

**FERMENTE ÜRÜNLERİNDEN İZOLE
EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
İZOLASYONU, TANIMLANMASI
VE ANTİMİKROBİYAL
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ş. YELDA ERİKÇİ
Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Genel Biyoloji Anabilim Dalı
Ağustos-2004

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Şerife Yelda ERİKÇİ'nin Fermente Ürünlerden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Tanımlanması ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması Başlıklı Genel Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki, Yüksek Lisans Tezi 27.05.2004 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarında değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışman) : Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Üye : Doç. Dr. Kıymet GÜVEN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Semra İLHAN

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 08.09.2004. tarih ve ...29/23..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Altuğ İFTAR
Fen Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FERMENTE ÜRÜNLERİNDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU, TANIMLANMASI VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ş. YELDA ERİKÇİ

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

2004, 83 Sayfa

Laktik asit bakterileri (LAB) doğada oldukça yaygın bir şekilde yer almaktadırlar. Laktik asit bakterileri sebze, zeytin, şarap, süt ve etlerin fermentasyonundaki başlıca sorumlulardır. Koruyucu etkilerinden dolayı çoğu laktik asit bakterisi rutin olarak gıda hazırlanmasında kullanılmaktadır. Bu çalışmada, fermente ürünlerden 260 adet laktik asit bakterisi izolatı elde edilmiştir. Bu izolatların, besinlerle taşınan bakteriyal patojenlere karşı antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiştir. Çalışma sonucunda, 33 izolatın pH 7'de bakteriyosin aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. 33 izolatın 3'ü *Lactobacillus brevis*, 3'ü *Lactobacillus buchneri*, 7'si *Lactobacillus confusus*, 2'si *Lactobacillus kefir*, 5'i *Lactobacillus casei*, 2'si *Lactobacillus delbrueckii*, 4'ü *Streptococcus lactis*, 3'ü *Pediococcus pentosaceus* ve 4'ü *Leuconostoc mesenteroides* olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, fermente ürünlerden izole edilen laktik asit bakterilerinin laktik asit miktarları 0.153-2.610 mg/ml arasında, proteolitik aktivite miktarları 0.001-0.012 tirozin mg/ml arasında ve hidrojen peroksit miktarları ise 0.119-0.994 µg/ml arasında değişiklik gösterdiği ortaya çıkarılmıştır.

Anahtar Kelimeler : Laktik Asit Bakterileri, Fermentasyon, Fermente Gıda, Bakteriyal

Patojen, Antimikrobiyal Aktivite

ABSTRACT**Master of Science Thesis****ISOLATION, IDENTIFICATION AND INVESTIGATION OF
ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF LACTIC ACID BACTERIA
ISOLATED FERMENTED PRODUCTS****Ş. YELDA ERİKÇİ****Anadolu University****Graduate School of Natural and Applied Sciences****Biology Program****Supervisor: Prof. Dr. Merih KIVANÇ****2004, 83 Pages**

Lactic acid bacteria (LAB) are widely distributed in nature. Lactic acid bacteria are mainly responsible for the fermentations of vegetables, olive, wine, milk and meat. Many lactic acid bacteria are routinely used food preparations for their preservative effects. In this study, isolates of lactic acid bacteria, 260 of which from fermented foods were isolated. These isolates were tested for antimicrobial activity against food-borne bacterial pathogens. At the end of study, 33 isolates were produced bacteriocin at pH 7.0. 33 isolates were identified 3 of them as *Lactobacillus brevis*, 3 of them as *Lactobacillus buchneri*, 7 of them as *Lactobacillus confusus*, 2 of them as *Lactobacillus kefir*, 5 of them as *Lactobacillus casei*, 2 of them as *Lactobacillus delbrueckii*, 4 of them as *Streptococcus lactis*, 3 of them as *Pediococcus pentosaceus* and 4 of them as *Leuconostoc mesenteroides*. Although, amount of lactic acid, proteolytic activity and hydrogen peroxide produced by lactic acid bacteria isolated from fermented foods ranged between 0.153-2.610 mg/ml, 0.001-0.012 tirosin mg/ml, 0.119-0.994 µg /ml respectively.

**Keywords : Lactic Acid Bacteria, Fermentation, Fermented Food, Bacterial Pathogen,
Antimicrobial Activity**

TEŞEKKÜR

Bana bu konuda çalışma olanağı sağlayan Değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Merih KIVANÇ'a teŐekkürü bir borç bilirim. ÇalıŐmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Uzman Erdoğan ÇAKIR'a, Araştırma Görevlisi M. Burçin MUTLU'ya, Araştırma Görevlisi Meral YILMAZ'a, Doktora Öğrencisi Seda ERCAN AKKAYA'ya ve ayrıca çalıŐmamın her aşamasında destek veren kardeŐim Merkez Bankası MüfettiŐlerinden YaŐar ERİKÇİ'ye ve anneannem AyŐe KIRIŐ'a içtenlikle teşekkür ederim.

Ő. Yelda ERİKÇİ

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Laktik Asit Bakterilerinin Özellikleri ve Sınıflandırılması	1
1.2. Laktik Asit Bakterilerinin Gıda Alanında Kullanımı	5
1.3. Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Metabolik Ürünler	7
1.3.1. Laktik Asit	7
1.3.2. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	8
1.3.3. Diasetil ve Asetaldehit	9
1.3.4. Hidrojen Sülfür (H ₂ S)	10
1.3.5. Proteolitik Aktivite	11
1.3.6. Poli-β-Hidroksibütirat (PHB) Üretimi	11
1.3.7. Bakteriyosin Üretimi	12
1.4. Laktik Asit Bakterilerinin Sağlık Alanında Kullanımı	14
1.4.1. Probiyotikler ve Prebiyotikler	14
1.5. Laktik Asit Bakterilerinde Yüzey Uzantıları	18
1.6. Laktik Asit Bakterilerinde Agregasyon, Koagregasyon ve Otoagregasyon	18
1.7. Laktik Asit Bakterilerinde Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi	19
1.8. Laktik Asit Bakterilerinde Plazmid DNA	22
2. MATERYAL VE METOT	24
2.1. Materyal	24
2.1.1. Fermente Ürün Örneklerinin Temini ve Laboratuvara Getirilmesi	24

2.1.2. Test Mikroorganizmaları	24
2.1.3. Besiyerleri ve Tampon Çözeltiler	25
2.1.3.1. MRS Broth.....	25
2.1.3.2. MRS Agar	25
2.1.3.3. Nutrient Broth	26
2.1.3.4. Nutrient Agar	26
2.1.3.5. Skim Milk	26
2.1.3.6. Litmus Milk Ortamı	27
2.1.3.7. Arjinin Dihidrolaz Broth (Thornley Ortamı)	27
2.1.3.8. TSI Agar (Triple Sugar Iron Agar)	27
2.1.3.9. MR-VP Broth	28
2.1.3.10. 0,1 N NaOH Çözeltisi	28
2.1.3.11. 1 N H ₂ SO ₄ Çözeltisi	28
2.1.3.12. α-Naftol Çözeltisi	29
2.1.3.13. % 40'lık NaOH Çözeltisi	29
2.1.3.14. Fenol Fitalein İndikatörü	29
2.1.3.15. Amonyum Molibden Çözeltisi	29
2.1.3.16. Potasyum İyodür Çözeltisi	29
2.1.3.17. 0.72 N TCA (Trikoloro Asetik Asit) Çözeltisi	30
2.1.3.18. Na ₂ CO ₃ .Na ₄ P ₂ O ₇ Çözeltisi	30
2.1.3.19. Laktik Asit Aktivitesinin Tespiti İçin Standart Çözelti	30
2.1.3.20. Hidrojen Peroksit Tespiti İçin Standart Çözelti	30
2.1.3.21. Proteolitik Aktivite İçin Standart Çözelti	30
2.1.3.22. STE Tamponu	30
2.1.3.23. TE Tamponu	31
2.2. Metot	31
2.2.1. Fermente Ürünlerden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	31
2.2.2. Antibakteriyel Aktivite ve Bakteriyosin Aktivitesinin Tespiti	32
2.2.2.1. Sandvic Overlay Yöntemi	32

2.2.2.2. Agar Difüzyon Yöntemi	33
2.2.3. İdentifikasyon Testleri	34
2.2.3.1. Gram Boyama	34
2.2.3.2. Katalaz Testi	34
2.2.3.3. %6.5, %7.0 ve % 10.0 NaCl'de Gelişme	35
2.2.3.4. 4, 8, 10, 15 ve 45 °C'de Gelişme	35
2.2.3.5. pH 3.9'da Gelişme	35
2.2.3.6. Arjininden NH ₃ Oluşumu	36
2.2.3.7. H ₂ S Üretimi	36
2.2.3.8. Voges-Proskauer Testi	36
2.2.3.9. Karbonhidrat Fermentasyon Testleri	36
2.2.4. Metabolik Ürünlerin Tespiti	37
2.2.4.1. Laktik Asit Üretimini Tespiti	37
2.2.4.2. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Üretimini Tespiti	38
2.2.4.3. Proteolitik Aktivitenin Tespiti	38
2.2.5. Plazmid DNA İzolasyonu	39
3. BULGULAR	41
3.1. Fermente Olmuş Ürünlerden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması	41
3.2. Sandvic Overlay Yönteminde Antibakteriyal Aktivite Gösteren Laktik Asit Bakterilerinin Sonuçları	41
3.3. Agar Difüzyon Yönteminde Antibakteriyal Aktivite Gösteren Laktik Asit Bakterilerinin Sonuçları	46
3.4. Fermente Ürünlerden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin İdentifikasyon Test Sonuçları	49
3.5. Fermente Ürünlerden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin pH ve Metabolik Ürünlerin Tespiti	56
3.6. Fermente Ürünlerden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinde Plazmid DNA İzolasyonu Sonuçları.	57
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	59

KAYNAKLAR

ŞEKİLLER DİZİNİ

3.6. Laktik Asit Bakterilerinde Plazmid DNA'nın Gözlenmesi	58
--	----

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.2. Laktik Asit Bakterileri Kullanılarak Elde Edilen Çeşitli Ürünler	6
1.3. Laktik Asit Bakterilerine Ait Metabolik Ürünler ve Etki Mekanizmaları	7
1.4.1. Probiyotik Olarak Kullanılan Laktik Asit Bakterileri	15
1.8. Laktik Asit Bakterilerinde Tespit Edilen Bazı Plazmidler	23
2.1.2. Test Mikroorganizmaları	24
3.2. Sandvic Overlay Yönteminde Antibakteriyal Aktivite Gösteren Laktik Asit Bakterileri	42
3.3.a. Antibakteriyal Aktivite Gösteren İzolatların Patojen Mikroorganizmalar Üzerindeki Etkisi	47
3.3.b. Ortam pH'sı 7'ye Ayarlandıktan Sonra Antibakteriyal Aktivite Gösteren İzolatların Patojen Mikroorganizmalar Üzerindeki Etkisi	48
3.4.a. Fermente Ürünlerden İzole Edilen Mikroorganizmaların İdentifikasyon Testi Sonuçları	51
3.4.b. Fermente Ürünlerden İzole Edilen Mikroorganizmaların Karbonhidrat Fermentasyon Testi Sonuçları	53
3.4.c. Standart Mikroorganizmaların İdentifikasyon Testi Sonuçları	55
3.5. Fermente Ürünlerden İzole Edilen Suşların pH ve Metabolik Ürünlerinin Miktarı.....	57

1.GİRİŞ

1.1. Laktik Asit Bakterilerinin Özellikleri ve Sınıflandırılması

Laktik asit bakterileri turşu, sucuk, şarap, zeytin, boza, yoğurt gibi fermente gıdaların üretiminde çok eski zamanlardan beri oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Fermente ürünlerin kalitesinin belirlenmesinde de son derece önemli bir etkiye sahiptir. Laktik asit bakterileri sebze, meyve, et ve süt ürünlerinde bulunmaktadır. Bu bakteri grubunun bir kısmı insan vücudunun doğal florasını oluşturmaktadır (Deet ve Tamime, 1981).

Laktik asit bakterileri farklı türden gıdaların besin değerinin artırılmasında ve raf ömrünün uzatılmasında kullanımının yanısıra, medikal alanda da intestinal enfeksiyonların ve bazı kanser tiplerinin kontrolünde kullanımı özellikle son yıllarda giderek önem kazanan bir konu haline gelmiştir (Gilliland, 1990).

Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkisinin laktik asit, hidrojen peroksit, asetik asit, hidrojen sülfür, bakteriyosin ya da bakteriyosin benzeri maddelerden meydana geldiği tespit edilmiştir (Lewus ve ark., 1991; Gilliland, 1990).

Laktik asit bakterileri bakteriyosin olarak adlandırılan küçük, ribozomal olarak sentezlenen antimikrobiyal peptitler üretmektedirler (Cuozzo ve ark., 2000; Eijsink ve ark., 1998). Laktik asit bakterilerinin bakteriyosinleri, gıdalarda bozulmaya ve hastalığa neden olan bazı Gram pozitif bakterilere karşı bakteriyosidal etkiye sahiptir (Kıvanç ve ark., 2002).

Laktik asit bakterilerinde bakteriyosin üretimi *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve *Carnobacterium* türleri arasında oldukça yaygındır. Bunlar arasında gıda endüstrisinde koruyucu olarak kullanılan ve en iyi bilinen bakteriyosin nisindir. Nisin, Dünya Sağlık Örgütü tarafından da gıda endüstrisinde koruyucu olarak kabul edilen bir bakteriyosindir (Zhu ve ark., 2000).

Bakteriyosin üretiminde ve aktivitesinde bazı faktörler önem kazanmaktadır. Bazı laktik asit bakterileri katı besiyerinde sıvı besiyerine oranla çok daha iyi antimikrobiyal aktivite göstermektedirler. Üretilen bakteriyosin miktarı, üretici bakterinin gelişme fazına bağlıdır. Bakteriyosin üretimi

bakteriyosin tipine bağlı olmakla birlikte genellikle geç logaritmik fazı ile erken durgun faz arasında meydana gelmektedir. Besiyerinin başlangıç pH'sı bakteriyosin üretimi ve stabilitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Ayrıca bakterilerin gelişmesi için optimum olan sıcaklık, bakteriyosin aktivitesinin gözlenebilmesi için de optimum sıcaklık değeridir (Yıldırım ve ark., 2000a). Laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretme yeteneklerinin gelecekte biyoteknoloji alanında önemli teknolojik ve bilimsel yarar sağlayacağı açıktır (Kılıç, 2001).

Çalışmamızda, evlerden ve piyasadan fermente ürünler alınarak, bu ürünlerden laktik asit bakterilerinin izolasyonu yapılarak, izole edilen suşların antimikrobiyal aktiviteleri incelenmesi amaçlanmıştır.

Laktik asit bakterileri, metabolizmaları sırasında laktozu parçalayarak laktik asit oluşturan mikroorganizmalar olup, laktat sentezinde rol alan Laktat Dehidrogenaz (LDH) enzimine sahip, Gram pozitif ve katalaz negatif bakterilerdir. Genel olarak laktik asit bakterileri grubunda *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* ve *Leuconostoc* cinsleri yer almaktadır. Fakat son yıllarda yapılan genetik çalışmalar sonucunda *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Weissella* ve *Vagococcus* cinsleri de bu grupta incelenmeye başlanmıştır. Yine son yıllara ait literatürlerde *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Atopobium*, *Dolosigranum*, *Tetragenococcus*, *Alloiococcus* ve *Gemella* gibi yeni cins isimlerine rastlanmakta ise de bu cinslerle ilgili taksonomik çalışmaların henüz tamamlanmadığı bildirilmektedir (Encinas ve ark., 1999; Stiles ve Holzapfel, 1997).

şahin (1990)'in belirttiğine göre, *Lactobacilleae* ubuk şeklinde, Gram pozitif bakterileri kapsar. Bunlar tekli hücreler olarak bulunabileceği gibi, ikili veya kısa ve uzun zincirler şeklinde de bulunabilirler. Hücreler genellikle düzgün ve iki uzun kenar birbirine paralel, uçlar ovaldir. *Lactobacilleae* içinde en önemli ve karakteristik cinsi *Lactobacillus* oluşturmaktadır. Bu cinse ait alt cins ve türlerin doğada çok yaygın olarak bulunduğu ve hemen her yerde rastlanan mikroorganizmalar olduğu belirtilmiştir. Besin istekleri bakımından bazı türler oldukça seçicidir. Genel olarak fakültatif anaerob bir gelişme gösterirler ve uygun gelişme pH'ları zayıf asit alanda yani 5.5-6.6 arasındadır. En uygun gelişme

sıcaklıkları, türlere göre değişir ve mezofil olanlarda 30 °C, termofil olanlarda ise 45-50 °C civarındadır (Şahin, 1990).

Her canlı türünde DNA ya da RNA'daki toplam nükleik asit içinde Guanin (G) ve Sitozin (S) oranı sabit olup, bu sabitlikten mikroorganizmaların tanımlanmasında yararlanılmaktadır. Laktik asit bakterileri Gram pozitif bakteriler içerisinde düşük düzeyde guanin ve sitozin oranına (% 50'den az) sahip olan bir bakteri grubudur (Ludwig ve ark., 1993). Bu grup içinde yer alan bakterilerin genom büyüklükleri ise, genel olarak 1.8-3.4 Mbp (mega base pair) arasında değişmektedir (Davidson ve ark., 1996).

Laktik asit bakterileri *Streptococcaceae* ve *Lactobacillaceae* olmak üzere iki ayrı familyada toplanmıştır. *Streptococcaceae* familyasında *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* türleri, *Lactobacillaceae* familyasında ise *Lactobacillus* türleri yer almaktadır (Tekinşen ve Atasever, 1994; Tunail ve Köşker, 1989; Daeschel, 1989).

Laktik asit bakterilerinden *Sporolactobacillus inulinus* hariç hiçbiri spor oluşturmaz. Birkaçı dışında hepsi hareketsizdir. Fizyolojik karakterleri bakımından birbirine yakın veya benzer bulunan, ancak morfolojileri oldukça farklı olan cinsleri içermektedirler. Buna rağmen laktik asit bakterilerinin tümünde oldukça sıkı filogenik bağ ve doğal yakınlık ile enerji metabolizması ve spesifik enzimler bakımından cinsler arası benzerlik olduğu bildirilmiştir. Morfolojileri cins ve türe göre değişmekle birlikte kok, düzgün çubuk ve düzensiz çubuk olmak üzere üç gruba ayrılmaktadırlar (Kılıç, 2001; Tunail ve Köşker, 1989; Halkman, 1991).

Laktik asit bakterileri insan, hayvan ve bitki gibi doğal ortamlardan izole edilebilirler. Belirli spesifik bir çevreye adapte olmuş gibidirler ve hemen hemen doğal habitatlarında bulunmaktadırlar (sebze, meyve, süt, vajina, sıcak kanlıların bağırsağı, feçes ve dudaklar gibi).

Streptococcus cinsi türlerine insan, hayvan ve kuşlarda rastlanır. Birçoğu saprofit olup, bazı türleri ise patojen özellik göstermektedir.

Leuconostoc cinsine ait türler ise daha çok sebzelerden ve süt ürünlerinden izole edilmektedir. Çünkü doğal olarak buldukları ortamlar bu ürünlerdir.

Pediococcus türleri ise sadece bitkilerde bulunmaktadır. Bunun dışında laktik asit bakterileri doğal fermentasyona uğramış bitkisel ve hayvansal birçok üründe diğer mikroorganizmalarla birlikte de bulunabilmektedir: fermente süt ürünleri (yoğurt, tereyağı, peynir), fermente et ürünleri (sosis, jambon, fume et), meyveye dayalı alkollü içkiler, sebze ve meyve turşuları, silo yemleri, fermente tahıllar gibi.

Lactobacillus cinsine ait türlere ise insan, hayvan ve bitkilerle birlikte bunların bulunduğu doğada, ortamda rastlanmaktadır. Özellikle insan ve hayvan bağırsaklarında yaşayanlar, o koşullarda adapte olmuş türlerdir. Genellikle antimikrobiyal etkinliklerinden söz edilmektedir. *Lactobacillus*'un beslenme süreci içinde immün sistemi uyarıcı ve bir probiyotik olarak yararlı etkilerinin olduğu da bilinmektedir. Vajinanın normal mikroflorasını oluşturmaktadırlar. Türlerinden çok azı patojen özellik göstermektedir (Marasco ve ark., 2000; Kılıç, 2001).

Laktik asit bakterilerinin "hem" grupları (sitokrom ve katalaz) yoktur. "Hem" gruplarının eksikliğine karşın havanın oksijeninde gelişip üreyebilmektedirler. Başka bir ifadeyle, katalaz enzimleri olmaksızın aerob koşullarda gelişebilen nadir bakteriler arasında laktik asit bakterileri de bulunmaktadır. Ancak bütün üyeleri anaerob veya mikroaerofiliktir. Bazı *Pediococcus* ve *Lactobacillus* türlerinin katalaz pozitif reaksiyon verdiği de bilinmektedir (Kılıç, 2001; Halkman, 1991).

Laktik asit bakterileri laktozu, genellikle % 0.5-1.5'lük laktik asit konsantrasyonuna kadar parçalarlar, fakat % 3 konsantrasyona kadar fermentasyon yapan türlerinin de varlığı bilinmektedir. Laktik asit bakterileri fermentasyonda oluşan ürünlerin cins ve miktarına göre de sınıflandırılmaktadır. Homofermentatif laktik asit bakterileri glikozu, Fruktöz Di Fosfat (FDP) yolu ile parçalar ve bu fermentasyon sonucunda % 99 oranında laktik asit üretmektedirler. Bunun yanında % 1 oranında ise formik asit, asetik asit ve etanol oluşturmaktadırlar. Heterofermentatif laktik asit bakterileri ise, glikozu Hegzos Mono Fosfat (HMF) yolu ile parçalayarak fermentasyon sonucunda % 70 oranında laktik asit üretirler, % 30 oranında ise etil alkol, asetik asit,

karbondioksit, gliserol, mannitol ve fruktoz oluşturmaktadırlar (Tekinşen ve Atasever, 1994; Daeschel, 1989).

Laktik asit bakterilerinin gelişimi oldukça karmaşıktır. Grubun hiçbir üyesi, içinde yalnız glikoz ve amonyum bulunan bir mineral besi ortamında gelişmez. Pek çoğu vitaminlerden bir ya da birden fazlasına gereksinim duymaktadırlar. Bunun yanısıra amino asit istekleri de çok fazladır. Laktik asit bakterileri genellikle, vitamince zengin, maya ekstraktı, peynir altı suyu, süt serumu, kan veya domates suyu içeren karmaşık besiyerlerinde iyi gelişmektedirler (Tunail ve Köşker, 1989; Halkman, 1991).

1.2. Laktik Asit Bakterilerinin Gıda Alanında Kullanımı

Bitkisel ve hayvansal kökenli gıda maddelerinin korunmasında yeni kurutma ve konsantre teknikleri, soğukta ve dondurarak muhafaza yöntemleri geliştirilmiş, konserve üretim teknolojisi oldukça ilerleme kaydetmiştir. Ancak koruma ve üretim tekniklerindeki tüm gelişme ve mekanizasyona karşın kullanımını sürdüren bir yöntem bulunmaktadır ki bu, en eski koruma yöntemlerinden birisi olan laktik asit fermentasyonu ile korumadır. Laktik asit fermentasyonu meyve ve sebzelerin bozulmadan saklanmasını sağladığı gibi, aynı zamanda onlara karakteristik tat ve aroma özelliklerini kazandırmaktadır. Böylece bu sebze ve meyveler bol ve ucuz oldukları mevsimlerde uygulanan yöntemlerle, taze olarak bulunmaları sağlanabilmektedir (Başer ve Kılıç, 1985).

Özellikle et ve et ürünleri mikrobiyal bozulmaya en duyarlı ve en yakın gıdalardır. Otoliz, oksidasyon, bakteriyel bozulma ve bu faktörlerin birlikte faaliyetiyle bozulmalar meydana gelmektedir. Kimyasal değişmelerin oluşmasında esas etken bakteriyel enzimlerdir (Küçüköner ve ark., 1990).

Bozulmaya neden olan bakteriler trimetilaminoksiti (TMAO) trimetilamine (TMA) indirgerler. TMA miktarının artışı bakterilerin çoğalma hızı ve aktivitesi ile paralel olduğundan bozulma kriteri olarak verilmektedir. Et ve et ürünlerinde meydana gelen bozulmayla ortaya çıkan nitrozaminler, kuvvetli kanserojenik etkili maddeler olmalarının yanısıra, mutajenik ve teratojenik etkili maddelerdir. Laktik asit bakterilerinin nitrat indirgeyici özelliğinden dolayı,

özellikle *L. plantarum*, nitrit ve sekonder aminlerden nitrozamin oluşumunun engellendiği belirtilmiştir (Vural ve Öztan, 1991).

Streptococcus ve *Lactobacillus*'lar gıda teknolojisinde starter (saf) kültür olarak geniş bir kullanım alanı bulmaları ve son yıllarda yapılan genetik çalışmalar sonucu sınıflandırılmalarında ortaya çıkan karışıklıklar gibi nedenlerle üzerinde yoğun olarak durulan ve araştırma konusu olmaya devam eden laktik asit bakterileridir (Kılıç, 2001).

