

**NAR SUYUNDA ÜRÜN ÖZELLİKLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİNDE PROBİYOTİK BAKTERİLERİN
KULLANIMI**

Hilal GENÇ

Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Ocak-2016

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1503F107.**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Hilal Genç'in “**Nar Suyunda Ürün Özelliklerinin Geliştirilmesinde Probiyotik Bakterilerin Kullanımı**” başlıklı **İleri Teknolojiler** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 20.01.2016 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Prof. Dr. MERİH KIVANÇ
Üye :	Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU
Üye :	Yrd. Doç. Dr. Emine DİNÇER

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun..... tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

NAR SUYUNDA ÜRÜN ÖZELLİKLERİNİN GELİŞTİRİLMESİNDE PROBİYOTİK BAKTERİLERİN KULLANIMI

HİLAL GENÇ

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

2016, 116 sayfa

Günümüzde probiyotik içeren gıdalara olan ilgi artmış ve bu gıdalar insan beslenmesinde önemli bir yer edinmişlerdir. Meyve sularının içerdiği mineral, vitamin, lif ve antioksidan gibi yararlı besinsel içerikler onları probiyotik kullanımı için uygun bir ortam haline getirmektedir. Nar suyu, zengin fenolik içeriği ve antioksidatif özellikleriyle insan sağlığı için büyük önem taşımaktadır. Çalışmada kullanılan fermente gıdalardan izole edilmiş, tannaz aktivitesi yüksek 6 laktik asit bakterisinin probiyotik özellikleri belirlenmiştir. Daha sonra taze nar sularına aşılama izolatların meyve suyunda fenolik madde miktarı ve diğer analizleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Nar suyu içerisindeki tanen miktarı düşürülerek daha hoş bir lezzete sahip, probiyotik meyve suyu elde edilmesine çalışılmıştır. Duyusal analizler sonucu *L. plantarum* A4 izolatında daha az buruk bir lezzet elde edilmiştir. Buna karşın probiyotik bir nar suyu elde edilememiştir. Nar suyuna ilave edilen laktik asit bakterileri düşük pH da canlı kalmalarına rağmen nar suyu içinde 48 saat içerisinde canlılıklarını yitirmiştir.

Anahtar Kelimeler: Probiyotik, Tannaz, Nar suyu

ABSTRACT

Master of Thesis

THE USE OF PROBIOTIC BACTERIA IN THE DEVELOPMENT OF PRODUCT CHARACTERISTICS OF THE POMEGRANATE JUICE

HİLAL GENÇ

Anadolu University Graduate School of Sciences

Advanced Technologies Departmen

Supervisor: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

2016, 116 pages

Nowadays, the interest for probiotic foods has risen and these foods have a important role on human diet. Due to the minerals, vitamins, fibers and the antioxidants that fruit juices have, they provide a suitable environment for probiotic use. Pomegranete juice with its rich phenolic content and antioxidative feature has been of major importance for human health. The probiotic features of 6 lactic acid bacteria strains with high tannase activity, used in the study and isolated from fermented foods, has been determined. Then, the effects of isolates inoculated with fresh pomagranate juice on the phenolic matter quantity in juice and other analyses have been tested. By lowering the tannin amount in pomegranete juice, probiotic fruit juice with a better taste has been tried to be provided. In the result of the sensorial analyses, a less acrid taste has been obtained in *L. plantarum* A4 isolate. In contrast, a probiotic pomegranate juice could be not obtained. However lactic acid bacterias adding to pomegranate juice are able to survive in low pH degrees, they are not able to live in pomegranate juice in the end of 48 hours.

Keywords: Probiotic, Tannase, Pomegranete juice

TEŐEKKÖR

Çalıőmamın gerekleőmesi sırasında bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösterip alıőmamı yakından takip eden değerli hocam Prof. Dr. Merih Kıvanç'a,

Analizler sırasında ICP okumaları için yardımcı olan Özgür Ateő'e,

Aynı alıőma ortamını paylaőtığım ve ihtiyacım olan her an yanımda hissettiğim sevgili laboratuvar arkadaşlarıma,

Hayatımın her aőamasında yanımda oldukları gibi yüksek lisans sürecim boyunca da elimi bırakmayıp maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen çok değerli aileme ve Onur Bilgin'e teşekkür ederim.

Hilal GENÇ

Ocak-2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x

1. GİRİŞ	1
1.1. Probiyotik.....	2
1.1.1. Probiyotik tanımı ve tarihçesi	2
1.1.2. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar	3
1.1.3. Probiyotik bakterilerin genel özellikleri.....	5
1.1.4. Probiyotik bakterilerde aranan özellikler	6
1.1.5. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen metabolik ürünler	8
1.1.5.1. Laktik asit üretimi	8
1.1.5.2. Hidrojen peroksit üretimi	8
1.1.5.3. Bakteriyosin üretimi.....	9
1.1.6. Ekstraselüler polisakkarit (EPS) üretimi.....	10
1.1.7. Probiyotik bakterilerin gıdalarda kullanımı	10
1.1.7.1. Probiyotik süt ve süt ürünleri	11
1.1.7.2. Sebzelerden elde edilen probiyotik ürünler.....	12
1.1.7.3. Meyvelerden elde edilen probiyotik ürünler	13
1.1.7.4. Et ürünlerinde probiyotikler	13
1.1.8. Probiyotik bakterilerin sağlık üzerine etkileri.....	13
1.2. Tanenler	14
1.2.1. Tannaz enzimi ve önemi	15
1.2.2. Tannaz enziminin uygulama alanları	15
1.3. Nar Suyunun Genel Bileşimi.....	16

2. MATERYAL VE YÖNTEM 18

2.1. Materyal.....	18
2.1.1. Test mikroorganizmaları	18
2.1.2. Besi ortamları	19
2.1.2.1. MRS agar	19
2.1.2.2. MRS agar laktoz ilaveli.....	20
2.1.2.3. MRS agar fruktoz ilaveli.....	20
2.1.2.4. MRS agar sükroz ilaveli.....	20
2.1.2.5. MRS agar galaktoz ilaveli.....	21
2.1.2.6. MRS agar maltoz ilaveli	21
2.1.2.7. MRS agar rafinoz ilaveli	21
2.1.2.8. MRS broth.....	21
2.1.2.9. Mueller Hinton broth	22
2.1.2.10. Mueller Hinton agar (70191, Fluka)	22
2.1.3. Kullanılan boyalar	22
2.1.3.1. Kristal violet.....	22
2.1.3.2. Safranin	23
2.1.3.3. Lugol	23
2.1.4. Kullanılan çözeltiler	24
2.1.4.1. Fizyolojik tuzlu su.....	24
2.1.4.2. %20'lik gliserol çözeltisi.....	24
2.1.4.3. Süt tozu çözeltisi (% 15'lik).....	24
2.1.4.4. Safra tuzu solüsyonu	24
2.1.4.5. Fosfat buffer	24
2.1.4.6. Ringer solüsyonu.....	25
2.1.4.7. Elektrolit solüsyonu	25
2.1.4.8. 0,05 M K ₂ HPO ₄ tampon (pH 6,5)	25
2.1.4.9. Kullanılan antibiyotikler	26
2.1.4.10. Proteolitik aktivite tayini için standart çözelti	26
2.1.4.11. 0,72 N Triklorasetik asit çözeltisi	26
2.1.4.12. Na ₂ CO ₃ .Na ₄ P ₂ O ₇ çözeltisi.....	27
2.1.4.13. Fenol ayıracı.....	27

2.1.4.14. 0,1 N NaOH çözeltisi	27
2.1.4.15. Hidrojen peroksit tespiti için standart çözelti.....	27
2.1.4.16. 1 N H ₂ SO ₄ çözeltisi	28
2.1.4.17. Amonyum molibdat çözeltisi	28
2.1.4.18. Potasyum iyodür çözeltisi	28
2.1.4.19. Sodyum fosfat tamponu	28
2.1.4.20. Potasyum klorür çözeltisi	28
2.1.4.21. Sodyum asetat çözeltisi	29
2.1.4.22. Toplam fenol tayini için standart çözelti.....	29
2.1.4.23. Fenol ayracı.....	29
2.1.4.24. 7 mM ABTS solüsyonu.....	29
2.1.4.25. 2,5 mM Potasyum persülfat çözeltisi	30
2.1.4.26. 0,1 mM DPPH solüsyonu.....	30
2.2. Yöntem.....	30
2.2.1. Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Hazırlanması	30
2.2.1.1. Gram boyama	30
2.2.1.2. Katalaz testi.....	31
2.2.2. Probiyotik Özelliklerinin İncelenmesi	31
2.2.2.1. Antimikrobiyal aktivite	31
2.2.2.2. Bazı enzimlerin antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi	32
2.2.2.3. Düşük pH dirençliliği.....	33
2.2.2.4. Safra tuzuna dirençlilik	34
2.2.2.5. Lizozim dirençliliği.....	34
2.2.2.6. Biyofilm oluşturma özelliklerinin incelenmesi.....	35
2.2.2.7. Otoagregasyon	35
2.2.2.8. Koagregasyon.....	36
2.2.2.9. Hidrofobisite	36
2.2.2.10. Antibiyotik duyarlılık testi	37
2.2.2.11. Antioksidan tktivite tayini.....	37
2.2.3. Metabolik Ürünlerin Belirlenmesi	38
2.2.3.1. Proteolitik aktivite tayini.....	38
2.2.3.2. Laktik asit üretiminin tayini	39

2.2.3.3. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) üretiminin tayini.....	39
2.2.4. Ekstraselüler polisakkarit (EPS) üretimi.....	40
2.2.5. Meyve sularının hazırlanması.....	41
2.2.6. Meyve suyuna uygulanan analizler.....	41
2.2.6.1. pH tayini.....	41
2.2.6.2. Titrasyon asitliği tayini.....	41
2.2.6.3. Suda çözünür kuru madde tayini.....	42
2.2.6.4. Toplam kuru madde tayini.....	42
2.2.6.5. Renk ölçümleri.....	42
2.2.6.6. Antosiyanin tayini.....	42
2.2.6.7. Toplam fenolik madde tayini.....	43
2.2.6.8. Antioksidan aktivite tayini.....	43
2.2.6.9. Mineral madde miktarı.....	44
2.2.6.10. Nar sularında bakteri sayımları.....	44
2.2.6.11. Duyusal analiz.....	45

3. BULGULAR **45**

3.1. Fermente Ürünlerden İzole Edilen Laktik Asit Bakterileri.....	45
3.2. İzolatların Probiyotik Özelliklerinin İncelenmesi.....	46
3.2.1. Laktik asit bakterilerine ait süpernatantın antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi.....	46
3.2.2. Antimikrobiyal aktiviteye bazı enzimlerin etkisinin belirlenmesi...	50
3.2.3. Düşük pH dirençliliğinin sonuçları.....	51
3.2.4. Safra tuzuna dirençlilik sonuçları.....	53
3.2.5. Lizozim dirençliliği sonuçları.....	54
3.2.6. Biyofilm oluşturma özellikleri.....	55
3.2.7. Otoagregasyon ve koagregasyon sonuçları.....	56
3.2.8. Hidrofobisite değerleri.....	57
3.2.9. Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları.....	57
3.2.10. Antioksidan aktivite test sonuçları.....	58
3.3. Metabolik Ürünlerin Belirlenmesi.....	59
3.4. Ekstraselüler Polisakkarit (EPS) Üretimi Miktarı.....	61

3.5. Meyve Suyuna Uygulanan Analiz Sonuçları.....	61
3.5.1. pH değerleri.....	63
3.5.2. Titrasyon asitliği değerleri	68
3.5.3. Suda çözünür kuru madde miktarı	73
3.5.4. Toplam kuru madde analiz sonucu	77
3.5.5. Renk ölçüm sonuçları.....	77
3.5.6. Antosiyanin Miktarları	83
3.5.7. Toplam fenolik madde miktarları.....	83
3.5.8. Antioksidan aktivite test sonuçları	88
3.5.8.1. ABTS.+(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6- sulphonicacid) radikal katyonu yakalama aktivitesi	88
3.5.8.2. DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) radikal katyonu yakalama aktivitesi.....	88
3.5.9. Nar sularında bakteri sayım sonuçları.....	91
3.5.10. Duyusal analiz sonuçları	92
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	93
KAYNAKLAR	105

ŞEKİLLER DİZİNİ

3.1 Saf filtratların <i>Salmonella typhimurium</i> üzerine olan antimikrobiyal aktivitesi.....	49
3.2 Saf filtratların <i>Listeria monocytogenes</i> üzerine olan antimikrobiyal aktivitesi.....	49
3.3 Kongo kırmızılı agar üzerinde siyah ve pembe koloni oluşumu.....	56
3.4 Proteolitik aktivite tayini standart eğrisi (650 nm)	59
3.5 Hidrojen peroksit üretimi standart eğrisi (350 nm).....	60
3.6 Nar suyu örneklerinin renk ölçümlerinin yapılması (420 nm).....	82
3.7 Nar suyu örneklerinin potasyum klorür (pH 1.0) ve sodyum asetat (pH 4.5) çözeltileri ile hazırlanışı.....	83
3.8 Toplam fenolik madde tayini için standart eğri.....	84
3.9 Farklı sıcaklıklardaki nar suyu örneklerinin ABTS yöntemi ile antioksidan aktivite tayini	89
3.10 Farklı sıcaklıklardaki nar suyu örneklerinin ABTS yöntemi ile antioksidan aktivite tayini	89
3.11 Nar suyu örneklerinin DPPH yöntemi ile antioksidan aktivite tayini (1, 2, 3, 4, 5 mg/ml)	91

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1 Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar	4
1.2 Nar sularının bazı özellikleri.....	17
2.1 Tannaz aktivitesi yüksek laktik asit bakterileri	18
2.2 Test Mikroorganizmaları (NRRL: Northern Regional Research Laboratory of the USDA, Peoria, Illinois, USA. ATCC: American Type Culture Collection, USA).....	19
3.1 Daha önceki çalışmalarda elde edilen izolatların kaynakları.....	45
3.2 Laktik asit bakterilerinin tanımlama, gram boyama, hücre morfolojisi ve katalaz testleri	46
3.3 Laktik asit bakterilerinin hücresiz filtratının bazı patojen organizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteleri	47
3.4 Laktik asit bakterilerine ait hücresiz süpernatanta katalaz enzim ilavesinden sonra patojen organizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteleri.....	48
3.5 Proteinaz K'nın antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi	50
3.6 Lizozimin antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi	51
3.7 Tripsinin antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi	51
3.8 Laktik asit bakterilerinin düşük pH değerlerindeki canlılığı (kob/ml).....	52
3.9 Laktik asit bakterilerinin safra tuzuna dirençlilik test sonuçları (560 nm)	54
3.10 Laktik asit bakterilerinin lizozime karşı dirençliği (% Direçli bakteri)	55
3.11 Laktik asit bakterilerinin farklı şekerlerde biyofilm oluşturma etkileri (570nm).....	56
3.12 Laktik asit bakterilerinin otoagregasyon ve koagregasyon test sonuçları.....	57
3.13 Laktik asit bakterilerinin % hidrofobisite değerleri	57

3.14 Laktik asit bakterilerinin antibiyotik test sonuçları.....	58
3.15 Laktik asit bakterilerinin ABTS antioksidan aktivite sonuçları (%).....	58
3.16 Laktik asit bakterilerinin hidrojen peroksit ve proteolitik aktivite miktarları.....	60
3.17 İzolatların laktik asit üretim miktarları (%)	61
3.18 Laktik asit bakterilerinin ekstrasellüler madde üretim miktarları (mg/ml)..	61
3.19 Çalışmada kullanılan nar suyunun analiz sonuçları.....	62
3.20 Nar suyunun mineral madde sonuçları.....	62
3.21 <i>L. brevis</i> ES6 izolatu içeren nar suyunun pH değerleri.....	63
3.22 <i>L. plantarum</i> A6 izolatu içeren nar suyu pH değerleri	64
3.23 <i>L. brevis</i> A6X izolatu içeren nar suyu pH değerleri	65
3.24 <i>L. plantarum</i> A4 izolatu içeren nar suyu pH değerleri	66
3.25 <i>L. plantarum</i> MT4 izolatu içeren nar suyu pH değerleri	67
3.26 <i>E. faecium</i> DZ2 izolatu içeren nar suyu pH değerleri.....	68
3.27 <i>L. brevis</i> ES6 izolatu içeren nar suyu titrasyon asitliği sonuçları (g/L).....	69
3.28 <i>L. plantarum</i> A6 izolatu içeren nar suyu titrasyon asitliği sonuçları (g/L)....	70
3.29 <i>L. brevis</i> A6X izolatu içeren nar suyu titrasyon asitliği sonuçları (g/L).....	71
3.30 <i>L. plantarum</i> A4 izolatu içeren nar suyu titrasyon asitliği sonuçları (g/L)....	71
3.31 <i>L. plantarum</i> MT4 izolatu içeren nar suyu titrasyon asitliği sonuçları (g/L). 72	
3.32 <i>E. faecium</i> DZ2 izolatu içeren nar suyu titrasyon asitliği sonuçları (g/L)	73
3.33 <i>L. brevis</i> ES6 izolatu içeren nar suyunun suda çözünür kuru madde sonuçları (Briks°)	74
3.34 <i>L. plantarum</i> A6 izolatu içeren nar suyunun suda çözünür kuru madde sonuçları (Briks°)	74
3.35 <i>L. brevis</i> A6X izolatu içeren nar suyunun suda çözünür kuru madde	

sonuçları (Briks°)	75
3.36 <i>L. plantarum</i> A4 izolatu içeren nar suyunun suda çözünür	
kuru madde sonuçları (Briks°)	75
3.37 <i>L. plantarum</i> MT4 izolatu içeren nar suyunun suda çözünür	
kuru madde sonuçları (Briks°)	76
3.38 <i>E. faecium</i> DZ2 izolatu içeren nar suyunun suda çözünür	
kuru madde sonuçları (Briks°)	77
3.39 <i>L. brevis</i> ES6 izolatu içeren nar suyunun renk analiz sonuçları (420 nm).....	78
3.40 <i>L. plantarum</i> A6 izolatu içeren nar suyunun renk analiz sonuçları (420 nm)	79
3.41 <i>L. brevis</i> A6X izolatu içeren nar suyunun renk analiz sonuçları (420 nm) ...	79
3.42 <i>L. plantarum</i> A4 izolatu içeren nar suyunun renk analiz sonuçları (420 nm)	80
3.43 <i>L. plantarum</i> MT4 izolatu içeren nar suyunun renk analiz sonuçları (420 nm).....	81
3.44 <i>E. faecium</i> DZ2 izolatu içeren nar suyunun renk analiz sonuçları (420 nm).	82
3.45 Nar suyu örneklerinin toplam antosiyanin miktar tayini sonuçları (mg/L)...	83
3.46 <i>L. brevis</i> ES6 izolatu içeren nar suyunun toplam fenolik madde miktarı	84
3.47 <i>L. plantarum</i> A6 izolatu içeren nar suyunun toplam fenolik madde miktarı	85
3.48 <i>L. brevis</i> A6X izolatu içeren nar suyunun toplam fenolik madde miktarı....	86
3.49 <i>L. plantarum</i> A4 izolatu içeren nar suyunun toplam fenolik madde miktarı	86
3.50 <i>L. plantarum</i> MT4 izolatu içeren nar suyunun toplam fenolik madde miktarı	87
3.51 <i>E. faecium</i> DZ2 izolatu içeren nar suyunun toplam fenolik madde miktarı..	87
3.52 Nar sularının ABTS sonuçları (%).....	88
3.53 Nar sularının farklı konsantrasyonlardaki DPPH sonuçları %.....	90

3.54 30°C %5 CO ₂ içeren koşullarda inkübe edilen nar sularının bakteri sayım sonuçları (kob/ml)	91
3.55 Nar suyunun duyusal analiz sonuçları.....	92
3.56 Laktik asit bakterileri içeren nar sularının duyusal analiz sonuçları.....	92

1. GİRİŞ

Özellikle son yıllarda insanların doğal katkı maddelerine yönelmek istemeleri probiyotik içeren gıdaların üretimini, tüketimini ve bu gıdalardan daha fazla nasıl faydalanılabilir sorusunu araştırma konusu olarak araştırmacıların karşısına çıkarmaktadır. Kimyasal madde kullanımı yerine probiyotiklerin kullanılmasının daha sağlıklı ve ekonomik olacağı düşünülmektedir. Teknolojiyle birlikte insanlar, içerisinde kanserojenik katkı maddeleri barındıran gıdalar yerine, mikroorganizmalardan faydalanarak daha doğal ve sağlıklı beslenmeyi tercih etmeye başlamışlardır.

Probiyotik mikroorganizmaların en önemli grubunu laktik asit bakterileri oluşturmaktadır. Laktik asit bakterileri et, süt gibi gıdaların korunmasında ve çeşitli gıdaların fermentasyonunda rol oynamaktadırlar. Ayrıca fermentatif ürünlerin raf ömrünün uzatılmasında önemli rol oynayan antimikrobiyal bileşikleri üretmektedirler. Son 20 yıl içerisinde laktik asit bakterilerinin organik asit, hidrojen peroksit, antifungal peptitler, ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyal bileşikleri üretebilme kabiliyetlerinin araştırılmasında önemli bir artış olmuştur (Zhu ve ark., 2000; Kurt ve Zorba, 2005; Dinçer ve ark., 2009).

Gıda bileşeni olarak fenolik bileşikler, tat, koku ve renk oluşumundaki etkileri, aynı zamanda antimikrobiyal özelliğe sahip olmaları ve insan sağlığı üzerine olumlu etki yapmaları nedeniyle önem taşımaktadırlar. Bu bileşiklerin antioksidan özelliklerinin keşfedilmesi ve kanser gibi oksidatif stres sonucu ortaya çıkan hastalıklara karşı oynadıkları roller büyük önem taşımaktadır (Manach ve ark., 2004). Fenolik bileşiklerin gıdalarda aroma artırıcı oldukları ve laktik asit bakterilerinin metabolizmaları sonucu oluştukları bilinmektedir.

Tanenler, yüksek yapılı bitkilerin genelinde bulunan, suda çözünebilir, polifenol yapısındaki ikincil metabolitlerdir (Ergezer ve Çam, 2008). Sindirim enzimini inhibe edici özellikte oldukları için gıdalarda istenmeyen maddelerdir (Rodriguez ve ark., 2008). Ayrıca içerdikleri tanen miktarına bağlı olarak tüketiminden sonar ağızda buruk bir tat bırakmasına neden olmaktadırlar *Lactobacillus* türleri, gıdalarda bulunan tanenleri hidrolize edip hücrede

tutunmalarını azaltması gibi yeteneklerinden dolayı bu tip ürünlerin üretiminde önemli rol oynamaktadırlar (Temel, 2012).

Tanenleri glukoz ve gallik asite parçalayan karboksil ester hidrolazlar sınıfında yer alan tannaz enzimidir ve çoğu mikroorganizma tannazı üretme yeteneğine sahiptir. Gallik asit, içeceklerde ve yağlarda antioksidan olarak yararlanılan propilgallat sentezinde kullanılmaktadır (Sarıkaya; 2005).

Nar, zengin fenolik madde, vitamin, polisakkarit ve antosiyanin içeriği, antioksidan ve antimikrobiyal oluşu nedeniyle dünyada tüketimi ve üretimi artmakta olan bir meyvedir. Damar üzerindeki hasarı giderme, ishali durdurma, prostat kanseri ve kireçlemeyi önleme, kan glikoz seviyesini koruma, stoking oluşumunu artırma, otooksidasyona karşı hücreleri koruma ve kemik eklemi iltihabını önlemeye karşı etkili olduğu bilinmektedir (Coşkun, 2006). Fakat nar meyvesinin en büyük olumsuzluğu, zengin polifenol içeriği nedeniyle meyve suyunun buruk bir lezzete sahip olmasıdır.

Çalışmada daha önceden fermente gıdalardan izole edilen laktik asit bakterileri arasından, tannaz aktivitesi yüksek olduğu belirlenen 6 izolat seçilmiştir. Bakterilerin ilk önce probiyotik özelliklere sahip olup olmadığı belirlenmiştir. Daha sonra nar suyuna aşılansarak daha iyi lezzette ve probiyotik bir meyve suyu eldesi hedeflenmiştir.

1.1. Probiyotik

1.1.1. Probiyotik tanımı ve tarihçesi

Yeterli miktarda tüketildiği zaman konak canlıının sağlığı üzerine olumlu etkiler yapan canlı mikroorganizmalar probiyotikler olarak tanımlanmaktadır (FAO/WHO, 2006). Probiyotik mikroorganizmalar tüketimleri sonucunda ağızda, sindirim sisteminde, üst solunum yollarında ve ürogenital sistemde canlılıklarını koruyarak bağırsaklara ulaşır burada gelişim göstererek bağırsak çeperlerinde biyolojik etki gösteren mikroorganizma kültürleridir (Özer ve Akın, 2000; Kanmani ve ark., 2013; Turchi ve ark., 2013).

Probiyotik kelimesi Yunanca kökenli olup ‘yaşamsal, canlı için’ anlamına gelmektedir. İlk olarak 1954 yılında Ferdinand Vergin tarafından, patojen olmayan mikroorganizmalar ve onların antimikrobiyal etkilerinin anlatıldığı bir makalede probiyotik teriminden bahsedilmiştir (Corthier, 2004). 1960’lı yıllarda D.M. Lilly ve R.H. Stillwell probiyotikleri, bir mikroorganizmanın, diğerinin büyümesi için salgıladığı maddeler olarak tanımlamıştır (Lilly ve Stilwell, 1965). Fuller (1989) tarafından günümüzde kullanım konseptine uygun olan ‘gıda katkı maddesi olarak intestinal sistemin dengesi ve sağlık üzerine olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar’ olarak tanımlanmıştır (Fuller, 1989). 1994 yılında ise Havenaar ve ark. probiyotiklerin canlı mikroorganizmalar olduğunu ve bu mikroorganizmaların bağırsak mikroflorasının önemli bir elemanı olduğunu söylemişlerdir (Havenaar ve ark., 1994).

Probiyotik terimi, özellikle son 10 yıldır gıdalarda kullanımı ve tüketimi ile sıkça karşılaştığımız bir kavram haline gelmiştir. Aslında probiyotik mikroorganizmalar, fermente gıdalar sayesinde özellikle yoğurt ve peynir gibi temel gıdaların tüketimiyle binlerce yıldır insan beslenmesinin önemli bir parçası olmuştur. 1908 yılında probiyotik kavramıyla nobel ödülü alan Rus mikrobiyolog Elie Metchnikof, yaşlanmanın bağırsaklarda bulunan bakterilerin neden olduğu bir zehirlenme olduğunu ileri sürmüştü, günlük olarak yoğurt yiyen Bulgar’ların yemeyenlere oranla daha uzun ömürlü oldukları teorisini savunmuştur. O dönemde insanlar bağırsakta yaşayan zararlı bakterilerin, laktik asit bakterileri sayesinde sayılarının azalacağı fikrine karşı duyarlılık göstermiş ve buda yoğurdun dünya çapında popüler bir besin maddesi olmasına sebep olmuştur (Gürsoy ve Kınık, 2005).

