumann D, Puppels GJ. 2003. Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *J Clin Microbiol*, 41 (1) ; 324–329.
15. Marley L, Signolle JP, Amiel C, Travert J. 2001. Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vib Spectrosc*, 26, 151– 159.
16. Jarvis RM, Goodacre R. 2005. Genetic algorithm optimization for pre-processing and variable selection of spectroscopic data. *Bioinformatics*, 21 (7); 860–868.
17. Orhunbilge N. 1996. Uygulamalı Regresyon ve Korelasyon Analizi, Avcıol Basım Yayın, İÜ İşletme Fak. Yayın No: 267, İstanbul.
18. Sharma S. 1996. Aplied Multivariate Techniques, U.S.A., John Wiley & Sons, Inc.
19. Yıldız N, Akbulut Ö, Bircan H. 2002. İstatistiğe Giriş. p. 247, Aktif Yayıncılık, İstanbul.
20. Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, van den Braak N, Endtz HP, Naumann D, Puppels GJ. 2002a. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *J Microbiol Meth*, 51 (3), 255–271.
21. Maquelin K, Choo-Smith LP, Kirschner C, Ngo-Thi NA, Naumann D, Puppels GJ. 2002b. Vibrational spectroscopic studies of microorganisms. In: Handbook of Vibrational Spectroscopy, Chalmers JM, Griffiths PR (eds.) Vol. 5, John Wiley & Sons, New York, pp. 3308–3334.
22. Dziuba B, Babuchowski A, Nalecz D, Niklewicz M. 2007. Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis. *Int Dairy J*, 17, 183–189.
23. Curk MC, Peladan F, Hubert JC. 1994. Fourier Transform infrared (FTIR) spectroscopy for identifying *Lactobacillus* species. *Fems Microbiol Lett*, 123, 241–248.
24. Etzion Y, Linker R, Cogan U, Shmulevich I. 2004. Determination of protein concentration in raw milk by Mid-Infrared Fourier Transform Infrared/Attenuated Total Reflectance Spectroscopy. *J Dairy Sci*, 87, 2779–2788.
25. Boye JI, Alli I, Ismail AA. 1996. Interactions involved in the gelation of bovine serum albumin. *J Agr Food Chem*, 44, 996-1004.
26. Parris N, Purcell JM, Ptashkin SM. 1991. Thermal denaturation of whey proteins in skim milk. *J Agr Food Chem*, 39, 2167.
27. Rodriguez-Saona LE, Koca N, Harper WJ, Alvarez VB, 2006. Rapid determination of Swiss cheese composition by fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy. *J Dairy Sci*, 89, 1407-1412.
28. Chen G, Kocaoglu-Vurma NA, Harper WJ, Rodriguez-Saona LE. 2009. Application of infrared microspectroscopy and multivariate analysis for monitoring the effect of adjunct cultures during Swiss cheese ripening. *J Dairy Sci*, 92, 3575–3584.
29. Kher A, Udabage P, McKinnon I, McNaughton D, Augustin MA. 2007. FTIR investigation of spray-dried milk protein concentrate powders. *Vib Spectrosc*, 44, 375–381.
30. Dıraman H, Özdemir D, Gündüz HH, Demirci M. 2009. Trakya bölgesinde üretilen çeşitli süt ürünlerinin nitrat ve nitrit düzeylerine göre kemometrik yöntemlerle sınıflandırılması. *GIDA*, 34 (6); 387-394.
31. Gürdeniz G, Tokatlı F, Özen B. 2008. Zeytinyağında Tağış Tespiti için Fourier-Dönüşümlü Kızıl Ötesi (FTIR) Spektroskopi Kullanımı. Türkiye 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs 2008, Erzurum, 33-36.

32. Gerçekaslan KE, Kotancılar HG, Karaoğlu MM. 2007. Ekmek bayatlaması ve bayatlama derecesini ölçmede kullanılan yöntemler – I. *GIDA*, 32 (6); 305-315.
33. Gerçekaslan KE, Kotancılar HG, Karaoğlu MM, Erтуgay MF. 2008. Ekmek bayatlaması ve bayatlama derecesini ölçmede kullanılan yöntemler-II *GIDA*, 33 (1); 27-34.
34. Onsekizoğlu P, Acar J, Gökmen V. 2008. Kuru kayıslarda akçıl sorununun nedenleri üzerine bir araştırma. Türkiye 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs 2008, Erzurum.