Laktik asit bakterileri; peynir, fermente süt ürünleri, et ve balık ürünleri, ekmekek, şarap ve bazı sebzeler gibi fermente gıdaların üretimlerinde ve olgunlaştırılmalarında önemli rol oynamaktadırlar. Ülkemizde ve dünyanın çeşitli yerlerinde üretilen bu fermente gıdaların çoğunun üretimi farklı olabilmekte ve bazıları üretildikleri yöreye göre farklı isimlerle bilinmektedir. Laktik asit bakterileri, fermente ürünlerin kalitesini ve niteliğini belirlemede önemli bir faktör olarak yer almaktadır (Hayaloğlu ve Erginkaya, 2001). Ayrıca, doğal olarak bulunan laktik asit bakteri florası çiğ materyalin kalitesi, sıcaklık ve hasat şartlarının bir fonksiyonu olarak da değişiklik göstermektedir (Gardner ve ark., 2001).

Laktik asit bakterileri gıda sanayisinde kullanımının yanısıra, tarım sanayisinde de (Çizelge 1.2.) yaygın olarak kullanılmaktadır (Tanasupawat ve ark., 1992).

Çizelge 1.2. Laktik Asit Bakterileri Kullanılarak Elde Edilen Çeşitli Ürünler

Yoğurt yapımı	<i>St. thermophilus, Lb. bulgaricus</i>
Tereyağı yapımı	<i>St. lactis, St. cremoris, Leu. cremoris</i>
Ekmekek yapımı	<i>Lb. plantarum, Lb. coryneformis</i>
Quark ve peynir yapımı	<i>St. lactis, Lb. bulgaricus, St. thermophilus, Lb. casei, Lb. brevis, Lb. delbrueckii, Lb. fermentum</i>
Biyoyoğurt yapımı	<i>Lb. acidophilus, St. thermophilus</i>
Kımız yapımı	<i>Lb. bulgaricus</i>
Fermente et ürünleri	<i>Lb. plantarum, Pd. pentosaceus</i>
Fermente balık ürünleri	<i>Lb. pentasus</i>
Silaj yapımı	<i>Lb. plantarum, St. lactis, Lb. brevis, Lb. delbrueckii, Lb. fermentum, Lb. curvatus, Lb. bavaricus</i>

1.3. Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Metabolik Ürünler

Çizelge 1.3. Laktik Asit Bakterilerine Ait Metabolik Ürünler ve Etki Mekanizmaları

Metabolik ürün	Etki mekanizması
Laktik ve diğer uçucu asitler	Hücre metabolizmasının bozulması
Hidrojen peroksit	Süperoksit iyon zincir reaksiyonuyla temel biyomoleküllerin aktivasyonunun yok edilmesi, laktoperoksidaz sistem aktivitesi
Diasetil ve asetaldehit	Arjinin metabolizmasına müdahale
Karbondioksit	Anaerobik çevre ve/veya enzim inhibisyonu, dekarboksilasyon ve/veya hücre membranının bozulması
Bakteriyosin (sekonder metabolit)	Sitoplazmik membranın bozulması (Nisinin etki şekli)

Laktik asit bakterilerinin metabolizmaları sonucunda oluşan çeşitli metabolik ürünler (Çizelge 1.3.) farklı etkilere sahip olup, diğer kontaminant mikroorganizmaların üremelerini engellemektedirler (Attaie ve ark., 1987; Daeschel, 1989; Reiter ve Harnulv, 1984; Carminati ve ark., 1989; Spelhaug ve Harlander, 1989).

1.3.1. Laktik Asit

Laktik asit bakterileri adından anlaşılacağı gibi, fermantasyon sırasında laktik asit üretirler. Bu ürün kokusuz, ekşi tatta bir organik asit olup, mikroorganizmalar üzerinde olumsuz etki yapmaktadır. Mikroorganizmaların membran yapısını bozarak, hücrenin subtrat taşıma özelliğini yok etmektedir. Endüstride kullanılan laktik asit renksizden açık sarıya kadar değişen renkte olup, kokusuz ve saydam bir özelliğe sahiptir (TSE, 1991).

Yapılan çalışmalar sonucunda, fermente süt ürünlerinin antimikrobiyal özellikler taşıdığı ve bu özelliklerin ortamda yer alan ve gıdaları mikrobiyal bozulmalara karşı koruyan laktik asit üretimine bağlı olarak gerçekleştiği ve özellikle ince bağırsakta yaşayan Gram negatif bakterilere karşı daha etkili olduğu ortaya konulmuştur (Kılıç, 2001).

Laktik asit bakterileri; laktozun bir kısmını L (+), bir kısmını ise D (-) formunda laktik aside dönüştürmektedirler. Fizyolojik olarak L (+) laktik asit, D (-) laktik asit formundan çok daha iyi metabolize edilmektedir. Bundan dolayı, özellikle çocukların ve gençlerin beslenmesinde son derece önem kazanmaktadır (Kılıç, 2001).

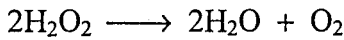
Yapılan çalışmalar sonucunda, laktik asit bakterilerinde, laktik asit üretiminin plazmid DNA ile kontrol edildiği bildirilmiştir (Prestini ve ark., 1983; Kok ve ark., 1988).

Kuipers ve ark. (2000) pH'nın düşmesine bağlı antimikrobiyal özelliğe sahip laktik asitin, Gram negatif bakterilerinin yaşamını kaybetmesine yol açan lipopolisakkaritlerin serbest bırakılmasına ve bunun sonucunda dış membranın geçirgen olmasına neden olan bir madde olduğunu bildirilmişlerdir.

Lactobacillus'ların pH'yı 3.2-3.5'e kadar düşürebildiklerinden dolayı asitliğe karşı daha dayanıklı olduğu gerçeği ortaya çıkarılmıştır (Kılıç, 2001).

1.3.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Laktik asit bakterileri üremeleri sonucu hidrojen peroksit oluşturmaktadırlar. Oluşturulan H₂O₂ miktarının, laktik asit bakterilerinin cins, tür ve hatta suşlarına göre farklılık gösterdiği ve pek çok mikroorganizma üzerinde inhibitör etkisine sahip olduğu belirlenmiştir. Hidrojen peroksit termodinamik bakımdan kararsız bir bileşik olup, su ve oksijene ayrılmaktadır (Daeschel, 1989; Lewus ve ark., 1991; Muriana ve Klaenhammer, 1991).



Araştırmacılar, bazı bakterilerin patojen mikroorganizmaların üremesini kontrol eden çeşitli antimikrobiyal maddeler oluşturduğunu saptamışlardır. Örneğin, *Lactobacillus lactis*'in hidrojen peroksit üretilip, *E. coli*'nin üremesini durdurduğunu gözlemişlerdir. Ayrıca laktik asit bakterileri tarafından antimikrobiyal maddelerin intestinal ve üriner sistem enfeksiyonlarında koruyucu rol aldığı tespit edilmiştir (Kılıç, 2001).

Rahim kanserinin en büyük nedenlerinden biri olan HPV (Human Papilloma Virus) seksüel yolla bulaşan bir hastalık olup, hidrojen peroksitin bu hastalık üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Bauer (2001) yaptığı bir çalışma sonucunda, hidrojen peroksitten hipoklorik asit üretimi yapıldığını belirlemiş ve bu ürünlerin kanser öncüsü hücreleri değiştirdiğini saptamıştır. Normal florada bulunan *Lactobacillus* türleriyle HPV enfeksiyonlarının ilişkili olabileceği ve yapılan bir çalışmada hidrojen peroksit konsantrasyonu yüksek olan ortamdaki hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümünün engellendiği, hatta laktik asit bakterilerinin oluşturduğu hidrojen peroksitin kanserli hücreleri tekrar eski haline dönüştürdüğü düşünülmektedir (Bauer, 2001).

1.3.3. Diasetil ve Asetaldehit

Yoğurt, tereyağı, kefir ve peynir gibi süt ürünlerinin kendine özgü tat ve aroması vardır. Starter kültürlerin önemli fonksiyonlarından biri de, kullanıldıkları süt ürünlerinde tat ve aromatik yapıyı oluşturmalarıdır. Tat ve aromayı oluşturan bileşikler, genellikle ürünün yapımında kullanılan starter kültürlerin faaliyetleri sonucu meydana gelmektedir. Süt ürünlerinde tat ve kokuyu oluşturan diasetil ve asetaldehit, karakteristik aroma bileşikleridir (Tzanetaki ve ark., 1988; Tekinşen ve Atasever, 1994).

Lactobacillus'larda asetaldehit üretimi türlere bağlı olarak değişmekle birlikte, son derece önemlidir. Buna karşın, *Streptococcus*'larda daha az asetaldehit üretilmektedir (Shimazu ve ark., 1985).

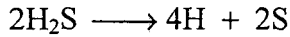
Bottazi ve ark. (1967) yaptıkları çalışma sonucunda, *St. thermophilus*'un bütün suşlarının diğer homofermentatif laktik *Streptococcus*'lardan daha fazla asetaldehit ve diasetil ürettiğini tespit etmişlerdir.

Yine bazı araştırmacılar, *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* ve *Leuconostoc cremoris* tarafından oluşturulan diasetil ve asetoinin piruvattan kaynaklandığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, *Leu. cremoris*'in diasetil üretiminde, özellikle *St. lactis* subsp. *diacetylactis* ve/veya *St. cremoris* ile etkili olduğunu açıklamışlardır (Petit ve ark., 1989).

Tunail ve Köşker (1989) homofermentatif laktik asit bakterilerinin heterofermentatif laktik asit bakterilerinden daha fazla ve hızlı diasetil ürettiklerini tespit etmişlerdir. Ayrıca, laktik asit bakterilerinin 18-22 °C'de, 30 °C ve üzerindeki sıcaklık derecelerine oranla daha fazla diasetil oluşturduklarını ve ortamın pH'sına bağlı olarak, düşük pH'larda yüksek pH derecelerine oranla fazla miktarda diasetil üretimi olduğunu bildirmişlerdir.

1.3.4. Hidrojen Sülfür (H₂S)

Hidrojen sülfür, karakteristik çürük yumurta kokusunda bir gaz olup, termodinamik bakımdan kararlı olmasına rağmen, çok yüksek sıcaklıklarda ayrışması mümkündür. Hidrojen sülfür çok etkili toksik bir maddedir ve kükürdün hidrojenle oluşturduğu renksiz, çok zehirli gaz halindeki bir bileşiktir. Bundan dolayı, hidrojen sülfüre "kükürtlü hidrojen" adı da verilmektedir (İlyaslı, 1997).



Sülfatların bakteriler tarafından redüksiyonu ve proteinlerin parçalanması sonucunda hidrojen sülfür oluşmaktadır. Laktik asit bakterileri besiyerindeki sistein, sistin ve methionin gibi kükürtlü aminoasitleri kullanarak hidrojen sülfür oluşturmaktadırlar (Toksoy, 1993).

Yapılan çalışmalar sonucunda, laktik asit bakterilerinin değişik miktarlarda hidrojen sülfür ürettikleri tespit edilmiştir (Tulumluoğlu, 1996; Toksoy, 1996; İlyaslı, 1997)

Hanna ve ark. (1983) et ürünlerinden izole ettikleri *Lactobacillus plantarum*, *L. coryneformis* ve *L. viridescens* türlerinin peptonlu demir agarda hidrojen sülfür meydana getirdiğini belirtmişlerdir.

Toksoy ve ark. (1999) fermente et ürünleri olan sosis ve sucuklardan izole ettikleri 9 adet *L. plantarum* suşunda H₂S üretimi tespit etmişlerdir.

Bununla birlikte, bazı laktik asit bakterilerinin hidrojen sülfür üretmedikleri yapılan çalışmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır. Hidrojen sülfür

üretiminde sistein desülfohidraz ve sülfid redüktaz enzim aktivitesine bağlı olduğu tespit edilmiştir (Sharpe ve ark., 1962).

1.3.5. Proteolitik Aktivite

Barry ve Kolstad (1983) laktik asit bakterilerinde proteolitik sistemlerin, büyüme için protein ve peptit N'ların yapımında, gıdalara karakteristik ve organoleptik özellikler kazandıran gıdayı hazırlamada ve olgunlaştırma aşamasında son derece önemli role sahip olduğu gerçeğini vurgulamışlardır.

Yapılan araştırmalar sonucunda, araştırmacılar laktik asit bakterilerinde laktik asit üretimi ve proteolitik aktivitenin cins, tür ve suşlar arasında farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Aslım, 1994).

1.3.6. Poli-β-Hidroksibütirat (PHB) Üretimi

Poli-β-hidroksibütirat (PHB), birçok bakteri hücrelerinin sitoplazmasında granül şeklinde depo edilen, intrasellüler karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılan mikrobiyal depo poliesterdir. Özellikle son yıllarda PHB, biyoplastik materyal olarak ilgi odağı olmuştur.

Termobiyoplastiklerin kullanım alanları şunlardır:

- Yapay damar
- Ortopedik plaka, çubuk ve vida
- Ameliyat ipliği
- Yara örtüsü
- Piyoelektriksellik nedeniyle kemik büyüme uyarıcısı
- Paketleme, şişe, poşet ve film gibi ambalaj malzemeleri
- Kontrollü ve uzun süreli zirai kimyasal (gübre, pestisit, fungusit gibi) salım ve taşıyıcı sistemleri
- Tek kullanımlık çocuk bezi ve hijyenik pedler
- Şampuan ve boya şişeleri

Petrolden elde edilen sentetik polimerler (plastik) toprakta uzun süre parçalanmadığından çevre kirlenmesine neden olmaktadır. Bu nedenle mikrobiyal plastik olan poli- β -hidroksibütirat, doğada kolay parçalanabilme özelliğinden dolayı önem kazanmıştır. Aslım ve ark. (1998) laktik asit bakterilerinde PHB üretiminin varlığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, PHB biyopolimerin bakterilerin dirençliliklerini arttırdığını bildirmişlerdir.

Termobiyoplastik maddenin toprakta mikroorganizma ile su ve karbondioksite parçalandığı ve parçalanma süresinin iki aydan iki yıla kadar değişebildiği bilinmektedir (Anon, 1994).

PHB'ler, çevre dostu fiziksel özelliklere sahip olmaları yanısıra, endüstriyel uygulamalar açısından ilgi çekici olmaları ve özel karakteristik özellikleri sayesinde biyomedikal alanda da kullanımı son derece yaygındır (Gürsel ve Hasırcı, 1995).

Endüstriyel üretilebilen termobiyoplastiklerin (PHB) sertlik durumlarının polietilene oranla dört kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Biyoplastikler, diğer plastikler gibi, şekil kazandırılarak değişik amaçlarla kullanılabilir. Bu madde toprakta mikroorganizmalar yoluyla parçalanabilmekte ve bu parçalanmış biyoplastik, bitki gelişimini de olumlu yönde etkilemektedir (Anon, 1994).

1.3.7. Bakteriyosin Üretimi

Bakteriyosinler, protein veya protein kompleksleri olup, bazı bakteri türleri tarafından üretilen potansiyel antimikrobiyal maddelerdir (Holzapfel, 2002; Daeschel, 1989; Demain ve Davies, 1999).

Tagg ve ark. (1976) tarafından belirtilen kriterlere göre, bakteriyosinler protein yapısında antagonistik maddeler olup, sınırlı sayıda bakterilere, özellikle de bakteriyosin üreten bakteriye yakın türlere karşı bakteriyosidal veya bakteriyostatik aktiviteye sahip bileşiklerdir. Bu tanım birçok bakteriyosin için geçerli olmasına karşın, günümüzde bazı bakteriyosinlerin gıdalarda bozulmaya neden olan bakteriler ile gıda kaynaklı patojenlere karşı inhibisyon etkisine sahip olduğu belirlenmiştir.

Laktik asit bakterilerinin bakteriyosinleri belirli Gram pozitif bakterilere örneğin; *Listeria*, *Staphylococcus*, *Clostridia*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* vb.'ye karşı inhibisyon etkisine sahiptirler (Delves ve ark., 1996).

Bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak tercih edilmeleri sonucunda, süt ve süt ürünlerinin biyolojik olarak korunması da sağlanabilmektedir. Özellikle patojen ve bozulma etkeni mikroorganizmalar üzerine etkili olan bakteriyosinler daha fazla uygulama alanı bulmaktadır. Son zamanlardaki çalışmalar, bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak soğutulmuş ve fermente gıdaların muhafazasında kullanımı üzerinde yoğunlaşmıştır (Geisen ve ark., 1992).

Messi ve ark. (2001) *Lactobacillus plantarum* straini tarafından üretilen (plantarisin 35d) bakteriyosinin başlangıç karakterizasyonu ve deteksiyonunu kapsayan bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışma sonucunda, *Lactobacillus plantarum* 35d'nin, yüksek aktiviteye sahip bir bakteriyosin ürettiği ve bunun yanısıra *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ve *Aeromonas hydrophila*'yı içeren geniş kapsamlı bir antimikrobiyal etkinliğe de sahip olduğu belirlenmiştir.

Maldonado ve ark. (2002) *Lactobacillus plantarum* LPCO10 tarafından üretilen class IIb bakteriyosini olan plantarisin S'nin üretiminden sorumlu olan *locus*'un zeytin fermentasyonundan izole edilen yabancı tipteki *L. plantarum* strainleri arasında geniş bir şekilde dağıtılması ile ilgili bir çalışma gerçekleştirmişlerdir.

Lactobacillus plantarum LPCO10'dan üretilen 2 peptitli bir bakteriyosin olan plantarisin S (Pls)'nin üretimi için gerekli olan *pls* A ve *pls* B genlerinin şifrelenmesi, zeytin fermentasyonundan izole edilen yabancı tiplerdeki *L. plantarum* strainleri arasında ortak bir şekilde dağıtılmıştır. Güney İspanya'da farklı zeytin işleme alanlarından 68 izolat arasından 15 tanesinin, patojenik bakterilerde olduğu gibi, diğer laktik asit bakterilerine karşı aktif olan bakteriyosinler ürettiği gösterilmiştir.

Bu sonuca göre; bakteriyosin üretiminin, geleneksel zeytin fermentasyonu işlemindeki spontan kolonizasyonda, yabancı tipdeki *Lactobacillus plantarum* strainlerinin ekolojik bir avantaja sahip olduğunu ortaya çıkarmaktadır.

Raccach ve Baker (1978) iki ticari et starter kültürü olarak *Pediococcus cerevisiae* ve *Lactobacillus plantarum* ile in vitro olarak H_2O_2 üretimini çalışmışlar ve $0.85 \mu g H_2O_2/10^5$ hücre maksimum seviyesini bulmuşlardır. Bu değer antimikrobiyal aktivite için yeterince yüksek olmadığını düşünerek, deneyin gerçekleştirildiği koşullarda et starter kültürlerinin H_2O_2 üretme ve biriktirme yeteneğinde olmadığı sonucuna varmışlardır.

Yoğurt sanayiinde kullanılan ticari kültürlerde yer alan bakterilerin özgül fajları ile enfekte olmaları kendilerinin lizisi ile sonuçlanmaktadır. Bu süreç, kültürün asit oluşturmasını yavaşlattığı gibi, ürünün tat ve aromasının bozulmasına, viskozitesinin değişmesine neden olmaktadır. Büyük faj ataklarında işletme uzun süren ekonomik sıkıntılarla karşı karşıya kalabilmektedir (Fayard ve ark., 1993).

1.4. Laktik Asit Bakterilerinin Sağlık Alanında Kullanımı

1.4.1. Probiyotikler ve Prebiyotikler

Laktik asit bakterileri, probiyotik kullanımda da son derece önem kazanmaktadır (Çizelge 1.4.1.). Probiyotik bakteriler, insan bağırsağında canlılığını koruyabilen ve çoğalabilen, bağırsaklarda sindirime yardımcı olabilen ve bağırsak mikroflorasının dengesini koruyabilen, insan sağlığına yararlı laktik asit bakterileridir (Turgut ve Çakmakçı, 2003; Vural ve Çelen, 2003).

Prebiyotikler ise, bağırsaktaki sindirime yardımcı, besin emilimini olumlu yönde etkileyen ve bağışıklık sistemini güçlendiren faydalı mikrofloranın (örneğin, Bifidobakteriler ve laktik asit bakterileri gibi) gelişimini ve/veya aktivitesini düzenleyerek patojen mikroorganizmaların gelişimini inhibe eden, kendileri sindirime uğramayan gıda ingrediyenleridir. Fruktooligosakkaritler, galaktooligosakkaritler, izomaltooligosakkaritler, ksilooligosakkaritler, gentiooligosakkaritler ve dirençli nişasta prebiyotik

özellik gösteren gıda bileşenleri arasındadır (Can ve Özçelik, 2003; Akalın ve ark., 2000; Apan, 2000).

Çizelge 1.4.1. Probiyotik Olarak Kullanılan Laktik Asit Bakterileri (Baele ve ark., 2002; Çelen ve ark., 1999)

Lactobacillus	<i>Lb. lactis</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. cellebiosus</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. johnsonii</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. crispatus</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. salivarius</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. gasseri</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>Pd. cerevisiae</i> , <i>Pd. acidilactici</i> , <i>Pd. pentosaceus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>St. cremoris</i> , <i>St. thermophilus</i> , <i>St. intermedius</i> , <i>St. diacetylactis</i> , <i>St. lactis</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Leu. mesenteroides</i>

Son yıllarda artan geçim sıkıntısı, olumsuz çevre şartları, kontrolsüz ve sağlıksız gıdaların kullanılmasıyla insan hayatı risk altındadır. Özellikle kontrolsüz kullanılan birçok antibiyotik ve ilaçlar organizmada mevcut mikrofloradaki dengeyi bozduğu gibi, onarılması güç hastalıklara neden olmaktadır. Örneğin, patojen bakteriler florada dominant duruma geçerek bağırsak, böbrek ve vajinada enfeksiyonlara neden olmaktadır. Probiyotikler, özellikle organizmada, gerek sağlıklı bir gelişme gerekse hastalıkların tedavisinde antibiyotiklerin yerine, doğal biyolojik ürünleri destekleyici alternatif ürünler olarak kullanılabilir. Bu sayede, mikroflorada stabilite sağlandığı gibi, dışarıdan alınan diğer maddelerin (ilaç, antibiyotik vb.) olumsuz etkilerinin de önüne geçilmiş olmaktadır. Laktik asit bakterilerinin, hiper-kolesteromi, gastrointestinal hastalıkların tedavisi, prokanserojenik enzimlerin baskılanması, bazı besinlerden kaynaklanan alerjilerin önlenmesi gibi özelliklerinden dolayı, probiyotik olarak kullanımda önemini arttırmıştır. Probiyotik bakteriler, doğal florayı geliştirdiği gibi, organizmanın immün sisteminde uyarıcı bir etki yaparak, tümörlerin oluşma sıklığını da azaltmaktadırlar. Laktik asit bakterilerinden *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus* suşlarının makrofaj aktivasyonunu arttırdıkları belirlenmiştir. Probiyotik etkili laktik asit bakterilerinin hücre duvarında bulunan peptidoglikan ve polisakaritlerin, nitrozamin gibi kanserojen etkili maddelerle kimyasal bağlar oluşturarak, onları etkisiz hale getirdikleri

bildirilmektedir (Prosod, 1998; Kimmet, 1998; Çelen ve ark., 1999; Çakmakçı ve ark., 2000; Yıldırım ve ark., 2003; Gürsel, 1999).

Laktik asit bakterileri sağlıklı kişilerin barsak sisteminde, süt ürünleri ve sebze materyalinde bulunmaktadır. Ayrıca, sağlıklı kadınların vajinasında dominant olarak bulunmakta ve patojen mikroorganizmalara karşı mikrobiyolojik bir bariyer görevi görmektedir. Vajina yaş, sigara kullanımı, hamilelik, menopoz, antibiyotik ve antifungal kullanımına bağlı olarak mikroflora içeriği değişmekte, dolayısıyla *Lactobacillus*'un vajinadaki oranı düşmekte ve buna bağlı olarak vajinal enfeksiyonlar oluşmaktadır. *Lactobacillus* suşlarının vajinada azalmasıyla, vajina enfeksiyonlarından sorumlu olan *Gardnerella vaginalis*'de artış meydana gelmektedir (Charteris ve ark., 1997; Ocana ve ark., 1999).

Nemcova (1997) tarafından, probiyotik olarak kullanılması ön görülen mikroorganizmaların uygulanacak konak için uygun olup olmadığı test edilerek belirlenmiştir.

Burada önem kazanan başlıca kriterler şunlar olmaktadır:

- mikroorganizmanın konağa tutunma özelliğinin belirlenmesi
- metabolizması sonucu oluşan maddelerin konağa zararının incelenmesi
- ürün içinde bulunan diğer mikroorganizmalarla olan ilişkisinin tespiti
- konağa uyum sağlama
- çoğalma hızı

Ülkemizde çok yaygın olmamakla birlikte, moleküler teknikler ve PCR ile probiyotik ürünlerin floradaki mikroorganizmalar üzerine etkisinin ayrıntılı analizi yapılabilmektedir (Güvener, 1999).