1.1.2. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar

Günümüzde en yaygın olarak kullanılan probiyotikler laktobasiller’dir. Bunun nedeni ise probiyotiklerin olumlu etkilerinin araştırılmasında, ilk bilimsel teorilerde kullanılmış olmalarıdır (Ouwehand ve ark., 2002). *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* bakterileri ve *Bifidobacterium* strainleri sıklıkla kullanılanlarıdır. Ayrıca *Saccharomyces cerevisiae* gibi mayalar ve *Escherichia coli*, *Bacillus* gibi bakteri türleri de

probiyotik olarak kullanılmaktadır (Song ve ark., 2012). Gıda, insan ve hayvan kaynaklı izolatların büyük çoğunluğunda *E. faecalis* ve *E. faecium* türleri bulunmuştur. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 1.1’ de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar (Salminen ve ark., 1998)

<i>Lactobacillus</i> türleri	<i>Lactobacillus cellobiosus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus johnsonii</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactobacillus gasser</i> , <i>L. casei</i>
<i>Bifidobacterium</i> türleri	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium thermophilum</i>
<i>Enterococcus</i> türleri	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>
<i>Bacillus</i> türleri	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus lentus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus coagulans</i>
<i>Pediococcus</i> türleri	<i>Pediococcus cerevisiae</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Streptococcus</i> türleri	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> , <i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Bacteriodes</i> türleri	<i>Bacteriodes capillus</i> , <i>Bacteriodes suis</i> , <i>Bacteriodes ruminicola</i> , <i>Bacteriodes amylophilus</i>
<i>Propionibacterium</i> türleri	<i>Propionibacterium shermanii</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i>

<i>Leuconostoc</i> türleri	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>Mesenteroides</i>
Küfler	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>
Mayalar	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida torulopsis</i>

Probiyotik meyve sularında en çok kullanılan bakteri türleri *L. plantarum*, *L. delbruekii*, *L. acidophilus*, *L. casei* ve *L. brevis*'dir (Song ve ark., 2012).

1.1.3. Probiyotik bakterilerin genel özellikleri

Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların büyük çoğunluğu laktik asit bakteri grubundan oluşmaktadır. Laktik asit bakterileri basil ve kok formunda olabilen, spor oluşturmeyen gram pozitif ve katalaz negatif olan bakterilerdir. Bu bakteriler Firmicutes filumuna ait *Eubacteriales* takımı ve *Streptococcaceae* ve *Lactobacillaceae* familyalarının üyeleridir. En önemli cinsleri *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella*'dır. Laktik asit bakterileri anaerob yani oksijensiz koşullar altında gelişim gösterebilirler. Bu nedenle aerotolerant mikroorganizmalar olarak adlandırılırlar (Salminen, 2004). 1919 yılında laktik asit bakterilerinin ilk sınıflandırması Orla-Jensen tarafından fiziksel ve kimyasal yapısı, ekolojisi, morfolojisi ve optimum üreme yapısı incelenerek bir klasifikasyon şeması oluşturulmuştur. Laktik asit bakterileri *Thermobacterium*, *Streptobacterium* ve *Betabacterium* olmak üzere üç taksonomiye ayrılmıştır (Yörük ve Güner, 2011).

Kok, çomak, tetra formasyon ve ovoid şeklinde bulunabilen laktik asit bakterileri gelişme sıcaklıkları bakımından termofil ve mezofil özellik göstermektedirler. 10-45 °C arası sıcaklıklarda, yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişme ve asit veya alkali tolere etme yeteneklerine sahiptirler (Şahin, 1995; Etöz, 2006). Bu mikroorganizmaların büyük çoğunluğu optimum 4-4,5 pH 'da gelişebilmektedirler. Fakat 3,2 gibi düşük 9,6 gibi yüksek pH' larda da gelişim gösterdikleri bilinmektedir (Holt ve ark., 2000).

Laktik asit bakterileri fermentasyonda oluşturdukları ürüne göre de sınıflandırılırlar. Heterofermentatif laktik asit bakterileri, glukozu Hegzos Mono Fosfat (HMF) yolu ile parçalayıp laktik asit ve bununla birlikte etanol, asetik asit, fruktoz ve gliserol üretirlerken homofermentatif laktik asit bakterileri Fruktoz Di Fosfat (FDP) yoluyla parçalayarak yalnızca laktik asit üretirler (Yetişmeyen, 1995; Halkman, 1991; Drinan ve ark. 1976; Prescott 1987). Laktik asit, mikroorganizmalar üzerinde olumsuz etkisi olan bir organik asittir. Ekşi tatta ve kokusuz olan bu asit, sahip olduğu kolay polimerleşme özelliğiyle besin maddelerinin korunmasında asidite sağlamaktadır (Çetin, 1983).

Laktik asit bakterileri antimikrobiyal özelliklerinden dolayı diğer kontaminant mikroorganizmaların üremelerini engellerler (Lindgren ve Dobrogozs, 1990). Gıdaların besin değerinin arttırılması, raf ömrünün uzatılması ve bağırsak enfeksiyonlarının kontrolü için kullanımı laktik asit bakterilerini son yıllarda önemli bir konuma getirmiştir (Lewus ve ark., 1991).

Ayrıca bu bakteriler, endüstriyel kullanımdaki en önemli mikroorganizma grubunu oluşturmaktadır. Gıda kaynaklı ürünlerin üretimi, makromoleküllerin, enzim ve metabolitlerin üretimi ve insan diyetinde düzenleme amacıyla kullanılmaktadırlar (Pfeiler ve Klaenhammer, 2007). Genellikle laktik asit bakterileri, bitki ve bitki artıklarında, süt ve süt ürünlerinde, meyve ve sebzelerde, insan ağız, bağırsak mukozası, ve vajina florasında bulunabilirler. Bu bakterilerin ürünlere kendine has tat, koku ve aroma sağladığı bilinmektedir (Evren ve ark. 2011).

1.1.4. Probiyotik bakterilerde aranan özellikler

Probiyotik bakteriler, intestinal ve vajen floralarında doğal dengeyi sağlayarak bağırsak bakteriyel dengesini yenileyebilmektedir. İstenmeyen mikroorganizmaların zararlı metabolitler oluşturmalarını önleyerek ve toksik gıda bileşenlerini parçalayarak sağlıklı bir yaşam sağlamaktadırlar. Bağışıklık sisteminin güçlendirme, bağırsak kanseri riskini azaltma, serum kolestrol düzeyini azaltma, kolon kanserini önleme, sindirim sistemini düzenleme, tümör oluşumunu inhibe etme, diyare oluşumunu engelleme, vitamin üretimi, laktoz toleransını

azaltma ve kalsiyum absorpsiyonunu geliştirme gibi faydaları bulunmaktadır (Tamime ve Marshall, 1997; Sağdıç ve ark., 2004).

FAO/WHO (2002) yönergesinde probiyotik aday strainlerin tanımlanma aşamasını strainlerin fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi izlemektedir. 2002 yılında yayınlanan yönergede fonksiyonel özellikler olarak asit ve safra direnci, antimikrobiyal aktivite, insan epitel hücrelerine ya da mukus tabakasına tutunma, patojenlerin tutunma yeteneğini azaltma ve safra tuzlarını hidrolize etme yer almaktadır.

Probiyotik bakterilerde aranan bazı özellikler aşağıda belirtildiği şekilde sıralanmaktadır (Yılsay ve Kurdal, 2000).

- Normal insan bağırsağı kökenli olmalıdır.
- Kullanıldığı canlıda yan etki oluşturmayacağı konusunda güvenilir olmalıdır.
- Bağırsaklara ulaşıncaya kadar geçen sürede canlı kalabilmelidir.
- Düşük pH ve safra tuzlarına karşı etkilenmeden bağırsakta ve midede kalabilmelidir, asit ve tuzu tolere edebilmelidir.
- Bağırsak hücrelerine tutunabilmeli ve kolonizasyon gösterebilmelidir
- Antibiyotiklere karşı direçli olmalıdır. Bağırsak florasında düzenleyici olarak görev alacağı için bağırsakta bulunan antibiyotiklerden etkilenmemelidir.
- Antimikrobiyal maddeler üretebilmelidir.
- Patojenlerle kontamine olmamalıdır.
- Depolama sırasında canlılığını koruyabilmelidir.

Probiyotik kültürün, ürün içerisinde minimum miktarının 10^7 cfu/ml olması gerekmektedir. Örneğin Japonya'da probiyotik süt ürünlerinin raf ömrü boyunca 40×10^9 kob/g probiyotik mikroorganizma bulundurması gerekliliği bulunmaktadır (Shortt, 1999). *L. casei* probiyotik laktik asit bakterisinin cheddar peynirinin üretiminde 6 aylık depolama süresinde 40×10^6 kob/g değerinde kaldığı ve bunun probiyotiklerin depolama süreçleri için gerekli olduğu bilinmektedir (Madkor ve ark., 2000).

1.1.5. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen metabolik ürünler

1.1.5.1. Laktik asit üretimi

Laktik asit 1780 yılında keşfedilen ve 1881 yılında ticari olarak ekşimiş sütten elde edilen organik hidroksi asittir. Bu asit tabiatta oldukça fazla bulunmakta ve asetik asitle birlikte gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır. Ekşi tatta bir organik asit olan laktik asit; membran yapısını bozmak suretiyle çeşitli mikroorganizmalar üzerinde inhibe edici etkiye sahip olan ve endüstriyel anlamda kullanılan kokusuz ve saydam bir maddedir (TSE, 1991).

Süt endüstrisinde starter olarak işlev gören laktik asit bakterilerinin fermentasyon sürecinde süt şekeri olarakta adlandırılan laktozun fermentasyonunu sağlayarak laktik asit oluşturmaları, en önemli işlevlerinden biri olmaktadır (Tükel ve Akçelik, 2000). Laktoz fermentasyonunda ana ürün olarak açığa çıkan laktik asit, fermentatif süt ve süt ürünlerinin fiziksel, kimyasal ve aromatik yapısını oluşturmakla birlikte, toksik ve bozulma sebebi olan patojen mikroorganizmalara karşı koruyucu rol oynayarak ürünlerin raf ömrünün uzamasında etkili olmaktadır (Günay, 2012).

İnsan ve hayvan bağırsak mikroflorasına yerleşmiş probiyotik bakteriler tarafından üretilen asetik ve laktik asit sindirim sistemi içerisindeki pH 'nın düşmesiyle ortamda bulunan patojen bakteriler üzerinde bakterisidal ve bakteriyostatik etki yapmaktadırlar (Sağdıç ve ark., 2004).

Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda bazı laktik asit bakterilerinin ürettiği laktik asit ve bakteriyosin sayesinde , mide ülseri ve mide kanserine neden olan *H. pylori* bakterisinin gelişim hızında bir düşüş olduğu ve bu bakterinin üreaz aktivitesinin çok büyük ölçüde azalmasına neden olduğu belirlenmiştir (Ceylan ve Alıç, 2012).

1.1.5.2. Hidrojen peroksit üretimi

Hidrojen peroksit laktik asit bakterileri tarafından ortaya çıkarılan ürünlerden bir diğeridir. Oksitleyici bir bileşik olan hidrojen peroksit birçok patojen mikroorganizmanın vejetatif hücreleri ile sporları üzerinde öldürücü etkiye sahiptirler (Ünlütürk, 1999). Fermente et ürünlerinde hidrojen peroksit oluşumu,

antimikrobiyal etkisi ve ürünlere renk ve lezzet konusunda sağladıkları katkılarıyla büyük bir önem taşıdıkları bilinmektedir (Serdaroğlu ve Özsüner, 1999).

Laktobasiller, oksijenin hidrojen perokside dönüşümünde rol oynayan flavoproteinleri kullanarak diğer organizmaları inhibe edecek kadar yüksek miktarda H₂O₂ oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Bu üretim için 5 farklı enzim kullanılmaktadır. Bu enzimler sırası ile NADH:H₂O₂ oksidaz, pürivat oksidaz, α gliserofosfat-oksidad, süperoksit dismutaz ve NADH peroksidazdır (Dinçer, 2007).

Değişik *Lactobacillus* türlerinin H₂O₂ üretimi ile ilgili literatürlerde 1945–1960 yılları arasında yapılan bazı araştırmalara rastlanmaktadır. Bu çalışmalarda 5°C de *Lactobacillus bulgaricus* ve *L. lactis* türlerinin *Staphylococcus aureus* 'u inhibe edebilecek düzeyde (6–12 µg/ml), yine *L. plantarum*'un ise *Pseudomonas* türlerinin adaptasyon periyodunu (lag faz) uzatacak düzeyde (3–13 µg/ml) H₂O₂ ürettiği, ayrıca laktik *Streptococcus* türlerinin de buzdolabında depolanan sütlerde psikrotrofik bakterilerin gelişmesini önleyecek düzeyde H₂O₂ ürettiği saptanmıştır. 1970 yılında yapılan bir çalışmada kıyılmış sığır etine *S. lactis* ve *Leuconostoc citrovorum* inoküle edilmiş ve bu bakterilerin 7°C de depolamada gram negatif bakterilerin gelişmesini önlediği saptanmıştır (Turantaş, 2007).

1.1.5.3. Bakteriyosin üretimi

Bakteriyosinler, özellikle gram pozitif bakteriler tarafından üretilen, ribozomal yapıda olan, kısmen dar spektrumda bakterisidal aktivite sergileyenisiya dayanıklı birincil ya da modifiye ekstraselüler aktif proteinlerdir. Bakteriyosin üretimini gerçekleştiren bakteri kendi ürününe karşı özel yapıda bir immün mekanizmasına sahip olduğu bildirilmiştir (Başbülbül ve Bıyık, 2010).

Araştırmacıların bakteriyosinleri keşfi 1925 yılında *E. coli* tarafından sentezlenmiş olan colicin'in farkedilmesiyle başlamıştır. Günümüzde hala bakterilerin bakteriyosinleri neden sentezledikleri tam anlamıyla belirlenememiş olsada, üretim mekanizmaları, RNA dizilişleri ve kökenleri açıklığa kavuşturulmuştur. Plazmid ve kromozal kökenli olarak ayrılan bakteriyosinlerin bir çok ortak özelliklere sahip oldukları saptanmıştır (Kurt ve Zorba, 2005).

Klaenhammer tarafından yapılan ve geçerliliğini koruyan bakteriyosin sınıflandırılmasında bazı ölçütler kullanılmıştır. Bunlar bakteriyosinin ısı ve

enzimatik duyarlılığı, translasyon sonrasında modifiye edilen amino asitlerinin varlığı, moleköl ağırlıkları ve etki mekanizmalarıdır. Buna göre bakteriyosinler 4 gruba ayrılmaktadırlar. 1. grup bakteriyosinler içerisinde en bilindik olarak nisin bulunduran lantibiyotikleridir. En fazla 19 aminoasit büyüklüğündedirler. 2. grup bakteriyosinler 1. grubun tersine lantiyonin içermeyen 30-60 amino asit büyüklüğündedirler. 3. grupta ise laktasin B₁ ve Helvetisin bulunmaktadır. Son olarak 4.grup bakteriyosinlerin en bilindik üyeleri glikoproteinlerdir (Akkoç ve ark., 2009).

1.1.6. Ekstraselüler polisakkarit (EPS) üretimi

Ekzopolisakkaritler (EPS), dallanmış şeker birimlerini içeren uzun zincirli, formları hücre duvarına birleşmiş şekilde olan kapsül yapısı ya da hücre duvarı dışında biriken polisakkaritlerdir (Yılmaz ve Çelik, 2007; Karaca ve ark., 2010).

EPS'ler bakterileri koruyucu bir örtü gibi sararak olumsuz çevre koşullarından korunmasında ve yüzeylere tutunmasında rol oynamaktadırlar. Ayrıca, zararlı bir ortamdan uzaklaşmasına da yardımcı olmaktadır. (Moriello ve ark., 2003; Ophir ve Gutnick, 1994).

EPS'lerin gıda endüstrisinde özellikle peynir ve yoğurtta yapı gelişimine sağladıkları katkıların yanında, laktik asit bakterilerinin salgıladığı EPS'lerin antitümoral olma, kolestrolü düşürme ve bağışıklık sistemi güçlendirme gibi sağlık için son derece önemli özellikleri bulunmaktadır (Van Calsteren ve ark., 2002).

1.1.7. Probiyotik bakterilerin gıdalarda kullanımı

Fermente gıda üretimi M.Ö 'ne dayanmasına rağmen, 1861 yılında Louis Pasteur tarafından keşfedilen pastörizasyonla birlikte mikroorganizma ve fermantasyon ilişkisi ortaya çıkmıştır. Bu ilişkinin anlaşılmasından sonra laktik asit bakterilerine karşı olan ilgi hızla artış göstermiştir (Arslankoz, 2011).

Gıdaların raf ömrünü uzatmak, fiziksel ve kimyasal özelliklerini geliştirmek amacıyla kullanılan katkı maddelerinin fazla tüketimi, kanserojenik ve toksik etki gösterebilmektedir. Tükettiğimiz gıdaların güvenilir olması için mümkün olduğunca proses uygulamalarının kullanılması yerine doğal katkı maddelerinin

tercih edilmesi tüketicilerin tercihi olmuştur (Kurt ve Zobra, 2005). Oksijensiz ve buzdolabı koşullarında dahi üreme ihtimali bulunan patojen mikroorganizmalardan korunabilmek için antimikrobiyal metabolitlere sahip katkı maddelerinin kullanılması gıdaların güvenilirliği hakkında duyulan endişeyi azaltacaktır (Soomro ve ark., 2002). Koruyucu olarak kullanılan organik asitler ve ürettikleri antimikrobiyal peptitler nedeni ile laktik asit bakterileri ve diğer bakteriler arasındaki etkileşimler çeşitli gıdaların üretiminde özellikle de fermente gıdalarda oldukça geniş bir şekilde araştırılmıştır. Bunun dışında laktik asit bakterilerinin insanlar tarafından kullanılması güç olan ve toksik etkisi bulunabilen bileşenleri daha küçük molekülü, sindirilebilen ya da toksik etkisinin ortadan kalktığı moleküllere parçalayabilme özelliği de gıdalarda kullanılmaları için avantaj sağlayacağı düşünülmektedir (Visser ve ark., 1986; Arıcı, 2008). Laktik asit bakterileri ürettikleri laktik asit sayesinde gıdalarda koruyucu olarak işlev görmektedirler.

Laktik asit bakterileri bakteriyosin olarak isimlendirilmiş küçük, ribozomal, ısıya dayanıklı, bakterisidal aktivite gösteren peptitler üretmektedirler. Gıdalara koruyucu olarak bakteriyosin ilave edilmesiyle; gıdaların raf ömrü uzatmakta, saklama koşullarından farklı sıcaklık değerlerinde korunması sağlanmakta, gıda kaynaklı patojenlerin çoğalma riski azaltılmakta, kimyasal koruyucuların kullanım zorunluluğu fikri yerini biyokoruyuculara bırakmakta ve gıdaların besinsel değerleri daha iyi korunabilmektedir (Kavas ve Kavas, 2011).

1.1.7.1. Probiyotik süt ve süt ürünleri

Süt ve süt ürünlerinde laktik asit bakterilerinin kullanımı çok eski tarihlere dayanmaktadır. Probiyotik bakterilerin kullanımından beri taşıyıcı olarak en fazla kullanılan gıdalar fermente süt ve yoğurt gibi ürünler olmuştur (Stanton ve ark., 1998). Gıdaların besleyici değeri, içerdikleri besin maddelerinin yeteri kadar sindirilebilir olmasına bağlıdır. Fermente süt ürünlerinin besleyici değeri ve sindirilebilirliği süte göre daha yüksektir. K, B6 ve B12 vitaminleri açısından daha zengin bir içeriğe sahiptirler (Kılıç, 2001). Laktokoklar, laktozu fermente edebilme sonucu laktik asit oluşturmaları, proteolitik aktivite göstermeleri ve bakteriyosin

üretimleriyle starter kültür olarak tanımlanmakta ve fermente süt üretiminde kullanılmaktadır (Akçelik ve ark., 2001).

Yoğurdun tat, aroma ve tekstürel özelliklerinin oluşumu, üretimde rol oynayan bakterilerin metabolik aktiviteleriyle oluşmaktadır. Fermente süt ürünlerinin büyük bir çoğunluğunda rol alan laktik asit bakterileri, ya doğal olarak bulunmakta ya da starter kültür olarak ilave edilmektedir (Lombardi ve ark., 2004). Yoğurt fermentasyonunda starter kültürler rol oynamaktadır. Yoğurt gibi fermente ürünlerin üretimi sırasında kullanılan laktik asit bakterilerinin sindirim sisteminde canlı kalamamaları üzerine probiyotik bakteriler olan *Lactobacillus acidophilus* ve *bifidobakteriler* ürüne ilave edilmektedir (Kalantzopoulos, 1997). Fakat Dave ve Shah tarafından yoğurt bakterilerinin probiyotik bakterilere karşı bakteriyosin üreterek bunları inhibe ettiği saptanmıştır. Örneğin *Lactobacillus acidophilus*'un bakteriyosin üreterek *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus jugurti* ve *Lactobacillus casei* gibi çeşitli suşları etkilemektedir. Bu nedenle probiyotik mikroorganizmaların birbirlerine karşı antagonist etkileri araştırılarak aynı üründe kullanılmaları önerilmiştir (Sağdıç ve ark., 2004).

Peynirin olgunlaşma sürecinde starter kültürler önemli bir rol oynamaktadırlar. Ürettikleri laktik asit pıhtılaşmaya yardımcı olmakta ve çeşitli aromaları üreterek pıhtıya asit tadını vermektedir. Ayrıca bu bakteriler peynirde bozulmaya neden olabilecek bakterilerin gelişimini inhibe etmektedirler (Duan ve ark. 2007).

Kefir üretimi esnasında, farklı mikroorganizmalar içeren kefir taneleri kullanılmaktadır. Bu taneler içerisinde *L. bulgaricus*, *L. brevis*, *L. subsp. lactis diacetilactis* gibi laktik bakterilerine ve laktozu fermente edebilen mayalara rastlanmıştır (Ünlütürk ve Turantaş, 1998; Kıvanç ve ark., 2010).

1.1.7.2. Sebzelerden elde edilen probiyotik ürünler

Zeytin ve turşu gibi bitki kökenli gıdaların fermantasyonunda *Lactobacillus plantarum*, bazı sebzelerin fermantasyonunda ise *Lactobacillus sanfrancisco*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum* gibi türlerin kullanıldığı bilinmiştir (Lücke, 1996). Soya fasülyesi yüksek protein içeriği ve niteliğinden dolayı son zamanlarda araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Laktik

asit bakterileri ve Bifidobacteria'nın farklı türleri kullanılarak fermente soya sütü üretimi üzerine çalışmalar bulunmaktadır (Wang ve ark., 2002; Tsai ve ark., 2006).

1.1.7.3. Meyvelerden elde edilen probiyotik ürünler

Günümüzde, probiyotik meyve sularına karşı artan bir talep söz konusudur. Meyve sularının içeriğinde bulunan mineraller, vitaminler, lifler ve antioksidanlar gibi yararlı besin maddeleri probiyotikler için ideal bir ortam sağlamaktadır (Verbeke, 2006; Tuorila ve Cardello, 2002; Luckow ve Delahunty, 2004). Probiyotiklerin uygun strainlerinin seçimiyle sağlıklı meyve sularının üretimi bu besinsel faydaları beraberinde getirmektedir. Geleneksel ürünlerle kıyaslandığında probiyotik kültürler aroma sağlama gibi duyuusal etkileri sayesinde meyve sularına farklı lezzetler kazandırmaktadırlar (Song ve ark. 2012). *L. plantarum* bakterisinin portakal suyuna eklenmesinden sonra tüketiciler lezzet farklılığından dolayı bu meyve suyunu tercih etmek istemeselerde sağlığa olumlu etkilerinden dolayı geleneksel portakal sularına oranla daha fazla tüketmeye başlamışlardır (Luckow ve Delahunty, 2004). Hint dutu, nar ve kaju meyvesinin elde edildiği elma sularıyla çalışmalar yapılmış ve bunların özellikle *L. plantarum* bakterisinin gelişimi ve canlılığı için uygun oldukları sonucuna varılmıştır (Wang ve ark., 2009; Mousavi ve ark., 2011; Pereira ve ark. 2011).

1.1.7.4. Et ürünlerinde probiyotikler

Fermente et ürünlerinde olgunlaşma süresini kısaltarak kontrol altına almak, raf ömründe dayanıklılığını artırmak ve ürünün renk, koku, aroma ve lezzet gibi morfolojik özelliklerinde iyileştirme yapılmasını sağlamak için bu yararlı mikroorganizmalardan yararlanılmaktadır (Yörük ve Güner, 2011).

1.1.8. Probiyotik bakterilerin sağlık üzerine etkileri

Probiyotik bakterilerin sindirim sistemine tutunabilmesi ve ürettikleri antimikrobiyal maddelerle patojen mikroorganizmaların gelişmesini inhibe edebilmesi bağırsak ve mide rahatsızlıklarında tedavi edici olarak kullanılmalarını sağlamaktadır (Yiğit, 2009). Örneğin; yoğurtta bulunan laktik asit bakterileri kolesterol düşürücü etkiye sahiptir ve bunun yanında ürettikleri laktik asitte bulunan antibakteriyel maddeler, kalın bağırsağa yerleşerek orada bazı fenolik bileşikler

üretirler. Bu antibakteriyal maddeler bağırsak dokusuna zarar verebilecek yapıda olan bakterileri inhibe ederek, vücudu enfeksiyonlara karşı güçlendirebilecek bağışıklık sistemini koruyucu özellikler sergilemektedirler (Evren ve ark. 2011).

Probiyotik bakteri içeren gıdalar mide enfeksiyonları içinde faydalı olmaktadır. Örneğin; mide ülseri üzerine koruyucu bir tabaka oluşturan yoğurt laktik asit bakterileri, hidroklorik etkiyi azaltmaktadır (Yiğit, 2009).

İdrar yolları enfeksiyonlarında *Lactobacillus* türleri epitel hücrelere bağlanarak patojenlerin etkisini ortadan kaldırarak reseptörlere ulaşmalarını engellerler (Raffle ve ark., 1956).

Probiyotik mikroorganizmaların karaciğer ve böbrek fonksiyonlarının yenilenmesinde patojenlerle savaşması, zehirlenmelerde zehirli maddelerin kana geçmesini engellemesi, ağız ve diş sağlığında çürüklere neden olan bakterileri inhibe etmedi, kolesterolü düşürmesi ve bağışıklık sistemini güçlendirmesi sağlık açısından önemli oldukları diğer alanlardır. Genellikle fermente gıdalarda ilave edilen probiyotikler artık tablet şeklinde üretilerek eczane ve marketlerde karşımıza çıkmaktadır (Vaughan ve Mollet, 1999).