35. Yetişemiyen A, Eren SÖ. 2009. Laktoz kristalleşmesinin fizikokimyası. *GIDA*, 34 (4); 231-237.
36. Türe H, Eroğlu E, Soyer F, Özen B. 2008. Natamycin içeren antifungal metil selüloz filmlerin fiziksel özellikleri. Türkiye 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs 2008, Erzurum.
37. Mantsch HH, Chapman D. 1996. *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*. John Wiley & Sons, New York, pp. 159-202.
38. Lasch P, Naumann D. 1998. FT-IR microspectroscopic imaging of human carcinoma thin sections based on pattern recognition techniques. *Cell Mol Biol*, 44, 189-202.
39. Papadimitriou K, Boutou E, Zoumpopoulou G, Tarantilis PA, Polissiou M, Vorgias CE, Tsakalidou E. 2008. RNA Arbitrarily Primed PCR and Fourier Transform Infrared Spectroscopy reveal plasticity in the acid tolerance response of *Streptococcus macedonicus*. *Appl Environ Microb*, 74 (19); 6068-6076.
40. Wharfe ES, Winder CL, Jarvis RM, Goodacre R. 2010. Monitoring the effects of chiral pharmaceuticals on aquatic microorganisms by metabolic fingerprinting. *Appl Environ Microb*, 76 (7); 2075-2085.
41. Kirschner Cİ, Ngo Thi NA, Naumann D. 1999. *Spectroscopy of Biological Molecules In: New Directions*, Greve J, Puppels GJ, Otto C (eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 561.
42. Udelhoven T, Naumann D, Schmitt J. 2000. Development of a hierarchical classification system with artificial neural networks and FT-IR spectra for the identification of bacteria. *Appl Spectrosc*, 54, 1471-1479.
43. Winder CL, Gordon SV, Dale J, Hewinson RG, Goodacre R. 2006. Metabolic fingerprints of *Mycobacterium bovis* cluster with molecular type: implications for genotype-phenotypelinks. *Microb*, 152, 2757-2765.
44. Mouwen DJM, Weijtens MJB, Capita R, Alonso-Calleja C, Prieto M. 2005. Discrimination of enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR types of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Appl Environ Microb*, 71 (8), 4318-4324.
45. Amiel C, Mariey L, Curk-Daubie MC, Travert J. 2000. Potentiality of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) for discrimination and identification of dairy lactic acid bacteria. *Le Lait*, 80, 445-459.
46. Horbach I, Naumann D, Fehrenbach FJ. 1988. Simultaneous infections with different serogroups of *Legionella pneumophila* investigated by routine methods and Fourier Transform infrared spectroscopy. *J Clin Microbiol*, 26, 1106-1110.
47. Hedrick DB, Nivens DE, Stafford C, White DC. 1991. Rapid differentiation of archaeobacteria from eubacteria by diffuse reflectance Fourier-transform IR spectroscopic analysis of lipid preparations. *J Microbiol Meth*, 13, 67-73.
48. Wenning M, Büchl NR, Scherer S. 2010. Species and strain identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and artificial neural networks. *J Biophotonics*, 1-13.
49. Luginbühl W, Jimeno J, Zehntner U. 2006. Identification of seven species of the *Lactobacillus acidophilus* group by FT-IR spectroscopy. *LWT-Food Sci Technol*, 39, 152-158.
50. Weinrichter B, Luginbühl W, Rohm H, Jimeno J. 2001. Differentiation of Facultatively Heterofermentative *Lactobacilli* from Plants, Milk, and Hard Type Cheeses by SDS-PAGE, RAPD, FTIR, Energy Source Utilization and Autolysis Type. *Lebensm.-Wiss. u.-Technology*, 34, 556-566.
51. Bosch A, Serra D, Pietro C, Schmitt J, Naumann D, Yantorno O. 2006. Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy. *Appl Microbiol Biot*, 71, 736-747.
52. Başyiğit Kılıç G. 2009. Bazı laktobasil suşlarının genetik tanısının yapılması ve faj dirençliliklerinin belirlenmesi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, Isparta, Türkiye, 149 s.
53. Goodacre R, Timmins EM, Rooney PJ, Rowland JJ, Kell DB. 1996. Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks. *Fems Microbiol Lett*, 140, 233- 239.
54. Oberreuter H, Mertens F, Seiler H, Scherer S. 2000. Quantification of micro-organisms in binary mixed populations by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Lett Appl Microbiol*, 30 (1), 85-89.