Fermente ürünlerinin sağlık açısından önemi yüzyıllardır bilinmektedir. 16 yy.'da rahatsızlanan Fransa Kralı I. Fransuva'nın uygulanan hiçbir tedavi yöntemiyle iyileşemediği, ancak bir Türk doktorunun uyguladığı bir çeşit yoğurt kürü ile sağlığına tekrar kavuşabildiği literatürlerde geçmektedir. 1903 yılında "yaşlanmadan uzun ömürlülük" teorisi ile Nobel ödülü alan Rus Biyolog Elie Metchnikoff günlük diyetlerinin düzenli bir parçası olarak yoğurt yiyen Bulgarların fark edilir derecede uzun ömürlü oldukları ve bundan yola çıkarak,

laktik asit bakterilerinin ömrü uzattıkları yolundaki teorisini ortaya koymuştur. O günlerde, bağırsak sistemindeki zararlı bakterilerin sayısının, laktik asit bakterileri enjeksiyonu ile azaltılabileceği teorisi, insanlarda bir duyarlılık yaratmış ve bunun bir sonucu olarak yoğurt, tüm dünyada popüler bir besin durumuna gelmiştir (Fuller, 1989).

Bazı araştırmacılar tarafından, probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların çok önemli viral ve bakteriyal hastalıkların tedavisinde veya bu hastalıklardan koruma amaçlı olarak kullanılabilmesi bildirilmiş ve buna bağlı olarak, bu mikroorganizmaların bazı özelliklere sahip olması gerekliliği vurgulanmıştır (Ocana ve ark., 1999; Yıldırım ve ark., 2000b; Yılsay ve ark., 2000).

Bu özellikler şunlar olmalıdır:

- Antimikrobiyal madde üretimi olmalıdır.
- İnsan sağlığında çeşitli nedenlerden dolayı kullanılan antibiyotiklere ve antifungal ilaçlara karşı dirençli olmalıdır.
- Antikanserojenik aktivite göstermelidirler.
- Ekzopolisakkarit (EPS) üretmelidir.
- Bulunduğu hücelere tutunabilmeli ve dominant olarak kolonize olmalıdır.
- Sabit olmalı ve çeşitli olumsuz dış etkenlere karşı yerini koruyabilmelidir.
- Güvenilir olmalıdır, insanda ve hayvanda bulunduğu yerde hastalık etkeni olmamalıdır.
- Kolay ve hızlı üreyebilmelidir.
- Doğum kontrolü amacıyla kullanılan sperm öldürücü ajanlara karşı dirençli olmalıdırlar.
- Düşük pH ve organik asitlere dirençli olmalı ve bağırsakta yaşayabilmelidir.
- Patojen olmamalı ve toksik madde üretmemelidir.
- Anaerobik ortamda canlılıklarını sürdürebilmelidirler.
- Kanserojenik ve patojenik bakterilere karşı antagonistik etkileri olmalıdır.
- Karışık bakterilerin hazırlanmasına uygun olmalıdırlar.
- Otoagregasyon ve koagregasyon özelliği göstermelidirler.

➤Bakteri üretim ve depolama aşamalarında canlılığını ve aktivitelerini koruyabilmelidirler.

1.5. Laktik Asit Bakterilerinde Yüzey Uzantıları

Laktik asit bakterilerinde tutunma işlevi hem epitel hücrelerinde, hem de bakteri üzerinde bulunan reseptör aracılığıyla sağlanmaktadır (Nemcova, 1997). Tutunma sırasında, bakteri konsantrasyonu son derece önem kazanmaktadır (Toumola ve Salminen, 1998).

Konsantrasyonun yanısıra, bakteriyel büyüklük de çok önemlidir. Buna göre, boyutu küçük olan bakteriler, büyük olanlara nazaran daha iyi tutunma özelliği göstermekte ve buna bağlı olarak da, epitel hücrelerine zararlı mikroorganizmaların tutunması daha iyi engellenmiş olmaktadır (Charteris ve ark., 1997).

1.6. Laktik Asit Bakterilerinde Agregasyon, Koagregasyon ve Otoagregasyon

Laktik asit bakterilerinin bir diğer önemli özelliği agregasyon, koagregasyon ve otoagregasyon özelliğine sahip olmasıdır. Agregasyon kelime anlamı olarak toplanma, bir araya gelme ve kümeleşme olarak tanımlanmaktadır. Agregasyon özelliği sayesinde, laktik asit bakterileri buldukları yüzeye ve birbirlerine yapışarak biyolojik bir bariyer meydana getirmektedirler.

Koagregasyon, farklı iki türe ait mikroorganizmanın birbiriyle tutunması olarak tanımlanabilmektedir (Roos ve ark., 1999). Sağlıklı bir floranın elde edilmesi ve korunmasında koagregasyon oldukça önemlidir. Koagregasyon özelliği sayesinde laktik asit bakterileri, bulunduğu ekosisteme giren patojen mikroorganizmalara yapışarak, onları etkisiz hale getirmekte, olası bir enfeksiyonu ve mikroorganizmanın toksik etkisini engelleyebilmektedirler (Mastromarino ve ark., 2002).

Boris ve arkadaşları (1997) normal ürogenital mikroflorada dengenin korunmasıyla, patojen bakterilerin bulunmaması arasında ilişki olabileceğini açıklamışlardır. Belirli *Lactobacillus* türlerinin koagregasyon mekanizmasıyla

üropatojenlerle rekabet içerisinde girdiği belirlenmiş, *Lactobacillus*'ların agregasyon ve koagregasyonla ilgili *Escherichia coli*'de çalışmalar yapılmıştır.

Buna göre, laktik asit bakterilerinin agregasyon aktiviteleri ile ürogenital bölgenin korunmasına yardımcı olacağı gibi, koagregasyon mekanizmaları ile de patojen *E. coli*'leri inhibe edebileceklerini bildirmişlerdir.

Yine Boris ve ark. (1997) agregasyon aktivitesinden aggregation promoting factor (APF) denilen ve hücre dışına salınan protein yapısındaki bir maddenin sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Proteinaz K ile muamele edildiğinde ise, bu özelliğin kaybolduğunu ileri sürmüşlerdir.

Otoagregasyon ise, aynı türe ait mikroorganizmaların birbirleriyle tutunarak oluşturdukları hücre kolonileri olarak tanımlanmaktadır. Birçok mikroorganizma türünde de otoagregasyona rastlamak mümkündür (Roos ve ark., 1999).

1.7. Laktik Asit Bakterilerinde Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi

Ekzopolisakkaritler, uzun zincirli polisakkaritlerdir. EPS'nin fiziksel karakteristikleri birçok mikroorganizmanın mukoid özelliği için sorumludurlar. Gıda endüstrisinde yoğunlaştırma ve jelleştirme amacıyla deniz yosunları ve bitkilerden gelen polisakkaritler kullanılmaktadır. Çoğu laktik asit bakterisi asidifikasyon, şeker metabolizmasının meydana gelmesi, mikrobiyal kontaminasyona ilave olan sınırlayıcılar gibi koruyucu etkilerinden dolayı, rutin olarak gıda hazırlamada kullanılmaktadır. Laktik asit bakterilerinin, ekzopolisakkaritleri (EPS) ürettikleri de bilinmektedir. EPS'ler yoğunlaştırıcı özellik sağlar ve aynı zamanda süt ürünlerinin yapısını geliştirmek için üzerinde durulan önemli bir faktördür (Faber ve ark., 2001a; Jolly ve Stingele, 2001; Hugenholtz ve ark., 2000; Marshal ve ark., 2001).

EPS üretiminde besiyeri ortamı ve pH son derece önemlidir. Optimum pH ise, organizmanın kendisine özgüdür. EPS üretimi logaritmik faz süresince meydana gelmektedir (Laws ve ark., 2001). Gıda üretiminde kullanımına ek olarak, EPS'lerin sağlık yararlarına ait raporlar da vardır ve özellikle bakteriyel EPS'lerin bağışıklık uyarıcı özelliklerine dikkat çekilmektedir. EPS'nin artan

üretimi, genetik manipülasyonlar veya mikrobiyal fizyolojinin kontrolü hakkında bilgi vermektedir. EPS biyosentezine giren karbon metabolizması değişkendir. Vuyst ve Degeest (1999) son zamanlarda mikrobiyal fizyolojinin EPS üretimi üzerinde sahip olduğu etkiyi göstermişlerdir.

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'ler, yeni ürünlerin gelişimi için önemli polimerlerdir. Son yıllarda, EPS'nin insan sağlığını koruma özelliği, antitümör, antiülser ya da kolesterol düşürücü özellikleri nedeniyle üzerinde yoğun olarak çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. EPS üretimi türden türe farklılık göstermektedir. Hatta suşlar arasında bile farklılık görülmektedir. Mikroorganizmaların salgıladıkları EPS molekülleri, fagositoz ve faj ataklarına, antibiyotiklere, toksik maddelere, ozmotik strese karşı hücreleri korumaktadır (Cerning ve Bouillanne, 1992; Nagaoka ve ark., 1994; Nakajima ve ark., 1992).

Prensip, genetik manipülasyonlar biyosentetik yollar içinde geçen enzimlerin herhangi birinin aktivitesini değiştirmekte kullanılabilir. EPS üretimini optimize etmek için, enzim katalizleme transformasyonlarının her birindeki metabolizma akışının detaylı bilgisi gereklidir. Laktik asit bakterileri gıda işleme endüstrisinde kullanılmak üzere, polisakkaritlerin sentezi için hücre faktörleri olarak kullanılmaktadırlar (Laws ve ark., 2001).

Laktik asit bakterilerinin fizyolojik aktiviteleri arasında genellikle birlikte oldukları diğer mikroorganizmalara karşı antagonistik aktiviteye sahip spesifik maddeler (inhibitör) üretme yetenekleri de vardır. Bunlardan bakteriyosinler, patojen mikroorganizmalara karşı insanı, bilmeden uzun zamandan beri koruyan inhibitör maddelerin yalnızca bir grubudur. Bunlar özellikle sindirim sisteminde mikroorganizmalar arasında dengenin kurulmasında ve fermente ürünlerin saklanmasında görev almaktadırlar. Bu bakımdan laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretme yeteneklerinin gelecekte biyoteknoloji alanında önemli teknolojik ve bilimsel yarar sağlayacağı açıkça görülmektedir (Kılıç, 2001).

Birçok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarda yoğurt bakterilerinin oluşturdukları laktik asidin antibakteriyal etkinliği sayesinde *Salmonella*, *Staphylococcus* ve *Pseudomonas* genuslarına ait türlerin gelişme ve aktivitelerinin sınırlandırıldığı veya durdurulduğu bildirilmiştir (Toksoy ve Beyatlı, 1999).

Bakteriyal polisakkaritlerin varlığı ve rolleri ilk olarak tıbbi incelemelerde ortaya konmuştur. Ancak EPS'lerin varlığı yalnızca virulent karakterli bakterilere özgü değildir. Günümüzde birçok fermente ürünün yapımında kullanılan mezofilik laktik bakterinin hücre dışı ve heteropolisakkarit ürettikleri bilinmektedir. Bunlar, örneğin süt ürünlerinde istenen dokunun oluşumunda önemli görev üstlenmektedirler. Bu maddelerin hepsi nötr özellikte olup, yapılarında galaktoz, glikoz başta olmak üzere az miktarlarda ramnoz, mannoz, pentoz bulunmaktadır. Oluşan polisakkarit miktarı ile ortamın viskozitesi arasında karmaşık bir ilişki görülmektedir (Kılıç, 2001).

Yoğurt ve kıvam istenen fermente süt içeceklerinin yapımında asitlik, aroma oluşumu, proteolitik aktivite ve probiyotik özellikleri yanısıra ekzopolisakkarit üreten bakterilerin kullanımına önem verilmelidir.

Ayrıca, karıştırılarak hazırlanan aromalı, meyveli gibi benzer yoğurtların ve süt içeceklerinin yapımı sırasında uygulanan mekanik işlemlerle bozulan dokunun sağlanması için kimyasal kökenli maddelerden yararlanılmaktadır. Son yıllarda, laktik asit bakterilerinin koyulaştırıcı suşlarından yararlanma yoluna gidilmektedir. Bu suşlar ile yoğurt ve fermente süt üretimi yapılmaktadır. Ayrıca bazı araştırmacılar, antitümör etkinliğinin bir *Lactobacillus* ve bir *Streptococcus* tarafından üretilen polisakkarite bağlandığını da bildirmişlerdir (Kılıç, 2001).

EPS'ler petrol işleme, tekstil, kağıt endüstrisi, ilaç ve kozmetik endüstrisinde de kullanılmaktadır. Dekstranlar tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır. Dekstransülfatlar kandaki yağ oranını ayarlayıcı, pıhtılaşmayı ve ülser önleyici özelliğe sahiptir. Dekstran-demir kompleksi anemi olaylarında, dekstran-kalsiyum kompleksi hayvancılıkta hipokalsemi tedavisinde kullanılmaktadır (Doco ve Didici, 1990).

Son yıllarda, tüketicilerin doğal ürünlere yönelmesi ve doğal ürünlerin tercih edilmesi nedeniyle, EPS üretimine sahip suşların koyulaştırıcı özelliği kimyasal kökenlere alternatif olarak ortaya çıkmakta ve önemleri daha da artmaktadır (Faber ve ark., 2001b).

Saf kültür kullanımının yaygın olduğu ülkelerde süt ürünlerinin yapımı sırasında faj bulaşmalarına zaman zaman rastlanmış ve bunların işletme ve

fabrikalarda önemli sorunlar yarattığı görülmüştür. Bu bakımdan süt endüstrisinde fajlara dirençli suşların kullanımı önem kazanmaktadır.

1.8. Laktik Asit Bakterilerinde Plazmid DNA

Plazmidler, pek çok bakteri türünde rastlanılan, ancak her suşta bulunmayan halkasal, ekstrakromozomal DNA molekülleridir. Plazmidler küçük moleküller olup, bu açıdan bir karşılaştırma yapılacak olursa; bakteriyal kromozomun % 4-20 arasındaki büyüklüklerde oldukları görülmektedir. Plazmidler, kromozomal DNA'dan bağımsız olarak ayrılabilen, bağımsız elementlerdir. Bakteri plazmidleri, genellikle her bir iplik içinde kovalent olarak bağlanmış çift sarmallı DNA (dsDNA) molekülleridir. Bunun tek istisnası, *Borrelia* spp. ve *Streptomyces* spp.'dir. Plazmidler, hücre yaşamı için zorunlu olması gereken yapılar değildir. Bununla birlikte, plazmidler pek çok bakterinin bazı özel koşullara uyum sağlamasına olanak sağlayan genetik bilgileri içermektedir (Kıvanç, 2002; Güven, 2002; Wang ve Lee, 1997).

Örneğin; antibiyotiklere karşı dirençlilik özelliği kazandıran R (resistant) plazmidine sahip bakteriler, aynı plazmidi taşımayan bakterilerin yaşayamadığı antibiyotik içeren ortamlarda gelişebilmekte ve bu şekilde diğerlerinden ayrılabilirler (Wang ve Lee, 1997).

Bakterilerde bulunan plazmidler, sahip oldukları genetik bilgiler ve özellikle de rekombinant DNA teknolojisinin uygulanmasında üstlendikleri görevler açısından moleküler biyoloji çalışmalarının önemli bir konusu haline gelmiştir. Laktik asit bakterileri plazmidlerinin önemi ise, daha çok bu gruptaki bakterilerin moleküler biyoloji alanında yeni araştırılmaya başlanmasından kaynaklanmaktadır. Bakterilerde plazmid varlığının saptanması ve karakterizasyonunun yapılması, incelenen bakteride gen izolasyonları ve suş düzeyinde modifikasyonların araştırılması açısından önemlidir (Wang ve Lee, 1997).

Beyatlı (1994) laktik asit bakterilerinden endüstriyel suş geliştirme programlarında, plazmidlerin önemli yere sahip olduğunu belirtmiştir (Çizelge 1.8.). Yine Beyatlı, yapılan çalışmaların *S. cremoris* suşlarında laktozun

katabolizmasında rol oynayan fosfotransferaz sistemi ve fosfo- β -galaktozidaz enzimlerinin, plazmid genleri tarafından kontrol edildiğini açıklamıştır.

Laktik asit bakteri türlerinin birçoğunun birkaç tane plazmid içerdiği bilinmektedir. Bir gruptaki bakterilerin; bakteriyosin üretimi, laktoz, aminoasit, sitrat metabolizması ve antibiyotiklere karşı direnç gibi önemli bazı özellikleri genellikle bu ekstrakromozomal DNA tarafından belirlenmektedir (Ruiz-Barba ve ark., 1991).

Çizelge 1.8. Laktik Asit Bakterilerinde Tespit Edilen Bazı Plazmidler (Beyatlı, 1994)

Bakteri	Plazmid	Spesifik Görevi	Hacim (M/dal)
<i>St. lactis</i> suşları	Lac.	Laktozu parçalama	30, 32, 33
		Protein parçalama	5, 12, 18
		Sakkaroz fermentasyonu	28
		Nisin üretimi	
		Kanamisin dirençlilik	
<i>St. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> suşları	Lac.	Laktozu parçalama	32, 41, 52
	Cit.	Sitrata parçalama	5.5
<i>St. cremoris</i> suşları	Lac. Prt.	Laktozu parçalama	34, 37, 42
		Protein parçalama	9, 14, 16
		Bakteriyosin üretimi	48
		Bakıra dirençlilik	40 6.1
<i>Lb. helveticus</i> subsp. <i>jugurti</i>	Lac.	Laktozu parçalama	8.2
<i>Lb. casei</i> suşları	Lac.	Laktozu parçalama	21, 33
<i>St. thermophilus</i>	5 adet	Laktozu parçalama	1.4, 2.2

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Fermente Ürün Örneklerinin Temini ve Laboratuvara Getirilmesi

Çalışmamızda kullanılan turşu, zeytin, sucuk, kefir, maya, tarhana, yoğurt ve bozaya ait fermente ürün örnekleri Eskişehir, Söğüt (Bilecik), İnönü (Eskişehir), Ankara, Mersin, Edremit (Balıkesir) ve çevresindeki piyasa ve evlerden temin edilmiştir. Fermentasyonu bitmiş ya da devam eden türünler daha önceden 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavlanmış steril kavanozlar içerisine alınmıştır. Bu örneklerin alımı sırasında aseptik çalışmaya özen gösterilmiş olup, + 4 °C'de laboratuvara getirilerek aynı gün analize alınmıştır.

2.1.2. Test Mikroorganizmaları

Çalışmamızda kullanılan test mikroorganizmaları (Çizelge 2.1.2.) uzun süreli olarak -85 °C'de % 20'lik gliserolde, kısa süreli olarak ise + 4 °C'de nutrient broth içerisinde saklanmıştır.

Çizelge 2.1.2. Test Mikroorganizmaları

Mikroorganizma	Kültürün Temin Edildiği Yer	Optimum Gelişme Sıcaklığı
<i>Bacillus cereus</i> NRRL B-3711	Anadolu Üniv. Fen Fak.	30 °C
<i>Staphylococcus aureus</i> NRRL B-767	Anadolu Üniv. Fen Fak.	30 °C
<i>Salmonella typhimurium</i> NRRL B-4420	Anadolu Üniv. Fen Fak.	37 °C
<i>Escherichia coli</i> NRRL B-3704	Anadolu Üniv. Fen Fak.	37 °C
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Ankara Üniv. Veteriner Fak.	37 °C
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ankara Üniv. Veteriner Fak.	30 °C
<i>Proteus vulgaris</i> NRRL B-123	Anadolu Üniv. Fen Fak.	37 °C
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ankara Üniv. Veteriner Fak.	30 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NRRL B-23	Anadolu Üniv. Fen Fak.	30 °C
<i>Streptococcus faecalis</i> NRRL B-14617	Anadolu Üniv. Fen Fak.	37 °C

Çizelge 2.1.2. (Devam) Test Mikroorganizmaları

<i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-744	Anadolu Üniv. Fen Fak.	30 °C
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Ankara Üniv. Veteriner Fak.	37 °C

2.1.3. Besiyerleri ve Tampon Çözeltiler

2.1.3.1. MRS Broth

Pepton	10 gr.
Lab-lemco powder	10 gr.
Yeast ekstrakt	5 gr.
Glikoz	20 gr.
Sodyum asetat.3H ₂ O	5 gr.
K ₂ HPO ₄	2 gr.
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 gr.
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.005 gr.
Tween 80	1 ml.
Distile su	1000 ml.

Hazırlandıktan sonra pH 6.2±0.2'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirilmiştir (Yaygın ve Kılıç, 1993).

2.1.3.2. MRS Agar

Pepton	10 gr.
Lab-lemco powder	10 gr.
Yeast ekstrakt	5 gr.
Glikoz	20 gr.
Sodyum asetat.3H ₂ O	5 gr.
K ₂ HPO ₄	2 gr.
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 gr.
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.005 gr.

MnSO ₄ .4H ₂ O	0.005 gr.
Tween 80	1 ml.
Agar	15 gr.
Distile su	1000 ml.

Hazırlandıktan sonra pH 6.2±0.2'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirilmiştir (Yaygın ve Kılıç, 1993).

2.1.3.3. Nutrient Broth

Beef ekstrat	3 gr.
Pepton	5 gr.
Distile su	1000 ml.

İyice çözüldürüldükten sonra pH 6.8±0.2'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirilmiştir (Difco Manual, 1984).

2.1.3.4. Nutrient Agar

Beef ekstrat	3 gr.
Pepton	5 gr.
Agar	15 gr.
Distile su	1000 ml.

Hazırlandıktan sonra pH 6.8±0.2'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirilmiştir (Difco Manual, 1984).

2.1.3.5. Skim Milk

Skim milk	10 gr.
Distile su	100 ml.

Hazırlandıktan sonra 110 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril hale getirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

2.1.3.6. Litmus Milk Ortamı

Litmus milk	105 gr.
Distile su	1000 ml.

İyice çözüldürüldükten sonra 110 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

2.1.3.7. Arjinin Dihidrolaz Broth (Thornley Ortamı)

Pepton	1 gr.
NaCl	5 gr.
K ₂ HPO ₄	0.3 gr.
Agar	3 gr.
Fenol red	0.01 gr.
L-Arginin HCl	10 gr.
Distile su	1000 ml.

İyice çözüldürüldükten sonra pH 7.2±0.2'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

2.1.3.8. TSI Agar (Triple Sugar Iron Agar)

Beef Ekstrakt	3 gr.
Yeast Ekstrakt	3 gr.
Pepton	15 gr.
Proteaz pepton	5 gr.
Laktoz	10 gr.
Sakkaroz	10 gr.

Dekstroz	1 gr.
FeSO ₄	0.2 gr.
NaCl	5 gr.
Sodyum Tiyosülfat	0.3 gr.
Agar	12 gr.
Fenol red	0.024 gr.
Distile su	1000 ml.

İyice çözüldürüldükten sonra pH 7.4±0.2'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

2.1.3.9. MR-VP Broth

Pepton	7 gr.
Glikoz	5 gr.
K ₂ HPO ₄	5 gr.
Distile su	1000 ml.

İyice çözüldürüldükten sonra pH 6.9±0.2'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirilmiştir (Tamer ve ark., 1989; İlhan, 1999).

2.1.3.10. 0,1 N NaOH Çözeltisi

0.4 gr. NaOH 100 ml. distile su içerisinde iyice çözüldürülerek hazırlanmıştır (Mumcu, 1997).

2.1.3.11. 1 N H₂SO₄ Çözeltisi

95 ml. distile su üzerine, 5 ml. H₂SO₄ kontrollü bir şekilde yavaş yavaş ilave edilerek hazırlanmıştır (Mumcu, 1997).

2.1.3.12. α -Naftol Çözeltisi

5 gr. α -naftol 100 ml. %95'lik etil alkol içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır. Bu çözelti kullanılacağı zaman taze olarak hazırlanmıştır (Tamer ve ark., 1989; İlhan, 1999).

2.1.3.13. % 40'lık NaOH Çözeltisi

40 gr. KOH 75 ml. distile suda çözündürülerek solusyon bir süre oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 0.3 gr. kreatin ilave edilerek iyice çözündürüldü ve 25 ml. distile su ilave edilerek hazırlanmıştır (Tamer ve ark., 1989; İlhan, 1999).

2.1.3.14. Fenol Fitalein İndikatörü

2 gr. fenol fitalein 100 ml. % 95'lik etil alkol içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır. Bu çözelti kullanılacağı zaman taze olarak hazırlanmıştır (Mumcu, 1997).

2.1.3.15. Amonyum Molibden Çözeltisi

0.12 gr. amonyum molibdenin 100 ml. distile su içerisinde çözündürülmesi ile hazırlanmıştır (Mumcu, 1997).

2.1.3.16. Potasyum İyodür Çözeltisi

16.6 gr. potasyum iyodür (KI) 100 ml. distile suda çözündürülerek hazırlanmıştır. Çözelti kullanılacağı zaman taze olarak hazırlanmıştır (Mumcu, 1997).

2.1.3.17. 0,72 N TCA (Trikloro Asetik Asit) Çözeltisi

59 gr. TCA 500 ml. distile su içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır (Mumcu, 1997).

2.1.3.18. $\text{Na}_2\text{CO}_3.\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ Çözeltisi

75 gr. Na_2CO_3 ve 10 gr. $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 500 ml. distile su içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır (Aslım, 1994).

2.1.3.19. Laktik Asit Aktivitesinin Tespiti İçin Standart Çözelti

1, 3, 8, 10, 12, 16 mg/ml. olacak şekilde saf laktik asitten 25 ml.'lik steril skim milk besiyerine ilave edilerek hazırlanmıştır (Aslım, 1994).