1.2. Tanenler

Tanenler ligninden sonra doğada en fazla bulunan polifenollerdir (Albertse, 2002). Genellikle bitkilerin meyve, yaprak, kök, gövde ve tohumlarında bulunmakla birlikte çilek, fındık, çay, ceviz, ahududu, mango, üzüm gibi gıda maddelerinde de bulunabilen tanenler farklı renk ve yapıda olabilen gevşek yapılı buruk tatta bileşiklerdir (Temel, 2012; Chung ve ark., 1998). Tanenler protein, nişasta ve sindirim enzimleriyle birleşerek gıdaların besin değerinde azalmaya neden olmaktadır (Chung ve ark., 1998).

Tanenler yapılarına göre iki büyük sınıfa ayrılmışlardır: Hidrolize olabilen tanenler (Gallik tanenler) ve kondanse tanenler (Proantosiyanidinler) (Yılmaz, 2001). Hidrolize olabilen tanenler bir enzim veya asitle birlikte hidroliz olarak gallik asit ve şeker gibi suda çözünebilen bileşikleri meydana getirirler. En basitleri gallotanenlerdir. Gallik asit, tannik asit, ellajik asit ve pirogallo eczacılık, tıp ve gıda endüstrisinde antimikrobiyal madde olarak kullanılmaktadırlar. Kondanse

tanenlerin hidrolize olabilen tanenlerden en büyük farkları ise şeker içermemeleridir (Sarıkaya, 2005; Yılmaz, 2001; Temel, 2012).

1.2.1. Tannaz enzimi ve önemi

Tannaz olarak bilinen Tanen Açıl Hidrolaz 1867 yılında Teighem tarafından keşfedilmiştir. Tannaz enzimi; bakteri, maya ve funguslar tarafından üretilen, tannik asidin ester bağlarıyla etkileşime girerek gallik asit ve glukozu hidrolizleyen ve tannik asit, metil gallat, etil gallat, izoamil gallat gibi hidrolizlenebilen tanenlerin yıkımını katalizleyen hücre dışı bir enzimdir (Akardere, 2012; Aguilar, 2007). Tannaz enziminin üretiminde bitki yaprakları ve ağaç kabukları gibi bitkisel olmakla birlikte, sığır rumeni gibi hayvansal kaynaklara da rastlanmaktadır. Fakat bu enzimin üretiminde en önemli kaynak mikroorganizmalardır. Çünkü mikroorganizmalardan üretilen enzim, daha stabil ve katalitik aktivitesi daha yüksek olmaktadır (Bhat, 1998).

1.2.2. Tannaz enziminin uygulama alanları

Tannaz enzimi yüksek enzim maliyetinden dolayı endüstriyel kullanımı çok fazla yaygınlaşmamış bir enzimdir (Lagemaat ve Pyle, 2005). Endüstriyel kullanımının artırılması için tannaz aktivitesi yüksek mikrobiyal çeşitliliğin araştırılması devam etmektedir.

Günümüzde tannaz enzimi, özellikle başta hazır çay olmak üzere kahve, meyve suları ve biranın berraklaştırılmasında, çay ve kahvenin aromasının pekiştirilmesinde kullanılmaktadır. Nar, ayva ve gliaburu gibi meyvelerin suyunda hissedilen burukluğun giderilmesinde de tannaz enzimi kullanılmaktadır. Ayrıca şarap yapımı sırasında açığa çıkan tanenler, şarabın yapısında bulanıklığa neden olmaktadır. Tannaz enzimi lakkaz ile birlikte kullanılarak bu bulanıklığı gidermede rol oynamaktadır. Hayvan yeminde ve gıdalarda sindirimi kolaylaştırmak ve tanenlerin mide mukozasına zarar vermesi yada vücuda demir alımını engellemesi gibi olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için tannaz enzimi kullanılmaktadır (Temel, 2012).

Tannaz enzimi, gallik asit üretiminde kullanılarak antibakteriyel ilaçların sentezine yardımcı olmaktadır. Bu uygulama sayesinde tannaz enzimi, farmasötik endüstrisinde önemli bir yer edinmiştir (Belmares, 2004).

Fenolik bileşiklerle kontamine olmuş atık suları arıtmak içinde tannaz enzimi kullanılmaktadır (Aguilar ve ark., 2001).

1.3. Nar Suyunun Genel Bileşimi

Nar (*Punica granatum* Linn.), tarihi M.Ö. 3000 yılına kadar dayanan, bilinen en eski meyvelerden biridir. Tropik ve sub-tropik iklimde yetişebilen, düşük sıcaklıklara dayanabildiği gibi kuraklığa ve yetiştiği topraktafi yüksek tuza da toleranslıdır (Maskan, 2004).

Nar Türkiye, İran, Amerika, Akdeniz, Ortadoğu ve Arap ülkelerinde yetiştirilen anavatamı Güneybatı Asya olan bir meyvedir. Narın dayanıklılığı, adaptasyon yeteneği ve faydalarının keşfedilmesinin gün geçtikçe artması üretiminde artışlara neden olmaktadır. Türkiye’de bu üretim 1997 yılında 56 000 ton iken, 2005 yılında 80 000 tona ve 2006 yılında ise 91 000 tona ulaşmaktadır (Karaca, 2011; Özhamamcı, 2008). Nar taze olarak tüketilebildiği gibi meyve suyu, şarap, reçel gibi farklı kullanım alanlarına da sahiptir. Ayrıca narın renk verici ve tatlandırıcı olarak kullanıldığı da bilinmektedir (Tamer, 2006).

Nar önemli miktarlarda asit, şeker, vitamin ve polifenol içermektedir (Maskan, 2004). Yüksek antioksidan aktiviteye sahip olması içeriğinde bulunan polifenol, tanen ve antosiyaninlerden kaynaklanmaktadır. İçeriğinde bulunan fenolikler ve organik asitler duyuşsal özelliklere de katkı sağlamaktadır (Poyrazoğlu ve ark., 2002). Narın renk tonlarının farklılıklarını oluşturan maddelerin antosiyaninler olduğu düşünölmektedir. Antosiyaninlerin rengi pH’a göre farklılık göstermekte, meyvenin işlenmesiyle birlikte renk kayıplarına sebep olmaktadır (Vardin, 2000). Nar sularında bulunan fenolik bileşiklerin bir kısmı nar tanelerinin suyunda, geri kalan büyük bir kısmı ise presleme sonucunda parçalanmış ve zedelenmiş çekirdeklerinden, meyve kabuğundan ve bölüm zarlarından meyve suyuna geçmektedir (Apaydın, 2008). Bu fenolik bileşikler nar suyunun buruk bir lezzete sahip olmasına neden olmaktadır.

Nar suyu tüketiminin damar sertleşmesini engelleyici etkisinin olduğu ve yüksek antioksidan aktivite sağladığı bilinmektedir. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada damar sertliği gelişiminin yavaşlatılmasına, nar suyunun ürettiği nitrik oksit kimyasalının neden olduğu belirtilmiştir (Tamer, 2006).

Meyve Suyu Endüstrisi Derneği (MEYED) verileri 2007 yılı içerisinde yaklaşık 14 milyon nar suyu üretildiğini, 2005-2007 yılları arasında narın meyve suyuna dönüşen miktarının 3.3 kat arttığını ve sanayide en fazla işlenen 4. meyve konumuna yükseldiğini bildirmiştir (Karaca, 2011). Nar üretimi 1990 yılında 10.000 ton iken 2000 yılında 60.000, 2003 yılı verilerine göre 73.000 tona ulaşmıştır (Anon, 2005).

Cemeroğlu ve ark. (2004) gerçekleştirdikleri çalışmada preslenerek hazırlanan nar suları kullanarak bazı özellikler belirlemişlerdir (Cemeroğlu ve ark., 2004).

Çizelge 1.2. Nar sularının bazı bileşen ve özellikleri

Bileşen/Özellik	Ortalama	Maksimum	Minimum
pH	3.53	4.41	2.4
Titrasyon asitliği(g/L)	8.58	55.2	2.0
Sitrik asit (g/L)	5.47	32.8	0.28
Briks (%)	16.3	18.7	13.2
İndirgen şeker (g/L)	153.2	194.2	110.4

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Test mikroorganizmaları

Daha önceki çalışmalarda fermente ürünlerden izole edilerek tannaz aktiviteleri belirlenmiş ve mikrobiyoloji laboratuvarında stoklanmış laktik asit bakterileri MRS broth besiyerlerine ekilerek aktifleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan test mikroorganizmaları (Çizelge 2.1.). MRS agar besiyerlerine çizgi ekim yapılmıştır. Saflık kontrolleri yapılan ve saf oldukları tespit edilen mikroorganizmalar %20'lik gliserol içerisinde ependorflara alınarak -80°C' de depolanmıştır.

Laktik asit bakterilerinin gıda kaynaklı bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterip göstermediklerinin tayini için kullanılan test mikroorganizmaları elde edildikleri kaynaklarla birlikte Çizelge 2.2.' de verilmiştir. Kullanılan tüm test mikroorganizmaları, analizlerden önce saflık kontrolleri yapılarak kullanılmıştır.

Çizelge 2.1. Tannaz aktivitesi yüksek laktik asit bakterileri (Temel, 2012)

İzolat Numaraları	Bakteri İsimleri
ES6	<i>Lactobacillus brevis</i>
A6	<i>Lactobacillus plantarum</i>
A6X	<i>Lactobacillus brevis</i>
A4	<i>Lactobacillus plantarum</i>
MT4	<i>Lactobacillus plantarum</i>
DZ2	<i>Enterococcus faecium</i>

Çizelge 2.2. Test Mikroorganizmaları (NRRL: Northern Regional Research Laboratory of the USDA, Peoria, Illinois, USA. ATCC: American Type Culture Collection, USA).

Mikroorganizma	Elde Edildiği Kaynak	Optimum Gelişme Sıcaklığı
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	30°C
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gazi Üniv. Fen Fakültesi	37°C
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi	30°C
<i>Bacillus subtilis</i>	NRLL B-744	30°C
<i>Escherichia coli</i>	NRRL B-3704	37°C
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC-7644	30°C
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi	30°C
<i>Salmonella typhimurium</i>	NRRL B-4420	37°C
<i>Enterococcus faecalis</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi	37°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	30°C
<i>Micrococcus luteus</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi	37°C

2.1.2. Besi ortamları

2.1.2.1. MRS agar

Di amonyum hidrojen sitrat	2 g
Di potasyum hidrojen fosfat	2 g
Glikoz	20 g

Magnezyum sülfat	0,2 g
Mangan sülfat	0,04 g
Et ekstraktı	8 g
Pepton	10 g
Maya ekstraktı	4 g
Sodyum asetat	5 g
Tween® 80	1 ml
Agar	14 g
Distile su	1000 ml

Ticari olarak (1.10660. Merck) satılan besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 5,4±0,2'ye ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.2.2. MRS agar laktoz ilaveli

Daha önce içeriği verilmiş olan MRS agar besiyeri içerisinden glikoz çıkartılarak yerine aynı miktarda olacak şekilde laktoz ilavesi yapılmış, distile suda çözüldükten sonra 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.2.3. MRS agar fruktoz ilaveli

Daha önce içeriği verilmiş olan MRS agar besiyeri içerisinden glikoz çıkartılarak yerine aynı miktarda olacak şekilde fruktoz ilavesi yapılmış, distile suda çözüldükten sonra 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.2.4. MRS agar sükroz ilaveli

Daha önce içeriği verilmiş olan MRS agar besiyeri içerisinden glikoz çıkartılarak yerine aynı miktarda olacak şekilde sükroz ilavesi yapılmış, distile suda çözüldükten sonra 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.2.5. MRS agar galaktoz ilaveli

Daha önce içeriği verilmiş olan MRS agar besiyeri içerisinde glikoz çıkartılarak yerine aynı miktarda olacak şekilde galaktoz ilavesi yapılmış, distile suda çözüldükten sonra 121 °C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.2.6. MRS agar maltoz ilaveli

Daha önce içeriği verilmiş olan MRS agar besiyeri içerisinde glikoz çıkartılarak yerine aynı miktarda olacak şekilde maltoz ilavesi yapılmış, distile suda çözüldükten sonra 121 °C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.2.7. MRS agar rafinoz ilaveli

Daha önce içeriği verilmiş olan MRS agar besiyeri içerisinde glikoz çıkartılarak yerine aynı miktarda olacak şekilde rafinoz ilavesi yapılmış, distile suda çözüldükten sonra 121 °C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.2.8. MRS broth

Magnezyum sülfat heptahidrat	0,2 g
Di potasyum hidrojen fosfat	2 g
Glikoz	20 g
Mangan sülfat tetrahidrat	0,05 g
Sodyum asetat trihidrat	5 g
Et ekstraktı	8 g
Pepton	10 g
Triamonyum sitrat	2 g
Yeast ekstraktı	5 g
Distile su	1000 ml

Ticari olarak (1.10661. Merck) satılan besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 6,2± 0,2' ye ayarlanmış, 1 ml Tween® 80 eklenmiş ve 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.2.9. Mueller Hinton broth

Sığır eti-kalp ekstraktı	2 g
Kazein hidrolizat	17,5 g
Nişasta	1,5 g
Distile su	1000 ml

Ticari olarak (1.10293. Merck) satılan besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 6,8 ± 0,2'ye ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.2.10. Mueller Hinton agar (70191, Fluka)

Sığır eti-kalp ekstraktı	4 g
Kazein hidrolizat	17,5 g
Nişasta	1,5 g
Agar	17 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 6,8 ± 0,2' ye ayarlanmış ve 121 °C de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3. Kullanılan Boyalar

2.1.3.1. Kristal violet

Kristal violet	2,0 g
----------------	-------

Etil Alkol (% 95)	20 ml
Amonyum Oksalat	0,2 g
Distile su	20 ml

Kristal violet 10 ml etil alkol içerisinde çözüldükten sonra üzerine ayrı bir şişede 20 ml distile su içerisinde çözülmüş olan amonyum oksalat eklenmiştir. Karışım filtreden geçirilerek kullanılmıştır (Speck ve ark., 1976).

2.1.3.2. Safranin

Di amonyum hidrojen sitrat	2 g
Safranin	0,25 g
Etil alkol (%95)	10 ml
Distile su	100 ml

Safranin alkol içerisinde çözdürüldükten sonra distile su ilave edilmiş ve 24 saat sonunda çözelti filtre kâğıdından geçirilerek süzülmüştür (Çotuk ve Küçüker, 1992).

2.1.3.3. Lugol

İyot	5 g
Potasyum iyodür (KI)	10 g
Distile su	100 ml

Potasyum iyodür 30 ml distile suda çözüldükten sonra üzerine iyot eklenmiştir. Çözelti distile su ile 100 ml.'ye tamamlanmıştır (Çotuk ve Küçüker, 1992).

2.1.4. Kullanılan çözeltiler

2.1.4.1. Fizyolojik tuzlu su

Sodyum klorür (NaCl)	85 g
Distile su	1000 ml

Fizyolojik tuzlu su çözeltisi sodyum klorür distile su içerisinde çözülerek kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

2.1.4.2. %20'lik gliserol çözeltisi

Gliserol	20 ml
Distile su	20 ml

Gliserol ve distile su karıştırılıp 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra kullanılmıştır (Akçelik ve ark., 2000).

2.1.4.3. Süt tozu çözeltisi (% 15'lik)

Süt tozu	15 g
Distile su	85 ml

Süt tozu distile su içerisinde çözündürülmüş ve 115 °C' de 10 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

2.1.4.4. Safra tuzu solüsyonu

Bile salt (4865, Sigma), distile su içerisinde çözündürülmüş ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır (Vinderola ve Reinheimer, 2003).

2.1.4.5. Fosfat Buffer

0.1 M Fosfat Buffer çözeltisi (P5244, Sigma)	10 ml
Distile su	90 ml

0.1 M Fosfat Buffer çözeltisi uygun miktarlarda distile su ile karıştırıldıktan sonra kullanılmıştır (Zago ve ark., 2011).

2.1.4.6. Ringer solüsyonu

NaCl	8,5 g
KCl	0,4 g
CaCl ₂	0,34 g
Distile su	1000 ml

NaCl, KCl ve CaCl₂ uygun miktarlarda karıştırıldıktan sonra distile su içerisinde çözdürülerek kullanılmıştır (Zago ve ark., 2011).

2.1.4.7. Elektrolit solüsyonu

CaCl	0,22 g
NaCl	6,2 g
KCl	2,2 g
NaHCO ₃	1,2 g
Distile su	1000 ml

CaCl, NaCl, KCl ve NaHCO₃ uygun miktarlarda karıştırıldıktan sonra distile su içerisinde çözdürülerek kullanılmıştır (Zago ve ark., 2011).

2.1.4.8. 0,05 M K₂HPO₄ tampon (pH 6,5)

K ₂ HPO ₄	0,096 g
Distile su	10 ml

Dipotasyum Fosfat (K₂HPO₄) distile su içerisinde çözüldükten sonra pH 6,5'e ayarlanmıştır. Tampon çözelti +4 °C' de buzdolabı koşullarında saklanmıştır (Vinderola ve Reinheimer, 2003).

2.1.4.9. Kullanılan antibiyotikler

Siprofloksasin (CIP 5 mcg/disk BİOANALYSE)

Gentamisin (G 10 mcg / disk BİOANALYSE)

Streptomisin (S 10 mcg/disk BİOANALYSE)

Tetraksilin (TE 30 mcg/disk BİOANALYSE)

Kanamisin (K 30 mcg/disk BİOANALYSE)

Vankomisin (VA 30 mcg/disk BİOANALYSE)

Gatifloksasin (GAT 5 mcg/disk BİOANALYSE)

Penisilin- G (P 10 U/ disk BİOANALYSE)

Eritromisin (E 15 mcg/disk BİOANALYSE)

Kloramfenikol (C 30 mcg/disk BİOANALYSE)

Levofloksasin (LEV 5 mcg/disk BİOANALYSE)

Netilmisin Sülfat (NET 30 mcg /disk BİOANALYSE)

2.1.4.10. Proteolitik aktivite tayini için standart çözelti

Proteolitik aktivite tayini için kullanılacak olan standart eğri için sırasıyla 0,02, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1 mg tirozin /ml olacak şekilde tirozin standart çözeltisini hazırlanmış ve 5 ml' lik MRS broth ortamı içeren tüplere ilave yapılmıştır (Aslım, 1994).

2.1.4.11.0,72 N Triklorasetik asit çözeltisi

Triklorasetik asit	118 g
Distile su	1000 ml

Triklorasetik asit (TCA) distile su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı ile çözülerek kullanılmıştır (Aslım, 1994).

2.1.4.12. Na₂CO₃.Na₄P₂O₇ çözeltisi

Sodyum bikarbonat	150 g
Sodyum di fosfat	20 g
Distile su	1000 ml

Sodyum bikarbonat (Na₂CO₃) ve sodyum di fosfat (Na₄P₂O₇) uygun miktarlarda karıştırıldıktan sonra distile su içinde çözülerek kullanılmıştır (Aslım, 1994).

2.1.4.13. Fenol ayracı

Folin Ciocalteus çözeltisi	50 ml
Distile su	100 ml

Proteolitik aktivite tayini için Folin Ciocalteus çözeltisinin 1:2 oranında distile su ile karıştırılmasıyla fenol ayracı hazırlanmıştır. Bu çözelti kullanılacağı zaman taze olarak hazırlanmalıdır. Stok solüsyonu hazırlanmamalıdır (Aslım, 1994).

2.1.4.14. 0,1 N NaOH çözeltisi

NaOH	3,4 g
Distile su	1000 ml

NaOH uygun miktarda tartıldıktan sonra distile su içersinde çözdürülerek kullanılmıştır.

2.1.4.15. Hidrojen peroksit tespiti için standart çözelti

0,1 ml saf (% 35) hidrojen peroksit alınıp distile su ilavesi ile 30 ml' ye tamamlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiden 1 ml başka bir şişeye alınarak tekrar distile su ile 30 ml' ye tamamlanmıştır (Mumcu, 1997).

2.1.4.16. 1 N H₂SO₄ çözeltisi

Sülfürik asit	1,67 ml
Distile su	100 ml

Saf sülfürik asitten distile su ilavesi ile 1 N olacak şekilde çözelti hazırlanmıştır (Mumcu, 1997).

2.1.4.17. Amonyum molibdat çözeltisi

Amonyum molibdat	0,12 g
Distile su	100 ml

Amonyum molibdat çözeltisi ((NH₄)₆Mo₇O₂₄) distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır (Mumcu, 1997).

2.1.4.18. Potasyum iyodür çözeltisi

Potasyum iyodür	16,6 g
Distile su	1000 ml

Potasyum iyodür çözeltisi (KI) distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır (Mumcu, 1997).

2.1.4.19. Sodyum fosfat tamponu

Sodyum fosfat dihidrat	0,78 g
Distile su	100 ml

Sodyum fosfat dihidrat (NaH₂PO₄.2H₂O) distile su içerisinde çözüldükten sonra pH; 7,5'e ayarlanmıştır. Tampon çözelti +4 °C'de buzdolabı koşullarında saklanmıştır.

2.1.4.20. Potasyum klorür çözeltisi

KCl	74,5 g
Distile su	1000 ml

KCl uygun miktarda tartıldıktan sonra distile su içerisinde çözdürülerek kullanılmıştır.

2.1.4.21. Sodyum asetat çözeltisi

C ₂ H ₃ NaO ₂	136,08 g
Distile su	1000 ml

C₂H₃NaO₂ uygun miktarda tartıldıktan sonra distile su içerisinde çözdürülerek kullanılmıştır.

2.1.4.22. Toplam fenol tayini için standart çözelti

Toplam fenol tayini için kullanılacak olan standart eğri için sırasıyla 0,3, 0,6, 1,2, 2,4, 4,8 mg tannik asit/ml olacak şekilde tannik asit standart çözeltisini hazırlanmış ve 5 ml' lik distile su ortamı içeren tüplere ilave yapılmıştır (Aslım, 1994).

2.1.4.23. Fenol ayracı

Folin Ciocalteus çözeltisi	1 ml
Distile su	10 ml

Toplam fenol tayini için, 1:10 oranı sağlanacak şekilde Folin Ciocalteu çözeltisi, distile su içerisine ilave edilerek hazırlanmıştır. +4 °C' de buzdolabı koşullarında saklanmıştır.

2.1.4.24. 7 mM ABTS solüsyonu

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonicacid)	0,384 g
Distile su	100 ml

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonicacid) uygun miktarda tartıldıktan sonra distile su içerisinde çözdürülerek kullanılmıştır (He ve ark., 2015).

2.1.4.25. 2,5 mM Potasyum Persülfat çözeltisi

Potasyum persülfat	67,575 g
Distile su	1000 ml

Potasyum persülfat uygun miktarda tartıldıktan sonra distile su içerisinde çözdürülerek kullanılmıştır (He ve ark., 2015).

2.1.4.26. 0,1 mM DPPH solüsyonu

2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl	0,0039 g
Distile su	100 ml

2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl uygun miktarda tartıldıktan sonra distile su içerisinde çözdürülerek kullanılmıştır (He ve ark., 2015).

2.2. Yöntem

2.2.1. Laktik asit bakteri izolatlarının hazırlanması

%20'lik gliserol ortamında -80°C'de saklanan mikroorganizmaların; 5 ml MRS Broth besiyerine pipet yardımıyla 100 µl aktarıldıktan sonra 30°C %5 CO₂ içeren koşullarda 24 saat inkübe edilerek aktifleşmeleri sağlanmıştır.

Canlanan organizmalardan, bir öze dolusu alınarak MRS agar katı besiyerine (*Lactobacillus* Agar acc. to De Man, Rogosa and Sharpe) çizgi ekim yapıldıktan sonra 30°C %5 CO₂ içeren koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Saf olmadığı düşünülen izolatlardan MRS agar katı besiyerine çizgi ekim yapılmıştır. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra izolatların saf olup olmadığı tekrar kontrol edilerek saf olan kültürler çalışmalarda kullanılmış, saf olmayanlar ise saflaştırılarak kullanılmıştır.

2.2.1.1. Gram boyama

Katı besiyerinde 30°C'de %5 CO₂ içeren koşullarda gelişen 18-24 saatlik laktik asit bakterilerinden öze yardımıyla alınarak, bir damla distile su damlatılmış lam yüzeyine yayılmış ve kuruması beklenmiştir. Yüzeyi tam olarak kuruyan lam

üç kez bek alevinden geçirilerek fikse edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra preparata kristal viyoleto boyası ilave edilerek 1 dakika bekletilmiştir. Lam yüzeyi distile su ile yıkandıktan sonra lügol çözeltisi eklenmiş ve 1 dakika bekletilmiştir. Tekrar distile su ile yıkama işlemi yapılarak fazla boya giderildikten sonra preparat %96'lık etil alkol ile 10-15 saniye muamele edilmiştir. Fazla su giderildikten sonra lam yüzeyi 30 saniye süreyle safranin boyası ile boyanmıştır. Preparat tekrar yıkandıktan sonra kurutma kağıdı ile kurutularak incelenmiştir.

İnceleme işlemi sonunda pembe veya kırmızı renkli görülen bakteriler Gram negatif, mor renkte olanlar ise Gram pozitif olarak kabul edilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

2.2.1.2. Katalaz testi

Katalaz testi ortamda bulunan hidrojen peroksidin su ve oksijene ayrılması temeline dayanan, bakterilerin katalaz enzimine sahip olup olmadıklarını gösteren bir testtir.

İzolatlarda katalaz enziminin varlığının veya yokluğunun belirlenmesi için kültürler MRS agar katı besiyerine çizgi ekim yapılarak 30°C 'de %5 CO₂ içeren koşullarda 24 saat inkübe edilmiş ve taze kültürlerin kullanılmasına dikkat edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kültürler üzerine birkaç damla %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) ilave edilerek gaz kabarcığı olup olmadığı gözlemlenmiştir. Gaz kabarcığı oluştuğu gözlemlenen izolatlar katalaz pozitif, oluşturmayanlar ise katalaz negatif kabul edilmişlerdir (Akçelik ve ark., 2000).

2.2.2. Probiyotik özelliklerinin incelenmesi

2.2.2.1. Antimikrobiyal aktivite

Agar difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Test edilecek olan kültürler MRS broth içerisinde, 30°C 'de %5 CO₂ içeren koşullarda 24 saat süreyle inkübasyona bırakılarak aktif hale getirilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürler +4°C' de, 11.000 g' de, 30 dakika süreyle santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Süpernatantlar pH 5,6'ya ayarlanmış ve liyofilize edilmiştir. Daha sonra liyofilize kültürler tekrar sulandırılarak 0,22 µm çaplı, düşük protein bağlayıcı özellikteki, steril selüloz membran filtrelerden geçirilmiş ve steril edilmiştir (Bennik ve ark., 1997).