2.1.3.20. Hidrojen Peroksit Tespiti İçin Standart Çözelti

0.1 ml. (% 35) hidrojen peroksit alınıp, 29.9 ml.'ye distile su ile tamamlanır. Bu çözümden de 1 ml. alınıp, tekrar 30 ml.'ye distile su ile tamamlanarak hazırlanmıştır (Mumcu, 1997).

2.1.3.21. Proteolitik Aktivite İçin Standart Çözelti

0.02 : 0.2 : 0.4 : 0.6 : 0.8 : 1 mg tirozin/ml. olacak şekilde tirozin standart çözeltisinden 5 ml.'lik steril skim milk besiyerine ilave edilerek hazırlanmıştır (Aslım, 1994).

2.1.3.22. STE Tamponu

NaOH	1 M
Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM

Distile su 1000 ml.

İyice çözüldürüldükten sonra pH 6.0 ± 0.2 'ye ayarlanmış ve $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirilmiştir (Çataloluk, 2003).

2.1.3.23. TE Tamponu

Tris-HCl 10 mM
EDTA 1 mM
Distile su 1000 ml.

İyice çözüldürüldükten sonra pH 8.0 ± 0.2 'ye ayarlanmış ve $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirilmiştir (Çataloluk, 2003).

2.2. Metot

2.2.1. Fermente Ürünlerden Laktik Asit Bakterilerin İzolasyonu

Laktik asit bakterilerinin doğal olarak buldukları ortamlardan izole edilip saf kültürlerinin elde edilmesi sırasında MRS agar, MRS broth, Elliker broth, M17 agar, APT agar gibi çeşitli besi ortamlarından yararlanılmaktadır. Özellikle MRS agar ve MRS broth son derece yüksek bir besleyici özelliğe sahip genel bir besiyeri olup, saflaştırma aşamasında ise MRS agar besiyeri kullanılmaktadır.

Evlerden ve piyasadan temin edilen fermente olmuş ürün örneklerinin steril fizyolojik tuzlu su ile 10^{-1} 'den 10^{-3} 'e kadar dilüsyonları hazırlanmıştır. Turşu suları için 10^{-1} ve 10^{-2} 'lik, turşu meyveleri için ise 10^{-2} ve 10^{-3} 'lük dilüsyonlar hazırlanmıştır.

Hazırlanan dilüsyonlar steril petrilere 0,5 ml. oranında homojen bir şekilde aktarılmış ve bunun üzerine $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulmuş MRS agar dökülerek

karıştırılmıştır. Daha sonra anaerobik jar içinde ve aerobik koşullarda 30 °C'deki etüve 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

Bu süre sonunda tek düşen ve birbirinden morfolojik olarak farklılık gösteren laktik asit bakterilerine ait (mat, krem rengi, küçük ve muntazam olmayan) koloniler seçilmiş olup, başka bir MRS agar içeren petrilere çizgi ekimi yöntemi ile yeniden ekilerek, izolatın saflığı tam olarak sağlandıktan sonra, 5 ml.'lik MRS brothlara inokule edilmiş ve 30 °C'de 18-24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

Daha sonra bu izolatlar (Gram boyama, katalaz testi, mikroskobik morfolojisi, Voges-Proskauer testi, arjininden amonyak oluşumu, karbonhidrat fermentasyon testleri, farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme, farklı sıcaklık ve pH'da gelişme gibi) identifikasyon testlerine tabi tutulmuştur.

Bu izolatlar uzun süreli olarak – 85 °C'de % 20'lik gliserolde, kısa süreli olarak ise + 4 °C'de litmuslu milk besiyerinde muhafaza edilmiştir (Kılıç, 2001; Yaygın ve Kılıç, 1993; Sneath ve ark.,1986; Schillinger ve Lücke 1987; Lewus ve ark., 1991; Maldonado ve ark., 2002).

2.2.2. Antibakteriyal Aktivite ve Bakteriyosin Aktivitesinin Tespiti

Fermente ürünlerden izole edilerek, identifikasyon testlerine tabi tutulan laktik asit bakterisi olduğu doğrulanan izolatların Çizelge 2.1.2.'de belirtilen test mikroorganizmalarına karşı antibakteriyal aktiviteleri sandvic overlay yöntemi ve agar difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir.

2.2.2.1. Sandvic Overlay Yöntemi

Laktik asit bakterilerine ait izolatlar MRS brotha aşılansarak, aerobik ve anaerobik koşullarda 30 °C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Gelişen izolatlar MRS agar besiyeri içeren petrilere 10 µl. damlatılarak 30 °C'de 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra aktifleştirilmiş olan test mikroorganizmalarının (Çizelge 2.1.2.) 8µl'si (ml'de yaklaşık 10⁷ hücre içeren) 5 ml yumuşak agar içeren tüplere inokule edilerek homojen hale gelinceye kadar

iyice karıştırılmış ve petrilere spotlanmış olan laktik asit izolatlarının üzerini kaplayacak şekilde petri yüzeyine dökülüp yayılması sağlanmıştır. Petriler test mikroorganizmalarının geliştiği optimum sıcaklığa göre 30 veya 37 °C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında eğer izolatin çevresinde bir zon oluşmuşsa, o izolatin teste tabi tutulan mikroorganizmaya karşı antibakteriyal etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır (Jimenez-Diaz ve ark., 1993).

2.2.2.2. Agar Difüzyon Yöntemi

Bakteriyosin aktivitesinin tespitinde kullanılacak olan patojen test mikroorganizmaları nutrient brotha aşılansarak 30-37 °C'de 24 saat süre ile inkübe edilip, aktif hale gelmesi sağlanmıştır. Bu süre sonunda, Mac-Farland 0.5 No'lu tüpe göre 10^6 bakteri/ml olacak şekilde steril petrilere aktif test mikroorganizmalarından 0.1 ml konulmuş ve üzerlerine 15 ml. 45 °C'ye kadar soğutulmuş nutrient agar besiyeri eklenerek homojen bir dağılım sağlanana kadar iyice karıştırılıp, soğumaya bırakılmıştır. Daha sonra petrilereki besiyerlerinin üzerinde 9 mm. çapında steril mantar delici ile çukurlar açılmıştır. Bu işlem sonrasında çukurların dipleri ince bir agar tabakası ile kaplanmış ve petriler + 4 °C'de 2 saat süre ile donmaya bırakılmıştır.

Antibakteriyal aktiviteleri tespit edilecek olan laktik asit bakterilerine ait izolatlar, aerobik ve anaerobik koşullarda 72 saat süre ile 30 °C'de inkübe edilmiş, bu süre sonunda izolatlar santrifüj tüplerine aktarılarak, + 4 °C'de, $12.000 \times g$ 'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant ikiye ayrılarak, bir kısmı kendi pH'sında bırakılmış, bir diğer kısmı ise 5 M NaOH ile pH'sı 7'ye ayarlanmıştır. Daha sonra bu süpernatantlar 0.22 µm çapındaki steril disposable filtrelerin kullanılmasıyla steril hale getirilmiştir. Sonrasında ise, steril hücresiz filtratlardan 100 µl. alınarak MRS agar üzerindeki çukurlara damlatılmıştır. Petriler bir süre oda sıcaklığında bekletilerek yumuşak nutrient agarın filtratı emmesi sağlanmıştır. Sonra bu petriler 24 saat süre ile 30-37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda çukurların etrafında oluşan zonlar ölçülmüştür. Kontroller çukurlara 100 µlt. steril MRS broth konularak yapılmıştır (Maldonado ve ark., 2002; Carminati ve ark., 1989)

2.2.3. İdentifikasyon Testleri

2.2.3.1. Gram Boyama

Christian Gram tarafından 1884 yılında geliştirilmiş diferansiyel bir boyama tekniği olan Gram boyama ile bakterilerin Gram reaksiyonu incelenmiştir. Litmuslu milk besiyerinde + 4 °C'de muhafaza edilmiş olan izolatlar, steril 10 ml. MRS agara çizgi ekimi yapılarak, aerobik ve anaerobik koşullarda 30 °C'de 24 saat süre ile aktive edilmiştir. Gram boyama işlemi, bu aktif kültürler ile yapılmıştır.

Katı besiyerindeki kültürden öze ile yaklaşık bir toplu iğne başı büyüklüğünde bir kısım alınarak, lam üzerine konulmuş bir damla su içerisinde emülsifiye edilip yüzeye öze ile yayılmıştır. Lam ilk olarak havada kurutulmuş, sonra bek alevinden 3 kez geçirilerek fiksasyon yapılmış ve soğutulmuştur. Preparat ilk önce kristal violet ile boyanarak 1 dakika beklenmiş ve fazla boya akıtılmıştır. Sonra iyot-lügol çözeltisi ile boyanarak 1 dakika beklemeye bırakılmıştır. Fazla boya akıtılarak, alkol ile 6 saniye muamele edilmiştir. Distile su ile alkol yıkanarak uzaklaştırılmış ve son olarak preparat safranin ile boyanarak 30 sn bekletilmiştir. Fazla boya distile su ile yıkanarak havada kendi halinde kurumaya bırakılmıştır. Preparata immersiyon yağı damlatıldıktan sonra 100'lük objektifle incelenmiştir. Mor renkli olan bakteriler Gram (+), pembe renkli olan bakteriler ise Gram (-) olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989; Akçelik ve ark., 1999).

2.2.3.2. Katalaz Testi

Litmuslu milk besiyerinde + 4 °C'de muhafaza edilmiş olan izolatlar, steril 10 ml. MRS broth içeren tüplere inokule edilerek, aerobik ve anaerobik koşullarda 30 °C'de 24 saat süre ile aktive edilmiştir. Bu aktif kültürler üzerine % 3 hidrojen peroksit (H₂O₂) damlatılarak gaz kabarcıklarının çıkıp çıkmadığı gözlenmiştir. Gaz kabarcığı görülen kültürler için test pozitif, gaz kabarcığı görülmeyen kültürler için ise test negatif olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

2.2.3.3. % 6.5, % 7.0 ve % 10.0 NaCl'de Gelişme

MRS brotha % 6.5, % 7.0 ve % 10.0 oranlarında NaCl ayrı ayrı olmak üzere ilave edilmiş, iyice çözündürüldükten sonra 10 ml. olacak şekilde tüplere paylaştırılmış ve 121 °C' de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 24 saatlik aktif kültürler besiyerlerine ekilmiştir. Ardından aerobik ve anaerobik koşullarda 30 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda bulanıklığın görüldüğü tüplerde test pozitif, bulanıklık olmayan tüplerde ise test negatif olarak değerlendirilmiştir (Sneath ve ark., 1986; Lewus ve ark., 1991).

2.2.3.4. 4, 8, 10, 15 ve 45 °C'de Gelişme

Litmuslu milk besiyerinde + 4 °C'de muhafaza edilmiş olan izolatlar steril 10 ml. MRS broth içeren tüplere inokule edilerek 4, 8, 10, 15, 45 °C'deki sıcaklıklarda aerobik ve anaerobik koşullarda 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bulanıklık görülen tüplerde üremenin olduğu kabul edilmiş ve test pozitif, üremenin görülmediği tüplerde ise test negatif olarak değerlendirilmiştir (Sneath ve ark., 1986; Lewus ve ark., 1991).

2.2.3.5. pH 3.9'da Gelişme

MRS broth hazırlanarak pH'sı 1N HCl ile 3.9'a ayarlanmıştır. Besiyeri 10 ml.'lik hacimlerde tüplere paylaştırılmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 24 saat'lik aktif kültürler besiyerlerine ekilmiştir. Sonrasında aerobik ve anaerobik koşullarda 30 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda bulanıklığın görüldüğü tüplerde test pozitif, bulanıklık olmayan tüplerde ise test negatif olarak değerlendirilmiştir (Sneath ve ark., 1986; Lewus ve ark., 1991).

2.2.3.6. Arjininden NH₃ Oluşumu

MRS brotha ekilerek 24 saat süre ile aktive edilmiş olan kültürler, arjinin dihidrolaz broth içeren kapaklı tüplere ekilmiş ve tüplerin ağzı sıkı bir şekilde kapatılmıştır. Tüpler aerobik ve anaerobik koşullarda 30 °C'de 7 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda eğer mikroorganizma arjinin dihidrolaz enzimine sahipse, oluşan alkali maddelerden dolayı besiyeri içindeki indikatörün rengi sarımsı-turuncudan kırmızıya dönmektedir. Kırmızı rengin görüldüğü tüplerde test pozitif olarak kaydedilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

2.2.3.7. H₂S Üretimi

MRS brotha ekilerek 24 saat süre ile aktive edilmiş olan kültürler, transfer iğnesi ile TSİ besiyerine dikine daldırma şeklinde ekilmiştir. Bütün tüpler aerobik ve anaerobik koşullarda 30 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda besiyerinde bir siyahlaşma görülen tüplerde o organizma için test pozitif kabul edilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

2.2.3.8. Voges-Proskauer Testi

MRS brotha ekilerek 24 saat süre ile aktive edilmiş olan kültürler, MR-VP broth içeren tüplere ekilerek, aerobik ve anaerobik koşullarda 30 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda tüpler üzerine 0.5 ml. α-naftol çözeltisinden ve daha sonra 0.5 ml. % 40'luk KOH çözeltisinden ilave edilerek çalkalanmış, 5-10 dakika sonra kırmızı renge doğru bir pembeleşme görülen tüpler pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

2.2.3.9. Karbonhidrat Fermentasyon Testleri

Karbonhidrat fermentasyon testleri arabinoz, sellobiyoz, eskulin, melibiyoz, ksiloz, trehaloz, gliserol, inulin, glikoz, mannitol, melezitoz, raffinoz,

salisin, ramnoz, riboz, galaktoz, glukonat, sorbitol, sukroz, maltoz, laktoz gibi karbonhidrat kaynakları kullanılmıştır.

Bu test için MRS broth besi ortamından karbonhidrat kaynağı olarak lab-lemco powder ve glikoz çıkarılmıştır. Testi yapılacak şeker besiyerine % 2 oranında ilave edilerek, 110 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Ayrıca besiyerine indikatör olarak % 0.04 oranında klorofenol red eklenmiştir. Hazırlanan besiyerine aktif kültürlerden % 1 oranında aşılandıktan sonra, aerobik anaerobik koşullarda yaklaşık bir hafta süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçta besiyerinin renginde herhangi bir değişimin varlığı kontrol edilmiştir. Sarı rengin olduğu tüplerde test pozitif, renk değişikliği olmayan tüplerde ise test negatif olarak değerlendirilmiştir (Lewus ve ark., 1991; Aslım, 1994).

2.2.4. Metabolik Ürünlerin Tespiti

Fermente ürünlerden izole edilerek, identifikasyon testlerine tabi tutulan laktik asit bakterisi olduğu doğrulanan izolatların metabolik ürünlerinden laktik asit ve hidrojen peroksit üretimi ile proteolitik aktivite tayinleri yapılmıştır.

2.2.4.1. Laktik Asit Miktarı

Laktik asit bakterilerine ait izolatlar aerobik ve anaerobik koşullarda 30 °C'de 24 saat süre ile inkübe edilerek aktif hale getirilmiştir. Daha sonra aktif suşlar, 110 °C'de 15 dakika otoklavlanmış 25 ml.'lik % 10 oranında skim milk içeren besiyerine % 2 oranında aşılanarak, aerobik ve anaerobik koşullarda 30 °C'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örneklerden 10 ml. alınıp, 90 ml. distile su içeren cam erlenlere aktarılmıştır. Üzerine 2-3 damla fenol fitalein indikatörü damlatılarak, 0.1 N NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Bakterilerin ürettiği laktik asit miktarı yüzde olarak aşağıdaki formülden hesaplanmıştır (Aslım, 1994).

% Asitlik Miktarı = $\frac{\text{Harcanan } 0.1 \text{ N NaOH (ml.)} \times 0.9}{\text{ml. örnek}}$

ml. örnek

2.2.4.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Üretiminin Tespiti

% 10'luk skim milk besiyeri hazırlanarak 30'ar ml. koyu renkli şişelere dağıtılıp, 110 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. MRS besiyerindeki laktik asit bakterilerine ait izolatlar, aerobik ve anaerobik koşullarda 30 °C'de 24 saat aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerden % 2 oranında, skim milk besiyerine inokule edilerek, aerobik ve anaerobik koşullarda 30 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, örnekler 30 ml.'ye distile su ile tamamlanarak, 5000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı kısım alınarak Whatman 42 filtre kağıdından karanlık bir ortamda süzölmüştür. Süzölen kısımdan 8'er ml alınarak, üzerlerine sırası ile 1 ml. sülfirik asit, 1 ml. amonyum molibden ve 1 ml. potasyum iyodür çözeltileri ilave edilerek karıştırılmış ve 350 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Hidrojen peroksit standardı hazırlamak için 0.1 ml. (%35) hidrojen peroksit alınıp, 29.9 ml.'ye saf su ile tamamlanmıştır. Metottaki işlem aynen uygulanarak, hidrojen peroksit standart kurve çıkarılmıştır. Standart kurveden 1 µg/ml hidrojen peroksit tekabül eden hidrojen peroksit değeri hesaplanmıştır. Ölçölen örnek değeri, standart hidrojen peroksit eğrisi ile karşılaştırılarak, bakterilerin oluşturduğu hidrojen peroksit üretimleri µg/ml olarak saptanmıştır (Mumcu, 1997).

2.2.4.3. Proteolitik Aktivitenin Tespiti

Proteolitik aktivitenin tespiti için, oluşan aminoasitlere eş değeri tirozin aminoasidi esas alınarak tespit edilmiştir.

Laktik asit bakterilerine ait kültürler MRS broth besiyerinde aktifleştirilmiştir. Daha sonra aktif suşlar, 110 °C'de 15 dakika otoklavlanmış 5 ml.'lik % 10 oranında skim milk içeren besiyerine % 1 oranında aşılınarak, aerobik ve anaerobik koşullarda 30 °C'de 42 saat süre ile inkübasyona

bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra örnek üzerine 1 ml. distile su ilave edilmiştir. Bunun üzerine de 10 ml. 0.72 N TCA (Trikloro asetik asit) ilave edilerek karıştırılmıştır. 10 dakika bekletildikten sonra örnekler Whatman 1 No'lu filtre kağıdı ile süzölmüşlerdir. Filtratlardan 5 ml. alınarak, üzerine 10 ml. $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ çözeltilisinden konup karıştırılmıştır. Bu işlem sonunda örnekler 4500 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda üstte kalan mavi berrak kısım alınarak spektrofotometrede 650 nm dalga boyunda ölçölmüştür.

0.02 : 0.2 : 0.4 : 0.6 : 0.8 : 1 mg tirozin/ml olacak şekilde tirozin standart çözeltilisinden 5 ml.'lik steril skim milk besiyerine ilave edilmiştir. Bu çözeltiler için de işlemler aynen uygulanmış ve bulunan değerlere göre standart kurve çıkarılmıştır. Suşlardan elde edilen değerler standart kurvede yerleştirilerek proteolitik aktivite miktarları hesaplanmıştır (Aslım, 1994).

2.2.5. Plazmid DNA İzolasyonu

Laktik asit bakterilerine ait izolatlar MRS broth besiyerinde aerobik ve anaerobik koşullarda 30⁰ C'de 24 saat süre ile inkübasyona bırakılarak aktif hale getirilmiştir. Bu süre sonunda aktif izolatlar, 100 ml.'lik MRS broth besiyerine % 1 oranında yeniden inokule edilerek, aerobik ve anaerobik koşullarda 30⁰ C'de 8-12 saat süre ile yeniden inkübasyona bırakılmıştır.

Hücreler 3000 x g'de 5 dakika süre ile 4⁰ C'de santrifüj edilerek süpernatant kısım atılmış ve pelletler 10'ar ml. STE tamponunda 2 kez yıkanarak % 20 oranında sukroz da içeren 5'er ml.'lik 50 mM Tris-HCl – 1 mM EDTA tamponunda yeniden süspanse hale getirilmiştir.

Bu solusyonlar tüplere alınıp, pH'sı 7.0'ye ayarlanmış ve her bir tüp gurubuna 0.0075 mg. lizozim eklenmiştir. 37⁰ C'de 7-15 dakika inkübe edilmiş inkübasyon sonrasında her tüpe 250 µl. fenol ve 250 µl. kloroform eklenerek çalkalayıcıda 5 dakika karıştırılmıştır. Ardından yine 5 dakika süre ile buz içine yerleştirilerek 13.000 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım tüp içlerine toplandıktan sonra % 95'lik alkol ve 3 M NaAc ile muamele edilmiştir. Plazmidler 14.000 x g'de 15 dakika santrifüj edilerek çökmesi sağlanmıştır. %

70'lik alkol ile yıkandıktan sonra, 1000 Bar'da 5 dakika vacuum chamber içinde kurutulmuştur. Bu işlem sonrasında plazmidler 50 µl. TE tamponu içinde yeniden süspanse haline getirilerek daha sonra kullanılmak üzere saklanmıştır.

Plazmidlerin gözlenmesi sırasında her bir tüpten 5 µl. örnek çekilerek EtBr'li (1 mg/ml.) 1 x TAE tamponunda % 0.7 agaroz jel üzerinde elektroforez edilmiştir (1 saat ve 100 V). Sonrasında ise, plazmidler jel dökümantasyon görüntüleme sisteminde gözlenmiştir (Çataloluk, 2003).

3. BULGULAR

3.1. Fermente Olmuş Ürünlerden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması

Fermente olmuş ürün örneklerinden izole edilen tipik laktik asit bakteri koloni özelliği (küçük, mat, krem renginde muntazam olmayan bir yapı) gösteren 260 izolattan 236 tanesinin antibakteriyal aktiviteye sahip olduğu ve bu antibakteriyal aktiviteye sahip bakterilerden de 33 tanesinin pH 7'de bakteriyosin aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu 260 izolatın 140 tanesi aerob, 120 tanesi anaerob koşullarda izole edilmiştir. Antibakteriyal aktivite gösteren 236 izolatın 129 tanesi aerob, 107 tanesi ise anaerob koşullarda izole edilen izolatlardır (Çizelge 3.2).

3.2. Sandvic Overlay Yönteminde Antibakteriyal Aktivite Gösteren Laktik Asit Bakterilerinin Sonuçları

Fermente ürünlerden izole edilen 260 tane laktik asit bakteri izolatından 236 tanesi sandvic overlay yönteminde test mikroorganizmalarına karşı antibakteriyal aktivite göstermiştir. Sonuçlar Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Buna göre; 236 tane laktik asit bakteri izolatınının 168 tanesi turşulardan (2 tanesi kornişondan, 7 tanesi lahanadan, 5 tanesi mısırdan, 7 tanesi mantardan, 15 tanesi patlıcandan, 12 tanesi kabaktan, 20 tanesi fasulyeden, 20 tanesi acurdan, 20 tanesi pancardan, 20 tanesi domatesten, 23 tanesi havuçtan, 8 tanesi kelekten ve 9 tanesi biberden), 22 tanesi zeytinden (16 tanesi yeşil zeytinden, 6 tanesi siyah zeytinden), 9 tanesi ekmek mayasından, 5 tanesi tarhanadan, 1 tanesi yoğurttan, 14 tanesi sucuktan, 4 tanesi kefirde ve 13 tanesi bozadan elde edilmiştir.

Ortam pH'sında KR2, KL3, MY1, KM5, LT3, KL7, MN3, PT13, KL7 izolatları patojen mikroorganizmaların tümüne karşı antibakteriyal aktivite gösterirken, SM4 ve LT6 izolatları ise patojen mikroorganizmaların konsantrasyonlarını azaltıcı yönde aktivite göstermiştir. Diğer izolatların ise

patojen mikroorganizmalara karşı antibakteriyal aktivitesi değişkenlik göstermiştir.

Çizelge 3.2. Sandvic Overlay Yönteminde Antibakteriyal Aktivite Gösteren Laktik Asit Bakterileri

İzolatlar	İzolatın Temin Edildiği Ürün	İzolatın Temin Edildiği Yer	İzolatın Gelişme Ortamı	Ortamın pH'sı
KR2	Kornişon Turşusu	Piyasa-Eskişehir	Aerob	4.4
KR4	Kornişon Turşusu	Piyasa-Eskişehir	Anaerob	5.5
LT1	Lahana Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	6.1
LT2	Lahana Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	3.8
LT3	Lahana Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.5
LT4	Lahana Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.5
LT5	Lahana Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.6
LT6	Lahana Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	5.6
LT7	Lahana Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	4.1
MT1	Mısır Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	5.9
MT2	Mısır Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	6.1
MT3	Mısır Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	5.3
MT4	Mısır Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	5.5
MT5	Mısır Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	4.2
MN1	Mantar Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	3.9
MN2	Mantar Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	5.1
MN3	Mantar Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	5.9
MN4	Mantar Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	5.9
MN5	Mantar Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	6.5
MN8	Mantar Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	4.7
MN9	Mantar Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	3.9
PT1	Patlıcan Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.8
PT2	Patlıcan Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.1
PT3	Patlıcan Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	5.5
PT4	Patlıcan Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.0
PT5	Patlıcan Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.1
PT6	Patlıcan Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	6.1
PT7	Patlıcan Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	3.9
PT8	Patlıcan Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	5.3
PT9	Patlıcan Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	5.1
PT10	Patlıcan Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	3.9
PT11	Patlıcan Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	4.6
PT12	Patlıcan Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	4.8
PT13	Patlıcan Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	5.5
PT14	Patlıcan Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	6.1
PT15	Patlıcan Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	3.9
KT2	Kabak Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.9
KT3	Kabak Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.5
KT4	Kabak Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	3.9
KT5	Kabak Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.9
KT6	Kabak Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.7
KT7	Kabak Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.8
KT8	Kabak Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	4.1
KT9	Kabak Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	4.0
KT10	Kabak Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	5.5
KT11	Kabak Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	6.1

Çizelge 3.2. (Devam) Sandvic Overlay Yönteminde Antibakteriyal Aktivite Gösteren Laktik Asit Bakterileri

KT12	Kabak Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	4.1
KT13	Kabak Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	5.2
F1	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	6.5
F2	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	6.5
F3	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	3.6
F4	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	6.4
F5	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.9
F6	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.8
F7	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	3.9
F8	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.2
F9	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	6.5
F10	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.0
F1X	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	4.0
F2X	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	3.9
F3X	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	5.8
F4X	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	4.0
F5X	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	4.0
F6X	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	4.2
F7X	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	5.7
F8X	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	4.2
F9X	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	4.0
F10X	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	4.1
P1	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	3.8
P2	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	5.9
P3	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	4.9
P4	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	4.0
P5	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	4.8
P6	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	3.9
P7	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	4.9
P8	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	4.1
P9	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	5.9
P10	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	4.2
P1X	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	4.1
P2X	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	4.0
P3X	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	5.0
P4X	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	5.9
P5X	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	3.9
P6X	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	4.1
P7X	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	4.0
P8X	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	4.0
P9X	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	3.9
P10X	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	4.1
D1	Domates Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.0
D2	Domates Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.0
D3	Domates Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.1
D4	Domates Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	5.1
D5	Domates Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.9
D6	Domates Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	3.9
D7	Domates Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.0
D8	Domates Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.0
D9	Domates Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.1
D10	Domates Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	3.9

Çizelge 3.2. (Devam) Sandvic Overlay Yönteminde Antibakteriyal Aktivite Gösteren Laktik Asit Bakterileri

D1X	Domates Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	4.0
D2X	Domates Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	5.0
D3X	Domates Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	3.9
D4X	Domates Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	4.9
D5X	Domates Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	5.0
D6X	Domates Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	3.9
D7X	Domates Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	4.0
D8X	Domates Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	4.0
D9X	Domates Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	5.9
D10X	Domates Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	4.1
A1	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	4.2
A2	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	5.9
A3	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	3.9
A4	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	5.7
A5	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	4.8
A6	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	4.0
A7	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	4.2
A8	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	4.1
A9	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	3.9
A10	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	4.0
A1X	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	3.9
A2X	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	4.0
A3X	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	4.2
A4X	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	6.6
A5X	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	4.2
A6X	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	5.8
A7X	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	4.9
A8X	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	3.9
A9X	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	4.0
A10X	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	4.1
H1	Havuç Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	6.6
H2	Havuç Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	3.9
H3	Havuç Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	4.0
H4	Havuç Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	4.1
H5	Havuç Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	5.4
H6	Havuç Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	4.9
H7	Havuç Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	3.9
H8	Havuç Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	6.6
H9	Havuç Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	3.9
H10	Havuç Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	4.0
H1X	Havuç Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	4.1
H2X	Havuç Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	3.8
H3X	Havuç Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	6.6
H4X	Havuç Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	3.9
H5X	Havuç Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	5.0
H6X	Havuç Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	3.9
H7X	Havuç Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	4.0
H8X	Havuç Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	6.6
H9X	Havuç Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	4.9
H10X	Havuç Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	5.5
HV2	Havuç Turşusu	Piyasa-Ankara	Aerob	5.2
HV3	Havuç Turşusu	Piyasa-Ankara	Aerob	6.1

Çizelge 3.2. (Devam) Sandvic Overlay Yönteminde Antibakteriyal Aktivite Gösteren Laktik Asit Bakterileri

HV4	Havuç Turşusu	Piyasa-Ankara	Aerob	5.1
KL1	Kelek Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.1
KL2	Kelek Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.7
KL3	Kelek Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.4
KL4	Kelek Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.9
KL5	Kelek Turşusu	Ev-Söğüt	Aerob	4.6
KL6	Kelek Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	5.1
KL7	Kelek Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	5.2
KL8	Kelek Turşusu	Ev-Söğüt	Anaerob	4.1
BB1	Biber Turşusu	Ev-Mersin	Aerob	6.1
BB2	Biber Turşusu	Ev-Mersin	Aerob	4.0
BB3	Biber Turşusu	Ev-Mersin	Anaerob	5.0
TB1	Biber Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	5.5
TB2	Biber Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	5.9
TB4	Biber Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	5.2
TB5	Biber Turşusu	Ev-Eskişehir	Aerob	3.9
TB6	Biber Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	5.0
TB8	Biber Turşusu	Ev-Eskişehir	Anaerob	5.6
BZ1	Yeşil Zeytin	Piyasa-Mersin	Aerob	5.3
BZ2	Yeşil Zeytin	Piyasa-Mersin	Aerob	4.9
BZ3	Yeşil Zeytin	Piyasa-Mersin	Anaerob	5.6
BZ4	Yeşil Zeytin	Piyasa-Mersin	Anaerob	5.5
EZ1	Yeşil Zeytin	Piyasa-Söğüt	Aerob	5.9
EZ2	Yeşil Zeytin	Piyasa-Söğüt	Aerob	6.0
EZ3	Yeşil Zeytin	Piyasa-Söğüt	Aerob	5.2
EZ4	Yeşil Zeytin	Piyasa-Söğüt	Aerob	5.3
EZ5	Yeşil Zeytin	Piyasa-Söğüt	Aerob	5.6
EZ6	Yeşil Zeytin	Piyasa-Söğüt	Aerob	5.6
EZ8	Yeşil Zeytin	Piyasa-Söğüt	Anaerob	5.9
YZ3	Yeşil Zeytin	Piyasa-Eskişehir	Anaerob	5.4
YZ4	Yeşil Zeytin	Piyasa-Eskişehir	Anaerob	5.1
DZ1	Yeşil Zeytin	Ev-Edremit	Aerob	4.6
DZ2	Yeşil Zeytin	Ev-Edremit	Aerob	5.9
DZ3	Yeşil Zeytin	Ev-Edremit	Aerob	3.9
SZ1	Siyah Zeytin	Piyasa-Eskişehir	Aerob	5.9
SZ2	Siyah Zeytin	Piyasa-Eskişehir	Aerob	4.7
SZ3	Siyah Zeytin	Piyasa-Eskişehir	Aerob	4.6
SZ4	Siyah Zeytin	Piyasa-Eskişehir	Aerob	4.9
SZ5	Siyah Zeytin	Piyasa-Eskişehir	Anaerob	6.1
SZ6	Siyah Zeytin	Piyasa-Eskişehir	Anaerob	5.1
SM1	Ekmek Mayası	Ev-İnönü	Aerob	5.1
SM2	Ekmek Mayası	Ev-İnönü	Aerob	5.1
SM3	Ekmek Mayası	Ev-İnönü	Aerob	4.0
SM4	Ekmek Mayası	Ev-İnönü	Aerob	5.4
SM5	Ekmek Mayası	Ev-İnönü	Anaerob	5.0
SM6	Ekmek Mayası	Ev-İnönü	Anaerob	4.9
MY1	Ekmek Mayası	Ev-Söğüt	Aerob	4.3
EM1	Ekmek Mayası	Ev-Eskişehir	Aerob	5.2
EM3	Ekmek Mayası	Ev-Eskişehir	Anaerob	4.6
AT1	Tarhana	Piyasa- Söğüt	Anaerob	5.0
AT2	Tarhana	Piyasa- Söğüt	Anaerob	5.1
AT3	Tarhana	Piyasa- Söğüt	Anaerob	5.0

Çizelge 3.2. (Devam) Sandvic Overlay Yönteminde Antibakteriyal Aktivite Gösteren Laktik Asit Bakterileri

TR1	Tarhana	Piyasa-Eskişehir	Anaerob	6.5
TN1	Tarhana	Piyasa-Eskişehir	Anaerob	6.0
YT1	Yoğurt	Ev-Eskişehir	Anaerob	4.9
ES2	Sucuk	Ev-Eskişehir	Aerob	5.8
ES3	Sucuk	Ev-Eskişehir	Aerob	5.3
ES4	Sucuk	Ev-Eskişehir	Aerob	4.3
ES5	Sucuk	Ev-Eskişehir	Anaerob	4.9
ES6	Sucuk	Ev-Eskişehir	Anaerob	6.1
DS1	Sucuk	Ev-Edremit	Aerob	3.9
DS2	Sucuk	Ev-Edremit	Aerob	4.6
DS3	Sucuk	Ev-Edremit	Aerob	3.9
DS4	Sucuk	Ev-Edremit	Anaerob	4.1
DS5	Sucuk	Ev-Edremit	Anaerob	4.7
GS1	Sucuk	Ev-Söğüt	Aerob	5.5
GS2	Sucuk	Ev-Söğüt	Aerob	4.1
GS3	Sucuk	Ev-Söğüt	Aerob	3.8
GS4	Sucuk	Ev-Söğüt	Anaerob	4.7
MK1	Kefir	Ev-Eskişehir	Aerob	5.5
MK2	Kefir	Ev-Eskişehir	Aerob	5.5
MK3	Kefir	Ev-Eskişehir	Anaerob	5.1
KM5	Kefir	Ev-Eskişehir	Anaerob	3.9
KB1	Boza	Piyasa-Eskişehir	Aerob	5.5
KB2	Boza	Piyasa-Eskişehir	Aerob	5.7
KB3	Boza	Piyasa-Eskişehir	Aerob	4.7
KB4	Boza	Piyasa-Eskişehir	Aerob	4.7
KB5	Boza	Piyasa-Eskişehir	Aerob	4.9
KB6	Boza	Piyasa-Eskişehir	Aerob	4.8
KB7	Boza	Piyasa-Eskişehir	Aerob	4.5
KB8	Boza	Piyasa-Eskişehir	Anaerob	5.9
KB9	Boza	Piyasa-Eskişehir	Anaerob	6.0
KB10	Boza	Piyasa-Eskişehir	Anaerob	4.1
KB11	Boza	Piyasa-Eskişehir	Anaerob	4.5
KB12	Boza	Piyasa-Eskişehir	Anaerob	4.6
KB13	Boza	Piyasa-Eskişehir	Anaerob	4.2

3.3. Agar Difüzyon Yönteminde Antibakteriyal Aktivite Gösteren Laktik Asit Bakterilerinin Sonuçları

Çizelge 3.2.'de sandvic overlay yönteminde patojen test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite gösteren laktik asit bakterilerinden 33 tanesi hem ortam pH'sında hem de pH 7'de patojen test mikroorganizmalara karşı antibakteriyal aktivite göstermiştir. Sonuçlar Çizelge 3.3.a. ve Çizelge 3.3.b.'de verilmiştir.

Çizelge 3.3.a. Antibakteriyal Aktivite Gösteren İzolatların Patojen Mikroorganizmalar Üzerindeki Etkisi (Etki gösteren izolatların zon çapları mm. cinsinden yazılmıştır. K.↓: konsantrasyon azaltma ; — : etkisiz)

	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
KR2	12	10	16	12,5	14	11	11,5	12,25	13	11,5	11	10,5
KL3	11,75	10	15,5	11,5	12	11	11,5	13	12,75	11,5	10	11
MN2	K.↓	K.↓	12	9,5	11	10,5	10,25	11	10,5	9	11	12
KL4	K.↓	K.↓	13,5	10	10	11	11	11	10,25	10	11	12,25
KT5	K.↓	K.↓	11	8,5	10,5	10	10,5	10,5	10,5	9,5	10,5	13
SZ1	—	—	—	—	10	—	—	—	—	K.↓	—	—
TB2	—	—	—	—	8,5	—	—	11	—	—	—	—
DZ2	—	—	—	—	8,5	—	—	10,5	—	K.↓	—	—
MK1	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	—	—	K.↓	K.↓	—	—
ES2	—	—	K.↓	—	9,25	K.↓	—	—	10,5	K.↓	9,5	—
ES3	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	—	—	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓
BZ1	9	9	11	K.↓	10	10,25	—	K.↓	K.↓	K.↓	—	—
MY1	11,25	9	11	10,5	10	8,5	11	12,25	11,25	11,25	10,5	9,75
GS1	K.↓	K.↓	11	K.↓	K.↓	K.↓	—	10,75	—	9,75	—	9,75
EZ8	K.↓	K.↓	—	—	—	—	—	—	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓
LT1	K.↓	K.↓	—	—	—	—	K.↓	—	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓
BZ4	K.↓	K.↓	8,5	—	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓
TR1	—	—	—	K.↓	K.↓	K.↓	—	—	—	K.↓	K.↓	—
MN5	—	—	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	—	—	—	K.↓	K.↓	—
SM4	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓
LT6	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓
SM6	K.↓	K.↓	11	13	12,5	12	12,75	11,75	9	12,75	14,5	—
KB8	—	—	—	—	—	K.↓	K.↓	—	—	K.↓	—	—
MT1	—	—	—	—	—	—	K.↓	—	—	K.↓	—	—
KM5	13	12	12,5	11	12	13,5	10	16	12	11	11	11
LT3	13	11,75	11	12,25	11,5	10	11,25	14	12	11,25	15	12,25
SZ5	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	10,75	K.↓	K.↓	K.↓	10,75
KB9	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	11
MT2	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	10,5
KL7	10,25	9	13	16	11	10	10	11,25	11	12	10	11
MN3	10	8	12	18	11	9,5	10,5	10,25	11,5	11	9	11,25
PT13	10	9	12,25	15	10,25	11	11	11,5	10	11	9,25	9,25
KT13	10,5	8	12,25	14	9	10	11	12	11,25	10	9	10

Çizelge 3.3.b. Ortam pH'sı 7'ye Ayarlandıktan Sonra Antibakteriyal Aktivite Gösteren İzolatların Patojen Mikroorganizmalar Üzerindeki Etkisi (Etki gösteren izolatların zon çapları mm. cinsinden yazılmıştır. K.↓: konsantrasyon azaltma ; — : etkisiz)

	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
KR2	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	—	—	—	K.↓	K.↓	—
KL3	K.↓	K.↓	—	K.↓	—	K.↓	—	—	—	K.↓	K.↓	—
MN2	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓
KL4	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓
KT5	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	—	—	—	—	—	—
SZ1	—	—	—	—	8,5	K.↓	—	11,5	—	K.↓	11,25	—
TB2	—	—	—	—	8,25	K.↓	—	11	—	K.↓	11,25	—
DZ2	—	—	—	—	8	K.↓	—	11,5	—	K.↓	11	—
MK1	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	—	K.↓	K.↓	K.↓	—	—
ES2	—	—	K.↓	—	9,75	K.↓	—	10,75	—	K.↓	9,5	—
ES3	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	10,5	K.↓	—	—	K.↓	K.↓	—	—
BZ1	K.↓	K.↓	—	K.↓	K.↓	K.↓	—	—	K.↓	—	—	—
MY1	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	—	K.↓	10	K.↓	—	—
GS1	K.↓	K.↓	—	K.↓	K.↓	K.↓	—	K.↓	12	—	—	—
EZ8	—	—	—	17,5	—	K.↓	—	—	—	—	—	—
LT1	—	—	—	17	—	K.↓	—	—	—	—	—	—
BZ4	K.↓	K.↓	—	—	—	9	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓
TR1	—	—	12,5	17,5	K.↓	K.↓	—	—	—	K.↓	K.↓	—
MN5	—	—	12	17	K.↓	K.↓	—	—	—	K.↓	K.↓	—
SM4	K.↓	K.↓	8	K.↓	K.↓	9	K.↓	—	—	12,75	—	12,75
LT6	K.↓	K.↓	8	K.↓	K.↓	9	K.↓	—	—	K.↓	—	12
SM6	K.↓	K.↓	8	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	—	—	K.↓	—	—
KB8	—	—	8	—	—	K.↓	K.↓	—	—	11	—	K.↓
MT1	—	—	8	—	—	K.↓	K.↓	—	—	10,5	—	K.↓
KM5	K.↓	K.↓	—	—	K.↓	K.↓	—	—	—	11	K.↓	—
LT3	K.↓	K.↓	—	—	K.↓	K.↓	—	—	—	10,5	K.↓	—
SZ5	K.↓	K.↓	8	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	—	—	K.↓	8,5	K.↓
KB9	—	—	K.↓	—	—	K.↓	K.↓	—	—	K.↓	—	—
MT2	—	—	K.↓	—	—	K.↓	K.↓	—	—	K.↓	—	—
KL7	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓
MN3	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓
PT13	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓
KT13	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓	K.↓

Bu laktik asit bakterilerine ait izolatlardan 16 tanesi turşulardan (KR2, LT1, LT3, LT6, MT1, MT2, MN2, MN3, MN5, PT13, KT5, KT13, KL3, KL4, KL7, TB2), 6 tanesi zeytinden (BZ1, BZ4, EZ8, DZ2, SZ1, SZ5), 3 tanesi ekmek mayasından (SM4, SM6, MY1), 1 tanesi tarhanadan (TR1), 3 tanesi sucuktan (ES2, ES3, GS1), 2 tanesi kefirde (MK1, KM5), 2 tanesi bozadan (KB8, KB9) izole edilmiştir.

Bu izolatlardan, ortamın pH'sında ayarlama yapılmamış olan laktik asit bakterilerinin son pH'sı 7'ye ayarlanan ortamdaki laktik asit bakterilerinden daha fazla antibakteriyal etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır. pH'sı 7'ye ayarlanan laktik asit bakterilerinin ise, daha çok patojen mikroorganizmaların konsantrasyonunu azaltıcı yönde etki gösterdiği saptanmıştır.

KR2, KL3, KM5, LT3, KL7, MN3, PT13, KT13, MY1 izolatları pH ayarlanmadan agar difüzyon yönteminde antibakteriyal aktivite gösteren en etkili izolatlar olmuştur.

MN2, KL4, KL7, MN3, PT13, KT13 izolatları ise pH 7'ye ayarlandıktan sonra bir veya daha fazla patojen mikroorganizmaya etkili olmuşlardır.

3.4. Fermente Ürünlerden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin İdentifikasyon Test Sonuçları

Çizelge 2.1.2'de gösterilen test mikroorganizmalarına karşı antibakteriyal aktivitesine sahip olan 33 izolat, gram boyama, katalaz testi, H₂S oluşumu, arjininden NH₃ oluşturma, farklı oranlarda tuz konsantrasyonlarında ve pH 3.9'da gelişebilme, farklı karbonhidrat kaynaklarını kullanabilme, Voges-Proskauer gibi 2.2.3.'te belirtilen identifikasyon testlerine alınmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.4.a. ve Çizelge 3.4.b.'de verilmiştir (Sneath ve ark., 1984; Yaygın ve Kılıç, 1993; Kılıç, 2001). Ayrıca, kontrol amaçlı olarak, Çizelge 3.4.c.'de laktik asit bakterilerine ait çeşitli standart mikroorganizmaların identifikasyon testi sonuçları verilmiştir.

Fermente ürünlerden izole edilen laktik asit bakterilerinin identifikasyon testi sonuçlarına göre 33 izolattan 9 farklı tür izole edilmiştir. Buna göre;

3'ü *Lactobacillus brevis* (KR2, KL3, ES2), 3'ü *Lactobacillus buchneri* (MN2, KL4, KT5), 7'si *Lactobacillus confusus* (GS2, EZ8, LT1, TR1, MN5, SM4, LT6), 2'si *Lactobacillus kefir* (MK1, SZ5), 5'i *Lactobacillus casei* (SM6, KB8, MT1, KM5, LT3), 2'si *Lactobacillus delbrueckii* (KB9, MT2), 4'ü *Streptococcus lactis* (SZ1, TB1, DZ2, ES3), 3'ü *Pediococcus pentosaceus* (BZ1, BZ4, MY1) ve 4'ü *Leuconostos mesenteroides* (KL7, MN3, PT13, KT13) olarak tanımlanmıştır.

Fermente ürünlerden izole ettiğimiz laktik asit bakterilerinin tümü Gram boyamada (+) sonuç vermiştir. 24 izolat katalaz (-), 9 izolat ise katalaz (+) reaksiyon vermiştir. 22 izolatın morfolojik yapısının çubuk, 11 izolatın morfolojik yapısının ise kok şeklinde olduğu gözlenmiştir. İzolatların tümü farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme göstermiştir. Hiçbir izolat 4 °C'de gelişme gösteremezken, tümü 10 °C'de gelişme göstermiştir. Buna karşılık izolatların büyük çoğunluğu 8 ve 15 °C'de gelişme gösterirken, az bir kısmı 45 °C'de gelişme gösterebilmiştir. İzolatların büyük bir kısmı arjininden NH₃ üretirken, hiçbiri arjininden gaz oluşturamamıştır. İzolatların bir kısmı Voges-Proskauer testinde (+) sonuç verirken, bir kısmı (-) sonuç vermiştir. Hiçbir izolatın H₂S üretme yeteneğinde olmadığı belirlenmiştir.

İzolatların bir kısmının EPS üretme yeteneğinde olduğu ortaya konulmuştur. EPS üretiminde karbon kaynağı olarak glikoz, fruktoz, sukroz ve laktoz kullanılmıştır. En fazla EPS üretimini ise sukrozu karbon kaynağı olarak kullanan izolatlar gerçekleştirmiştir.

Karbonhidrat fermentasyon testlerinde izolatların tümü maltoz ve glikozu karbon kaynağı olarak kullanmıştır. Büyük bir çoğunluğu arabinoz, sellobiyoz, eskulin, galaktoz, gliserol, rafinoz, salisin, mellibiyoz, sorbitol, trehaloz, riboz, sukroz, ksiloz, mannitol, laktoz, arbutin ve fruktozu karbon kaynağı olarak kullanırken, az bir kısmı ise inulin, ramnoz ve nişastayı karbon kaynağı olarak kullanmıştır. İzolatların tümü glikozdan gaz oluştururken, büyük bir çoğunluğu da laktozdan gaz oluşturmuştur.