Test bakterileri olarak kullanılacak olan organizmalar (Çizelge 2.2) BHI broth (Brain Heart Infusion) içerisinde 24 saat süreyle inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Müeller Hinton katı besi yeri hazırlanmış ve 45°C' ye kadar soğutulduktan sonra besi ortamına; test bakterisinin Mc Farland No: 0,5 (10^8 kob/ml) 'e göre yoğunluğu ayarlanmış olan sıvı kültüründen %1 oranında inokülasyon yapılmıştır. İyice karıştırıldıktan sonra 20 ml olacak şekilde, steril boş petrilere dökülmüş, yüzeylerinin kuruması beklenmiştir. Petrilerin yüzeyler kuruduktan sonra, steril mantar delici yardımı ile 0,8 cm çapında kuyucuklar açılmıştır. Kuyucuklara, 80 µl filtrat doldurulmuş ve petrilere 30°C 'de %5 CO₂ içeren koşullarda 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kuyucukların etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçülmüştür. Deney çift paralel olarak gerçekleştirilmiştir (Ryan ve ark., 1996; Choi ve ark., 1999; Zhu ve ark., 2000).

Laktik asit bakterilerinden elde edilen antimikrobiyal aktivitenin hidrojen peroksit üretiminden kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirlemek için filtratlara katalaz ilave edilerek deney tekrarlanmıştır. Filtrat içerisinde 5 µg/ml katalaz ilave edildikten sonra 37 °C'de 4 saat bekletilmiş ve agar difüzyon yöntemi aynı şekilde uygulanmıştır (Ryan ve ark., 1996; Choi ve ark., 1999; Zhu ve ark., 2000).

2.2.2.2. Bazı enzimlerin antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi

Test edilecek olan kültürler MRS broth tüpleri içerisinde 30°C 'de %5 CO₂ içeren koşullarda 24 saat süreyle geliştirilerek aktif hale getirilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürler +4 °C' de, 11.000 g' de, 30 dakika süreyle santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüş ve bölüm 2.2.2.5. de anlatıldığı şekilde filtrat hazırlanmıştır.

Proteinaz K, Tripsin ve Lizozim enzimlerinin etkisi incelenmiştir.

Proteinaz K; 0,05 M sodyum-fosfat tamponu (pH:7,5) içerisinde çözülen enzimden 1 mg/ml olacak şekilde filtratlara ilave edilmiş, 4 saat süreyle 37°C'de bekletilmiştir.

Tripsin; 0,05 M sodyum-fosfat tamponu (pH:7,5) içerisinde çözülen enzimden 2 mg/ml olacak şekilde filtratlara ilave edilmiş, 4 saat süreyle 37°C'de bekletilmiştir.

Lizozim; 0,01 M sodyum klorür içerisinde hazırlanan lizozim stok solüsyonundan 1 mg/ml olacak şekilde filtratlara ilave yapılmış ve yine 4 saat süreyle 37°C'de bekletilmiştir.

Dökme plak yöntemi için Mueller Hinton agar besiyeri hazırlanıp 45°C'ye kadar soğutulduktan sonra 20 ml agar içerisine 500 µl patojen test organizmaları eklenerek steril boş petri kutularına dökülerek kurutulmuştur.

Petrilerin yüzeyleri tamamen kuruduktan sonra, steril koşullarda, mantar delici yardımı ile 0,8 cm çapında kuyucuklar açılmıştır. Kuyucuklara, 80 µl filtrat+enzim doldurulmuş ve petriler 30°C'de %5 CO₂ içeren koşullarda 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucukların etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçülmüştür. Deney çift paralel olarak gerçekleştirilmiştir (Ryan ve ark., 1996; Choi ve ark., 1999; Zhu ve ark., 2000).

2.2.2.3. Düşük pH dirençliliği

pH dirençliliği test edilecek mikroorganizmalar MRS broth içerisinde, 30°C'de %5 CO₂ içeren koşullarda 24 saat süreyle inkübasyona bırakılarak aktif hale getirilmiştir. Çalışma çift paralel olarak yürütülmüştür.

MRS broth besiyerinin pH'sı sırasıyla 3.5, 3 ve 2.5'e göre ayarlandıktan sonra 0,22 µm çaplı, düşük protein bağlayıcı özellikteki, steril selüloz membran filtrelerden geçirilerek steril edilmiş ve içerisine %1 oranında aktifleştirilmiş kültürlerden eklenerek 30°C 'de %5 CO₂ içeren koşullarda inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresince 0., 30., 60., 90., 120., 150., ve 180. dakikalarında örnek alınarak fizyolojik tuzlu su ile 1:10 oranında dilüsyonlar hazırlanmıştır. 10⁻⁸'e kadar seyreltilen dilüsyonlardan MRS agar petrileri üzerine damla plak yöntemi kullanılarak ekim yapılmış ve petriler 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda bakteri sayımları yapılmıştır (Anandharaj ve Sivasankari, 2014).

2.2.2.4. Safra tuzuna dirençlilik

Safra tuzu dirençliliği test edilmek istenen mikroorganizmalar MRS broth içerisinde, 30°C'de %5 CO₂ içeren koşullarda 24 saat süreyle inkübasyona bırakılarak aktif hale getirilmiştir.

Safra tuzundan %0, %0.06, %0.125, %0.25, %0.5 ve %1 oranlarına göre solüsyonlar hazırlanmıştır. Aktif hale getirilen kültürlerin yoğunlukları 10⁸'e göre ayarlandıktan sonra 1:40 oranı sağlanacak şekilde 96 kuyucuklu petrilere inokülasyon yapılmıştır. 195 µl safra tuzu solüsyonu üzerine 5 µl organizma olacak şekilde ekimler yapılmış ve 24 saat süreyle 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda 560 nm absorbans değerinde spektrofotometrik okuma değerleri alınarak değerlendirilmiştir (Vinderola ve Reinheimer, 2003).

2.2.2.5. Lizozim dirençliliği

İzolatların lizozim dirençliliğinin belirlenmesi için kullanılacak kültürler MRS broth içerisinde, 30°C'de %5 CO₂ içeren koşullarda 24 saat süreyle inkübasyona bırakılarak aktif hale getirilmiştir. Çalışma çift paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

İnkübasyon süresi sonunda mikroorganizmalar santrifüj edilerek daha önceden hazırlanmış fosfat tamponu ile 2 kez yıkanmıştır. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra santrifüj edilmiş ve pelet ringer solüsyonunda süspansiyon edilmiştir.

Elde edilen süspansiyon, lizozim ilaveli ve lizozim ilavesiz olmak üzere 2 farklı şekilde hazırlanan elektrolit solüsyonu kullanılarak Mac Farland No: 0,5 (10⁸ kob/ml)'e uygun olacak şekilde ayarlanmış ve 120 saniye süreyle vortex yardımıyla karıştırılmıştır.

0., 30. ve 120. dakikalarda steril fizyolojik tuzlu su içerisinde 1:10 oranı olacak şekilde 10⁹ oranına kadar seri dilüsyonlar hazırlanmış ve MRS agar petrilere damla plak yöntemiyle ekimler yapılmıştır. 24 saat inkübasyon süresi sonunda petri yüzeyinde oluşan bakteri sayımları yapılmış ve 0. dakikaya göre % dirençli bakteri oranı hesaplanmıştır (Zago ve ark., 2011).

2.2.2.6. Biyofilm oluşturma özelliklerinin incelenmesi

İzolatların biyofilm oluşturma özelliklerinin belirlenmesinde mikrotitrasyon plak ve Kongo red agar (CRA) metotları kullanılmıştır.

Test edilecek mikroorganizmalar MRS broth içerisinde, 30°C 'de %5 CO₂ içeren koşullarda 24 saat süreyle inkübasyona bırakılarak aktif hale getirilmiştir.

Fruktoz, galaktoz, maltoz, rafinoz, laktoz, sükroz şekerleri ayrı ayrı %2 oranında MRS broth içerisine eklenerek besiyeri hazırlanmıştır. Geliştirilen mikroorganizmaların yoğunluğu 10⁸ kob/ml'ye göre ayarlandıktan sonra 1:40 oranı sağlanacak şekilde 96 kuyucuklu platelere inokülasyonu yapılmış 30°C 'de %5 CO₂ içeren koşullarda 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda 490 nm absorbansta spektrofotometrik okuma değerleri alınmıştır. Daha sonra plate içi dökülüp fizyolojik tuzlu su ile 3 kez yıkanmıştır. Kuyucukların ilerine 200 µl metanol eklenerek fiksasyon sağlanmıştır. 15 dk bekletildikten sonra dökülüp, havada kurutulmuştur. Daha sonra herbir kuyucuğa kristal viyole boyasından 200 µl konularak 5 dk bekletilmiştir. Srenin sonunda boya dökülüp, kuyucuklar distile suyla dikkatlice yıkanmıştır. Plaklar havada kurutulduktan sonra yapışan hücrelerin kalkmasını sağlamak için 200 µl glasiyel asetik asit konulmuştur. Negatif kontrol olarak bakteri eklenmemiş besiyeri kullanılmıştır. 570 nm absorbansta ölümleri yapılmıştır (Freeman ve ark., 1989).

Kongo red agar (CRA) metodu kullanılarak yapılan biyofilm çalışması için kullanılacak laktik asit bakterileri, MRS broth tüpleri içerisinde 30°C 'de %5 CO₂ içeren koşullarda 24 saat süre ile inkübasyona bırakılarak aktif hale getirilmiştir. CRA katı besiyeri hazırlandıktan sonra izolatlar çizgi ekim yapılmış ve 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmışlardır. Süre sonunda biyofilm pozitif olan kültürler siyah, biyofilm negatif olanlar ise pembe koloniler oluşturmuştur (Freeman ve ark., 1989).

2.2.2.7. Otoagregasyon

Bakterilerin agregasyon özelliği göstermeleri, baskın bir kolonizasyon gösterebilmeleri açısından önemli sayılan bir probiyotik özelliktir.

Otoagregasyon özelliklerinin belirlenmesi için kullanılacak laktik asit bakterileri, MRS broth tüpleri içerisinde 30°C 'de %5 CO₂ içeren koşullarda 18 saat süreyle inkübe edildikten sonra pH'sı 6.2 olan PBS içerisinde optimum yoğunlukları 10⁸ kob/ml'ye ayarlanmıştır.

Mikrobiyal süspansiyon temiz bir lam yüzeyine damlatıldıktan sonra hızlı bir şekilde ışık mikroskopunda gözlemlenmiştir. Test organizmaları içerisinde hücreleri ilk 2 dakika içinde agregre olanların agregasyon sonucu pozitif, diğerlerinin ise negatif kabul edilmiştir (Pascual ve ark., 2008).

2.2.2.8. Koagregasyon

Laktik asit bakterileri ve *E. coli* bakterisi 24 saat süre ile uygun sıvı besiyeri içerisinde aktifleştirildikten sonra, PBS içerisinde optimum yoğunlukları 10⁹ kob/ml'ye göre ayarlanmıştır. 1 ml LAB ve 1 ml *E.coli* olacak şekilde karışımlar hazırlanarak 15 saniye süreyle vortekslenmiştir. Çalışma çift paralel olacak şekilde hazırlanmıştır.

24 kuyucuklu plakalara dağıtılan karışımlar 30°C'de 4 saat hafifçe karıştırılarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda gram boyama yapılarak mikroskopta gözlemlenmiştir.

Koagregasyon özelliği gösteren laktik asit bakterileri patojen organizmalara karşı bir bariyer görevi göstererek onları etkisiz hale getirdiği için önemli bir özellik olarak kabul görmektedir (Pascual ve ark., 2008).

2.2.2.9. Hidrofobisite

Hidrofobisite yetenekleri incelenmek üzere kullanılacak izolatlar MRS sıvı besiyeri içeren tüplerde 30°C 'de %5 CO₂ li ortamda 24 saat süreyle inkübasyona bırakılarak aktif hale getirilmiştir 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmışlardır.

İnkübasyon süresi sonunda 12000 g 5°C 5 dk süreyle santrifüj edilerek 0,05 M K₂HPO₄ (pH: 6,5) tamponuyla 2 kez yıkanmış ve en son aynı tamponla çözdürülmüştür ve hücre süspansiyonu A₅₆₀ nm'de yaklaşık olarak 1.0 olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen karışımdan 3 ml ayrı bir falkona alındıktan sonra üzerine 0,6 ml n-hexadecane ilave edilerek 120 saniye süreyle vortekslenmiştir.

Vortekleme işlemi tamamlandıktan sonra örneklerde üstte berrak bir sıvı olacak şekilde iki ayrı faz gözlemlenmiştir. Üst faz pipet yardımıyla alındıktan

sonra A_{560} nm’de spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır (Vinderola ve Reinheimer, 2003).

Hidrofobisite aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% = (A_0 - A)A_0 \times 100$$

A_0 : İlk absorbans değeri

A : Son absorbans değeri

2.2.2.10. Antibiyotik duyarlılık testi

Kirby-Bauer Disk-Difüzyon metodu kullanılarak antibiyotik dirençlilikleri test edilecek olan izolatların MRS agar petrilinde geliştirilmiş olan 48 saatlik aktif kültürlerinden alınarak 1 ml fizyolojik tuzlu su içerisinde dilüsyonları hazırlanmıştır. 1 ml fizyolojik tuzlu su ile Mc Farland No: 0,5 (10^8 kob/ml) bulanıklığına ayarlanmıştır. Dilüsyonların her birinden 0,5 ml alınarak daha önceden hazırlanmış ve petrilere aktarılmış olan Müller Hinton agar ortamına, steril koşullar altında yayma plaka yöntemiyle ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petrilere, kapakları açık biçimde 5–10 dakika süreyle steril koşullar altında bekletilmiş ve yüzeylerinin kuruması sağlanmıştır. Ardından ticari olarak satılan antibiyotik diskleri petrilere aralarında en az 1,5 cm boşluk olacak şekilde steril koşullarda yerleştirilmiştir. Diskler yerleştirildikten sonra petrilere 10–15 dakika süreyle steril koşullarda bekletilmiş ve sonrasında test organizmasının optimum gelişme koşullarında 24-48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu petrilere oluşan inhibisyon zon çapları ölçülmüş ve değerlendirme yapılmıştır (Anonim, 1997; Rollins ve Joseph, 2000; Halami ve ark., 2000).

2.2.2.11. Antioksidan aktivite tayini

Laktik asit bakterilerinin antioksidan aktivite tayini için ABTS metodu kullanılmıştır. 2’-Azinobis-(3-etilbenziazolin-6-stilfonat) (ABTS) 7 mM potasyum persülfat ise 2,5 mM olarak hazırlanmıştır. 1:1 oranında iki solüsyondan da alınarak siyah bir şişede karıştırılmış ve 16 saat süreyle karanlık odada 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda, 734 nm’de $0,7 \pm 0,01$ absorbansı gösterecek şekilde etanol kullanılarak izolatların yoğunlukları ayarlanmıştır. Daha sonra

ABTS solüsyonundan 2.5 ml, izolatlardan ise 0,5 ml alınarak iyice karıştırılmış ve oda sıcaklığında 6 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda 15000 rpm, 5°C, 5 dk santrifüj edilerek üst fazdan örnek alınmıştır. 734 nm absorbansta spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır (He ve ark., 2015).

$$\% = [1 - A_{\text{örnek}} / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

2.2.3. Metabolik ürünlerin belirlenmesi

2.2.3.1. Proteolitik aktivite tayini

Proteolitik aktivite tayininde, oluşan aminoasitlere eş değer tirosin aminoasidi temel alınmıştır. İzolatlar MRS broth içerisinde 30°C 'de %5 CO₂ içeren koşullarda 18 saat süreyle inkübasyona bırakılarak aktif hale getirilmiştir. Daha sonra, 5 ml yağsız süt sıvı besiyeri ortamına %1 oranında eklenerek 42 saat inkübasyona bırakılmıştır. Çalışma çift paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

Kültürlerin üzerine 1 ml distile su, daha sonra 10 ml 0,72 N trikloro asetik asit (TCA) ilave edilmiş ve örnekler iyice karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 10 dakika süreyle bekletildikten sonra Whatman 1 nolu filtre kâğıdından geçirilerek süzölmüşlerdir. Oluşan süzöntüden 2,5 ml ayrı bir tüp içersine alınıp ve üzerine 5 ml Na₂CO₃.Na₄P₂O₇ çözeltisinden konularak iyice çalkalanmıştır. Daha sonra üzerlerine 1,5 ml Fenol ayırıcı konularak koyu mavi bir renk oluşuncaya kadar çalkalanmıştır. Renk oluşumunun gözlemlenmesinden sonra örnekler 8000 rpm' de 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Üstte oluşan berrak mavi sıvı alınarak 650 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Shimadzu, UV-2101PC) okutulmuştur. Elde edilen değerler proteolitik aktivite için çıkarılan standart eğriye göre, µg / ml cinsinden değerlendirilmiştir (Aslım, 1994).

Bu tayinde standart eğri oluşturmak için tirosin aminoasidi kullanılmıştır. İçerisinde 5 ml skim milk besiyeri içeren tüplere sırasıyla 0,02, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ve 1 mg tirosin /ml olacak şekilde tirosin eklenerek çözelti serisi elde edilmiştir. Serideki her bir tüp birer izolat gibi düşünülüp, izolatlar için uygulanan işlemler çözeltilere de uygulanmıştır ve yine 650 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. Daha sonra elde edilen OD değerleri grafik üzerine yerleştirilerek standart eğri oluşturulmuştur (Aslım, 1994).

2.2.3.2. Laktik asit üretim tayini

İzolatlar 5 ml MRS broth içerisinde 30°C 'de %5 CO₂ içeren koşullarda 48 saat süreyle inkübasyona bırakılarak aktif hale getirilmiştir. Aktifleştirilen bu kültürden 10 ml skim milk besiyerine %1 oranında inokülasyon yapılarak 24 saat inkübasyona bırakılmış ve laktik asit üretim tayininde bu kültürler kullanılmıştır. Çalışma çift paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

İnkübasyon sonunda 10 ml olan aktif kültürler erlene alınarak üzerine 90 ml distile su eklenip 100 ml'e tamamlanmıştır.

Elde edilen karışımın üzerine 5 damla fenol fitalein indikatörü damlatılıp karıştırıldıktan sonra 0,1 N NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Titrasyon işlemi sırasında çözülden damla damla eklenerek karıştırmaya devam edilmiş ve gözlemlenen renk değişiminin kalıcı olduğu farkedildiği anda çözelti ekleme işlemi durdurulmuştur. Bu işlem yapılırken harcanan çözelti miktarı kaydedilmiştir.

Kültürlerin ürettiği asit, titre edilebilir yüzde asitlik olarak hesaplanmıştır (Demirci ve Gündüz, 1994).

% Asitlik: Harcanan 0,1 N NaOH (ml) × 0,9 / alınan örnek miktarı (ml) formülünden yararlanılmıştır.

2.2.3.3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) üretim tayini

Hidrojen peroksit üretim tayini için kullanılacak olan laktik asit bakterileri MRS sıvı besiyeri içerisinde 30°C 'de %5 CO₂ içeren koşullarda 24 saat süreyle inkübasyona tabi tutulmuş ve çalışma çift paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

İnkübasyon süresi sonunda kültürlerle 5 ml distile su ilave edilmiş ve 5000 rpm 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi bittikten sonra üstte oluşan açık renkli berrak sıvı Whatman 42 nolu filtre kâğıdından geçirilmiş ve elde edilen filtrattan 4 ml alınarak ayrı bir tüpe aktarılmıştır. 0,5 ml sülfürik asit, 0,5 ml amonyum molibdat ve 0,5 ml potasyum iyodür çözeltisi sırası ile tüp içerisindeki filtrata ilave edilerek, manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırılmıştır. Bu basamakların sonunda elde ettiğimiz sıvı 350 nm dalga boyunda spektrofotometre de (Shimadzu, UV-2101PC) optik yoğunluk tespiti için kullanılmıştır. Elde edilen

optik yoğunluk (OD) değerleri; ayrıca hazırlanan standart eğriye göre $\mu\text{g} / \text{ml}$ cinsinde hesaplanmıştır (Mumcu, 1997).

0,1 ml saf (% 35) hidrojen peroksit bu tayin için oluşturulması gereken standart eğri için kullanılmıştır. 30 ml distile su ilavesi ile tamamlandıktan sonra elde edilen çözeltiden 1 ml başka bir falkona alınmış ve tekrar distile su ile 30 ml' ye tamamlanmıştır. Elde edilen çözelti bir izolat gibi düşünülerek tüm işlem basamakları tek tek standart çözeltiye de uygulanarak eğri elde edilmiştir.

1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hidrojen peroksit karşılık gelen hidrojen peroksit değeri standart eğriye göre hesaplanmıştır. İzolatlardan elde edilen değerler ile standart eğri karşılaştırılarak $\mu\text{g} / \text{ml}$ cinsine çevrilmiştir (Mumcu, 1997).

2.2.4. Ekstraselüler polisakkarit (EPS) üretimi

CRA besiyerine ekim yapılan izolatlardan renk değişimi gösterenler seçilerek çalışma yalnızca bunlara uygulanmıştır.

Kültürler MRS broth içerisinde 30°C 'de %5 CO_2 içeren koşullarda 24 saat süreyle inkübasyona bırakılarak aktif hale getirildikten sonra %2 glukozlu MRS broth içerisine %1 oranında kültür eklendikten sonra 24 saat daha inkübasyona bırakılmıştır.

İçerisinde %20 glukoz bulunan MRS broth 1 lt olacak şekilde erlenlerde hazırlanıp steril edildikten sonra toplamda 48 saat inkübasyon aşamalarından geçmiş olan aktif kültürler %1 oranında bu besiyeri içerisine aktararak 30°C 'de %5 CO_2 içeren koşullarda 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonrası 15000 g, 4°C ' de, 15 dakika santrifüj edilmiş ve supernatant kısmı alınarak üzerine %4 oranında TCA eklenip iyice çalkalanmıştır. $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 1 gece bekletilmiştir. Bu süre sonunda 15000 g, 4°C ' de, 30 dakika santrifüj edilmiş ve supernatant kısmı alınarak üzerine 1:1 oranında saf alkol eklenmiş yine 1 gece $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiştir. Bu süre sonunda 15000 g, 4°C ' de, 30 dakika santrifüj edilip supernatant kısmı atılmıştır. Elde edilen pellet 5 ml sıcak distile su ile tamamen çözdürülerek temiz bir falkona toplanmıştır. Daha sonra EPS miktarı hesaplanmıştır (Dubois ve ark. 1956; Masuko ve ark., 2004).

2.2.5. Meyve sularının hazırlanması

Araştırmada materyal olarak seçilen nar suları, narın kabuğu, tanesi ve zarının tamamının preslenmesiyle elde edilmiştir. Hiçbir fermentatif işlem uygulanmayan nar suları Anadolu Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına getirilmiştir.

Nar sularının sterilizasyonu 105 °C'de 10 dakika otoklavlanarak sağlanmıştır.

Nar sularına inoküle edilecek, tannaz aktivitesi yüksek 6 izolat 5 ml MRS Broth tüpleri içerisine %1 oranında aşılandıktan sonra 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda 5 ml MRS Broth + %2 Glukozlu besiyeri tüplerine önceki aktif kültürlerden %1 oranında alınarak inoküle edilmiş ve 24 saat inkübasyon süresi sonunda kültürlerin yoğunlukları 10^8 optimum yoğunluğa göre ayarlanmıştır.

Steril edilen nar suları 3 kısma ayrılmış her biri aktif bakteri ile aşılanmıştır. Aşılanmış nar suları 5°C, 25°C aerobik ve 30°C %5 CO₂ koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Çalışma çift paralel olarak yapılmıştır. Nar sularına uygulanan analizler 24 saat aralıklarla 5 gün süre ile yapılmıştır.

2.2.6. Meyve suyuna uygulanan analizler

2.2.6.1. pH tayini

pH tayini nar suyu örneklerinin içerisine cam elektrotlu pH metrenin cam elektrodunun daldırılmasıyla yapılmıştır (Cemeroğlu, 1992). Nar suları örneklerinin herbirine günlük olarak uygulanmıştır.

2.2.6.2. Titrasyon asitliği tayini

Titrasyon asitliği ölçülmek istenen nar suyu örneklerinden 5 ml alınıp 4 kat seyreltildikten sonra 0.1 N NaOH çözeltisi kullanılarak pH 8.1' e ulaşınca kadar titre edilmeye devam edilmiştir (Shwartz ve ark., 2008). Amaçlanan pH değerine ulaşınca kadar harcanan NaOH çözeltisi miktarı ml olacak şekilde kaydedilmiştir. Nar suyu örneklerinin titrasyon asitliği, yüzde sitrik asit cinsinden hesaplanmıştır (Shwartz ve ark., 2008). Çalışma nar suyu örneklerine günlük olarak uygulanmıştır.

2.2.6.3. Suda çözüner kuru madde tayini

Refraktometrik yöntem, suda çözünen kuru madde tayini için kullanılmıştır. Nar suyu örneklerinin suda çözüner kuru madde değerleri (°Briks) el refraktometresi ile 20 °C'de ölçülmüştür (Karaca, 2012). Çalışma nar suyu örneklerine günlük olarak uygulanmıştır.

2.2.6.4. Toplam kuru madde tayini

Nar suyu örneklerinden 10 ml alınarak 70° C vakumlu etüvde, 100 mmHg (13.3kPa) basınç altında kurutulmuştur. Sabit ağırlığa kadar gelindikten sonra yüzde kuru madde olarak hesaplamalar yapılmıştır (Karaca, 2012).

2.2.6.5. Renk ölçümleri

5° C, 25° C ve 30° C %5 CO₂ bekleyen farklı kültürlerden günlük olarak renk ölçüm tayini için örnekler alınmıştır. Örnekler 0,45 µm çaplı, düşük protein bağlayıcı özellikteki, steril selüloz membran filtrelerden geçirildikten sonra 96 kuyucuklu platelere 200 µl konularak 420 nm absorbansta spektrofotometrik okuma değer sonuçları alınmıştır (Alper ve Acar, 2004).