Çizelge 3.4.a. Fermente Ürünlerden İzole Edilen Mikroorganizmaların İdentifikasyon Testi Sonuçları

İzolatlar	İzolatın Kaynağı	Ürünün Türü	Temin Edildiği Yer	Gram Boyama	Katalaz Reaksiyonu	Morfoloji	% 6.5 NaCl'de Gelişme	% 7 NaCl'de Gelişme	% 10 NaCl'de Gelişme	4 °C'de Gelişme	8 °C'de Gelişme	10 °C'de Gelişme	15 °C'de Gelişme	Tanımlanan İzolat
KR2	Turşu	Kornişon	Pys.	+	-	r	+	+	+	-	-	+	+	Lb.brevis
KL3	Turşu	Kelek	Ev	+	-	r	+	+	+	-	-	+	+	Lb.brevis
MN2	Turşu	Mantar	Ev	+	-	r	+	+	+	-	+	+	+	Lb.buchneri
KL4	Turşu	Kelek	Ev	+	-	r	+	+	+	-	+	+	+	Lb.buchneri
KT5	Turşu	Kabak	Ev	+	-	r	+	+	+	-	+	+	+	Lb.buchneri
SZ1	Zeytin	Siyah z.	Pys.	+	-	c	+	+	+	-	+	+	+	St.lactis
TB2	Turşu	Biber	Ev	+	-	c	+	+	+	-	+	+	+	St.lactis
DZ2	Zeytin	Yeşil z.	Ev	+	-	c	+	+	+	-	+	+	+	St.lactis
MK1	Kefir	Kefir	Ev	+	-	r	+	+	+	-	+	+	+	Lb.kefir
ES2	Sucuk	Sucuk	Ev	+	-	r	+	+	+	-	-	+	+	Lb.brevis
ES3	Sucuk	Sucuk	Ev	+	-	c	+	+	+	-	+	+	+	St.lactis
BZ1	Zeytin	Yeşil z.	Pys.	+	+	c	+	+	+	-	+	+	+	Pd.pentosaceus
MY1	Maya	Maya	Ev	+	+	c	+	+	+	-	+	+	+	Pd.pentosaceus
GS1	Sucuk	Sucuk	Ev	+	-	r	+	+	+	-	+	+	+	Lb.confusus
EZ8	Zeytin	Yeşik z.	Ev	+	-	r	+	+	+	-	+	+	+	Lb.confusus
LT1	Turşu	Lahana	Ev	+	-	r	+	+	+	-	+	+	+	Lb.confusus
BZ4	Zeytin	Yeşil z.	Pys.	+	+	c	+	+	+	-	+	+	+	Pd.pentosaceus
TR1	Tarhana	Tarhana	Pys.	+	-	r	+	+	+	-	+	+	+	Lb.confusus
MN5	Turşu	Mantar	Ev	+	-	r	+	+	+	-	+	+	+	Lb.confusus
SM4	Maya	Maya	Ev	+	-	r	+	+	+	-	+	+	+	Lb.confusus
LT6	Turşu	Lahana	Ev	+	-	r	+	+	+	-	+	+	+	Lb.confusus
SM6	Maya	Maya	Ev	+	+	r	+	+	+	-	+	+	+	Lb.casei
KB8	Boza	Boza	Pys.	+	+	r	+	+	+	-	+	+	+	Lb.casei
MT1	Turşu	Mısır	Ev	+	+	r	+	+	+	-	+	+	+	Lb.casei
KM5	Kefir	Kefir	Ev	+	-	r	+	+	+	-	+	+	+	Lb.casei
LT3	Turşu	Lahana	Ev	+	-	r	+	+	+	-	+	+	+	Lb.casei
SZ5	Zeytin	Siyah z.	Pys.	+	+	r	+	+	+	-	+	+	+	Lb.kefir
KB9	Boza	Boza	Pys.	+	+	r	+	+	+	-	+	+	-	Lb.delbrueckii
MT2	Turşu	Mısır	Ev	+	+	r	+	+	+	-	+	+	-	Lb.delbrueckii
KL7	Turşu	Kelek	Ev	+	-	c	+	+	+	-	+	+	+	Leu.mesenteroides
MN3	Turşu	Mantar	Ev	+	-	c	+	+	+	-	+	+	+	Leu.mesenteroides
PT13	Turşu	Patlıcan	Ev	+	-	c	+	+	+	-	+	+	+	Leu.mesenteroides
KT13	Turşu	Kabak	Ev	+	-	c	+	+	+	-	+	+	+	Leu.mesenteroides

Çizelge 3.4.a. (Devam) Fermente Ürünlerden İzole Edilen Mikroorganizmaların İdentifikasyon Testi Sonuçları

İzolatlar	İzolatın Kaynağı	Ürünün Türü	Temin Edildiği Yer	45°C'de Gelişme	pH:3.9'da Gelişme	Arjininden NH ₃ Üretimi	Arjininden Gaz Oluşumu	Voges-Proskauer	H ₂ S Üretimi	EPS Üretimi (Fruktoz)	EPS Üretimi (Glikoz)	EPS Üretimi (Sukroz)	EPS Üretimi (Laktoz)	Tanımlanan İzolat
KR2	Turşu	Kornişon	Pys.	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	Lb.brevis
KL3	Turşu	Kelek	Ev	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	Lb.brevis
MN2	Turşu	Mantar	Ev	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	Lb.buchneri
KL4	Turşu	Kelek	Ev	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	Lb.buchneri
KT5	Turşu	Kabak	Ev	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	Lb.buchneri
SZ1	Zeytin	Siyah z.	Pys.	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	St.lactis
TB2	Turşu	Biber	Ev	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	St.lactis
DZ2	Zeytin	Yeşil z.	Ev	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	St.lactis
MK1	Kefir	Kefir	Ev	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	Lb.kefir
ES2	Sucuk	Sucuk	Ev	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	Lb.brevis
ES3	Sucuk	Sucuk	Ev	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	St.lactis
BZ1	Zeytin	Yeşil z.	Pys.	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	Pd.pentosaceus
MY1	Maya	Maya	Ev	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	Pd.pentosaceus
GS1	Sucuk	Sucuk	Ev	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	Lb.confusus
EZ8	Zeytin	Yeşik z.	Ev	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	Lb.confusus
LT1	Turşu	Lahana	Ev	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	Lb.confusus
BZ4	Zeytin	Yeşil z.	Pys.	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	Pd.pentosaceus
TR1	Tarhana	Tarhana	Pys.	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	Lb.confusus
MN5	Turşu	Mantar	Ev	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	Lb.confusus
SM4	Maya	Maya	Ev	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Lb.confusus
LT6	Turşu	Lahana	Ev	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Lb.confusus
SM6	Maya	Maya	Ev	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Lb.casei
KB8	Boza	Boza	Pys.	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	Lb.casei
MT1	Turşu	Mısır	Ev	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	Lb.casei
KM5	Kefir	Kefir	Ev	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	Lb.casei
LT3	Turşu	Lahana	Ev	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	Lb.casei
SZ5	Zeytin	Siyah z.	Pys.	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	Lb.kefir
KB9	Boza	Boza	Pys.	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Lb.delbrueckii
MT2	Turşu	Mısır	Ev	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Lb.delbrueckii
KL7	Turşu	Kelek	Ev	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Leu.mesenteroides
MN3	Turşu	Mantar	Ev	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Leu.mesenteroides
PT13	Turşu	Patlıcan	Ev	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Leu.mesenteroides
KT13	Turşu	Kabak	Ev	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Leu.mesenteroides

Çizelge 3.4.b. Fermente Ürünlerden İzole Edilen Mikroorganizmaların Karbonhidrat Fermentasyon Testi Sonuçları

	Arabinoz	Sellobiyoz	Eskulin	Galaktoz	Gliserol	İnulin	Maltoz	Rafinoz	Salisin	Mellihiyoz	Sorbitol	Ramnoz	Tanımlanan İzolat
KR2	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>Lb.brevis</i>
KL3	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	<i>Lb.brevis</i>
MN2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Lb.buchneri</i>
KL4	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Lb.buchneri</i>
KT5	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lb.buchneri</i>
SZ1	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>St.lactis</i>
TB2	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	<i>St.lactis</i>
DZ2	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	<i>St.lactis</i>
MK1	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>Lb.kefir</i>
ES2	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	<i>Lb.brevis</i>
ES3	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>St.lactis</i>
BZ1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Pd.pentosaceus</i>
MY1	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	<i>Pd.pentosaceus</i>
GS1	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	<i>Lb.confusus</i>
EZ8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lb.confusus</i>
LT1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Lb.confusus</i>
BZ4	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	<i>Pd.pentosaceus</i>
TR1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Lb.confusus</i>
MN5	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	<i>Lb.confusus</i>
SM4	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	<i>Lb.confusus</i>
LT6	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	<i>Lb.confusus</i>
SM6	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	<i>Lb.casei</i>
KB8	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	<i>Lb.casei</i>
MT1	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	<i>Lb.casei</i>
KM5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lb.casei</i>
LT3	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	<i>Lb.casei</i>
SZ5	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	<i>Lb.kefir</i>
KB9	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	<i>Lb.delbrueckii</i>
MT2	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>Lb.delbrueckii</i>
KL7	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	<i>Leu.mesenteroides</i>
MN3	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	<i>Leu.mesenteroides</i>
PT13	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>Leu.mesenteroides</i>
KT13	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	<i>Leu.mesenteroides</i>

Çizelge 3.4.b. (Devam) Fermente Ürünlerden İzole Edilen Mikroorganizmaların Karbonhidrat Fermentasyon Testi Sonuçları

	Trehaloz	Riboz	Sukroz	Ksiloz	Mannitol	Laktoz	Laktozdan Gaz Oluşumu	Glikoz	Glikozdan Gaz Oluşumu	Arbutin	Nişasta	Fruktoz	Tanımlanan İzolat
KR2	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	<i>Lb.brevis</i>
KL3	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	<i>Lb.brevis</i>
MN2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lb.buchneri</i>
KL4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lb.buchneri</i>
KT5	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lb.buchneri</i>
SZ1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>St.lactis</i>
TB2	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	<i>St.lactis</i>
DZ2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	<i>St.lactis</i>
MK1	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	<i>Lb.kefir</i>
ES2	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	<i>Lb.brevis</i>
ES3	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>St.lactis</i>
BZ1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Pd.pentosaceus</i>
MY1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Pd.pentosaceus</i>
GS1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Lb.confusus</i>
EZ8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lb.confusus</i>
LT1	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lb.confusus</i>
BZ4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Pd.pentosaceus</i>
TR1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lb.confusus</i>
MN5	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Lb.confusus</i>
SM4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>Lb.confusus</i>
LT6	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	<i>Lb.confusus</i>
SM6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Lb.casei</i>
KB8	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	<i>Lb.casei</i>
MT1	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	<i>Lb.casei</i>
KM5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lb.casei</i>
LT3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lb.casei</i>
SZ5	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	<i>Lb.kefir</i>
KB9	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>Lb.delbrueckii</i>
MT2	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	<i>Lb.delbrueckii</i>
KL7	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	<i>Leu.mesenteroides</i>
MN3	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>Leu.mesenteroides</i>
PT13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>Leu.mesenteroides</i>
KT13	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	<i>Leu.mesenteroides</i>

Çizelge 3.4.c. Standart Mikroorganizmaların İdentifikasyon Testi Sonuçları

	Arabinoz	Sellobiyoz	Eskulin	Galaktoz	Gliseroz	İnulin	Maltoz	Rafinoz	Salisin	Melibiyoz	Sorbitol	Ramnoz	Trehaloz	Riboz
B4496 <i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Lactobacillus buchneri</i>	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
B1116 <i>Pediococcus acidilactici</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
B984 <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-
ATCC11842 <i>Lb.bulgaricus</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
B1186 <i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-
B633 <i>Streptococcus lactis</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
ISP986 <i>St.thermophilus</i>	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>Lactobacillus Lactis</i>	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+
	Sukroz	Ksiloz	Mannitol	Laktoz	Glikoz	Arbutin	Nişasta	Fruktoz	15°C'de Gelişme	45°C'de Gelişme	Arjininden NH ₃ Üretimi	Katalaz reaksiyonu	Morfoloji	Gram Boyama
B4496 <i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	r	+
<i>Lactobacillus buchneri</i>	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	r	+
B1116 <i>Pediococcus acidilactici</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	c	+
B984 <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	r	+
ATCC11842 <i>Lb.bulgaricus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	r	+
B1186 <i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	c	+
B633 <i>Streptococcus lactis</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	c	+
ISP986 <i>St.thermophilus</i>	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	c	+
<i>Lactobacillus Lactis</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	r	+

3.5. Fermente Ürünlerden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin pH ve Metabolik Ürünlerin Tespiti

Fermente ürünlerden izole edilen laktik asit bakterilerinin pH, laktik asit, proteolitik aktivite ve hidrojen peroksit üretim miktarlarının sonuçları Çizelge 3.5.'te belirtilmiştir. Fermente ürünlerden izole edilerek tanımlanan laktik asit bakterilerinin pH aralığı 4.3-6.8 arasında, laktik asit miktarları 0.153-2.610 mg/ml. arasında, proteolitik aktivite miktarları 0.001-0.012 tirozin mg/ml. arasında ve hidrojen peroksit miktarları ise 0.119-0.994 µg/ml. arasında değişiklik göstermiştir.

Fermente ürünlerden izole edilen laktik asit bakterilerinden *L.brevis* izolatları ile elde edilen laktik asit miktarı 0.153-0.891 mg/ml., proteolitik aktivite miktarı 0.006-0.007 mg/ml., hidrojen peroksit miktarı ise 0.808-0.903 µg/ml. arasında; *L.kefir* izolatları ile elde edilen laktik asit miktarı 1.143-0.261 mg/ml., proteolitik aktivite miktarı 0.003-0.004 mg/ml., hidrojen peroksit miktarı ise 0.237-0.689 µg/ml. arasında; *L.delbrueckii* izolatları ile elde edilen laktik asit miktarı 0.288-0.294 mg/ml., proteolitik aktivite miktarı 0.009 mg/ml., hidrojen peroksit miktarı ise 0.984-0.994 µg/ml. arasında; *L.casei* izolatları ile elde edilen laktik asit miktarı 0.261-1.116 mg/ml., proteolitik aktivite miktarı 0.001-0.010 mg/ml., hidrojen peroksit miktarı ise 0.146-0.972 µg/ml. arasında; *L.buchneri* izolatları ile elde edilen laktik asit miktarı 1.184-2.610 mg/ml., proteolitik aktivite miktarı 0.005 mg/ml., hidrojen peroksit miktarı ise 0.662-0.704 µg/ml. arasında; *L.confusus* izolatları ile elde edilen laktik asit miktarı 0.288-1.125 mg/ml., proteolitik aktivite miktarı 0.003-0.011 mg/ml., hidrojen peroksit miktarı ise 0.119-0.283 µg/ml. arasında; *St.lactis* izolatları ile elde edilen laktik asit miktarı 1.575-1.818 mg/ml., proteolitik aktivite miktarı 0.002-0.012 mg/ml., hidrojen peroksit miktarı ise 0.281-0.757 µg/ml. arasında; *Pd.pentosaceus* izolatları ile elde edilen laktik asit miktarı 0.396-1.233 mg/ml., proteolitik aktivite miktarı 0.004-0.009 mg/ml., hidrojen peroksit miktarı ise 0.236-0.962 µg/ml. arasında; *Leu.mesenteroides* izolatları ile elde edilen laktik asit miktarı 0.675-0.694 mg/ml., proteolitik aktivite miktarı 0.006-0.007 mg/ml., hidrojen peroksit miktarı ise 0.809-0.986 µg/ml. arasında değişmiştir.

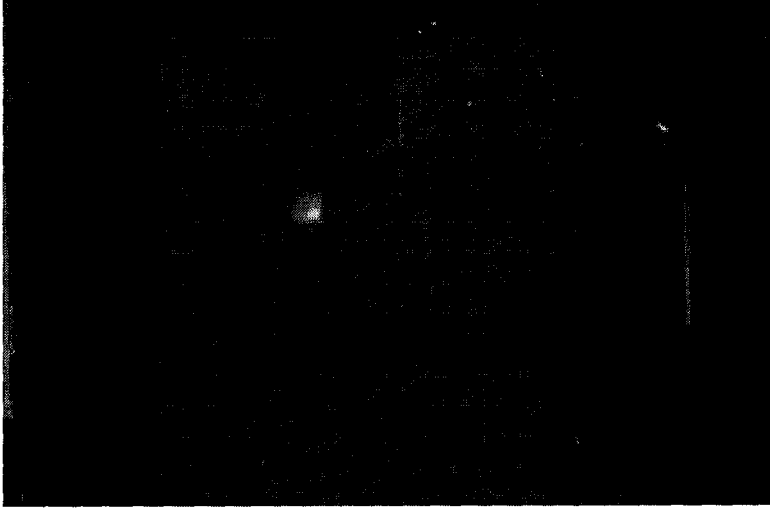
Çizelge 3.5. Fermente Ürünlerden İzole Edilen Suşların pH ve Metabolik Ürünlerinin Miktarı

İzolat	Ortam pH'sı	Laktik Asit Miktarı mg/ml.	Proteolitik Aktivite Miktarı Tirozin mg/ml.	Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarı µg/ml.
KR2	4.4	0.891	0.006	0.808
KL3	4.6	0.902	0.007	0.903
MN2	5.1	2.610	0.005	0.662
KL4	4.9	1.251	0.005	0.704
KT5	5.0	1.184	0.005	0.704
SZ1	5.9	1.818	0.010	0.281
TB2	5.7	1.703	0.012	0.304
DZ2	5.8	1.783	0.011	0.374
MK1	5.7	1.143	0.004	0.237
ES2	5.8	0.153	0.006	0.884
ES3	5.3	1.575	0.002	0.757
BZ1	5.3	1.233	0.004	0.236
MY1	4.3	0.432	0.005	0.871
GS1	5.5	1.080	0.003	0.119
EZ8	6.3	0.765	0.009	0.252
LT1	6.1	0.774	0.009	0.281
BZ4	6.8	0.396	0.009	0.962
TR1	6.5	1.125	0.008	0.145
MN5	6.4	1.040	0.011	0.154
SM4	5.4	0.288	0.009	0.276
LT6	5.6	0.296	0.011	0.283
SM6	4.9	0.261	0.006	0.972
KB8	5.8	0.360	0.001	0.146
MT1	5.9	0.365	0.002	0.167
KM5	4.9	1.116	0.009	0.685
LT3	4.5	1.104	0.010	0.734
SZ5	6.1	0.261	0.003	0.689
KB9	6.0	0.288	0.009	0.984
MT2	6.1	0.294	0.009	0.994
KL7	6.0	0.675	0.006	0.809
MN3	5.9	0.682	0.007	0.968
PT13	5.5	0.694	0.007	0.896
KT13	4.9	0.686	0.006	0.946

3.6. Fermente Ürünlerden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinde Plazmid DNA İzolasyonu Sonuçları

Laktik asit bakterilerinden standartımız olan *Lactobacillus bulgaricus* (ATCC 11842) kültüründe plazmid DNA'yı izole edip, jel dökümantasyon görüntüleme sisteminde gözlememize rağmen (Şekil 3.6.), fermente ürünlerden izole edilen laktik asit bakterilerine ait izolatlar arasında herhangi bir plazmid DNA gözlemlenmemiştir.

Laktik asit bakterilerinden standartımız olan *Lactobacillus bulgaricus* (ATCC 11842) kültüründe plazmid DNA'yı izole edip, jel dökümantasyon görüntüleme sisteminde gözlememize rağmen (Şekil 3.6.), fermente ürünlerden izole edilen laktik asit bakterilerine ait izolatlar arasında herhangi bir plazmid DNA gözlemlenmemiştir.



Şekil 3.6. Laktik Asit Bakterilerinde Plazmid DNA'nın Gözlenmesi (*Lactobacillus bulgaricus*'a Ait Plazmid DNA)

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Laktik asit bakterileri Gram (+), katalaz (-) bakteri grubudur. Bu bakteriler, gıda bozulması ve gıda kaynaklı hastalıklara neden olan Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı laktik asit, hidrojen peroksit, asetik asit, hidrojen sülfür, bakteriyosin ya da bakteriyosin benzeri bazı inhibitör maddeler üretirler. Bu nedenle de, bazı gıdaların korunmasına katkıda bulunurlar. Antimikrobiyal maddeler üreten starter kültürlerin faaliyeti sonucunda oluşan fermente gıdalar, biyolojik olarak korunan gıdaların en iyi örnekleridir (Lewus ve ark., 1991; Gilliland, 1990).

Tamime ve Robinson (1989) fermente ürünlerin standart ve yüksek kalitede üretilebilmesinin, büyük ölçüde güvenilir starter kültürlerin kullanımına bağlı olduğunu vurgulamışlardır. Çünkü, starterler ürüne istenen yapı, tat, koku ve aroma gibi özellikleri kazandırmak, belli ve standart kalitede ürün elde etmek amacıyla kullanılan, bilinen özelliklere sahip mikroorganizma kültürleridir. Laktik starterlerin temel fonksiyonları; laktozun fermentasyonu ile laktik asit üretimi, asetaldehit ve diasetil gibi aroma sağlayan uçucu bileşiklerin üretimi, proteolitik ve lipolitik aktivite, ürünü patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmalardan koruyan asidik ortamın oluşturulması olarak sıralanabilmektedir.

Fermente ürünlerden izole edilen 260 adet laktik asit bakterisinden gerek geliştikleri ortamın pH'sında gerekse besiyeri ortamının pH'sı 7'ye ayarlandığında antimikrobiyal aktivite gösteren 33 adet laktik asit bakterisi tanımlanarak 9 farklı tür ortaya konulmuştur (Çizelge 3.3.a. ve Çizelge 3.3.b.).

Çalışmamızda fermente ürünlerden izole edilen laktik asit bakterileri Çizelge 2.1.2'de belirtilen patojen mikroorganizmalara karşı farklı antimikrobiyal etki göstermişlerdir. Sandvic overlay yönteminde (Jimenez-Diaz ve ark., 1993), 260 izolattan 236 tanesi; agar difüzyon yönteminde (Maldonado ve ark., 2002; Carminati ve ark., 1989) ise, bu 236 izolattan sadece 33 tanesi hem optimum gelişme pH'sında hem de ortam pH'sının 7'ye ayarlanmasıyla patojen mikroorganizmalara karşı etkili olmuştur.

Ayrıca, ortam pH'sında antimikrobiyal aktiviteye tabi tutulan laktik asit bakterilerinin patojen mikroorganizmalara karşı genellikle bakteriyosidal, nötralize edilmiş laktik asit bakterilerinin ise daha çok bakteriyostatik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Benzer olarak, Beyatlı ve ark. (2000) starter olarak kullanılan 19 adet *Lactobacillus* suşundan 3 adedinde (*Lb. plantarum* 10, *Lb. acidophilus* 1, *Lb. fermentum* 25) bakteriyosin ve/veya bakteriyosin benzeri madde üretildiğini tespit etmişlerdir.

pH'sı 7'ye ayarlanan laktik asit bakteri süpernatantlarının antimikrobiyal aktivitesi laktik asit bakterilerine göre değişmiştir. pH'sı ayarlanmamış süpernatantlara göre daha az sayıda antibakteriyal aktivite göstermiştir (Çizelge 3.3.a. ve Çizelge 3.3.b.).

Laktik asit bakterilerinden *Lb. brevis* (KR2, KL3), *Lb. casei* (KM5, LT3), *Leu. mesenteroides* (KL7, MN3, PT13, KT13) ve *Pd. pentosaceus* (MY1) izolatları patojen mikroorganizmalar olan *Bac. cereus*, *Bac. subtilis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Y. enterocolitica*, *E. coli*, *A. hydrophila*, *P. vulgaris*, *S. typhimurium* ve *S. faecalis*'e karşı süpernatantı pH ayarlanmadan oldukça yüksek antibakteriyal aktivite gösterirken, *Lb. confusus* (SM4, LT6) patojen mikroorganizmaların konsantrasyonlarını azaltıcı yönde etki göstermiştir. Diğer izolatların ise antibakteriyal aktivitesinin değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir.

pH'sını NaOH ile 7'ye ayarladığımız laktik asit bakterilerinden sadece *Lb. confusus* (MN2, KL4) ve *Leu. mesenteroides* (KL7, MN3, PT13, KT13)'e ait izolatların patojen mikroorganizmaların konsantrasyonlarını azaltıcı yönde aktivite gösterdiği, diğer izolatların ise aynı patojen mikroorganizmalara karşı değişen oranlarda antibakteriyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Aşkar ve ark.(1997) izole ettikleri 5 adet *Pd. halophilus* izolatının 4 adetinin *E. coli* K12'ye karşı inhibisyon etkisi gösterdiğini belirlemişlerdir.

Yapılan araştırmalar sonucunda, laktik asit bakterileri tarafından üretilen birçok bakteriyosinin bakterisidal etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Fakat, *Lactobacillus helveticus* suşundan elde edilen Lactocin 27, *L.sake* 148 suşundan elde edilen bakteriyosin ve *Leuconostoc gelidum*'dan elde edilen

bakteriyosinin ise bakteriyostatik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Sobrin ve ark., 1991; Hastings ve Stiles, 1991).

Araştırmacılar, *Lactococcus lactis* ve *Pediococcus pentosaceus* tarafından üretilen bakteriyosinlerin *E. coli* ve *S. aureus* zerinde inhibe edici etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir (Spelhaug ve Harlander, 1989).

Schillinger ve Lücke (1989) etlerden izole ettikleri laktik asit bakterilerinden biri olan *L. sake*'nin bakteriyosin ürettiğini ve bu bakteriyosinin *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *P. fluorescens* zerinde bakteriyosidal etki yaptığını bildirmişlerdir.

Atrih ve ark. (1993) *Lb. plantarum* C19'dan izole ettikleri bakteriyosini plantaricin C19 olarak tanımlamışlar ve bu bakteriyosinin *S. aureus* zerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır.

Abdel-Bar ve ark. (1983) *Lb. bulgaricus*'un laktik asitten farklı bir madde ürettiğini ve bu antibiyotik maddenin bakteriyosin ve/veya bakteriyosin benzeri bir madde olduğunu, *Pseudomonas fragii* ve *S. aureus*'u inhibe ettiğini açıklamışlardır.

Çalışmamız sırasında izelge 2.1.2.'de gösterilen patojen mikroorganizmalar sandvic overlay ve agar difüzyon yöntemine göre antibakteriyal aktivite gösteren 33 adet laktik asit bakterisi gram boyama, katalaz testi, H₂S oluşumu, arjininden NH₃ oluşturma, farklı oranlarda tuz konsantrasyonlarında ve pH 3.9'da gelişebilme, farklı karbonhidrat kaynaklarını kullanabilme, Voges-Proskauer gibi identifikasyon testlerine tabi tutulmuştur. Laktik asit bakterilerine ait izolatların tanımlanması Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'ye göre yapılmıştır. Sonuçlar izelge 3.4.a. ve izelge 3.4.b.'de verilmiştir (Sneath ve ark., 1984; Yaygın ve Kılıç, 1993; Kılıç, 2001).

Buna göre; 3' turşudan ve sucuktan izole edilen *Lactobacillus brevis* (KR2, KL3, ES2), 3' turşudan izole edilen *Lactobacillus buchneri* (MN2, KL4, KT5), 7'si turşudan, sucuktan, zeytinden, mayadan ve tarhanadan izole edilen *Lactobacillus confusus* (LT1, MN5, LT6, GS2, EZ8, SM4, TR1), 2'si kefir ve zeytinden izole edilen *Lactobacillus kefir* (MK1, SZ5), 5'i turşudan, mayadan, bozadan ve kefirden izole edilen *Lactobacillus casei* (MT1, LT3, SM6, KB8, KM5), 2'si turşudan ve bozadan izole edilen *Lactobacillus*

delbrueckii (MT2, KB9), 4'ü turşudan, zeytinden ve sucuktan izole edilen *Streptococcus lactis* (TB1, SZ1, DZ2, ES3), 3'ü zeytinden ve mayadan izole edilen *Pediococcus pentosaceus* (BZ1, BZ4, MY1) ve 4'ü turşudan izole edilen *Leuconostos mesenteroides* (KL7, MN3, PT13, KT13) olarak tanımlanmıştır.

Bu tanımlamaya göre, izolatlardan 16 tanesi turşulardan (KR2, LT1, LT3, LT6, MT1, MT2, MN2, MN3, MN5, PT13, KT5, KT13, KL3, KL4, KL7, TB2), 6 tanesi zeytinden (BZ1, BZ4, EZ8, DZ2, SZ1, SZ5), 3 tanesi ekmekek mayasından (SM4, SM6, MY1), 1 tanesi tarhanadan (TR1), 3 tanesi sucuktan (ES2, ES3, GS1), 2 tanesi kefirde (MK1, KM5), 2 tanesi bozadan (KB8, KB9) izole edilmiştir.

Çalışmamızda fermente ürünlerden izole edilen laktik asit bakterilerinin geliştiği besiyeri ortamının pH aralığı 4.3-6.8 arasında değişiklik göstermekle birlikte, patojen test mikroorganizmalarına karşı en iyi aktivite sonucu ortam pH'sının 4.3-6.0 arasında olduğu durumlarda alınmıştır.

Fermente ürünlerden izole edilen laktik asit bakterilerinin patojen test mikroorganizmalarına karşı gösterdikleri antimikrobiyal etki, laktik asit bakterilerinin ürettiği asitliğe bağlı olarak pH'da meydana gelen düşme ile ilgili olabilir.

Benzer olarak, Hancıoğlu ve ark. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada, fermente bir ürün olan geleneksel Türk içeceği olan bozanın *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* ve *S. aureus* adlı patojenler üzerine antimikrobiyal etkisi araştırılmış ve örneklerde fermentasyon sırasında pH değişimi de takip edilmiştir. Ayrıca, Hancıoğlu ve Karapınar (1997) tarafından bozadan izole edilen laktik asit bakterisi izolatlarının *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium*, *S. aureus* ve *L. monocytogenes* üzerinde antimikrobiyal etkisi agar difüzyon yöntemi ile belirlenerek bu etkinin kaynağı saptanmaya çalışılmıştır.

Çalışma sonucunda boza fermentasyonu sırasında *E. coli* O157:H7'nin pH 3.7'de 32 saat canlı kaldığı saptanırken, *S. typhimurium* ve *S. aureus*'un 12 saat sonunda (pH < 4.5) inhibisyonlarının başladığı belirlenmiştir. *E. coli* O157:H7'nin, diğer patojenlere oranla boza fermentasyonunda canlı kalışı asitliğe direncini göstermekte olup, bu organizmanın bu tür gıdalarda halk sağlığı açısından önemini ortaya koymaktadır. Diğer taraftan, bozadan izole edilen laktik

asit bakterisi izolatlarının patojenlere karşı antimikrobiyal etkisinin, kültürlerin ürettikleri asite bağlı olarak meydana gelen pH düşüşünden kaynaklandığı ortaya konulmuştur.

Çalışmamızda fermente ürünlerden izole edilerek tanımlanan laktik asit bakterilerinin laktik asit üretim miktarları % 0.153-2.610 mg/ml. arasında değişiklik göstermiştir. Bu sonuca göre elde edilen laktik asit üretim miktarları; *Lb. brevis* izolatlarında % 0.153-0.891 mg/ml. arasında, *Lb. kefir* izolatlarında % 1.143-0.261 mg/ml. arasında, *Lb. delbrueckii* izolatlarında % 0.288-0.294 mg/ml. arasında, *Lb. casei* izolatlarında % 0.261-1.116 mg/ml., *Lb. buchneri* izolatlarında % 1.184-2.610 mg/ml. arasında, *Lb. confusus* izolatlarında % 0.288-1.125 mg/ml. arasında, *St. lactis* izolatlarında % 1.575-1.818 mg/ml. arasında, *Pd. pentosaceus* izolatlarında % 0.396-1.233 mg/ml. arasında, *Leu. mesenteroides* izolatlarında ise laktik asit üretim miktarları % 0.675-0.694 mg/ml. arasında değişmiştir.

İzolatların göstermiş oldukları antimikrobiyal etki büyük ihtimalle ürettikleri laktik asit ile ilişkili olabilir.

Benzer olarak, Danon ve ark. (1963) tarafından yapılan çalışmalarda da, antibakteriyal etkinin bakterilerin oluşturduğu laktik asitten ileri geldiği ve Salmonella, Koliform, Staphylococcus, Pseudomonas üzerine etkili olduğu bildirilmiştir.

Yine Mel'nikova ve Koroleva (1975) da, *Salmonella* ve *E. coli* üzerine laktik asit bakterilerinin inhibitör etkisinin laktik asitten meydana geldiğini rapor etmişlerdir.

Özkaya (2001) *Lactococcus* ve *Lactobacillus* izolatlarıyla yaptığı bir çalışmada *Lactobacillus*'ların (*L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *helveticus* ve *L. plantarum*) laktik asit üretim miktarlarının % 0.15-0.25 arasında olduğunu tespit etmiştir. Salamura beyaz peynirden izole edilen *Lactobacillus*'larda (*L. plantarum*, *L. casei* ve *L. lactis*) laktik asit üretimi pH değerindeki azalma ölçülerek belirlenmiş ve asit oluşturma aktivitelerinin çok yavaş olduğu tespit edilmiştir. Bu değerler çalışmamızdaki değerlerden oldukça düşüktür.

Daly ve ark. (1973) *Pd. acidilactici* izolatları tarafından ortamın asitliğinin düşürülmesine bağlı olarak, *S. aureus* izolatlarının üremelerini hızlı bir şekilde azalttıklarını tespit etmişlerdir.

Frank ve Marth (1977) homofermentatif laktik asit bakterilerinin gıda kaynaklı patojenlere etkisinin laktik asitten kaynaklandığını ortaya koyabilmek amacıyla, *St. cremoris* ve *St. lactis* kültürlerinin enteropatojenik *E. coli* üzerindeki etkisini incelemişler ve bunun sonucunda, laktik asit bakterilerinin inhibisyon etkisinin laktik asitten kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Yapılan bir araştırmaya göre, sucuk ve sosisten izole edilen *L. plantarum* suşlarının laktik asit üretim miktarlarının % 0.62-0.88 arasında, *Pediococcus acidilactici* suşlarının laktik asit üretim miktarlarının ise % 0.11-0.64 arasında olduğu bildirilmiştir (Toksoy ve ark., 1999).

Kıvanç ve ark. (2002) yoğurttan izole ettikleri, *Lb. bulgaricus* suşlarında laktik asit üretim miktarını % 0.18-1.31 arasında, *Lb. plantarum* suşlarında % 0.18-1.08 arasında, *Lb. buchneri* suşlarında ise % 0.36-0.49 arasında olduğunu tespit etmişlerdir.

Yine sucuk ve sosis gibi fermente ürünlerden izole edilen *Pediococcus halophilus* izolatlarında laktik asit üretim miktarları % 0.28-0.54 arasında bulunmuştur (Aşkar ve ark., 1997).

Gassem ve Abu-Tarboush (2000) farklı ortamlarda ürettikleri *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşlarının laktik asit üretim miktarlarını araştırmışlar ve bu suşlara ait titre edilebilir laktik asit miktarlarının % 0.19-0.47 arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Çalışmamız sırasında tanımladığımız *Lb. delbrueckii* izolatlarının ürettiği laktik asit miktarı bu aralık arasında yer almaktadır.

Mumcu (1997) kefirde izole ettiği *Lactobacillus* suşlarının laktik asit üretim miktarlarının % 0.17-1.14 arasında olduğunu tespit etmiştir.

Aslım ve ark. (2000) yoğurt starter kültürlerinde yaptıkları bir araştırma sonucunda, *Lactobacillus bulgaricus* suşlarının % 0.60-1.20 arasında laktik asit ürettiğini tespit etmişlerdir.

Laktik asit bakterisi olarak tanımlanan izolatlarımızın hidrojen peroksit miktarı 0.119-0.994 µg/ml. arasında değişiklik göstermiştir. Çalışmamız sonucunda elde edilen hidrojen peroksit miktarları; *Lb. brevis* izolatlarında

0.808-0.903 µg/ml., *Lb. kefir* izolatlarında 0,237-0,689 µg/ml., *Lb. delbrueckii* izolatlarında 0.984-0.994 µg/ml., *Lb. casei* izolatlarında 0.146-0.972 µg/ml., *Lb. buchneri* izolatlarında 0.662-0.704 µg/ml., *Lb. confusus* izolatlarında 0.119-0.283 µg/ml., *St. lactis* izolatlarında 0.281-0.757 µg/ml., *Pd. pentosaceus* izolatlarında 0.236-0.962 µg/ml. ve *Leu. mesenteroides* izolatlarında ise hidrojen peroksit miktarı 0.809-0.986 µg/ml. arasında değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda, laktik asit bakterilerinin farklı miktarlarda hidrojen peroksit ürettikleri tespit edilmiştir. Bu farklılığın nedeni olarak da, hidrojen peroksit üretiminin oksijen oksidoredüktaz aktivitelerinin farklı olmasından ileri geldiği bildirilmiştir (Reinheimer ve ark., 1990).

Dahiya ve Speck (1968) *Lb. bulgaricus*'un ürettiği ve *S. aureus*'u inhibe eden antibakteriyal maddenin H₂O₂ özelliğinde bileşik olduğunu bildirmişlerdir.

Toksoy ve ark. (1999) sosis ve sucuk gibi fermente ürünlerden izole ettikleri *L. plantarum*'da hidrojen peroksit üretim miktarlarının 1.80-3.45 µg/ml arasında olduğunu tespit etmişlerdir. Bizim değerlerimiz bu değerlerin oldukça altındadır.

Aşkar ve ark. (1997) sosis ve sucuk örneklerinden izole ettikleri *Pd. halophilus* izolatlarında hidrojen peroksit üretim miktarlarının 0.625-0.900 µg/10ml arasında olduğunu belirlemişlerdir.

Mumcu (1997) kefirde izole ettiği *Lactobacillus* suşlarının hidrojen peroksit üretim miktarlarının 0.04-0.19 µg/ml arasında olduğunu tespit etmiştir. Yaptığımız çalışma sonucunda bulduğumuz değerler genellikle bu değerlerin üstündedir.

Kıvanç ve ark. (2002) yoğurttan izole ettikleri, *Lb. bulgaricus* suşlarında hidrojen peroksit üretim miktarını 1.32-2.26 µg/ml arasında, *Lb. plantarum* suşlarında 0.97-3.73 µg/ml arasında, *Lb. buchneri* suşlarında ise 1.38-1.79 µg/ml arasında olduğunu belirlemişlerdir.

Aslım ve ark. (2000) yoğurttan izole ettikleri *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşlarının hidrojen peroksit üretim miktarlarının 0.26-0.51 µg/ml arasında olduğunu tespit etmişler fakat, bu miktarların test edilen *E.coli* ve

S.aureus üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olmadığını gözlemişlerdir. Bu değerler bizim değerlerimizin arasında yer almaktadır.

Yapılan bir araştırma sonucunda bazı araştırmacılar, in vitro koşullarda yüksek miktarda H₂O₂ üreten *Lactobacillus*'ların viral kaynaklı bir hastalık olan, immün sistemin baskılanması sonucunda oluşan ve AIDS etkeni olan HIV (Human Immunodeficiency Virus)'e karşı antiviral etki gösterdiğini saptamışlardır (Martin ve Richardson, 2000).

Reiter ve Harnulv (1984) laktik asit bakterilerinden birçok *Lactobacillus* ve *Streptococcus*'un aerobik şartlarda, laktoperoksidaz sistemini aktive ederek, yeterli miktarda hidrojen peroksit ürettiklerini tespit etmişlerdir.

Yapılan bir çalışma sonucunda araştırmacılar, *Lactobacillus acidophilus* tarafından üretilen hidrojen peroksitin *Candida albicans* üzerinde inhibisyon etkisine sahip olduğunu bildirmişler ve *Lactobacillus*'ların peroksidaz-hidrojen peroksit-tiyosiyanatın antimikrobiyal sistem için hidrojen peroksit sağlamada kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır. Çünkü, bu sistem bakteri, fungus, virüs ve parazitlere karşı geniş spektrumlu bir aktiviteye sahiptir (Okkers, 1999).

Reinheimer ve ark. (1990) laktik *Streptococcus* ve *Lactobacillus*'ların hidrojen peroksit oluşturma yeteneklerinin aerobik koşullarda, anaerobik koşullara nazaran daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir.

Berthier (1993) *Lactobacillus sake* ATCC 15521, *L. plantarum* ATCC 14917 ve *L. lactis* NCDO 280 bakterilerinin hidrojen peroksit oluşturma yeteneklerini tespit etmiştir.

Kot ve ark. (1996) *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'un 5.0-6.5 pH aralığında, glikoz ve oksijen varlığında hidrojen peroksit ürettiğini tespit etmişlerdir.

Attaie ve ark. (1987) yoğurttan izole ettikleri *L. lactis* ve *L. bulgaricus*'un *S. aureus*'a karşı inhibitör bir madde içerdiğini tespit etmişler ve bu maddenin hidrojen peroksit olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda fermente ürünlerden izole edilen laktik asit bakterilerine ait izolatların proteolitik aktivite miktarları 0.001-0.012 tirozin mg/ml. arasında değişiklik göstermiştir. Bu sonuca göre elde edilen proteolitik aktivite miktarları; *Lb. brevis* izolatlarında 0.006-0.007 mg/ml., *Lb. kefir* izolatlarında 0.003-0.004 mg/ml., *Lb. delbrueckii* izolatlarında 0,009 mg/ml., *Lb. casei* izolatlarında 0.001-

0.010 mg/ml., *Lb. buchneri* izolatlarında 0.005 mg/ml., *Lb. confusus* izolatlarında 0.003-0.011 mg/ml., *St. lactis* izolatlarında 0.002-0.012 mg/ml., *Pd. pentosaceus* izolatlarında 0.004-0.009 mg/ml., *Leu. mesenteroides* izolatlarında ise proteolitik aktivite miktarı 0.006-0.007 mg/ml. arasında değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir.

Yapılan bir araştırma sonucuna göre, *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus*'un genellikle zayıf bir proteolitik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Buna rağmen, bu düşük proteolitik aktivitenin ürünün fiziksel yapısında önemli değişikliklere yol açtığı ve aromatik bileşiklerin oluşumuna da katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Tamime ve Deeth, 1980).

Çalışmamızda antimikrobiyal aktivite gösteren izolatların plazmid profilleri belirlenmeye ve aktivite ile plazmid profilleri arasında bir ilişkinin var olup olmadığı saptanmaya çalışılmıştır.

Plazmidler, pek çok bakteri türünde bulunmasına karşılık, her izolatta bulunmayan, kromozomal DNA'dan bağımsız olarak ayrılabilen, ekstrakromozomal DNA molekülleridir. Plazmidler, birçok bakterinin özel ortamlara uyum sağlamasına imkan veren genetik bilgileri içermektedir. Bakterilerde plazmid varlığının saptanarak, karakterizasyonun yapılması, incelenen bakteride gen izolasyonları açısından önem kazanmaktadır (Wang ve Lee, 1997).

Çalışmamızda laktik asit bakterilerinin plazmid DNA izolasyonu Çataloluk'a (2003) göre yapılmıştır. Ancak, izolatlarımız arasında plazmid DNA'nın varlığı belirlenememiştir.

Bunun nedenlerinden biri olarak, izolatların logaritmik gelişme evresi farklı olduğundan optimizasyon sağlanamamış olabilir. Çünkü, her bakterinin logaritmik gelişme evresi birbirinden farklılık göstermektedir. Diğer bir nedeni, kullanılan yöntemin bu bakteriler için uygun bir yöntem olmadığı sonucu çıkartılabilir ya da izole edilen bu bakterilerin plazmid içermedikleri sonucuna varılabilir. Daha sonra yapılacak çalışmalarda, hem bu yöntem hem de diğer yöntemler kullanılarak optimizasyon sağlanması yararlı olabilir.

Akçelik (1999) yaptığı bir çalışmada, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* suşuna ait 36 kb büyüklüğünde bir plazmid saptadığını bildirmiştir. Buna karşılık,

St. thermophilus'da plazmidler çok yaygın olmadığı ve plazmid içeriği açısından daha fakir olduğu ileri sürülmüştür (Mercenier, 1990). Dikkat çekici olan bu özelliğin, yoğurt üretiminde *St. thermophilus* ile birlikte kullanılan *Lb. bulgaricus* için de geçerli olduğu kabul edilmektedir (Mercenier, 1990).

Prestini ve ark. (1983) *Lb. bulgaricus* ve *Lb. helveticus* suşlarından proteolitik aktivite ve laktozu kullanma yeteneklerinin plazmidle ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Buna göre, *Lb. helveticus*'da 6 tane plazmid, *Lb. bulgaricus*'da ise 4 tane plazmid gözlemiştir.

Son yıllarda, bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin izole edilmesi ve bu bakteriyosinlerin özelliklerinin ortaya konulması önem kazanmaktadır. Bu da beraberinde pek çok sektöre fayda sağlayacaktır. Gerek gıda alanında daha kaliteli besinlerin üretilmesi ve besinlerin raf ömrünün uzatılmasında, gerekse sağlık alanında hastalıkların tedavisinde antibiyotiklerin yerine, doğal biyolojik ürünleri destekleyici alternatif ürünlerin geliştirilmesinde son derece önemlidir.

Bundan sonraki çalışmalarda, organizmaya olumlu etkisi olabileceği düşünülen laktik asit bakterilerine ait izolatların belirlenip, bunların medikal alanda kullanımına ait araştırmalar yapılabilir. Bunun yanısıra doğal floradan izole edilen bazı üstün özelliklere sahip izolatların probiyotik olarak kullanımlarının sadece hastalıkların tedavisiyle sınırlı kalmayıp, bu tip izolatların tıpta koruma amaçlı olarak kullanılması yolunda da araştırmalar yapılabilir.

Starter kültür üreticisi firmalar, bakterilerini tek tek ya da bir arada fermente ürün starteri olarak hazırlayıp, genellikle liyofilize formda pazarlamaktadırlar. Fakat, ticari starter kültürler çok sayıda pasaj yapmaya uygun değildir. Birkaç pasajdan sonra kalitelerini belirleyen niteliklerini kaybetmektedirler. Bu durumun büyük ölçüde, ticari starter bakterileri pazarlayan firmaların nitelikli özellikleri taşıyan bakteri izolatlarını seçip kullanması ve seçilen bakteri izolatlarına bu yönde kazandırdıkları genetik özellikler olabilmektedir.

Bu belirlemelerden yola çıkarak, ülkemizde starter bakterilerin izolasyonu ve karakterizasyonu ve bunlardan fermente ürünlerin üretimine uygun olanların seçimi konusundaki araştırmalar ancak genetik çalışmalara ağırlık verilerek gerçekleştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Özellikle ülkemiz starter kültür temini açısından yurt dışına bağımlı kalmaktadır. Daha sonraki çalışmalarda, izole edilen laktik asit bakterilerinin endüstriyel açıdan kullanımına ilişkin girişimler yapılabilirse, çok büyük ekonomik harcamaların da önüne geçilmiş olunacaktır.

Çalışmamızda antimikrobiyal aktiviteye, yüksek proteolitik aktiviteye sahip olan ve bakteriyosin üreten izolatlar endüstriyel kullanım amaçlı olarak belirlenmeye çalışılmıştır. Ancak antimikrobiyal aktivite gösteren izolatlar arasında KR2, LT1, LT3, LT6, MT1, MT2, MN2, MN3, MN5, PT13, KT5, KT13, KL3, KL4, KL7, TB2, BZ1, BZ4, EZ8, DZ2, SZ1, SZ5, SM4, SM6, MY1, TR1, ES2, ES3, GS1, MK1, KM5, KB8, KB9 izolatlarının bakteriyosin ürettikleri düşünülmektedir. Elde edilen bu sonuçların kesinleştirilmesi için bakteriyosin veya bakteriyosin olmayan etken madde/maddelerin saptanarak saflaştırılması, analiz edilerek tanımlanması ve tekrar patojen mikroorganizmalar üzerinde test edilerek doğrulanması gerekmektedir. Çalışmamız bu bağlamda, aktivite gösteren izolatların tespiti ile bir temel oluşturmaktadır. Belirtilen bu analizlerin de ileriki çalışmalarda yapılması ile daha kesin sonuçlar elde edilerek endüstriye yönelik starter kültür olarak kullanımını önerilebilecektir.

5. KAYNAKLAR

1. ABDEL-BAR, N., HARRIS, N.D. ve RILL, R.L., *Purification and Properties of An Antimicrobial Substance Produced by L. bulgaricus*, J. Food Sci., 52, 2, 411-415, (1987).
2. AKALIN, S., GÖNÇ, S. ve SENDERYA, S., *Probiyotik Süt Ürünleri ve Prebiyotikler, Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri*, VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı, 29-36, (2000).
3. AKÇELİK, M., AYHAN, K., GÜRGÜN, V. ve TUNAİL, N., *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, Ankara, (1999).
4. AKÇELİK, M., *The Conjugal Plasmid pLL 10236 Encodes Lactose Fermentation Ability, Restriction/Modification Activity, Bacteriocin Production and Immunity in Lactococcus lactis subsp. lactis, LL102*, Food Microbiology, 16, 5, 487-494, (1999).
5. ANON, *Biodegradable Plastic Using Lactic Acid Bacteria*, Genetic Engineering and Biotechnology, Monitor, 1, 64, (1994).
6. APAN, T.Z., *Mikrobiyolojide Probiyotikler ve Prebiyotikler*, İnfeksiyon Dergisi, 14, 4, 579-583, (2000).
7. ASLIM, B., BEYATLI, Y. ve HALKMAN, K., *Yoğurt Starter Kültür Metabolitlerinin İnhibisyon Etkisi*, Turk J. Biol., 24, 65-78, (2000).
8. ASLIM, B., ÇALIŞKAN, F., BEYATLI, Y. ve GÜNDÜZ, U., *Poly- β -Hydroxybutyrate Production by Lactic Acid Bacteria*, FEMS Microb., 159, 293-297, (1998).
9. ASLIM, B., *Lactobacillus bulgaricus ve Streptococcus thermophilus Bakterilerinin Metabolik ve Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Bazı Fiziksel ve Kimyasal Mutagenlerin Etkisi*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, (1994).
10. AŞKAR, M. ve BEYATLI, Y., *Pediococcus halophilus Suşlarının Bazı Metabolik ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi*, Kükem Dergisi, 20, 2, 29-36, (1997).

11. ATRIH, A., REKHIF, N., MILLIERE, J.B. ve LEFEBVRE, G., *Detection and Characterization of A Bacteriocin Produced by L. plantarum C19*, Can. J. Microbiol., **39**, 1173-1179, (1993).
12. ATTAIE, R., WHALEN, P.J., SHAHANI, K.M. ve AMER, M.A., *Inhibition of Growth of Staphylococcus aureus During Production of Acidophilus Yoghurt*, Journal of Food Protection, **50**, **3**, 224-228, (1987).
13. BAELE, M., VANEECHOUTTE, M., VERHELST, R., VANCANNETY, M., DEVRIESE, L.A. ve HAESBROUCK, F., *Identification of Lactobacillus species Using tDNA-PCR*, Journal of Microbiology Methods, (2002).
14. BARRY, A. ve KOLSTAD, J., *Proteolytic Systems in Lactic Acid Bacteria*, Antonie van Leeuwenhook, **49**, 225-245, (1983).
15. BAŞER, D. ve KILIÇ, O., *Bursa Bölgesinde Laktik Asit Fermentasyonu İle Sofralık Zeytin ve Turşu Üretimi*, Tarımda İşbirliği Sempozyumu, Köy Hizmetleri Bölge Müdürlüğü Toplantı Salonu, Bursa, (1985).
16. BAUER, G., *Lactobacilli-Mediated Control of Vaginal Cancer Through Specific Reactive Oxygen Species Interaction*, Med. Hypotheses, **57**, **2**, 252-257, (2001).
17. BERTHIER, F., *On The Screening of Hydrogen Peroxide Generating Lactic Acid Bacteria*, Letters in Applied Microbiology, **16**, 150-153, (1993).
18. BEYATLI, Y., ASLIM, B. ve MUMCU, Z.M., *Starter Olarak Kullanılan Bazı Bakteri Türlerinde Bakteriyosin Üretiminin Tespit Edilmesi*, Gazi Üniversitesi, Ankara, (2000).
19. BEYATLI, Y., *Bazı Laktik Asit Bakterilerinde Tespit Edilen Plazmid DNA'ların Fonksiyonları*, Kükem Dergisi, **17**, **1**, 51-59, (1994).
20. BORIS, S., SUAREZ, J. E. ve BARBES, C., *Characterization of The Aggregation Promiting Factor from Lactobacillus gasseri, Vaginal Isolate*, Journal of Applied Microbiology, **83**, 413-420, (1997).
21. BOTTAZI, V. ve DELLAGLIO, F., *Acetaldehyde and Diacetyl Production by Streptococcus thermophilus and Other Lactic Streptococci*, J. Dairy Res., **34**, 109-113, (1967).