2.2.6.6. Antosiyanin tayini

Çalışmada örneklerin antosiyanin tayinlerinin yapılması için Fuleki ve Francis (1968) tarafından önerilen, ve Giusti ve Wrolstad (2001) tarafından geliştirilen pH diferansiyel metodu kullanılmıştır. Bu metot ortamın pH değerlerinin 1.0 ve 4.5 olduğu zaman ölçülen absorbans değerlerinin farkı ile antosiyanin konsantrasyonunun orantılı olduğunu göstermektedir. Nar suları potasyum klorür (pH 1.0) ve sodyum asetat (pH 4.5) çözeltileri ile 1:50 oranı sağlayacak şekilde hazırlanmıştır. Elde edilen karışımların 15 dakika bekletildikten sonra 515 nm ve 700 nm absorbansta spektrofotometrik olarak değerleri alınmıştır (Karaca, 2012) Monomerik antosiyanin miktarı, nar suyunda baskın bulunan siyanidin-3-glukozit cinsinden (Gil ve ark., 2000) aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplanmıştır. Siyanidin-3-glikozidin molar absorbans değeri 29600; molekülağırlığı ise, 445.2 alınarak hesaplama yapılmıştır (Giusti ve Wrolstad 2001).

$$\text{Monomerik antosiyanin miktarı (mg/L)} = \frac{(A) \times (MW) \times (SF) \times 1000}{(\epsilon) \times (L)}$$

A: Absorbans farkı (pH 1.0 ve 4.5 değerlerinde ölçülen absorbans farkı)

(A= (A515-A700)_{pH1} - (A515-A700)_{pH4.5})

MW: Baz olarak alınacak antosiyaninin molekülağırlığı

SF: Seyreltme faktörü

ϵ : Molar absorpsiyon katsayısı

L: Absorbans ölçüm küvetinin tabaka kalınlığı (cm)

2.2.6.7. Toplam fenolik madde tayini

Toplam fenolik madde tayini için microtitrasyon plak (MTP) yöntemi kullanılmıştır. 96 kuyucuklu plate içerisine 100'er µl Folin Ciocalteu ayracı kullanılarak hazırlanan folin ayracı paralelleri olacak şekilde konulmuştur. Daha önceden hazırlanmış olan sodyum karbonattan 80 µl alınarak ayraç üzerine eklenmiştir. Son olarak farklı etüvlerde inkübasyona bırakılan ve içerisinde bakteri bulunan ve bulunmayan nar suyu örneklerinden 10 µl eklenerek 630 nm absorbans değerinde spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır.

1:2 oranı sağlanacak şekilde tannik asitten 5 seri delüsyon hazırlanmış ve bu delüsyonlar 960 µg/ml ile 60 µg/ml arasında olacak şekilde yapılmıştır. Örneklere uygulanan işlem basamakları aynı sıra ile tannik asit çözeltilerine de uygulanmış ve bu sayede toplam fenolik madde standart eğrisi oluşturulmuştur (Attard, 2013).

2.2.6.8. Antioksidan aktivite tayini

Nar suyu örneklerinde antioksidan aktivite tayini iki farklı test ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma ilk ürün ve son ürüne yapılmıştır (He ve ark., 2015).

2.2.6.8.1. ABTS+(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) radikal katyonu yakalama aktivitesi

ABTS yöntemi kullanılarak nar sularına yapılan antioksidan tayini Bölüm 2.2.2.11.'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Çalışma izolatlar yerine nar suları

kullanılarak tekrarlanmıştır. 734 nm absorbansta spektrofotometrik olarak ölçüm yapılarak % hesaplamaları elde edilmiştir (He ve ark., 2015).

$$\% = [1 - A_{\text{örnek}} / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

2.2.6.8.2.DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) radikal katyonu yakalama aktivitesi

İzolatlar MRS Broth tüpleri içerisine %1 oranında ekildikten sonra 48 saat süreyle 30° C %5 CO₂ koşullarında inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon süresi sonunda bakteri yoğunlukları 10¹⁰ a göre ayarlanmış ve bu tayin için kullanılmışlardır.

0,1 mM DPPH solüsyonu çalışmada kullanılacak miktara göre hazırlanmıştır. Aktif kültürlerden 1,5 ml, hazırlanan DPPH solüsyonundan 1,5 ml ve nar suyu örneklerinden (0, 1, 2, 3, 4, 5) ml olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda karıştırılmıştır. Hazırlanan karışımlar 30 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 8000 g' de 10 dakika santrifüj edildikten sonra platelere alınarak 517 nm absorbansta etanole karşı spektrofotometrik olarak okuma değerleri alınmıştır (He ve ark., 2015).

$$\% = [1 - (A_{\text{örnek}} - A_{\text{kör}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

2.2.6.9. Mineral madde miktarı

Mineral madde miktar analizi için nar suyu filtre kağıdından süzüldükten sonra saf su ile 1:10 oranında seyreltme yapılmıştır. Okuma değerleri ICP OES cihazında yaptırılmıştır.

2.2.6.10.Nar sularında bakteri sayımları

Farklı sıcaklık koşullarında bekleyen örneklerden günlük olarak bakteri sayımları yapılmıştır. Fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisinde 1:9 oranında nar suları dilüsyonları hazırlanmış ve 10⁸ 'e kadar delüe edilmiştir.

MRS agar besiyerine çift paralel olarak damla plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. 30°C 'de %5 CO₂ içeren koşullarda 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda bakteri sayımları yapılmış ve bakterilerin nar suları içerisindeki canlılık süreleri test edilmiştir.

2.2.6.11. Duyusal analiz

Çalışmada kullanılan nar suyunun ve içerisine laktik asit bakterilerinin ilavesinden sonra burukluk, acılık ve ekşilik üzerine olan duyusal analizleri yapılmıştır. Değerlendirmeler 5 üzerinden yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Fermente Ürünlerden İzole Edilen Laktik Asit Bakterileri

Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarında daha önceki çalışmalarda fermente gıdalardan izole edilen ve yüksek tannaz aktivitesine sahip olduğu belirlenen laktik asit bakterileri, izole edildiği fermente gıdalar ve temin edildiği yerler Çizelge 3.1 'de verilmiştir. Seçilen izolatlardan 3 tanesi Acur Turşusu A6, A6X, A4, 1 tanesi Sucuk ES6 ve 1 tanesi de yeşil zeytin DZ2 örneğine aittir.

Çizelge 3.1. Daha önceki çalışmalarda elde edilen izolatların kaynakları (Temel, 2012)

İzolatlar	İzole Edildiği Ürün	Temin Edildiği Yer
ES6	Sucuk	Ev-Eskişehir
A6	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir
A6X	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir
A4	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir
MT4	Mısır Turşusu	Ev-Söğüt
DZ2	Yeşil Zeytin	Ev-Edremit

Seçilen izolatların Gram boyama, hücre morfolojisi ve katalaz test sonuçları ayrıca daha önceki çalışmalarda yapılan riboprinter ile tanımlanması Çizelge 3.2.'de verilmiştir (Temel, 2012). 3 izolatın *Lactobacillus plantarum* A6, A4, MT4,

2 tanesinin *Lactobacillus brevis* ES6, A6X ve 1 tanesinin *Enterococcus faecium* DZ2 olduğu bulunmuştur. Tüm izolatların gram pozitif ve katalaz negatiftir.

Çizelge 3.2. Laktik asit bakterilerinin tanımlama, Gram boyama, hücre morfolojisi ve katalaz testleri

İzolat No	Tanımlanan Tür	Gram Boyama	Hücre Morfolojisi	Katalaz Testi
ES6	<i>Lactobacillus brevis</i>	(+)	Basil	(-)
A6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(+)	Basil	(-)
A6X	<i>Lactobacillus brevis</i>	(+)	Basil	(-)
A4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(+)	Basil	(-)
MT4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(+)	Basil	(-)
DZ2	<i>Enterococcus faecium</i>	(+)	Kok	(-)

3.2. İzolatların Probiyotik Özelliklerinin İncelenmesi

3.2.1. Laktik asit bakterilerine ait süpernatantın antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin *B. subtilis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *M. luteus*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *A. hydrophila*, *S. typhimurium*, *E. fecalis*, *Yersinia enterocolitica* patojen organizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları Çizelge 3.3.'te verilmiştir. *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. fecalis*, *Yersinia enterocolitica* patojenlerine karşı hiçbir etki gözlenmezken diğer test mikroorganizmalarına karşı farklı oranlarda antimikrobiyal aktivite göstermiş ve oluşan zon çapları aşağıda verildiği şekilde derecelenmiştir.

Çizelge 3.3. Laktik asit bakterilerinin hücresiz filtratının bazı patojen organizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteleri

	ES6	A6	A6X	A4	MT4	DZ2
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Micrococcus luteus</i>	++	-	-	-	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	+++	+	+	+++
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	+	+	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	+	-	-	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-	-	-

- Antimikrobiyal aktivite yok
- + 0.1 – 0.2 cm aralığında zon çapı
- ++ 0.2 – 0.4 cm aralığında zon çapı
- +++ 0.4 – 0.6 cm aralığında zon çapı

Agar difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesi incelenen izolatlar katalaz ilavesi yapıldıktan sonra elde edilen sonuçlar Çizelge 3.4.'te verilmiştir. Çalışmada bazı izolatların antimikrobiyal aktivitesi devam ederken bazılarında bu etkinliğin kaybolduğu görülmüştür. MT4 ve DZ2 izolatının hücresiz filtratları *E.coli*'ye, A6X izolatının *P. aeruginosa*'ya ve MT4 izolatının *M. luteus*'a karşı etkili olan antimikrobiyal aktivitesi katalaz ilavesinden sonra kaybolmuştur. Bu izolatlar ait filtratların antimikrobiyal aktivitelerinin hidrojen peroksit ile ilgili olduğu belirlenmiştir.

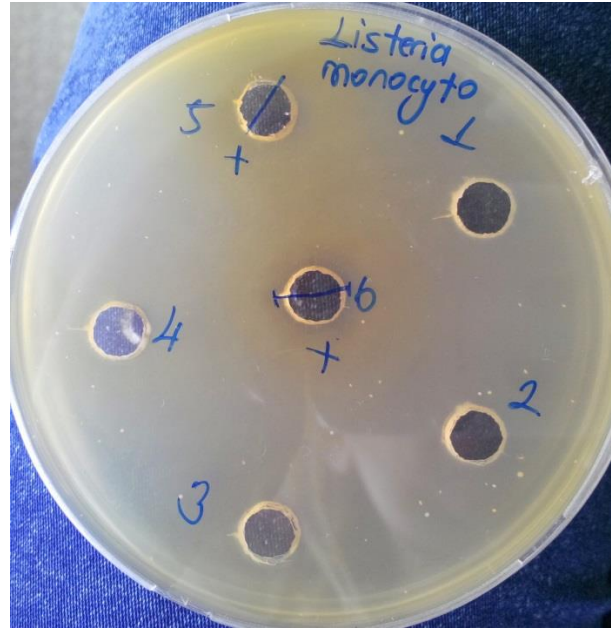
Çizelge 3.4. Laktik asit bakterilerine ait hücresiz süpernatanta katalaz enzim ilavesinden sonra patojen organizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteleri

	ES6	A6	A6X	A4	MT4	DZ2
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylacoccus aureus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	-	+	+	+++
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	+	+	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	+	-	-	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-	-	-



Şekil 3.1. Saf filtratların *Salmonella typhimurium* üzerine olan antimikrobiyal aktivitesi

Şekil üzerinde: 2: DZ2, 6: A6.



Şekil 3.2. Saf filtratların *Listeria monocytogenes* üzerine olan antimikrobiyal aktivi

Şekil üzerinde: 5: A6, 6: A6X.

3.2.2. Antimikrobiyal aktivite üzerine bazı enzimlerin etkisinin belirlenmesi

Proteinaz K ilavesi yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmasının sonuçları değerlendirildiğinde ES6, A4 ve MT4 izolatlarının *Pseudomonas aeruginosa* patojen organizmasına karşı, A6X izolatının *Listeria monocytogenes*'e karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitenin kaybolduğu görülmektedir. Bu da aktivitenin protein özelliğinde olabileceğini göstermektedir. Diğer izolatların patojen organizmalara karşı artış göstermesi ise maddenin proteinaz K'dan etkilenmediğini göstermektedir. DZ2 izolatının *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterococcus fecalis*'e karşı, A6 izolatının *Listeria monocytogenes*'e karşı artış gösterdiği görülmektedir. (Çizelge 3.5.)

Lizozim ve tripsin ilavesi yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmasının sonuçları da Çizelge 3.6. ve Çizelge 3.7.'de verilmiştir. Bazı izolatlarda antimikrobiyal aktivitenin kaybolduğu, bazı izolatlarda ise değişen derecelerde etkinin kaybolduğu görülmektedir.

Çizelge 3.5. Proteinaz K'nın antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi

Proteinaz K	ES6	A6	A6X	A4	MT4	DZ2
<i>Staphylacoccus aureus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	++	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	+++	-	-	++++
<i>Enterococcus fecalis</i>	-	-	-	-	-	++

Çizelge 3.6. Lizozimin antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi

Lizozim	ES6	A6	A6X	A4	MT4	DZ2
<i>Staphylacoccus aureus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	-	+++	+	+	+
<i>Enterococcus fecalis</i>	-	-	-	-	-	++

Çizelge 3.7. Tripsinin antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi

Tripsin	ES6	A6	A6X	A4	MT4	DZ2
<i>Staphylacoccus aureus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	++	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	+++	+	+	++
<i>Enterococcus fecalis</i>	-	-	-	-	-	+

3.2.3. Düşük pH' a dirençlilik sonuçları

Tannaz aktivitesi yüksek 6 laktik asit bakterisinin pH 2,5 ve pH 3,5 daki canlılığı Çizelge 3.8.' de verilmiştir. *E. faecium* DZ2 pH 2.5 ve pH 3.5 da 180 dakika süre ile canlılığını korumuştur. *L. plantarum* MT4 pH 2.5 ta 60 dakika canlı kalabilirken, pH 3.5 ta 180 dakika canlı kalmıştır. *L. plantarum* A4 pH 3.5 ta 180 dakika canlı kalırken pH 2.5 ta sadece 0. dakikada canlılık gözlemlenmiştir. *L. brevis* A6X, *L. plantarum* A6 ve *L. brevis* ES6 her iki pH aralığında da 180 dakika canlılığını korumuştur.

Çizelge 3.8. Laktik asit bakterilerinin düşük pH değerlerindeki canlılığı (kob/ml)

Süre	pH =3,5	pH =2,5
<i>L. brevis</i> ES6		
0. dakika	1.10x10 ⁴	1.03x10 ⁴
30. dakika	1.24x10 ⁴	1.04x10 ⁴
60. dakika	1.39x10 ⁴	3.70x10 ²
90. dakika	1.42x10 ⁴	9.50x10
120. dakika	1.18x10 ⁴	6.40x10
150. dakika	1.09x10 ⁴	2.20x10
180. dakika	1.03x10 ⁴	0.40x10
<i>L. plantarum</i> A6		
0. dakika	1.16x10 ⁴	3.70x10 ⁴
30. dakika	1.23x10 ⁴	4.20x10 ⁴
60. dakika	1.43x10 ⁴	1.38x10 ⁴
90. dakika	1.38x10 ⁴	5.40x10 ³
120. dakika	1.28x10 ⁴	1.34x10 ²
150. dakika	1.20x10 ⁴	50x10
180. dakika	8.50x10 ³	0.30x10
<i>L. brevis</i> A6X		
0. dakika	2.00x10 ⁵	2.70x10 ⁴
30. dakika	1.66x10 ⁵	3.50x10 ⁴
60. dakika	1.80x10 ⁵	2.90x10 ⁴
90. dakika	1.91x10 ⁵	3.10x10 ⁴
120. dakika	1.92x10 ⁵	10x10 ³
150. dakika	1.60x10 ⁵	40x10 ³
180. dakika	1.50x10 ⁵	30x10 ³

Çizelge 3.8 (Devam) Laktik asit bakterilerinin düşük pH değerlerindeki canlılığı (kob/ml)

<i>L. plantarum</i> A4		
0. dakika	7.50x10 ⁴	50x10 ²
30. dakika	5.10x10 ⁴	-
60. dakika	5.90x10 ⁴	-
90. dakika	6.40x10 ⁴	-
120. dakika	3.20x10 ⁴	-
150. dakika	2.40x10 ⁴	-
180. dakika	2.50x10 ⁴	-
<i>L. plantarum</i> MT4		
0. dakika	1.24x10 ⁴	2.04x10 ³
30. dakika	1.05x10 ⁴	1.08x10 ³
60. dakika	1.20x10 ⁴	2.20x10 ²
90. dakika	1.58x10 ⁴	-
120. dakika	9.10x10 ³	-
150. dakika	1.32x10 ⁴	-
180. dakika	1.20x10 ⁴	-
<i>E. faecium</i> DZ2		
0. dakika	1.93x10 ⁵	1.22x10 ⁴
30. dakika	1.50x10 ⁵	2.37x10 ⁴
60. dakika	1.40x10 ⁵	1.17x10 ⁴
90. dakika	1.41x10 ⁵	3.00x10 ²
120. dakika	1.36x10 ⁵	1.00x10 ²
150. dakika	1.20x10 ⁵	7.20x10 ¹
180. dakika	1.15x10 ⁵	3.50x10 ¹

3.2.4. Safra tuzuna dirençlilik sonuçları

Fermente gıdalardan elde edilen laktik asit bakterilerinin farklı konsantrasyonlardaki safra tuzuna karşı göstermiş olduğu dirençlilik sonuçları Çizelge 3.9.'da verilmiştir. Konsantrasyon arttıkça safraya olan toleransta düşme gözlenmiştir.

Çizelge 3.9. Laktik asit bakterilerinin safra tuzuna dirençlilik test sonuçları (560 nm)

İzolat No	Kontrol	%0.03	%0.06	%0.125	%0.25	%0.5	%1
ES6	1,0176	0,9558	0,4436	0,2050	0,1411	0,0142	0,0021
A6	1,0237	0,6530	0,4082	0,2343	0,1872	0,0236	0,0012
A6X	1,1299	0,9431	0,5277	0,2872	0,1635	0,1369	0,0018
A4	1,2983	0,7765	0,4315	0,2111	0,1974	0,1613	0,0001
MT4	1,0388	0,4944	0,2752	0,1216	0,1165	0,0130	0,0011
DZ2	1,3082	0,7301	0,4551	0,1750	0,1734	0,0229	0,0008

3.2.5. Lizozim dirençliliği sonuçları

Lizozime karşı dirençlilikleri test edilen 6 laktik asit bakterisinin sayım sonuçları Çizelge 3.10'te verilmiştir. 0. dakikadan sonra bakteri sayısını en fazla koruyan *L. plantarum* A4 ve *E. faecium* DZ2, *L. brevis* A6X izolatlarının olduğu görülmüştür. *L. plantarum* A6 ise, en düşük değeri veren izolat olmuştur.

Çizelge 3.10. Laktik asit bakterilerinin lizozime karşı dirençliği

İzolat Numaraları	% Direçli Bakteri
ES6	62.19
A6	54.76
A6X	83.92
A4	83.76
MT4	63.04
DZ2	83.92

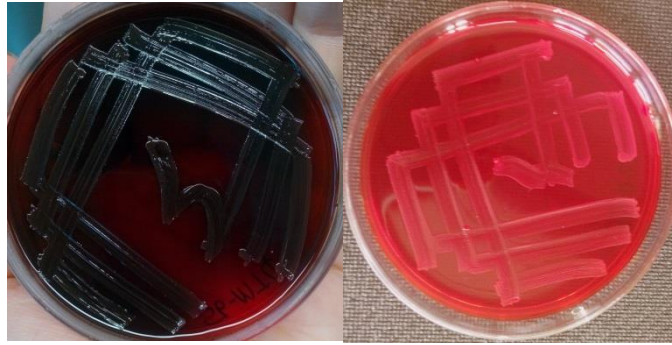
3.2.6. Biyofilm oluşturma özellikleri

Laktik asit bakterilerinin %2'lik fruktoz, galaktoz, maltoz, rafinoz, laktoz ve sükröz içeren MRS besiyerinde biyofilm oluşturma sonuçları Çizelge 3.11.' te verilmiştir. 570 nm'deki optik yoğunluk (OD) değerleri gösterilmiştir. *E. faecium* DZ2 ve *L. brevis* ES6 izolatlarının galaktoz şekeri hariç tüm diğer şeker ortamlarında biyofim oluşturma özelliği, diğer izolatlara göre daha yüksek bulunmuştur.

Çizelge 3.11. Laktik asit bakterilerinin farklı şekerlerde biyofilm oluşturma etkileri (570nm)

İzolat No	Fruktoz	Galaktoz	Maltoz	Rafinoz	Laktoz	Sükroz
ES6	1,733	0,623	2,363	1,293	1,531	1,691
A6	0,126	0,150	0,215	0,103	0,076	0,211
A6X	0,145	0,090	0,162	0,098	0,038	0,033
A4	0,128	0,248	0,006	0,076	0,075	0,210
MT4	0,200	0,131	0,397	0,025	0,125	0,112
DZ2	1,428	0,278	1,521	1,357	1,423	1,200

Laktik asit bakterilerinin Kongo kırmızılı agarda biyofilm oluşturma çalışması yapılmıştır. *L. brevis* ES6 ve *E. faecium* DZ2 izolatlarında siyah, *L. plantarum* A6, *L. brevis* A6X, *L. plantarum* A4, *L. plantarum* MT4 izolatlarında pembe renkli koloniler olduğu görülmüştür. Siyah renkli koloniler pozitif, pembe renkli koloniler ise negatif sonuç vermektedir. Şekil 3.3.



Şekil 3.3. Kongo kırmızılı agar üzerinde siyah ve pembe koloni oluşumu

Şekil üzerinde siyah koloniler ES6, pembe koloniler MT4

3.2.7. Otoagregasyon ve koagregasyon sonuçları

İzolatların otoagregasyon ve koagregasyon özelliklerinin sonuçları Çizelge 3.12.'da verilmiştir. Bakterilerin buldukları hücrelere tutunabilmeleri ve

kolonizasyon göstemeleri açısından önemli bir probiyotik özellik olan bu testler 6 izolat için de pozitif sonuç vermiştir.

Çizelge 3.12. Laktik asit bakterilerinin otoagregasyon ve koagregasyon test sonuçları

İzolat No	Otoagregasyon	Koagregasyon
<i>L. brevis</i> ES6	+	+
<i>L. plantarum</i> A6	+	+
<i>L. brevis</i> A6X	+	+
<i>L. plantarum</i> A4	+	+
<i>L. plantarum</i> MT4	+	+
<i>E. faecium</i> DZ2	+	+

3.2.8. Hidrofobisite değerleri

İzolatların % hidrofobisite değerleri intestinal epitel hücrelere tutunabileceğini göstermektedir. Çizelge 3.13.'te en düşük oranın *L. brevis* ES6 izolatında olduğu görülmektedir.

Çizelge 3.13. Laktik asit bakterilerinin % hidrofobisite değerleri

<i>L. brevis</i> ES6	<i>L. plantarum</i> A6	<i>L. brevis</i> A6X	<i>L. plantarum</i> A4	<i>L. plantarum</i> MT4	<i>E. faecium</i> DZ3
94,8311	97,7196	97,8284	97,5545	95,0935	97,1147

3.2.9. Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları

İzolatların antibiyotik duyarlılık test sonuçları Çizelge 3.14.'de verilmiştir.Yapılan çalışma sonucunda laktik asit bakterilerinin Penisilin G ve Vankomisine duyarlı oldukları görülmüştür.

Çizelge 3.14. Laktik asit bakterilerinin antibiyotik test sonuçları

	ES6	A6	A6X	A4	MT4	DZ2
Siprofloksasin	R	15 mm	1.5 cm	15 mm	R	15 mm
Penisilin G	20 mm	15 mm	15 mm	15 mm	15 mm	30 mm
Gentamisin	10 mm	10 mm	R	R	R	10 cm
Netilmisin Sülfat	1.0 mm	R	R	R	R	R
Kanamisin	R	R	R	R	R	R
Kloramfenikol	R	R	20 mm	R	R	10 mm
Gatifloksasin	15 mm	R	R	R	20 mm	10 mm
Streptomisin	10 mm	R	R	R	10 mm	20 mm
Levofloksasin	10 mm	15 mm	R	R	10 mm	R
Tetrasiklin	20 mm	30 mm	R	R	R	R
Eritromisin	20 mm	R	10 mm	10 mm	05 mm	R
Vankomisin	20 mm	20 mm	20 mm	30 mm	20 mm	30 mm

R: Dirençli

3.2.10. Antioksidan aktivite test sonuçları

Laktik asit bakterilerinin antioksidan aktiviteleri ABTS yöntemi kullanılarak test edilmiş ve % değerleri hesaplanmıştır. En yüksek değer *L. plantarum* A6 izolatına ait olduğu görülse de değerler birbirine oldukça yakın bulunmuştur (Çizelge 3.15.)

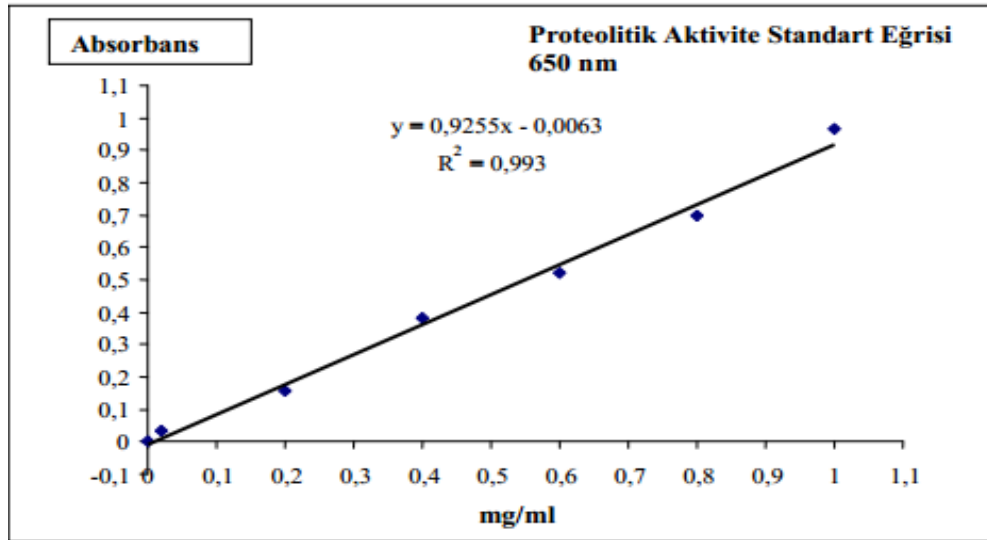
Çizelge 3.15. Laktik asit bakterilerinin ABTS antioksidan aktivite sonuçları (%)

İzolot No	<i>L. brevis</i> ES6	<i>L. plantarum</i> A6	<i>L. brevis</i> A6X	<i>L. plantarum</i> A4	<i>L. plantarum</i> MT4	<i>E. faecium</i> DZ3
% ABTS	96.77	97.20	97.11	96.42	96.39	96.98

3.3. Metabolik ürünlerin belirlenmesi

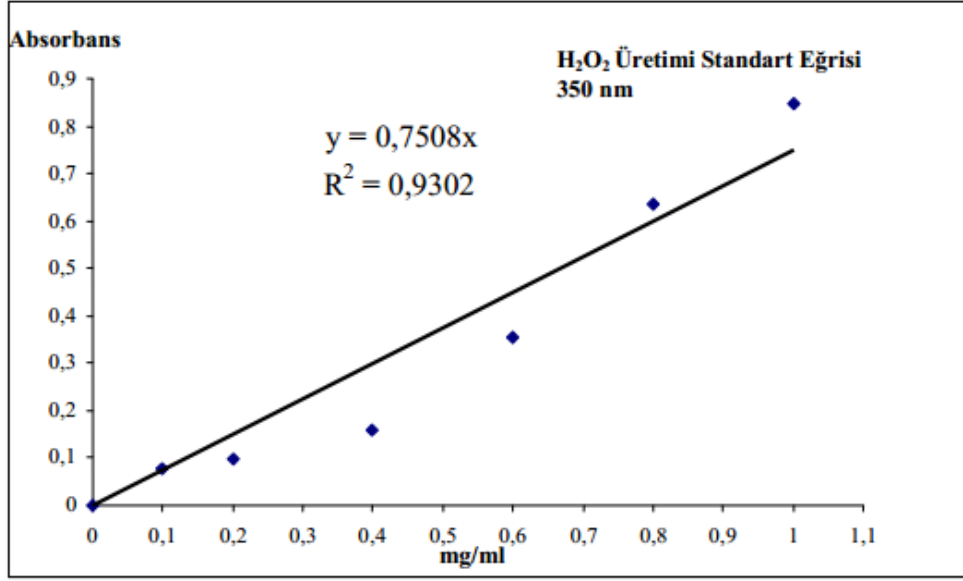
Fermente ürünlerden izole edilen laktik asit bakterilerinin proteolitik aktivitesi, laktik asit miktarı ve hidrojen peroksit üretim miktarları belirlenmiştir. Çizelge 3.16.'da hidrojen peroksit ve proteolitik aktivite miktarları, Çizelge 3.17.'de laktik asit üretim miktarları verilmiştir. Ayrıca Şekil 3.4.'de proteolitik aktivite belirlenmesi için kullanılan standart eğri ve Şekil 3.5.'de hidrojen peroksit üretiminin belirlenmesi için kullanılan standart eğri yer almaktadır. Proteolitik aktivite miktarı belirlenmesinde birim olarak mg/ml kullanılırken hidrojen peroksit miktarı belirlenmesinde µg/ml kullanılmıştır.