22. CAN, A. ve ÖZÇELİK, B., *Prebiyotik Süt Ürünleri ve İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri*, Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu, 257-261, (2003).
23. CARMINATI, D., GIRATFA, G. ve BOSSI, M.G., *Bacteriocin-like Inhibitors of Streptococcus lactis Against Listeria monocytogenes*, Journal of Food Protection, 52, 9, 614-617, (1989).
24. CERNING, J. ve BOUILLANNE, C., *Isolation and Characterisation of Exopolysaccharides from Slime-Forming Mesophilic Lactic Acid Bacteria*, J. Dairy Sci., 75, 692-699, (1992).
25. CHARTERIS, W.P., KELLY, P.M., MORELLI, L. ve COLLINS, J.K., *The Role and Therapeutic Potential of Lactobacillus Species in Female Urogenital Tract Infection*, Microecology and Therapy, 26, 59-96, (1997).
26. CUOZZO, S.A., SESMA, F., PALCIOS, J.M., HOLGADO., A.R. ve RAYA, R.R., *Identification and Nucleotide Sequence of Genes Involved in The Synthesis of Lactocin 705, A Two-Peptide Bacteriocin from Lactobacillus casei CRL 705*, FEMS Microbiology Letters, 185, 157-161, (2000).
27. ÇAKMAKÇI, M.L. ve KARAHAN, A.G., *Probiyotikler ve Etki Mekanizmaları*, XV. Ulusal Biyoloji Kongresi, Bildiri Özetleri Kitabı, 43, (2000).
28. ÇATALOLUK, O., *The Development of A Modified Method for Isolating Plasmids from Exopolysaccharide Producing Lactobacillus Species Using Conventional Plasmid Isolation Methods*, Turk J. Biol. 125-129, 27, (2003).
29. ÇELEN, E., HIZ, I. ve VURAL, T., *Probiyotikler*, Güncel Gastroenteroloji Dergisi, 403-408, Aralık, (1999).
30. DAESCHEL, M.A., *Antimicrobial Substances from Lactic Acid Bacteria for Use as Food Preservatives*, Food Technol., January, 164-167, (1989).
31. DAHIYA, R.S. ve SPECK, M.L., *Hydrogen Peroxyde Formation by Lactobacilli and Its Effects on Staphylococcus aureus*, J. Dairy Scien., 51, 10, 1568-1572, (1968).

32. DALY, C., SANDINE, W.E. ve ELLIKER, P.R., *Control of S. aureus in Sausage by Starter Cultures*, J. Food Scien., **38**, 462-430, (1973).
33. DANON, S., ZHEKOV, S. ve KOZEREVA, M., *Role of Lactic Acid in The Antibiotic Effect of Yoghurt*, Dairy Sci., **25**, **1**, 183, (1963).
34. DAVIDSON, B.E., KORDAS, N., DOBOS, M. ve HILLIER, A.J., *Genomic Organization of Lactic Acid Bacteria*, Antonie Van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology, **70**, 161-183, (1996).
35. DEET, H.C. ve TAMIME, A.Y., *Yoghurt: Nutritive and Therapeutic Aspects*, Journal of Food Protection, **44**, **1**, 78-86, (1981).
36. DELVES B., BLACKBURN, P., EVANS, R.J. ve HUGENHOLTZ, J., *Application of The Bacteriocin, Nisin*, Antonie Van Leeuwenhoek., **69**, 193-202, (1996).
37. DEMAİN, A.L. ve DAVIES, J. L., *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Second Edition, (1999).
38. DIFCO MANUAL, *Dehydrated Cultures Media and Reagents for Microbiology*, Tenth Edition, Difco Laboratories, USA, (1984).
39. DOCO, T. ve DIDICI, C., *Structure of Exocelular Polysaccharide Produced by Streptococcus thermophilus*, Carbohydrate Research, **198**, 313-321, (1990).
40. EIJSINK, V.G., SKEIE, M., MIDDELHOVEN, P.H., BRURBERG, M.B. ve NES, I.F., *Comparative Studies of Class IIa Bacterocins of Lactic Acid Bacteria*, Applied and Environmental Microbiolgy, **64**, **9**, 3275-3281, (1998).
41. ENCINAS, J.P., SANZ, J.J., GARCIA-LOPEZ, M.L. ve OTERO, A., *Behaviour of Listeria spp. in Naturally Contaminated Chorizo (Spanish Fermented Sausage)*, International Journal of Food Microbiology, **46**, 167-171, (1999).
42. FABER, E.J., KAMELING. J.P. ve VLIEGENTHART J.P., *Structure of Extracellular Polysaccharide Produced by Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus 291*, Carbonhydrate Research, **331**, 183-194, (2001a).

43. FABER, E.J., VAN DEN HAAK, M.J., KAMELING, J.P. ve VLIEGENTHART, J.P., *Structure of The Exopolysaccharide Produced by Streptococcus thermophilus S3*, Carbonhydrate Research, **331**, 173-182, (2001b).
44. FAYARD, B., HAEFLIGER, M. ve ACCOLAS, J.P., *Interactions of Temperate Bacteriophages of Streptococcus salivarius subsp. thermophilus with Lysogenic Indicators Affect Phage DNA Restriction Patterns and Host Ranges*, J. Dairy Res., 385-399, (1993).
45. FRANK, J.F. ve MARTH, E.H., *Inhibition of Enteropathogenic E. coli by Homofermentative Lactic Acid Bacteria in Skim Milk*, Journal of Food Protection, **40**, 754-759, (1977).
46. FULLER, R., *Probiotics in Man and Animals*, Journal of Applied Bacteriology, **66**, 365-378, (1989).
47. GARDNER, N.J., SAVARD, T., OBERMEIER, P., CALDWELL, G. ve CHAMPANGE, C.P., *Selection and Characterization of Mixed Starter Cultures for Lactic Acid Fermentation of Carrot, Cabbage, Beet and Onion Vegetable Mixtures*, International Journal of Food Microbiology, **64**, 261-275, (2001).
48. GASSEM, M.A. ve ABU-TARBOUS, A., *Lactic Acid Production by Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus in Camel's and Cow's Wheys*, Milchwissenschaft, **55,7**, 374-378, (2000).
49. GEISEN, R., LÜCKE, K.K. ve KRÖCKEL, L., *Starter and Protective Cultures for Meat and Meat Products*, Fleischwirtsch., **72, 6**, 894-898, (1992).
50. GILLIAND, S.E., *Health and Nutritional Benefits from Lactic Acid Bacteria*, FEMS Microbiology Reviews, **87**, 175-188, (1990).
51. GÜRSEL, A., *Laktik ve Propiyonik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Bakteriyosinler ve Süt Teknolojisi Alanındaki Uygulamaları*, Gıda, **24, 6**, 399-410, (1999).
52. GÜRSEL, I. ve HASIRCI, V., *Mikroorganizmal Kökenli Biyopolimerler*, TÜBİTAK, Bilim ve Teknik Dergisi, 97-98, (1995).

53. GÜVEN, K., *Bakteri İdentifikasyonu ve Tiplendirilmesinde Modern Yöntemler Ders Notları*, Ünite 2, Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir, (2002).
54. GÜVENER, E., *Probiyotikler*, Flora, 4, 3, 156-162, (1999).
55. HALKMAN, K., *Tarım Mikrobiyolojisi*, A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, Ankara, (1991).
56. HANCIOĞLU, Ö., AKTUĞ GÖNÜL, Ş. ve KARAPINAR, M., *Bozanın Bazı Patojen Bakteriler Üzerine Antimikrobiyal Etkisi*, Biyoteknoloji (Kükem) Dergisi, XI. Kükem-Biyoteknoloji Kongresi, Özel Sayısı 23, 2, 93-94, (1999).
57. HANCIOĞLU, Ö. ve KARAPINAR, M., *Microflora of Boza, A Traditional Fermented Turkish Beverage*, International Journal of Food Microbiology, 35, 271-274, (1997).
58. HANNA, M.O., SAVELL, J.W., SMITH, G.C., PURSER, D.E., DARDNER, F.A. ve VANDERZANT, G., *Effect of Growth of Individual Meat Bacteria on pH, Color and Odor of Aseptically Prepared Vacuum Packaged Round Steaks*, Journal of Food Protection, 46, 216-219, (1983).
59. HASTINGS, J.W. ve STILES, M.E., *Antibiosis of Leuconostoc gelidum Isolated from Meat*, Journal of Applied Bacteriology, 70, 127-134, (1991).
60. HAYALOĞLU, A.A. ve ERGİNKAYA, Z., *Gıda Endüstrisinde Kullanılan Laktik Asit Bakterileri*, Gıda Teknolojisi Derneği, Yayın No:23, Ankara, (2001).
61. HOLZAPFEL, W.H., *Appropriate Starter Culture Technologies for Small-Scale Fermentation in Developing Countries*, International Journal of Microbiology, 75, 197-212, (2002).
62. HUGENHOLTZ, J., LOOIJESTEIJN, E., STARRENBURG, M. ve DIJKEMA, C., *Analysis of Sugar Metabolism in An EPS Producing Lactococcus lactis by ³¹P NMR*, Journal of Biotechnology, 77, 17-23, (2000).
63. İLHAN, S., *Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu*, Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir, (1999).

64. İLYASLI, F., *İstavrit (Trachurus trachurus) Balığından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik ve Antimikrobiyal Aktivitesinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, (1997).
65. JIMENEZ-DIAZ, R., RIOS-SANCHEZ, R.M., DESMAZEAUD, M., RUIZ-BARBA, J.L. ve PIARD, J.C., *Plantarisin S and T, Two New Bacteriocins Produced by Lactobacillus plantarum LPCO10 Isolated from A Green Olive Fermentation*, Applied and Environmental Microbiology, 1416-1424, (1993).
66. JOLLY, L. ve STINGELE, F., *Molecular Organization and Functionality of Exopolysaccharide Gene Clusters in Lactic Acid Bacteria*, International Dairy Journal, 11, 733-745, (2001).
67. KILIÇ, S., *Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri*, E.Ü., Ziraat Fak., Süt Teknolojisi Bölümü, Bornova-İzmir, (2001).
68. KIMMET S.A., *Optimization of Exopolysaccharide Production by Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus RR Growth in A Semidefined Medium*, Applied and Environmental Microbiology, 64, 2, 659-664, (1998).
69. KIVANÇ, M., *Bakteriyoloji Ders Notları*, Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir, (2002).
70. KIVANÇ, M., ÇAKIR, E. ve YILMAZ, M., *Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Isolated from Turkish Yoghurt*, 2nd World Engineering Congress, Sarawak, Malaysia, 22-25 July, (2002).
71. KOT, E., FURMANOV, S. ve BEZKOROVAINY, B., *Hydrogen Peroxide Production and Oxidation of Ferrous Iron by L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, J. Dairy Sci., 79, 758-766, (1996).
72. KUIPERS, O.P., BUIST, G. ve KOK, J., *Current Strategies for Improving Food Bacteria*, Res. Microbiology, 151, 815-822, (2000).
73. KÜÇÜKÖNER, E. ve KÜÇÜKÖNER, Z., *Balık Mikroflorası ve Balıklarda Meydana Gelen Mikrobiyal Değişmeler*, 100. Yıl Üniv., Ziraat Fakültesi, Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü Dergisi, 15, 6, 339-341, (1990).

74. LAWS, A., GU, Y. ve MARSHALL, V., *Biosynthesis, Characterisation and Desing of Bacterial Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria*, *Biotechnology Advances*,**19**, 597-625, (2001).
75. LEWUS, C.B., KAISER, A. ve MONTVILLE, J.T., *Inhibition of Food-Borne Bacterial Pathogens by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat*, *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, **6**, 1683-1688, (1991).
76. LUDWIG, W., NEUMAIER, J., KLUGBAUER, N., BROCKMANN, E., ROLLER, C., JILG, S., REETZ, K., SCHACHTNER, I., LUDWIGSEN, A., WALLNER, G., BACHLEITNER, M., FISCHER, U. ve SCHLEIFER, K.H., *Phylogenetic Relationships of Bacteria*, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **64**, 285-304, (1993).
77. MALDONADO, A., RUIZ-BARBA, J.L., FLORIANO, B., ve JIMENEZ-DIAZ, R., *The locus Responsible for Production of Plantaricin S, A Class IIb Bacteriocin Produced by Lactobacillus plantarum LPCO10, is Widely Distrubuted Among Wild-Type Lactobacillus plantarum Strains Isolated from Olive Fermentations*, *International Journal of Food Microbiology*, Article in Press, (2002).
78. MARASCO, R., SALATIELLO, I., DE FELLICE, M. ve SACCO, M., *A Physical Functional Analysis of The Newly-Identified bglGPT Operon of Lactobacillus plantarum*, *FEMS Microbiology Letters*, **186**, 269-273, (2000).
79. MARSHALL, V.M., DUNN, H., ELVIN, M., MC LAY, N., GU, Y. ve LAWS, A.P., *Structural Characterisation of The Exopolysaccharide Produced by Streptococcus thermophilus EU20*, *Carbohydrate Research*, **331**, 413-422, (2001).
80. MARTIN, H.L. ve RICHARDSON B.A., *Vaginal Lactobacilli Microbiol Flora and Risk of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Sexually Transmitted Disease Acquisition*, *Journal of Infect. Dis.*,**180**, **6**, 1863-1868, (2000).

81. MASTROMARINO, P., BRIGIDI, P., MACCHIA, S., MAGGI, L., PIROVANO, F., TRINCHIERI, V., CONTE, U. ve MATTEUZZI, D., *Characterization and Selection of Vaginal Lactobacillus Strains for The Preparation of Vaginal Tablets*, Journal of Applied Microbiology, **93**, 884-893, (2002).
82. MEL'NIKOVA, E.U. ve KOROLEVA, N.S., *Capacity of A Lb. bulgaricus and St. thermophilus Starter to Produce Antibiotic Substances*, Dairy Sci., **37**, 7, 4329, (1975).
83. MERCENIER, A., *Molecular Genetics of Streptococcus thermophilus*, FEMS Microbiology Reviews, **87**, 61-78, (1990).
84. MESSI, P., BONDI, M., SABIA, C., BATTINI, R. ve MANICARDI, G., *Detection and Preliminary Characterisation of A Bacteriocin (Plantaricin 35d) Produced by A Lactobacillus plantarum Strain*, International Journal of Food Microbiology, **64**, 193-198, (2001).
85. MUMCU, Z.N., *Kefirden İzole Edilen Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik, Antimikrobiyal ve Plazmid DNA'larının İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, (1997).
86. MURIANA, P.M. ve KLAENHAMMER, T.R., *Purification and Partial Characterization of Lactacin F, A Bacteriocin Produced by Lactobacillus acidophilus 11088*, Applied and Environmental Microbiology, **57**, 114-121, (1991).
87. NAGAOKA, M., HASHIMOTO, S., WATANABE, T., YOKOKURA, T. ve MARI, Y., *Anti-ulcer Effects of Lactic Acid Bacteria and Their Cell-Wall Polysaccharides*, Biol. Pharm. Bull., **17**, 1012-1017, (1994).
88. NAKAJIMA, H., SUZUKI, Y., KAUZU, H. ve HIROTA, T., *Colesterol-Lowering Activity of Ropy Fermented Milk*, Journal of Food Sci., **57**, 1327-1329, (1992).
89. NEMCOVA, R., *Criteria for Selection of Lactobacilli for Probiotic Use*, Vet Med (Praha), **2**, 1, 19-27, Jan, (1997).
90. NEYZİ, O. ve YOLSAL, N., *Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar Tanı ve Tedavi Rehberi*, İnsan Kaynağı Geliştirme Vakfı, İstanbul, (1997).

91. OCANA, S.V., PESCE DE RUIZ HOLGADO A.A. ve NADER-MACIAS E.M., *Selection of Vaginal H₂O₂-Generating Lactobacillus Species for Probiotic Use*, Current Microbiol., **38**, 279-284, (1999).
92. OKKERS, D.J., *Characterization of Pentocin TV 35b Bacteriocin-like Peptide Isolated from Lactobacillus acidophilus with A Fungistatic Effect on Candida albicans*, Journal of Applied Microbiology, **87**, 726-734, (1999).
93. ÖZKAYA, F.D., *Salamura Beyaz Peynirden İzole Edilen Bazı Lactococcus, Enterococcus ve Lactobacillus Suşlarının Proteolitik Aktivite, Bakteriyosin Etkenliği ve Biyogen Amin Oluşumu Açısından Karşılaştırılması*, A.Ü. Gıda Müh. A.B.D., Doktora Tezi., s 129, (2001).
94. PETIT, C., VILCHEZ, F. ve MARCZAK, R., *Formation and Stabilization of Diacetyl and Acetoin Concentration in Fully Grown Cultures of Streptococcus lactis subsp. diacetylactis*, Biotech. Letter., **19**, 319-323, (1989).
95. PRESTINI, P., BOTTAZZI, V., VESCOVA, M. ve MORELLI, L., *Relationship Among Plasmid DNA, Lactose Fermentation and Proteolytic Activity in Lactobacillus helveticus and Lactobacillus bulgaricus*, Annali Della Facolta di Agaria, **23**, **1**, 71, (1983).
96. PROSOD, J., *Selection and Characterization of Lactobacillus, Bifidobacterium Strains for Use as Probiotics*, International Dairy J., **8**, 993-1002, (1998).
97. RACCAH, M. ve BAKER, C., *Formation of Hydrogen Peroxide by Meat Starter Cultures*, Journal of Food Protection, **41**, 789-799, (1978).
98. REINHEIMER, J.A., DEMKOW, M.R. ve CONDIOTI, M.C., *Inhibition of Coliform Bacteria by Lactic Acid Cultures*, The Aust. J. Dairy Technol., May, 5-9, (1990).
99. REITER, B. ve HARNULV, G., *Lactoperoxidase Antibacterial System: Natural Occurrence, Biological Functions and Partical Applications*, Journal of Food Protection, **47**, **9**, 724-732, (1984).

100. ROOS, S., LINGREN, S. ve JONSSON, H., *Autoaggregation of Lactobacillus reuteri is Mediated by Putative Dead-Box Helicase*, Molecular Microbiology, 32, 2, 427-436, (1999).
101. RUIZ-BARBA, J.L., PIARD, J.C. ve JIMENEZ-DIAZ, R., *Plasmid Profiles of L. plantarum*, Journal of Applied Bacteriology, 71, 417-421, (1991).
102. SCHILLINGER, U. ve LÜCKE, F.K., *Antibacterial Activity of L. sake Isolated from Meat*, Applied and Environmental Microbiology, 55, 8, 1901-1906, (1989).
103. SCHILLINGER, U. ve LÜCKE, F.K., *Identification of Lactobacilli from Meat and Meat Products*, Food Microbiology, 4, 199-200, (1987).
104. SHARPE, M.E. ve FRANKLIN, J.G., *Production of Hydrogen Sulfide by Lactobacilli with Special References to Strains Isolated from Cheddar Cheese*, 8th., Int. Cong. Microbiol., 46, (1962).
105. SHIMAZU, Y., VEHARA, M. ve WATANABE, M., *Transformation of Citric Acid to Acetic Acid, Acetoin and Diacetyl by Wine Making Lactic Acid Bacteria*, Agric. Biol. Chem., 49, 7, 2147-2157, (1985).
106. SNEATH, P.H., MOIR, N.S., SHARPE, M.E. ve HOLT, J.G., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore, (1986).
107. SNEATH, P.H., MOIR, N.S., SHARPE, M.E. ve HOLT, J.G., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 2, (1984).
108. SOBRINO, O.J., RODRIGUEZ, J.M., MOREIRA, W.L., FERNANDEZ, M.F., SANZ, B. ve HERNANDEZ, P.E., *Antibacterial Activity of L. sake Isolated from Dry Fermented Sausages*, International Journal of Food Microbiology, 13, 1-10, (1991).
109. SPELHAUG, S.R. ve HARLANDER, S.K., *Inhibition of Food-Borne Bacterial Pathogenes by Bacteriocins from Lactococcus lactis and Pediococcus pentosaceus*, Journal of Food Protection, 52, 12, 856-862, (1989).

110. STILES, M.E. ve HOLZAPFEL, W.H., *Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy*, International Journal of Food Microbiology, **36**, 1-29, (1997).
111. SÜRMEİ, G., TUNAİL, N. ve KÖŞKER, Ö., *Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonunda Kullanılan Besiyerlerinin Karşılaştırılması Üzerinde Araştırmalar*, Gıda, **1**, 3-9, (1982).
112. ŞAHİN, İ., *Mikrobiyolojiye Giriş*, Eser Matbaası, Samsun, (1990).
113. TAGG, J.R., DAJANI, A.S. ve WANNAMAKER, L.W., *Bacteriocins of Gram Positive Bacteria*, Bacteriol. Rev., **40**, 722-756, (1976).
114. TAMER, A.Ü., UÇAR, F., ÜNVER, E., KARABOZ, İ., BURSALIOĞLU, M. ve OĞULTEKİN, R., *Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu*, Anadolu Üniversitesi, Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları, No. 74, Eskişehir, (1989).
115. TAMIME, A.Y. ve DEETH, B.C., *Yoghurt: Technology and Biochemistry*, Journal of Food Protection, **43**, **12**, 939-977, (1980).
116. TAMIME, A.Y. ve ROBINSON, R.K., *Yoghurt: Science and Technology*, Pergamon Press, Oxford, p 431, (1989).
117. TANASUPAWAT, S., EZAKI, T., SUZUKI, K., OKADA, S., KOMAGATA, K. ve KOZAKI, M., *Characterization and Identification of L. pentosus and L. plantarum Strains from Fermented Foods in Thailand*, J. Gen. App. Microbiol., **38**, 121-134, (1992).
118. TEKİNŞEN, O.C. ve ATASEVER M., *Süt Ürünleri Üretiminde Starter Kültür*, Selçuk Üniversitesi, Vet. Fak.Yayımları, 150s, Konya, (1994).
119. TEMİZ, A. ve YILMAZER, A.N., *Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Tarhana During Fermentation*, Acta Alimentaria, **27**, **3**, 277-291, (1998).
120. TOKSOY, A., *Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Oluşturduğu Antimikrobiyal Maddelerin Kontaminant Mikroorganizmalar Üzerine İnhibisyon Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, (1993).

121. TOKSOY, A., BEYATLI, Y. ve ASLIM, B., *Sucuk ve Sosislerden İzole Edilen L. plantarum Suşlarının Bazı Metabolik ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi*, Tr. J. of Veter. and Animal Sci., **23**, 533-540, (1999).
122. TOKSOY, A. ve BEYATLI, Y., *Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Antagonistik İlişkileri Üzerine Bir Araştırma*, Gıda Dergisi, **24**, 269-275, (1999).
123. TOKSOY, A., *Lactobacillus plantarum ve Pediococcus pentosaceus Suşlarının Metabolik ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, (1996).
124. TOUMOLA, E.M. ve SALMINEN, S.J., *Adhesion of Some Probiotic and Dairy Lactobacillus Strains to Caco-2 Cell Cultures*, International Journal of Microbiology, **41**, **1**, 45-51, (1998).
125. TUNAİL, N. ve KÖŞKER, Ö., *Süt Mikrobiyolojisi*, A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, Ankara, (1989).
126. TURGUT, T. ve ÇAKMAKÇI, S., *Probiyotik Bakterilerin Dondurma Üretiminde Kullanımı*, Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu, 277-281, (2003).
127. TÜRK STANDARTLARI ENSTİTÜSÜ, TS8979, *Laktik Asit-Sanayide Kullanılan*, Ankara, (1991).
128. TZANETAKI, E.L. ve MASTROJIANNAKI, A.V., *Diacetyl and Acetaldehyde Concentrations During Ripening of Kefalatyri Cheese*, J. Food Scien., **53**, **2**, 663-664, (1988).
129. VURAL, H. ve ÖZTAN, A., *Et Ürünlerinde Nitrozamin Oluşumunun Laktik Asit Bakterileri Kullanımıyla Önlenmesi*, Gıda Dergisi, **16**, **4**, 237-240, (1991).
130. VURAL, T. ve ÇELEN, E., *Probiyotiler*, Aktüel Tıp Dergisi, **8**, **4**, 71-74, (2003).

131. VUYST, L. ve DEGEEST, B., *Indication That The Nitrogen Source Influences Both Amount and Size of Exopolysaccharides Produced by Streptococcus thermophilus LY03 and Modelling of The Bacterial Growth and Exopolysaccharide Production in A Complex Medium*, Applied and Environmental Microbiology, **65**, 2863-2870, (1999).
132. WANG, T.T. ve LEE, B.H., *Plasmids in Lactobacillus*, Biotechnology, **17**, 3, 227-272, (1997).
133. YAYGIN, H. ve KILIÇ, S., *Süt Endüstrisinde Saf Kültür*, İzmir, (1993).
134. YILDIRIM, Z., BAYRAM, M. ve YILDIRIM, M., *Probiyotik, Prebiyotik ve İnsan Sağlığı Üzerindeki Yararlı Etkileri*, Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu, 267-272, (2003).
135. YILDIRIM, Z. ve YILDIRIM, M., *Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Bakteriyosinlerin Genel Karakteristikleri*, Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri, Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, Tebliğler Kitabı, Tekirdağ, 247-253, (2000a).
136. YILDIRIM, Z. ve YILDIRIM, M., *Probiyotik Özellik Gösteren Bifidobakteriler*, VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, 266-271, (2000b).
137. YILSAY, T.Ö. ve KURDAL, E., *Probiyotik Süt Ürünlerinin Beslenme ve Sağlık Üzerindeki Etkisi*, VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, 279-286, (2000).
138. ZHU, W.M., LIO, W. ve WU, D.Q., *Isolation and Characterization of A New Bacteriocin from Lactobacillus gasseri KT7*, Journal of Applied Microbiology, **88**, 877-886, (2000).