Laktik asit bakterilerinden proteolitik aktivitesi en yüksek olan izolat *L. plantarum* A6X ve en düşük ise *L. brevis* A6 olarak bulunmuştur.



Şekil 3.4. Proteolitik aktivite tayini standart eğrisi (650 nm)

Çalışmada kullanılan 6 izolattan hidrojen peroksit miktarı en yüksek olan izolat MT4, en düşük olan ise A6 olarak bulunmuştur. Tüm izolatların hidrojen peroksit miktarlarının birbirine yakın değerler olduğu görülmektedir.



Şekil 3.5. Hidrojen peroksit üretimi standart eğrisi (350 nm)

Çizelge 3.16. Laktik asit bakterilerinin hidrojen peroksit ve proteolitik aktivite miktarları

İzolat No	Hidrojen Peroksit Miktarı	Proteolitik Aktivite Miktarı
	μ g/ml	Tirosin mg/ml
<i>L. brevis</i> ES6	0.3747 \pm 0.020	0,160 \pm 0,009
<i>L. plantarum</i> A6	0,2635 \pm 0,002	0,010 \pm 0,027
<i>L. brevis</i> A6X	0.3368 \pm 0,037	0,915 \pm 0,058
<i>L. plantarum</i> A4	0.369 \pm 0,024	0,079 \pm 0,140
<i>L. plantarum</i> MT4	0.8202 \pm 0,013	0,032 \pm 0,061
<i>E. faecium</i> DZ2	0.4216 \pm 0,009	0,340 \pm 0,101

İzolatların laktik asit üretimleri % asitlik olarak hesaplanmış ve Çizelge 3.17.'de verilmiştir. Çalışmada test edilen 6 laktik asit bakterisinden en düşük miktarın *L. plantarum* (A6) %0.079 ve en yüksek *L. plantarum* (MT4) %0.089 izolatlarına ait olduğu görülmüştür

Çizelge 3.17. İzolatların laktik asit üretim miktarları (%)

İzolat No	Laktik Asit Üretim Miktarı
<i>L. brevis</i> ES6	0,0837
<i>L. plantarum</i> A6	0,0792
<i>L. brevis</i> A6X	0,0846
<i>L. plantarum</i> A4	0,0819
<i>L. plantarum</i> MT4	0,0891
<i>E. faecium</i> DZ2	0,0819

3.4. Ekstraselüler polisakkarit (EPS) üretim miktarı

CRA besiyerine yapılan ekim sonucu EPS üretme ihtimali olduğu için seçilen izolatlardan A6, A6X, A4 ve MT4'e uygulanan test sonuçları Çizelge 3.18.'de verilmiştir. En yüksek üretim miktarının A6 izolatında olduğu görülmüştür.

Çizelge 3.18. Laktik asit bakterilerinin ekstraselüler madde üretim miktarları (mg/ml)

İzolat No	A6	A6X	A4	MT4
EPS Üretim Miktarı	100	80	60	60

3.5. Meyve suyuna uygulanan analiz sonuçları

Çalışmada kullanılan nar suyu örneğinin pH, titrasyon asitliği, suda çözünen toplam kuru madde miktarı, toplam kuru madde miktarı, renk analizi, antosiyanin özelliği, toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan özellikleri belirlenmiştir. Test sonuçları Çizelge 3.19. 'da verilmiştir. Nar suyunun mineral madde analiz sonuçları ise Çizelge 3.20.'de verilmiştir.

Çizelge 3.19. Çalışmada kullanılan nar suyunun analiz sonuçları

Ph	3.12±0.00
Titrasyon Asitliği (%)	5.12±0.00
Suda Çözünür Kuru Madde Miktarı (Briks°)	18.4±0.00
Renk (420 nm)	3.16±0.00
Toplam kuru madde (g/100 ml)	17,9
Toplam fenolik madde (%)	0.982
Toplam Antosiyanin Miktarı (mg/L)	206,34
ABTS (%)	9.13
DPPH (%)	(1mg/ml) 55.63
	(2mg/ml) 75.13
	(3mg/ml) 82.27
	(4mg/ml) 95.35
	(5mg/ml) 99.88

Çizelge 3.20. Nar suyunun mineral madde sonuçları

B	Ca	Cu	K	Mg	Mn	P	Zn
2.15	18.75	0.22	2280	63.24	0.28	136.5	1.66

3.5.1. pH değerleri

5°C, 25°C aerobik ve 30°C %5 CO₂ içeren ortamlarda laktik asit ilavesi yapılarak 3 farklı gruba ayrılan nar suyu örneklerinin günlük olarak yapılan pH ölçümleri herbir izolat için kontrol gruplarıyla birlikte Çizelge 3.20’de verilmiştir.

İçerisine *L. brevis* ES6 izolatı aşılanan nar sularında, pH nın zamanla düşüş gösterdiği, sıcaklık farklılıklarının belirgin bir etkisinin olmadığı görülmüştür. 5°C sıcaklıkta bekleyen nar sularının son gün ölçümü 3.01±0.00, 25°C sıcaklıkta 2.82±0.02 ve 30°C %5 CO₂ içeren koşullarda ise 2.78±0.02 değerleri elde edilmiştir (Çizelge 3.21.)

Çizelge 3.21. *L. brevis* ES6 izolatı içeren nar suyunun pH değerleri

<i>L. brevis</i> ES6	0. gün	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
Nar suyu+bakteri (5°C)	3.12±0.00	3.08±0.01	3.03±0.01	3.08±0.00	3.01±0.00
Nar suyu (5°C)	3.12±0.00	3.05±0.02	3.10±0.00	2.99±0.00	3.05±0.05
Nar suyu+bakteri (25°C)	3.12±0.00	3.09±0.01	3.08±0.00	2.75±0.00	2.82±0.02
Nar suyu (25°C)	3.12±0.00	3.05±0.05	3.25±0.15	2.86±0.02	2.95±0.05
Nar suyu+bakteri (30°C %5 CO ₂)	3.12±0.00	3.04±0.01	3.05±0.03	2.85±0.00	2.78±0.02
Nar suyu (30°C %5 CO ₂)	3.12±0.00	3.04±0.02	3.05±0.03	2.85±0.02	2.78±0.01

İçerisine *L. plantarum* A6 izolatı aşılanan nar sularında, pH nın zamanla düşüş gösterdiği, sıcaklık farklılıklarının belirgin bir etkisinin olmadığı görülmüştür. 5°C sıcaklıkta bekleyen nar sularının son gün ölçümü 3.01±0.00, 25°C sıcaklıkta 2.82±0.02 ve 30°C %5 CO₂ içeren koşullarda ise 2.96±0.02 değerleri elde edilmiştir (Çizelge 3.22.)

Çizelge 3.22. *L. plantarum* A6 izolatu içeren nar suyu pH değerleri

<i>L. plantarum</i> A6	0. gün	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
Nar suyu+bakteri (5°C)	3.12±0.00	3.08±0.01	2.89±0.13	3.04±0.04	3.01±0.00
Nar suyu (5°C)	3.12±0.00	3.05±0.02	3.1±0.00	2.99±0.00	3.05±0.05
Nar suyu+bakteri (25°C)	3.12±0.00	3.09±0.01	3.08±0.00	2.75±0.00	2.82±0.02
Nar suyu (25°C)	3.12±0.00	3.05±0.05	3.25±0.15	2.86±0.02	2.95±0.05
Nar suyu+bakteri (30°C %5 CO ₂)	3.12±0.00	3.09±0.05	2.98±0.15	2.92±0.03	2.96±0.02
Nar suyu (30°C %5 CO ₂)	3.12±0.00	3.04±0.02	3.05±0.03	2.85±0.02	2.78±0.01

İçerisine *L. brevis* A6X izolatu aşılanan nar sularında, pH nın zamanla düşüş gösterdiği, sıcaklık farklılıklarının belirgin bir etkisinin olmadığı görülmüştür. 5°C sıcaklıkta bekleyen nar sularının son gün ölçümü 3.11±0.01, 25°C sıcaklıkta 3.07±0.02 ve 30°C %5 CO₂ içeren koşullarda ise 3.11±0.01 değerleri elde edilmiştir (Çizelge 3.23.)

Çizelge 3.23. *L. brevis* A6X izolatu içeren nar suyu pH değerleri

<i>L.brevis</i> A6X	0. gün	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
Nar suyu+bakteri (5°C)	3.12±0.00	3.05±0.02	3.12±0.02	3.08±0.03	3.11±0.01
Nar suyu (5°C)	3.12±0.00	3.05±0.02	3.10±0.00	2.99±0.00	3.05±0.05
Nar suyu+bakteri (25°C)	3.12±0.00	3.09±0.01	3.10±0.01	3.08±0.02	3.07±0.02
Nar suyu (25°C)	3.12±0.00	3.05±0.05	3.25±0.15	2.86±0.02	2.95±0.05
Nar suyu+bakteri (30°C %5 CO ₂)	3.12±0.00	3.07±0.01	3.09±0.03	3.06±0.01	3.11±0.01
Nar suyu (30°C %5 CO ₂)	3.12±0.00	3.04±0.02	3.05±0.03	2.85±0.02	2.78±0.01

İçerisine *L. plantarum* A4 izolatu aşılana nar sularında, pH nın zamanla düşüş gösterdiği, sıcaklık farklılıklarının belirgin bir etkisinin olmadığı görülmüştür. 5°C sıcaklıkta bekleyen nar sularının son gün ölçümü 3.01±0.00, 25°C sıcaklıkta 3.07±0.02 ve 30°C %5 CO₂ içeren koşullarda ise 3.15±0.03 değerleri elde edilmiştir (Çizelge 3.24.)

Çizelge 3.24. *L. plantarum* A4 izolatu içeren nar suyu pH değerleri

<i>L. plantarum</i> A4	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün
Nar suyu+bakteri (5°C)	3.12±0.00	3.08±0.01	3.13±0.01	3.08±0.00	3.01±0.00
Nar suyu (5°C)	3.12±0.00	3.05±0.02	3.1±0.00	2.99±0.00	3.05±0.05
Nar suyu+bakteri (25°C)	3.12±0.00	3.09±0.01	3.10±0.01	3.08±0.02	3.07±0.02
Nar suyu (25°C)	3.12±0.00	3.05±0.05	3.25±0.15	2.86±0.02	2.95±0.05
Nar suyu+bakteri (30°C %5 CO ₂)	3.12±0.00	3.07±0.01	3.09±0.03	3.05±0.02	3.15±0.03
Nar suyu (30°C %5 CO ₂)	3.12±0.00	3.04±0.02	3.05±0.03	2.85±0.02	2.78±0.01

İçerisine *L. plantarum* MT4 izolatu aşılanan nar sularında, pH'nın zamanla düşüş gösterdiği, sıcaklık farklılıklarının belirgin bir etkisinin olmadığı görülmüştür. 5°C sıcaklıkta bekleyen nar sularının son gün ölçümü 3.01±0.00, 25°C sıcaklıkta 3.07±0.02 ve 30°C %5 CO₂ içeren koşullarda ise 3.12±0.02 değerleri elde edilmiştir (Çizelge 3.25.)

Çizelge 3.25. *L. plantarum* MT4 izolatı içeren nar suyu pH değerleri

<i>L. plantarum</i> MT4	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün
Nar suyu+bakteri (5°C)	3.12±0.00	3.08±0.01	3.14±0.03	3.08±0.20	3.01±0.00
Nar suyu (5°C)	3.12±0.00	3.05±0.02	3.1±0.00	2.99±0.00	3.05±0.05
Nar suyu+bakteri (25°C)	3.12±0.00	3.07±0.02	3.01±0.00	3.08±0.02	3.07±0.02
Nar suyu (25°C)	3.12±0.00	3.05±0.05	3.25±0.15	2.86±0.02	2.95±0.05
Nar suyu+bakteri (30°C %5 CO ₂)	3.12±0.00	3.06±0.03	3.05±0.02	3.05±0.02	3.12±0.02
Nar suyu (30°C %5 CO ₂)	3.12±0.00	3.04±0.02	3.05±0.03	2.85±0.02	2.78±0.01

İçerisine *E. faecium* DZ2 izolatı aşılanan nar sularında, pH'nın zamanla düşüş gösterdiği, sıcaklık farklılıklarının belirgin bir etkisinin olmadığı görülmüştür. 5°C sıcaklıkta bekleyen nar sularının son gün ölçümü 3.01±0.00, 25°C sıcaklıkta 3.04±0.00 ve 30°C %5 CO₂ içeren koşullarda ise 3.08±0.03 değerleri elde edilmiştir (Çizelge 3.26.)

Çizelge 3.26. *E. faecium* DZ2 izolatı içeren nar suyu pH değerleri

<i>E. faecium</i> DZ2	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün
Nar suyu+bakteri (5°C)	3.12±0.00	3.09±0.00	3.15±0.03	3.06±0.01	3.01±0.00
Nar suyu (5°C)	3.12±0.00	3.05±0.02	3.1±0.00	2.99±0.00	3.05±0.05
Nar suyu+bakteri (25°C)	3.12±0.00	2.95±0.02	3.13±0.01	3.03±0.03	3.04±0.00
Nar suyu (25°C)	3.12±0.00	3.05±0.05	3.25±0.15	2.86±0.02	2.95±0.05
Nar suyu+bakteri (30°C %5 CO ₂)	3.12±0.00	3.07±0.02	3.12±0.04	3.08±0.03	3.08±0.03
Nar suyu (30°C %5 CO ₂)	3.12±0.00	3.04±0.02	3.05±0.03	2.85±0.02	2.78±0.01

3.5.2. Titrasyon asitliği değerleri

Nar suyu örneklerine 5°C, 25°C aerobik ve 30°C %5 CO₂ içeren ortamlarda laktik asit ilavesi yapılarak 3 farklı gruba ayrılarak günlük olarak yapılan titrasyon asitliği değerleri verilmiştir

İçerisine *L. brevis* ES6 izolatı aşılanan nar sularında, son gün yapılan ölçümlerde farklı sıcaklıklara göre sırasıyla 4.55±0.04, 4.78±0.05 ve 4.78±0.05 g/L değerleri elde edilmiştir. Bulgulara göre sıcaklık ve zamanın bu izolat için belirgin bir farklılık yaratmadığı görülmüştür (Çizelge 3.27.)

Çizelge 3.27. *L. brevis* ES6 izolatı içeren nar suyu titrasyon asitliği sonuçları (g/L)

<i>L. brevis</i> ES6	0. gün	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
Nar suyu+bakteri (5 °C)	5.12±0.00	4.58±0.01	4.83±0.03	4.54±0.10	4.55±0.04
Nar suyu (5 °C)	5.12±0.00	4.60±0.06	4.94±0.08	4.71±0.01	4.59±0.08
Nar suyu+bakteri (25 °C)	5.12±0.00	4.44±0.22	4.30±0.23	4.28±0.15	4.78±0.05
Nar suyu (25 °C)	5,12±0.00	4.49±17	4.78±0.08	4.62±0.14	4.70±0.10
Nar suyu+bakteri (30 °C %5 CO ₂)	5.12±0.00	4.52±0.30	4.09±0.03	4.28±0.15	4.78±0.05
Nar suyu (30 °C %5 CO ₂)	5,12±0.00	4.44±0.22	4.58±0.14	4.09±0.03	4.63±0.09

İçerisine *L. plantarum* A6 izolatı aşılanan nar sularında son gün ölçümlerinde 5°C, 25°C aerobik ve 30°C %5 CO₂ içeren koşullarda sırası ile 4.19±0.06 4.35±0.09 4.54±0.28 g/L değerleri elde edilmiştir. İlk gün elde edilen değerlere göre düşüş olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.28.)

Çizelge 3.28. *L. plantarum* A6 izolatu içeren nar suyu titrasyon asitliği sonuçları (g/L)

<i>L. plantarum</i> A6	0. gün	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
Nar suyu+bakteri (5 °C)	5.12±0.00	4.75±0.11	4.70±0.06	4.57±0.19	4.19±0.06
Nar suyu (5 °C)	5.12±0.00	4.60±0.06	4.94±0.08	4.71±0.01	4.59±0.08
Nar suyu+bakteri (25 °C)	5.12±0.00	4.89±0.03	4.54±0.32	4.41±0.03	4.35±0.09
Nar suyu (25 °C)	5,12±0.00	4.49±0.17	4.78±0.08	4.62±0.14	4.70±0.10
Nar suyu+bakteri (30 °C %5 CO ₂)	5.12±0.00	4.84±0.01	4.22±0.16	4.12±0.00	4.54±0.28
Nar suyu (30 °C %5 CO ₂)	5,12±0.00	4.44±0.22	4.58±0.14	4.09±0.03	4.63±0.09

İçerisine *L. brevis* A6X izolatu aşılanan nar sularında, son gün yapılan ölçümlerde farklı sıcaklıklara göre sırasıyla 4.27±0.04, 4.28±0.06 ve 4.08±0.04 değerleri elde edilmiştir. 30 °C %5 CO₂ içeren koşullar altında inkübe edilen nar sularında diğer sıcaklık değerlerine göre daha fazla düşüş olduğu ve kontrol grubuyla farklılık gösterdiği gözlenmiştir (Çizelge 3.29.)

Çizelge 3.29. *L. brevis* A6X izolatu içeren nar suyu titrasyon asitliği sonuçları (g/L)

<i>L. brevis</i> A6X	0. gün	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
Nar suyu+bakteri (5 °C)	5.12±0.00	4.84±0.04	4.59±0.04	4.35±0.9	4.27±0.04
Nar suyu (5 °C)	5.12±0.00	4.60±0.06	4.94±0.08	4.71±0.01	4.59±0.08
Nar suyu+bakteri (25 °C)	5.12±0.00	4.75±0.11	4.35±0.09	4.24±0.01	4.28±0.06
Nar suyu (25 °C)	5,12±0.00	4.49±0.17	4.78±0.08	4.62±0.14	4.70±0.10
Nar suyu+bakteri (30 °C %5 CO ₂)	5.12±0.00	4.73±0.09	4.24±0.01	4.17±0.14	4.08±0.04
Nar suyu (30 °C %5 CO ₂)	5,12±0.00	4.44±0.22	4.58±0.14	4.09±0.03	4.63±0.09

İçerisine *L. plantarum* A4 izolatu aşılana nar sularında, son gün yapılan ölçümlerde farklı sıcaklıklara göre sırasıyla 3.08±0.06, 2.68±0.20 ve 2.96±0.01 değerleri elde edilmiştir. Nar sularının kontrol grubuyla büyük bir farklılık gösterdiği ve oldukça düşük değerler elde edildiği gözlenmiştir (Çizelge 3.30.)

Çizelge 3.30. *L. plantarum* A4 izolatu içeren nar suyu titrasyon asitliği sonuçları (g/L)

<i>L. plantarum</i> A4	0. gün	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
Nar suyu+bakteri (5 °C)	5.12±0.00	2.83±0.04	2.97±0.03	3.08±0.04	3.08±0.06
Nar suyu (5 °C)	5.12±0.00	4.60±0.06	4.94±0.08	4.71±0.01	4.59±0.08
Nar suyu+bakteri (25 °C)	5.12±0.00	2.60±0.06	2.84±0.03	3.04±0.11	2.68±0.20

Nar suyu (25 °C)	5,12±0.00	4.49±0.17	4.78±0.08	4.62±0.14	4.7±0.10
Nar suyu+bakteri (30 °C %5 CO ₂)	5.12±0.00	3.00±0.06	2.84±0.03	2.91±0.22	2.96±0.01
Nar suyu (30°C %5 CO ₂)	5,12±0.00	4.44±0.22	4.58±0.14	4.09±0.03	4.63±0.09

İçerisine *L. plantarum* MT4 izolatu aşılanan nar sularında, son gün yapılan ölçümlerde 5°C, 25°C aerobik ve 30°C %5 CO₂ içeren koşullarda sırası ile 2.88±0.19, 3.04±0.09 ve 2.94±0.06 değerleri elde edilmiştir. İzolatların nar sularının titrasyon asitliklerinde düşüşe neden olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.31.)

Çizelge 3.31. *L. plantarum* MT4 izolatu içeren nar suyu titrasyon asitliği sonuçları (g/L)

<i>L. plantarum</i> MT4	0. gün	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
Nar suyu+bakteri (5 °C)	5.12±0.00	3.00±0.06	3.12±0.04	2.96±0.00	2.88±0.19
Nar suyu (5 °C)	5.12±0.00	4.60±0.06	4.94±0.08	4.71±0.01	4.59±0.08
Nar suyu+bakteri (25 °C)	5.12±0.00	2.97±0.03	3.08±0.01	3.00±0.12	3.04±0.09
Nar suyu (25 °C)	5,12±0.00	4.49±0.17	4.78±0.08	4.62±0.14	4.7±0.10
Nar suyu+bakteri (30 °C %5 CO ₂)	5.12±0.00	2.99±0.04	3.00±0.06	2.92±0.08	2.94±0.06
Nar suyu (30°C %5 CO ₂)	5,12±0.00	4.44±0.22	4.58±0.14	4.09±0.03	4.63±0.09

İçerisine *E. faecium* DZ2 izolatu aşılanan nar sularında, son gün yapılan ölçümlerde 5°C, 25°C aerobik ve 30°C %5 CO₂ içeren koşullarda sırası ile 2.91±0.22, 3.04±0.06, 3.04±0.03 değerleri elde edilmiştir (Çizelge 3.32.)

Çizelge 3.32. *E. faecium* DZ2 izolatı içeren nar suyu titrasyon asitliği sonuçları (g/L)

<i>E. faecium</i> DZ2	0. gün	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
Nar suyu+bakteri (5 °C)	5.12±0.00	2.84±0.03	2.94±0.03	2.99±0.11	2.91±0.22
Nar suyu (5 °C)	5.12±0.00	4.60±0.06	4.94±0.08	4.71±0.01	4.59±0.08
Nar suyu+bakteri (25 °C)	5.12±0.00	2.89±0.04	2.94±0.06	2.78±0.09	3.04±0.06
Nar suyu (25 °C)	5,12±0.00	4.49±0.17	4.78±0.08	4.62±0.14	4.7±0.10
Nar suyu+bakteri (30 °C %5 CO ₂)	5.12±0.00	3.02±0.08	3.00±0.06	2.94±0.06	3.04±0.03
Nar suyu (30 °C %5 CO ₂)	5,12±0.00	4.44±0.22	4.58±0.14	4.09±0.03	4.63±0.09

3.5.3.Suda çözünür kuru madde miktarı

Nar sularından günlük olarak alınan örneklerin laktik asit izolatları ve kontrol gruplarıyla çalışılan suda çözünür kuru madde değerleri Çizelge 3.33., Çizelge 3.34., Çizelge 3.35., Çizelge 3.36., Çizelge 3.7. ve Çizelge 3.38. 'de verilmiştir. Genel olarak briks değerleri 14.00-18.6 arasında bulunmuştur. İçerisinde laktik asit bakterisi bulunan nar sularının briks değerlerinde zamanla birlikte düşüş olduğu ve en düşük değerlerin en son günde ölçüldüğü görülmüştür. ES6, A6 ve A6X izolatlarının en yüksek değerlere, DZ2 izolatının ise en düşük değerlere sahip olduğu bulunmuştur.

Çizelge 3.33. *L. brevis* ES6 izolatı içeren nar suyunun suda çözünür kuru madde sonuçları (Briks°)

<i>L. brevis</i> ES6	0. gün	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
Nar suyu+bakteri (5 °C)	18.4±0.00	17.8±0.02	17.6±0.02	17.6±0.0	17.2±0.04
Nar suyu (5 °C)	18.4±0.00	18.4±0.00	18.4±0.00	18.4±0.02	18.0±0.01
Nar suyu+bakteri (25 °C)	18.4±0.00	17.4±0.02	17.4±0.00	16.6±0.03	15.8±0.02
Nar suyu (25 °C)	18.4±0.00	18.6±0.01	18.4±0.00	18.4±0.02	18.2±0.02
Nar suyu+bakteri (30 °C %5 CO ₂)	18.4±0.00	17.6±0.02	17.4±0.04	17.2±0.01	15.4±0.02
Nar suyu (30 °C %5 CO ₂)	18.4±0.00	18.6±0.02	18.4±0.01	18.6±0.02	14.8±0.00

Çizelge 3.34. *L. plantarum* A6 izolatı içeren nar suyunun suda çözünür kuru madde sonuçları

<i>L. plantarum</i> A6	0. gün	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
Nar suyu+bakteri (5 °C)	18.4±0.00	18.4±0.00	18.4±0.02	18.4±0.01	18.0±0.03
Nar suyu (5 °C)	18.4±0.00	18.4±0.00	18.4±0.00	18.4±0.02	18.0±0.01
Nar suyu+bakteri (25 °C)	18.4±0.00	18.0±0.01	18.0±0.00	17.4±0.03	17.1±0.02
Nar suyu (25 °C)	18.4±0.00	18.6±0.01	18.4±0.00	18.4±0.02	18.2±0.02
Nar suyu+bakteri (30 °C %5 CO ₂)	18.4±0.00	18.6±0.02	18.4±0.02	18.6±0.01	18.4±0.00
Nar suyu (30 °C %5 CO ₂)	18.4±0.00	18.6±0.02	18.4±0.01	18.6±0.02	14.8±0.00

Çizelge 3.35. *L. brevis* A6X izolatı içeren nar suyunun suda çözünür kuru madde sonuçları (Briks°)

<i>L. brevis</i> A6X	0. gün	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
Nar suyu+bakteri (5 °C)	18.4±0.00	17.8 ±0.10	17.8±0.03	17.6±0.03	17.6±0.02
Nar suyu (5 °C)	18.4±0.00	18.4±0.00	18.4±0.00	18.4±0.02	18.0±0.01
Nar suyu+bakteri (25 °C)	18.4±0.00	17.4±0.03	17.6±0.20	16.6±0.01	16.0±0.03
Nar suyu (25 °C)	18.4±0.00	18.6±0.01	18.4±0.00	18.4±0.02	18.2±0.02
Nar suyu+bakteri (30 °C %5 CO ₂)	18.4±0.00	17.6±0.02	17.8±0.02	17.4±0.00	17.0±0.01
Nar suyu (30 °C %5 CO ₂)	18.4±0.00	18.6±0.02	18.4±0.01	18.6±0.02	14.8±0.00

Çizelge 3.36. *L. plantarum* A4 izolatı içeren nar suyunun suda çözünür kuru madde sonuçları (Briks°)

<i>L. plantarum</i> A4	0. gün	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
Nar suyu+bakteri (5 °C)	18.4±0.00	14.8 ±0.01	15.8±0.02	16.2±0.00	16.2±0.01
Nar suyu (5 °C)	18.4±0.00	18.4±0.00	18.4±0.00	18.4±0.02	18.0±0.01
Nar suyu+bakteri (25 °C)	18.4±0.00	15 ±0.00	15±0.05	14.6±0.02	14.8±0.03
Nar suyu (25 °C)	18.4±0.00	18.6±0.01	18.4±0.00	18.4±0.02	18.2±0.02

Nar suyu+bakteri (30 °C %5 CO ₂)	18.4±0.00	15.8±0.02	15.6±0.02	14.8±0.01	14.2±0.02
Nar suyu (30 °C %5 CO ₂)	18.4±0.00	18.6±0.02	18.4±0.01	18.6±0.02	14.8±0.00

Çizelge 3.37. *L. plantarum* MT4 izolatu içeren nar suyunun suda çözünür kuru madde sonuçları (Briks°)

<i>L. plantarum</i> MT4	0. gün	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
Nar suyu+bakteri (5 °C)	18.4±0.00	14.8 ±0.01	14.8±0.02	14.9±0.00	15.2±0.01
Nar suyu (5 °C)	18.4±0.00	18.4±0.00	18.4±0.00	18.4±0.02	18.0±0.01
Nar suyu+bakteri (25 °C)	18.4±0.00	15.3±0.00	14.9±0.05	14.8±0.02	14.7±0.03
Nar suyu (25 °C)	18.4±0.00	18.6±0.01	18.4±0.00	18.4±0.02	18.2±0.02
Nar suyu+bakteri (30 °C %5 CO ₂)	18.4±0.00	14.6±0.02	15.1±0.02	14.7±0.01	14.1±0.02
Nar suyu (30 °C %5 CO ₂)	18.4±0.00	18.6±0.02	18.4±0.01	18.6±0.02	14.8±0.00

Çizelge 3.38. *E. faecium* DZ2 izolatı içeren nar suyunun suda çözünür kuru madde sonuçları (Briks°)

<i>E. faecium</i> DZ2	0. gün	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
Nar suyu+bakteri (5 °C)	18.4±0.00	15.5 ±0.00	14.3±0.02	14.4±0.00	14.0±0.01
Nar suyu (5 °C)	18.4±0.00	18.4±0.00	18.4±0.00	18.4±0.02	18.0±0.01
Nar suyu+bakteri (25 °C)	18.4±0.00	15.3±0.00	14.5±0.00	15.3±0.02	14.7±0.01
Nar suyu (25 °C)	18.4±0.00	18.6±0.01	18.4±0.00	18.4±0.02	18.2±0.02
Nar suyu+bakteri (30 °C %5 CO ₂)	18.4±0.00	15.3±0.02	14.7±0.01	15.7±0.02	14.6±0.00
Nar suyu (30 °C %5 CO ₂)	18.4±0.00	18.6±0.02	18.4±0.01	18.6±0.02	14.8±0.00

3.5.4. Toplam kuru madde analiz sonucu

Nar meyvesinin prenslenmesiyle elde edilen ve herhangi bir fermentatif işlem basamağına tabi tutulmayan nar sularının toplam kuru madde miktarı 17,9 g/100 ml, (% 17,9) olarak hesaplanmıştır.

3.5.5. Renk ölçüm sonuçları

Nar sularından alınan örneklerin 5 gün süresince renklerinde meydana gelen değişimlerin ölçümleri verilmiştir. İçerisinde laktik asit bakterisi bulunan ve bulunmayan tüm nar suyu örneklerinin zamanla renklerinde bozulma meydana gelmiştir. Fakat laktik asit bakterisi ilaveli olan nar sularında, normal nar sularına oranla daha az renk bozulması olduğu gözlenmiştir.

İçerisinde *L. brevis* ES6 izolatı bulunan nar sularında farklı sıcaklıklarda benzer değerler elde edilmiştir. 5 °C aerobik ortamda inkübe edilen nar sularınının

son gün ölçülen absorbans değerleri 1.34 ± 0.10 iken *L. brevis* ES6 izolatu bulunan nar sularında bu değer 3.13 ± 0.01 olarak ölçülmüştür. $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ aerobik ortamda bulunan normal nar sularında 1.11 ± 0.02 iken içerisinde izolat bulunan nar sularında bu değer 3.12 ± 0.0 olarak gözlenmiştir. $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ %5 CO_2 içeren koşullarda inkübe edilen nar sularında son gün değerleri 1.06 ± 0.06 iken bakteri varlığında bu değer 3.08 ± 0.02 olarak elde edilmiştir (Çizelge 3.39.)

Çizelge 3.39. *L. brevis* ES6 izolatu içeren nar suyunun renk analiz sonuçları (420 nm)

<i>L. brevis</i> ES6	0. gün	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
Nar suyu+bakteri ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$)	3.12 ± 0.00	3.16 ± 0.02	3.12 ± 0.01	3.12 ± 0.02	3.13 ± 0.01
Narsuyu ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$)	3.16 ± 0.00	2.75 ± 0.02	1.73 ± 0.01	1.49 ± 0.12	1.34 ± 0.10
Nar suyu+bakteri ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$)	3.11 ± 0.00	3.11 ± 0.01	3.13 ± 0.00	3.12 ± 0.00	3.12 ± 0.01
Narsuyu ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$)	3.16 ± 0.00	2.60 ± 0.06	1.17 ± 0.01	1.12 ± 0.01	1.11 ± 0.02
Nar suyu+bakteri ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$ %5 CO_2)	3.16 ± 0.02	3.06 ± 0.05	3.10 ± 0.01	3.09 ± 0.00	3.08 ± 0.02
Narsuyu ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$ %5 CO_2)	3.16 ± 0.00	2.67 ± 0.10	1.70 ± 0.03	1.44 ± 0.04	1.06 ± 0.06

İçerisinde *L. plantarum* A6 izolatu bulunan nar sularında zamanla birlikte dikkate değer bir bozulma yaşanmamışken kontrol gruplarında düşüşler olduğu gözlenmiştir. $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta bekletilen nar sularının son gün değerleri 1.34 ± 0.10 , $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 1.11 ± 0.02 ve $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ %5 CO_2 içeren koşullarda ise 1.06 ± 0.06 olarak ölçülmüştür. Bakteri ilavesinden sonra elde edilen bu değerlerin sırasıyla 3.10 ± 0.03 , 3.07 ± 0.06 ve 3.11 ± 0.01 olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.40.)

Çizelge 3.40. *L. plantarum* A6 izolatu içeren nar suyunun renk analiz sonuçları (420 nm)

<i>L. plantarum</i> A6	0. gün	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
Nar suyu+bakteri (5 °C)	3.12±0.02	3.09±0.02	3.11±0.03	3.11±0.02	3.10±0.03
Narsuyu (5 °C)	3.16±0.00	2.75±0.02	1.73±0.01	1.49±0.12	1.34±0.10
Nar suyu+bakteri (25 °C)	3.11±0.02	3.12±0.04	3.09±0.02	3.09±0.01	3.07±0.06
Narsuyu (25 °C)	3.16±0.00	2.60±0.06	1.17±0.01	1.12±0.01	1.11 ±0.02
Nar suyu+bakteri (30 °C %5 CO ₂)	3.16±0.00	3.08±0.01	3.09±0.08	3.09±0.01	3.11±0.01
Narsuyu (30 °C %5 CO ₂)	3.16±0.00	2.67±0.10	1.70±0.03	1.44±0.04	1.06±0.06

İçerisine *L. brevis* A6X izolatu aşıl原因 nar sularında da benzer değerler elde edilmiştir. 5 °C sıcaklıkta bekletilen bakteri ilaveli nar sularının son gün değerleri 3.11±0.04, 25 °C sıcaklıkta 3.10±0.00 ve 30 °C %5 CO₂ içeren koşullarda ise 3.11±0.02 olarak ölçülmüştür (Çizelge 3.41.)

Çizelge 3.41. *L. brevis* A6X izolatu içeren nar suyunun renk analiz sonuçları (420 nm)

<i>L. brevis</i> A6X	0. gün	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
Nar suyu+bakteri (5 °C)	3.12±0.02	3.13±0.01	3.11±0.02	3.08±0.07	3.11±0.04
Narsuyu (5 °C)	3.16±0.00	2.75±0.02	1.73±0.01	1.49±0.12	1.34±0.10
Nar suyu+bakteri (25 °C)	3.11±0.02	3.13±0.00	3.12±0.00	3.10±0.00	3.10±0.00

Narsuyu (25 °C)	3.16±0.00	2.60±0.06	1.17±0.01	1.12±0.01	1.11 ±0.02
Nar suyu+bakteri (30 °C %5 CO ₂)	3.16±0.00	3.16±0.03	3.10±0.02	3.14±0.02	3.11±0.02
Narsuyu (30 °C %5 CO ₂)	3.16±0.00	2.67±0.10	1.70±0.03	1.44±0.04	1.06±0.06

İçerisine *L. plantarum* A4 izolatu aşılanan nar sularında ES6, A6, A6X izolatu bulunan nar sularına kıyasla daha fazla bozulma yaşandığı görülse de bakteri ilavesiz nar sularından daha yüksek değerler elde edilmiştir. 5°C sıcaklıkta bulunan bakteri ilaveli nar sularının son gün değerleri 2.16±0.08 iken kontrol grubunda 1.34±0.10, 25°C sıcaklıkta 2.10±0.00 iken kontrol grubunda 1.11 ±0.02 ve 30°C %5 CO₂ içeren koşullarda 1.96±0.02 iken kontrol grubunda 1.06±0.06 olarak ölçülmüştür (Çizelge 3.42.)

Çizelge 3.42. *L. plantarum* A4 izolatu içeren nar suyunun renk analiz sonuçları (420 nm)

<i>L. plantarum</i> A4	0. gün	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
Nar suyu+bakteri (5 °C)	3.12±0.02	2.43±0.02	2.15±0.04	2.36±0.08	2.16±0.08
Narsuyu (5 °C)	3.16±0.00	2.75±0.02	1.73±0.01	1.49±0.12	1.34±0.10
Nar suyu+bakteri (25 °C)	3.11±0.07	2.54±0.02	2.54±0.02	2.43±0.02	2.10±0.00
Narsuyu (25 °C)	3.16±0.00	2.60±0.06	1.17±0.01	1.12±0.01	1.11 ±0.02
Nar suyu+bakteri (30 °C %5 CO ₂)	3.16±0.00	2.59±0.02	2.28±0.01	1.88±0.02	1.96±0.02
Narsuyu (30 °C %5 CO ₂)	3.16±0.00	2.67±0.10	1.70±0.03	1.44±0.04	1.06±0.06

İçerisine *L. plantarum* MT4 izolatu aşılanan nar sularının kontrol gruplarıyla birlikte ölçülen renk analiz sonuçları Çizelge 3.43.'te verilmiştir. Tüm nar suyu gruplarında genel olarak zamanla renk bozulması olduğu gözlenmiştir. 5°C sıcaklıkta bulunan bakteri ilaveli nar sularının son gün değerleri 2.19±0.06 iken kontrol grubunda 1.34±0.10, 25°C sıcaklıkta 2.17±0.01 iken kontrol grubunda 1.11 ±0.02 ve 30°C %5 CO₂ içeren koşullarda 1.95±0.02 iken kontrol grubunda 1.06±0.06 olarak ölçülmüştür.

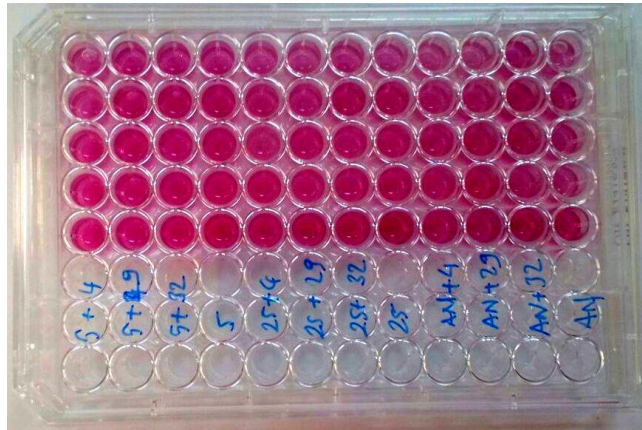
Çizelge 3.43. *L.plantarum* MT4 izolatu içeren nar suyunun renk analiz sonuçları (420 nm)

<i>L. plantarum</i> MT4	0. gün	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
Narsuyu+bakteri (5 °C)	3.12±0.02	2.59±0.02	2.29±0.02	2.22±0.02	2.19±0.06
Narsuyu (5 °C)	3.16±0.00	2.75±0.02	1.73±0.01	1.49±0.12	1.34±0.10
Narsuyu+bakteri (25 °C)	3.11±0.02	2.66±0.02	2.46±0.01	2.38±0.04	2.17±0.01
Narsuyu (25 °C)	3.16±0.00	2.60±0.06	1.17±0.01	1.12±0.01	1.11 ±0.02
Narsuyu+bakteri (30 °C %5 CO ₂)	3.16±0.02	2.69±0.02	2.22±0.03	1.93±0.02	1.95±0.02
Narsuyu (30°C %5 CO ₂)	3.16±0.00	2.67±0.10	1.70±0.03	1.44±0.04	1.06±0.06

İçerisine *E. faecium* DZ2 izolatu aşılanan nar sularının 5°C sıcaklıkta son gün değerleri 2.19±0.06, 25°C sıcaklıkta 2.17±0.01 ve 30°C %5 CO₂ içeren koşullarda 1.95±0.02 olarak ölçülmüştür. Bakteri ilaveli nar sularının kontrol gruplarından daha iyi renkte olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.44.)

Çizelge 3.44. *E. faecium* DZ2 izolatı içeren nar suyunun renk analiz sonuçları (420 nm)

<i>E. faecium</i> DZ2	0. gün	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
Nar suyu+bakteri (5 °C)	3.12±0.02	2.54±0.02	2.37±0.02	2.22±0.01	2.16±0.03
Narsuyu (5 °C)	3.16±0.00	2.75±0.02	1.73±0.01	1.49±0.12	1.34±0.10
Nar suyu+bakteri (25 °C)	3.11±0.02	2.65±0.01	2.61±0.09	2.33±0.07	2.10±0.00
Narsuyu (25 °C)	3.16±0.00	2.60±0.06	1.17±0.01	1.12±0.01	1.11 ±0.02
Nar suyu+bakteri (30 °C %5 CO ₂)	3.16±0.02	2.70±0.08	2.16±0.02	1.95±0.03	2.05±0.02
Narsuyu (30 °C %5 CO ₂)	3.16±0.00	2.67±0.10	1.70±0.03	1.44±0.04	1.06±0.06



Şekil 3.6. Nar suyu örneklerinin renk ölçümlerinin yapılması (420 nm)

3.5.6. Antosiyanin miktarları

Nar sularının toplam antosiyanin tayini için yapılan analizler ilk ürün ve çalışma sonunda son ürüne uygulanmıştır ve Çizelge 3.45. 'de verilmiştir. Elde edilen değerler birbirine yakın bulunmuştur.

Çizelge 3.45. Nar suyu örneklerinin toplam antosiyanin miktar tayini sonuçları (mg/L)

	Nar suyu +ES6	Nar suyu +A6	Nar suyu +A6X	Nar suyu +A4	Nar suyu +MT4	Nar suyu +DZ2	Kontrol
0. gün	200,91	201,12	209,74	206,88	202,29	202,556	206,34
5. Gün	220,11	216,82	211,63	217,79	213,46	220,00	218,82

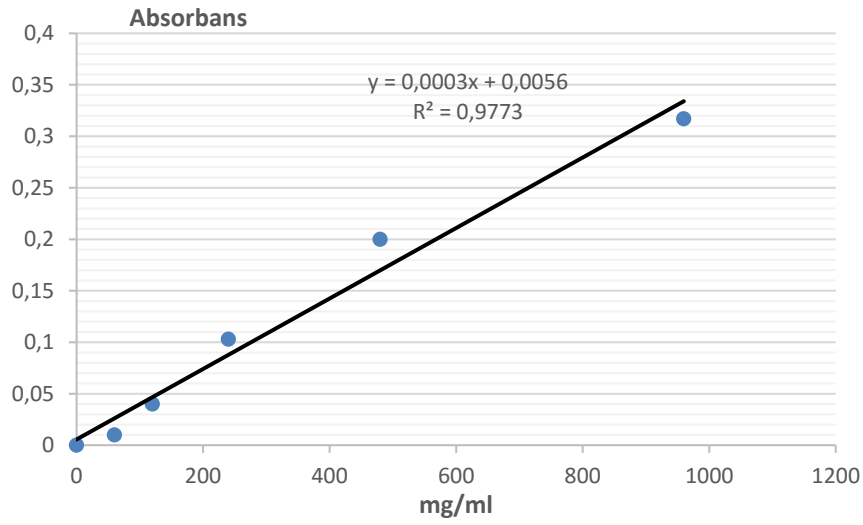


Şekil 3.7. Nar suyu örneklerinin potasyum klorür (pH 1.0) ve sodyum asetat (pH 4.5) çözeltileri ile hazırlanışı

3.5.7. Toplam fenolik madde miktarları

Nar sularından günlük olarak alınan örneklere uygulanan toplam fenolik madde tayini sonuçları Çizelge 3.46., Çizelge 3.47., Çizelge 3.48., Çizelge 3.49., Çizelge 3.50. ve Çizelge 3.51.'de ve tannik asit kullanılarak oluşturulan standart eğri Şekil 3.9.'da verilmiştir.

Narın içerisinde yüksek oranda bulunan fenoller, özellikle tanen miktarı meyvenin rahatsız edici boyutta buruk bir tada sahip olmasına neden olmaktadır. Bu maddenin miktarının meyve sularında azaltılması ve lezzetinde iyileştirme yapılması tüketimini daha da kolaylaştıracaktır. Yapılan çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde normal nar suları ve içlerinde probiyotik laktik asit bakterileri bulunan nar sularındaki fenol madde miktarının zamanla düştüğü görülmektedir. Bu sonuçta bize lezzetli ve probiyotik bir meyve suyu eldesi sunmaktadır.



Şekil 3.8. Toplam fenolik madde tayini için standart eğri

Çizelge 3.46. *L. brevis* ES6 izolatu içeren nar suyunun toplam fenolik madde miktarı (%)

<i>L. brevis</i> ES6	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün
Nar suyu+bakteri (5 °C)	0.673	0.354	0.129	0.101	0.062
Narsuyu (5 °C)	0.982	0.897	0.598	0.212	0.112
Nar suyu+bakteri (25 °C)	0.532	0.265	0.110	0.051	0.012
Narsuyu (25 °C)	0.831	0.843	0.338	0.237	0.109

Nar suyu+bakteri (30 °C %5 CO ₂)	0.664	0.340	0.127	0.226	0.025
Narsuyu (30 °C %5 CO ₂)	0.823	0.634	0.432	0.299	0.187

Çizelge 3.47. *L. plantarum* A6 izolatu içeren nar suyunun toplam fenolik madde miktarı (%)

<i>L. plantarum</i> A6	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün
Nar suyu+bakteri (5 °C)	0.930	0.542	0.321	0.305	0.196
Narsuyu (5 °C)	0.982	0.897	0.598	0.212	0.112
Nar suyu+bakteri (25 °C)	0.642	0.654	0.212	0.307	0.288
Narsuyu (25 °C)	0.831	0.843	0.338	0.237	0.109
Nar suyu+bakteri (30 °C %5 CO ₂)	0.650	0.324	0.358	0.276	0.120
Narsuyu (30 °C %5 CO ₂)	0.823	0.634	0.432	0.299	0.187

Çizelge 3.48. *L. brevis* A6X izolatu içeren nar suyunun toplam fenolik madde miktarı (%)

<i>L. brevis</i> A6X	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün
Nar suyu+bakteri (5 °C)	0.665	0.543	0.321	0.400	0.293
Narsuyu (5 °C)	0.982	0.897	0.598	0.212	0.112
Nar suyu+bakteri (25 °C)	0.772	0.431	0.38	0.349	0.169
Narsuyu (25 °C)	0.831	0.843	0.338	0.237	0.109
Nar suyu+bakteri (30 °C %5 CO ₂)	0.650	0.523	0.247	0.186	0.117
Narsuyu (30 °C %5 CO ₂)	0.823	0.634	0.432	0.299	0.187

Çizelge 3.49. *L. plantarum* A4 izolatu içeren nar suyunun toplam fenolik madde miktarı (%)

<i>L. plantarum</i> A4	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün
Nar suyu+bakteri (5 °C)	0.521	0.412	0.386	0.282	0.160
Narsuyu (5 °C)	0.982	0.897	0.598	0.212	0.112
Nar suyu+bakteri (25 °C)	0.845	0.632	0.642	0.428	0.387
Narsuyu (25 °C)	0.831	0.843	0.338	0.237	0.109
Nar suyu+bakteri (30 °C %5 CO ₂)	0.572	0.47126	0.372	0.224	0.226
Narsuyu (30 °C %5 CO ₂)	0.823	0.634	0.432	0.299	0.187

Çizelge 3.50. *L. plantarum* MT4 izolatı içeren nar suyunun toplam fenolik madde miktarı (%)

<i>L. plantarum</i> MT4	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün
Narsuyu+bakteri (5 °C)	0.623	0.435	0.447	0.387	0.225
Narsuyu (5 °C)	0.982	0.897	0.598	0.212	0.112
Narsuyu+bakteri (25 °C)	0.623	0.5323	0.427	0.553	0.254
Nar suyu+bakteri (25 °C)	0.772	0.431	0.38	0.349	0.169
Narsuyu+bakteri (30 °C %5 CO ₂)	0.543	0.4224	0.367	0.245	0.154
Narsuyu (30 °C %5 CO ₂)	0.823	0.634	0.432	0.299	0.187

Çizelge 3.51. *E. faecium* DZ2 izolatı içeren nar suyunun toplam fenolik madde miktarı (%)

<i>E. faecium</i> DZ2	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün
Nar suyu+bakteri (5 °C)	0.909	0.634	0.538	0.447	0.398
Narsuyu (5 °C)	0.982	0.897	0.598	0.212	0.112
Nar suyu+bakteri (25 °C)	0.558	0.511	0.443	0.453	0.323

Narsuyu (25 °C)	0.831	0.843	0.338	0.237	0.109
Nar suyu+bakteri (30 °C %5 CO ₂)	0.874	0.649	0.322	0.242	0.122
Narsuyu (30°C %5 CO ₂)	0.823	0.634	0.432	0.299	0.187

3.5.8. Antioksidan aktivite test sonuçları

3.5.8.1. ABTS.+(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonicacid) radikal katyonu yakalama aktivitesi

Nar suyu örneklerinin ABTS yöntemi ile belirlenen antioksidan aktivite sonuçları Çizelge 3.52. 'de verilmiştir. Örneklere 0. gün ve çalışmanın son günü uygulanan bu tayinin sonuçlarına göre tüm izolatlarda sıcaklık artmasıyla düşüş gözlenmiştir.

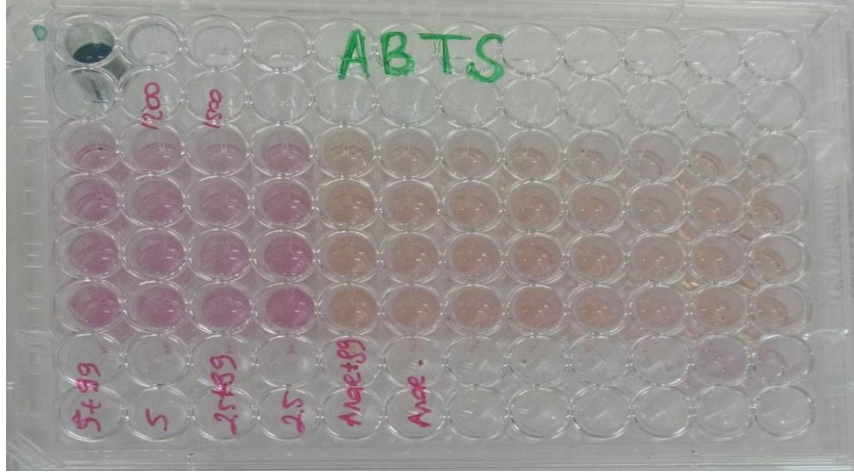
Çizelge 3.52. Nar sularının ABTS sonuçları (%)

	Nar suyu +ES6	Nar suyu +A6	Nar suyu +A6X	Nar suyu +A4	Nar suyu +MT4	Nar suyu +DZ2	Kontrol
0. gün	98.47	98.89	99.37	98.94	99.40	98.97	99.13
5. gün	* 98.85	99.22	99.17	99.52	99.60	99.68	99.82
	** 96.73	98.82	97.59	96.61	98.85	97.36	99.01
	***94.44	94.79	94.68	95.30	96.12	94.75	96.13

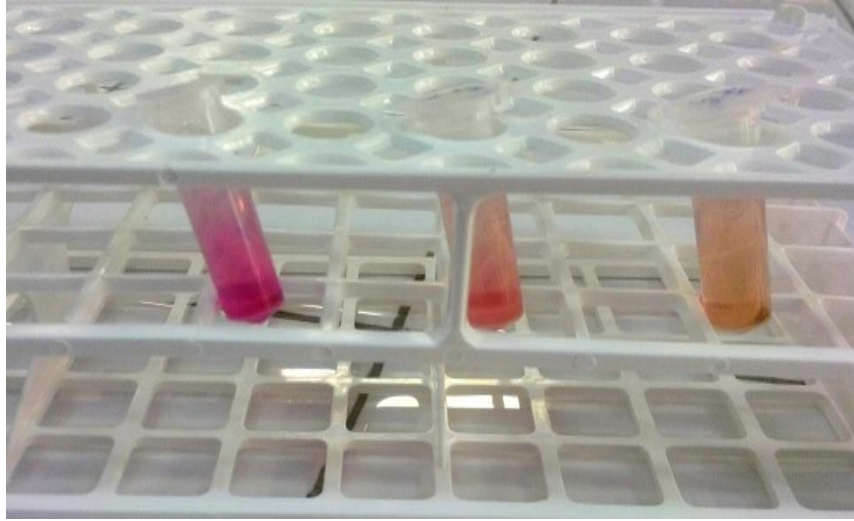
* 5 °C sıcaklıkta inkübe edilen nar sularının 5. günde ölçülen ABTS sonuçları

** 25 °C sıcaklıkta inkübe edilen nar sularının 5. günde ölçülen ABTS sonuçları

*** 30 °C sıcaklıkta inkübe edilen nar sularının 5. günde ölçülen ABTS sonuçları



Şekil 3.9. Farklı sıcaklıklardaki nar suyu örneklerinin ABTS yöntemi ile antioksidan aktivite tayini



Şekil 3.10. Farklı sıcaklıklardaki nar suyu örneklerinin ABTS yöntemi ile antioksidan aktivite tayini

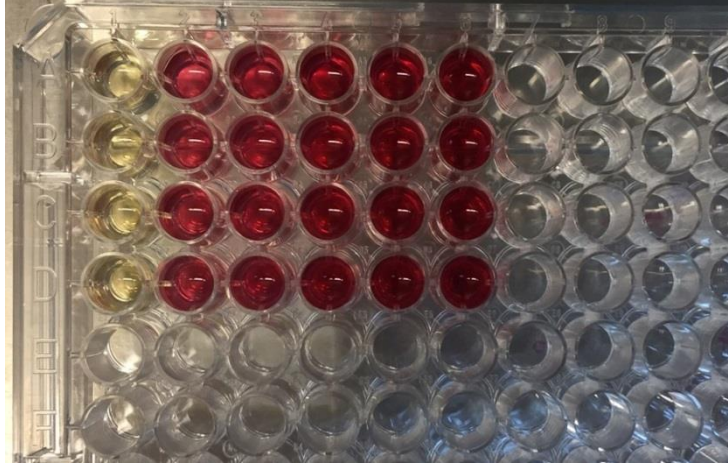
3.5.8.2. DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) radikal katyonu yakalama aktivitesi

Nar suyu örneklerinin DPPH yöntemi ile belirlenen antioksidan aktivite sonuçları Çizelge 3.53.'te verilmiştir. 5. günü sonunda hesaplanan değerlerde düşüş olduğu görülmüş, antioksidan aktivite miktarı nar suyu konsantrasyonunun artmasıyla yükseliş göstermiştir.

Çizelge 3.53. Nar sularının farklı konsantrasyonlardaki DPPH sonuçları %

0. gün (mg/ml)	Nar suyu +ES6	Nar suyu +A6	Nar suyu +A6X	Nar suyu +A4	Nar suyu +MT4	Nar suyu +DZ2	Kontrol
1	49.79	52.66	51.38	52.56	54.11	49.92	55.63
2	71.32	77.71	75.44	75.27	77.10	72.91	75.13
3	79.89	83.40	82.13	82.74	83.82	80.19	82.27
4	92.15	90.25	93.22	90.18	93.51	93.64	95.35
5	98.22	98.49	99.13	97.58	99.43	99.67	99.88

5. gün (mg/ml)	Nar suyu +ES6	Nar suyu +A6	Narsuyu +A6X	Nar suyu +A4	Nar suyu +MT4	Nar suyu +DZ2	Kontrol
1	40.42	41.18	41.29	41.70	45.56	39.91	45.83
2	67.15	70.71	70.44	71.27	74.10	69.91	74.13
3	76.22	79.10	79.19	79.64	80.27	77.43	79.22
4	85.15	85.25	88.22	86.18	87.51	85.64	86.33
5	93.68	92.54	92.73	92.30	94.78	90.09	94.99



Şekil 3.11. Nar suyu örneklerinin DPPH yöntemi ile antioksidan aktivite tayini
(1, 2, 3, 4, 5 mg/ml)

3.5.9. Nar sularında bakteri sayım sonuçları

Nar suları örneklerinden günlük olarak yapılan bakteri sayım sonuçları Çizelge 3.55.'te verilmiştir. 48. saatten sonra bakteri gelişimi gözlenmemektedir.

Çizelge 3.54. 30°C %5 CO₂ içeren koşullarda inkübe edilen nar sularının bakteri sayım sonuçları (kob/ml)

Süre	Nar suyu +ES6	Nar suyu +A6	Nar suyu +A6X	Nar suyu +A4	Nar suyu +MT4	Nar suyu +DZ2
1. gün	22x10 ²	24 x10 ²	29x10 ²	20x10 ²	16x10 ²	25x10 ²
2. gün	15x10	28x10	23x10	29x10	20x10	12x10
3. gün	-	-	-	-	-	-
4. gün	-	-	-	-	-	-
5. gün	-	-	-	-	-	-

3.5.10. Duyusal analiz sonuçları

Nar suyunun duyusal analiz sonuçları Çizelge 3.56.'da, laktik asit bakterileri içeren nar sularının duyusal analiz sonuçları ise Çizelge 3.57' de verilmiştir. *L.plantarum* (A4) izolatu ile 25 °C'de inkübe edilen nar suyu örneği çalışmada kullanılan normal nar suyundan daha az buruk ve daha tatlı bulunmuştur. Burukluk değeri 5 üzerinden 1.0, ekşilik değeri 1.0 ve acılık değeri ise 0.6 olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.55. Nar suyunun duyusal analiz sonuçları

	Burukluk	Ekşilik	Acılık
(5 °C)	2.6	2.0	0.0
(25 °C)	4.0	2.6	2.6
(30 °C)	3.3	3.0	3.0

Çizelge 3.56. Laktik asit bakterileri içeren nar sularının duyusal analiz sonuçları

Burukluk	Nar suyu +ES6	Nar suyu +A6	Nar suyu +A6X	Nar suyu +A4	Nar suyu +MT4	Nar suyu +DZ2
(5 °C)	2.3	1.6	2.6	2.6	4.6	3.3
(25 °C)	3.0	3.0	2.0	1.0	2.3	3.0
(30 °C)	2.0	2.0	2.6	3.0	4.3	2.3
Ekşilik						
(5 °C)	3.0	3.0	1.3	3.3	3	1.3
(25 °C)	1.0	1.6	3.3	1.0	3.0	3.0
(30 °C)	2.6	3.0	2.6	2.6	3.3	1.3
Acılık						
(5 °C)	2.3	2.0	1.3	3.0	1.0	2.0
(25 °C)	2.6	1.3	0.6	0.6	0.6	1.0
(30 °C)	2.6	1.3	2.3	2.0	1.3	2.0

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Probiyotikler; gıda, ilaç ve katkı maddeleri dahil birçok ürün içerisinde bulunan, yaşayan mikroorganizmalardır (Song ve ark., 2012). Laktobasiller, Bifidobakteriler ve Enterokoklar insanların sindirim sisteminde doğal olarak bulunan bakterilerdir (Gibson, 2002; Guslandi, 2003). Firmucates filumuna ait özellikle *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Enterococcus* gibi cinsleri içeren laktik asit bakterileri, fermente gıdaların üretiminde kullanılmalarından dolayı günümüzde önemli bir yere sahiptir (Madigan ve Matrinko, 2006).

Çalışmamızda çeşitli fermente gıdalardan izole edilen ve tannaz aktivitesinin yüksek olduğu tespit edilmiş laktik asit bakterilerinin öncelikli olarak probiyotik özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır. Daha sonra bu laktik asit bakterileri, nar suyu içerisine aşılansak tanen miktarı düşürülmeye çalışılarak, daha hoş bir lezzete sahip, probiyotik meyve suyu eldesi sağlanmaya çalışılmıştır.

Çalışmada kullanılan tannaz aktivitesi yüksek olan laktik asit bakterileri *L. brevis* ES6, *L. plantarum* A6, *L. brevis* A6X, *L. plantarum* A4, *L. plantarum* MT4, *E. faecium* DZ2. Sucuk, acur turşusu ve mısır turşusundan izole edilen 5 izolatın basil, yeşil zeytinden izole edilen 1 izolatın ise kok şeklinde olduğu görülmüştür.

Probiyotik özelliklerinin belirlenmesi için öncelikle izolatların antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiş ve bunun için agar difüzyon yöntemi kullanılmıştır. *L. plantarum* MT4 ve *E. faecium* DZ2 izolatlarına ait hücresiz filtratlar *K. pneumoniae* ve *E. coli*, *L. plantarum* MT4 izolatına ait hücresiz filtrat ise *M. luteus* üzerine etkili olurken; *L. brevis* ES6, *L. brevis* A6X, *L. plantarum* A4, *L. plantarum* MT4, *E. faecium* DZ2 izolatlarına ait hücresiz filtratlar *P. aeruginosa* üzerine etkili olmuştur. *L. plantarum* A6 ve *L. brevis* A6X izolatına ait hücresiz filtratlar *L. monocytogenes*, *E. faecium* DZ2 izolatına ait hücresiz filtrat *A. hydrophila* ve *E. fecalis* üzerine etkili olurken; *L. brevis* A6X, *E. faecium* DZ2 izolatına ait hücresiz filtratlar *S. typhimurium* üzerine etkili olmuştur. İzolatların hiçbiri *B. subtilis*, *S. aureus* ve *Y. enterocolitica* patojen organizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. Test edilen laktik asit bakterilerine ait hücresiz filtratlar (pH 5.6) bir veya daha fazla Gram (+) veya Gram (-) bakteriye karşı inhibitor aktivite göstermiştir. Ogunbanwo ve ark. (2003) izole edilen *L. plantarum* F 1'e ait hücresiz

filtratın geniş spektrumlu bir inhibisyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda ES6, A6 ve A4 dar spektrumlu, DZ2 ise geniş spektrumlu aktivite göstermiştir. Agar difüzyon yönteminin agar içerisinde difüze olamayan bakteriyosinler, çökelti oluşma ihtimali ve kullanılan konsantrasyon nedeniyle hassas bir yöntemdir. Aynı zamanda hücresiz filtratların pH değerleri 5,6'ya göre ayarlandığı için asitlik nedeniyle oluşabilecek etkide engellenmiştir. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkisinin laktik asit, hidrojen peroksit, asetik asit, bakteriyosin ya da bakteriyosin benzeri maddelerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Gilliand, 1990).

Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktivitelerinin hidrojen peroksit üretimleriyle ilgisinin olup olmadığının tespiti için katalaz ilave edilerek yapılan çalışmada *L. plantarum* MT4, *E. faecium* DZ2, *L. brevis* A6X izolatlarının belirli test mikroorganizmalarına karşı var olan etkisinin kaybolduğu görülmüştür. İzolatların etkilerinin bakteriyosin ve benzeri maddelerin üretiminden değil, hidrojen peroksitten kaynaklandığı düşünülmektedir. Todorov ve Dicks (2006) yaptıkları bir çalışmada elde ettikleri filtratların antimikrobiyal aktivite sonuçlarının, katalaz ilavesinden sonra hidrojen peroksit kaynaklı olmadığını bildirmişleridir. Gonzalez ve ark. (2007) peynirden izole ettikleri laktik asit bakterileriyle yaptıkları çalışmalarında antimikrobiyal aktivite araştırdıktan sonra bu etkinin hidrojen peroksit kökenli olup olmadığını tespit etmek için katalaz ilave ettiklerini bildirmişlerdir.

Çalışmada antimikrobiyal aktivite gösteren izolatlara ait hücresiz filtrattaki etkili madde üzerine proteinaz K, tripsin ve lizozim enzimlerinin etkisi araştırılmıştır *L. brevis* A6X hücresiz filtratının *L. monocytogenes* üzerine etkisinin, *L. plantarum* MT4 *L. brevis* ES6 ve *L. plantarum* A4 hücresiz filtratlarının *P.aeruginosa*'ya antimikrobiyal etkisi proteinaz K ilavesinden sonra ortadan kalkmıştır. Proteolitik enzimler ile muamelesi sonucunda aktivite kaybı göstermeleri etken maddenin protein yapısında olduğunu göstermektedir (Dinçer, 2007).

Bakteriyosinlerin pankreas orijinli tripsin ve α -kimotripsin gibi metabolik proteolitik enzimlerden etkilenebildiği bilinmektedir. *L. plantarum* A6 hariç tüm

izolatlarda lizozim ve tripsin ilavesinden sonra *P. aeruginosa* 'ya antimikrobiyal aktivitesi görülmektedir.

Tannaz aktivitesi yükek olan izolatların pH dirençlilikleri test edilmiştir. Laktik asit bakterilerinin çoğunun optimum 4-4,5 pH 'da geliştiği bilinmektedir. Ancak 3,2 gibi düşük ve 9,6 gibi yüksek pH aralıklarında da gelişebildikleri bildirilmiştir (Holt ve ark., 2000). pH , midede 1 kadar düşük değerde olabilir fakat in vitro çalışmalarda çoğunlukla tercih edilen pH 3'tür. pH 2 ve altı değerlerde strainlerin yaşama yeteneklerinde belirgin bir düşüş olduğu görülmektedir (Anandharaj ve Sivasankari, 2014). *E. faecium* DZ2 pH 2.5 ve pH 3.5 da 180 dakika süre ile canlılığını korumuştur. *L. plantarum* MT4 pH 2.5 ta 60 dakika canlı kalabilirken, pH 3.5 ta 180 dakika canlı kalmıştır. *L. plantarum* A4 pH 3.5 ta 180 dakika canlı kalırken pH 2.5 ta sadece 0. dakikada canlılık gözlemlenmiştir. *L. brevis* A6X, *L. plantarum* A6 ve *L. brevis* ES6 her iki pH aralığında da 180 dakika canlılığını korumuştur.

Çalışmada tüm izolatların pH 3,5 te, ES6, A6, A6X izolatlarının pH 2,5 te canlılıklarını koruduğu gözlemlenmiştir. A4 ve MT4 izolatlarında ise pH 2,5 te canlılık kısa süre korunabilmiştir. Bu süre izolatların bağırsağın aktif bölgelerine ulaşmak için yeterli olduğu görülmektedir. Fernandez ve ark. (2003) laktik asit bakterilerinden *L. acidophilus*'un ve Chang ve ark. (2001) laktik asit bakterilerinin bağırsağa ulaşması için geçen 90 dakikalık sürede canlı kalmasının o suşun probiyotik olarak seçilmesi açısından yeterli olduğunu belirtmişlerdir.

Probiyotik bakterilerin mide asitliğinden geçerek bağırsak sisteminde safra tuzlarına karşı dirençli olmaları probiyotik seçiminde önemli kriterlerden biridir. İntestinal sistemde bulunan safra tuzunun fizyolojik konsantrasyonu % 0.3-0.5 arasında değişmektedir (Begley ve ark., 2005). Yapılan çalışmalarda, % 0.3' lük safra konsantrasyonunun insandaki safra konsantrasyonuna yakın bir değer olduğu için dirençli suşların belirlenmesinde önemli bir kriter olduğu bildirilmiştir (Erkkilä ve Petäjä, 2000). Alp ve Aslim (2010), bifidobakterilerin % 0.3 konsantrasyonundaki safrayı % 12.35–80.66 arasında tolere edebildiklerini, Sabir ve arkadaşları (2010) ise laktobasillerin aynı konsantrasyondaki safrayı % 72–92 arasındaki oranlarda tolere ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmada *L. brevis* ES6

izolatının safrayı %0,3 konsantrasyonunda % 95 tolere edebildiği, *L. plantarum* MT4 izolatının ise aynı konsantrasyonda safrayı % 49 tolere edebildiği bulunmuştur.

Safra tuzuna dirençlilik için bakterilerin bağırsaklarda bulunan safraya olan toleransında, safranın %0,03, %0,06, %0,125, %0,25, %0,5 ve %1 artan konsantrasyonlarına bağlı olarak düşme gözlenmiştir. Elde edilen verilere göre, laktobasil cinsine ait farklı suşların safraya olan dirençliliklerinin literatürde belirlenen laktobasillere göre düşük olduğu görülmüştür.

Probiyotik laktik asit bakterilerinin lizozim enzimine dirençli olması beklenmektedir. Çalışmamızda lizozim eklenen *L. brevis* ES6, *L. plantarum* A6, *L. plantarum* A4, *L. plantarum* MT4 ve *E. faecium* DZ2 izolatlarının 30. ve 120. dakikalarda bakteri sayımlarında düşüş olsa bile canlı kaldıkları görülmüştür. *L. brevis* A6X izolatında ise 0. dakikadan sonra artış gözlenmiştir. İzolatların 0. dakikaya göre, 30. ve 120. dakikalarda hayatta kalış % oranları hesaplanmış olup en düşük değer *L. plantarum* A6 % 54.76, en yüksek değer ise *E. faecium* DZ2 %83.92 olduğu bulunmuştur. Zago ve ark. (2011) tarafından yürütülen bir çalışmada elde edilen verilere göre hayatta kalış oranlarının %3.24-99.97 aralığında olduğu bildirilmiştir. Çalışmada tespit edilen değerlerin literatür verileriyle uyumlu olduğu görülmüştür.

İzolatların fruktoz, galaktoz, maltoz, rafinoz, laktoz ve sükroz içeren MRS besiyerinde biyofilm oluşturma yetenekleri incelenmiştir. Biyofilm, mikroorganizmaların kendi ürettikleri polimerik ve jelsi bir tabaka içinde, buldukları ortamdaki bir yüzeye yapışarak oluşturdukları topluluk olarak tanımlanmıştır (Leone ve ark., 2006). Biyofilm oluşumunda yüzey özellikleri, sıcaklık, pH, besin miktarı ve bakteri suşu gibi etkenler rol oynamaktadır (Donlan, 2002). *L. brevis* ES6, *L. plantarum* A6, *L. brevis* A6X, *L. plantarum* MT4, *E. faecium* DZ2 izolatlarının maltoz, *L. plantarum* A4 izolatının ise galaktoz şekeri bulunan ortamda biyofilm oluşturma özelliği yüksek bulunmuştur.

Laktik asit bakterilerinin bağırsak florasının düzenlenmesinde görev alabilmesi için, bağırsak epiteline kolonize olabilmesi gerekmektedir. Bakterilerin baskın bir kolonizasyon gösterebilmeleri önemli bir probiyotik özelliktir. Agregasyon özelliğine sahip olan laktobasiller; hücrelere, bulunduğu yüzeye ve birbirlerine

tutunarak biyolojik bir bariyer oluşturlar (Messaoudi ve ark., 2013; Darılmaz ve ark., 2012). Suşlar arasındaki farklılıklar, yüzey hidrofobisitesi, ortamın pH 'sı ve üreme ortamının sıcaklığına göre değişiklik gösterebilmektedir. Çalışmada kullanılan laktik asit bakterilerinin tümünde agregasyon yeteneği gözlenmiş olup, bağırsak epiteline tutunarak burada kolonize olabilecekleri sonucuna ulaşılmıştır.

Koagregasyon özelliği, laktik asit bakterilerinin karşılaştığı patojen organizmalara yapışıp bariyer görevi göstererek onları etkisiz hale getirdiği için önemli bir özellik olarak kabul görmektedir. Laktobasiller koagregasyon özellikleri ile patojenlerin etrafında antimikrobiyal içeriğini artırarak olası bir enfeksiyonu ve bakterinin toksik etkisini engelleyebilmektedirler (Pascual., 2008; Lang ve ark., 2010). Çalışmamızda *E. coli* test bakterisi ile koagregasyon yeteneği araştırılması yapılmış olup tüm laktik asit bakterilerinin koagregasyon özelliğine sahip olduğu gözlenmiştir.

Probiyotik özelliklerin belirlenmesinde gerekli görülen en önemli özelliklerden bir diğeri ise hidrofobisite özelliğidir. Hidrofobik yeteneğe sahip olan probiyotik bakterilerin epitel yüzeylere daha iyi tutunabildikleri bildirilmiştir. Bakterilerin bağırsağa ulaşmasından sonra kayıp gitmemesi için lümeninde bulunan epitel hücrelere ve mukus tabakasına yapışabilmesi gerekmektedir (Fernández, 2003). Bu sindirim sistemindeki kolonizasyon için gerekli bir özelliktir. n-hekzadekan mikrobiyal adezyon, hidrofobisite değerlendirmesinde geçerli kalitatif fenomenolojik bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir (Vinderola ve Reinheimer 2003). Çalışmada hidrofobisite analizi uygulanan izolatlardan yüksek verim alınmıştır. Fermente gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin değerleri %94,83-97,82 aralığında değişim göstermektedir. En yüksek hidrofobisite değerine *L. brevis* A6X izolatı sahiptir. Bunu *L. plantarum* A6, *L. plantarum* A4 ve *E. faecium* DZ2 izolatları takip etmektedir. Vinderola ve Reinheimer (2003) tarafından yapılan çalışmada, probiyotik suşların hidrofobisitesi %38.1 ve %68.7 arasında değişim göstermiştir. Karasu (2006) tarafından zeytin ve turşudan izole edilmiş laktik asit bakterilerine yapılan çalışmada ise %30.32 ve %80.07 arasında değerler saptanıldığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda kullanılan acur turşusu ve zeytinden izole edilmiş 6 izolatın elde edilen verilerinin literatür verilerine yakın olmakla birlikte daha yüksek olduğu görülmektedir.

Walther ve ark. (2008) 72 *Lactococcus* suşu ile yaptıkları çalışmalarında izolatların tümünün protein sentezi inhibitörü olan Gentamisine ve hücre duvarı sentezini inhibe eden Penisilin ile Vankomisine karşı duyarlı olduklarını belirlemişlerdir. Dinçer (2007) 'de aynı şekilde izolatlarının büyük çoğunluğunun Penisilin-G, Gentamisin ve Netilmisin sülfata duyarlılıklarını tespit etmiştir. Çalışmada kullanılan tüm izolatların Vankomisin ve Penisilin G'ye duyarlı oldukları gözlenmiştir. En büyük zon çapı *E. faecium* DZ2 izolatının Vankomisin', *L. plantarum* A6 izolatının Tetrasiklin ve *E. faecium* DZ2 izolatının Penisilin G' karşı duyarlılıklarında elde edilmiştir.

Fermente ürünlerden izole edilmiş laktik asit bakterilerinin proteolitik aktivite miktarları 0.915-0.010 mg/ml, hidrojen peroksit üretim miktarları 0.26-0.82 µ g/ml ve laktik asit üretim miktarları % 0.079-0.089 arasında bulunmuştur. En düşük hidrojen peroksit üretimi *L. plantarum* A6 ve en yüksek üretim ise *L. plantarum* MT4 izolatına aittir. Mumcu (1997) yaptığı çalışmasında kefirde izole edilmiş laktik asit bakterilerinin hidrojen peroksit üretim miktarını 0.04-0.019 µg/ml arasında bulunduğunu belirtmiştir. Başka bir çalışmada Aslım ve ark. (2000) hidrojen peroksit üretim miktarını 0,26–0,51 µg /ml olarak tespit etmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen hidrojen peroksit miktarı literatür sınırları içerisinde.

Protein ve peptidlerin, aminoasitleri parçalamasında önemli bir rolü olan proteolitik aktivite, mikroorganizmaların gelişmesinde yer almaktadır. Ayrıca süt ürünlerinde yapılan proteolizis olayı göz önünde bulundurulduğunda proteolitik aktivitenin önemi açığa çıkmaktadır (Dinçer, 2007). En yüksek 0.915 mg/ml *L. brevis* A6X izolatında, en düşük ise 0.010 mg/ml *L. plantarum* A6 izolatında bulunmuştur. Badis (2004) ve Yüksekdağ (1998) yaptıkları çalışmalarında, *L. plantarum* izolatlarının proteolitik aktivite değerlerini sırasıyla 0.00256 mg/ml ve 0.0-0.09 mg/ml tirozin olarak bulmuşlardır. Beyatlı ve Tunail (1984) ise *S. thermophilus* ile yaptıkları çalışmalarında 0,2–1,0 mg/ml tirozin aralığında tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen verilerin düşük olmamakla birlikte literatür sınırları içinde olduğu görülmüştür.

Fermente gıdaların üretiminde, gıdaların kalitesini ve raf ömrünü belirleyen önemli özelliklerden bir diğeri ise % asit oranıdır. % asitlik değeri arttıkça ürünün

kalitesi ve raf ömründe artmaktadır. Çalışmada % laktik asit üretimi test edilen 6 laktik asit bakterisinden en düşük miktarın *L. plantarum* A6 %0.079 ve en yüksek *L. plantarum* MT4 %0.089 izolatlarına ait olduğu görülmüştür. Yoon ve ark. (2006) lahana suyundan izole ettikleri *L. plantarum* bakterisinin % asitlik miktarının %0.12 olduğunu bildirmişlerdir. Şimşek (2003) *L.brevis ssp. lindneri* 2103'ün %0.21 laktik asit ürettiğini belirtmiştir. Damiani ve ark. (1996) ise *L.brevis ssp. lindneri* ile yaptıkları çalışmalarında asitliğin %0.288-0.379 arasında olduğunu ifade etmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen verilerin literatür değerlerinden düşük olduğu sonucuna varılmaktadır.

Laktik asit bakterilerinin ürettikleri ekzopolisakkaritler (EPS) özellikle yoğurt, peynir, kaymak gibi süt ürünleri başta olmak üzere birçok fermente gıdanın üretiminde önemli rol oynamaktadırlar. EPS üretim yeteneği probiyotik tayini için önemli özelliklerden bir diğeridir. EPS'ler bakterinin yüzeye tutunmasını ve olumsuz çevre koşullarından korunmasını sağlamaktadırlar. Piegon ve ark. (2002) yaptığı bir çalışmada, EPS'nin safra asitleri ve kolestrole bağlanarak vucuttan uzaklaştırılmasını sağladıklarını söylemişlerdir. Kolesterolün ve safra asitlerinin bakteri hücre duvarında bağlanmasında üretilen EPS'lerin de rol oynadıklarını öne sürmüşlerdir (Tok ve Aslım, 2002). Çalışmada EPS üretim yeteneği olan 4 izolat için deney yapılmış ve sonuçlar mg/ml cinsinden hesaplanmıştır. *L. plantarum* A6 izolatının 100 mg/ml, *L. brevis* A6X izolatının 80 mg/ml, *L. plantarum* A4 ve *L. plantarum* MT4 izolatlarının 60 mg/ml EPS ürettikleri tespit edilmiştir. Yüksekdağ ve Aslım fermente süt ürünlerinden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin ürettikleri ekzopolisakkarit miktarını 116-255 mg/L olarak bildirmişlerdir. Sabir ve ark., *Lactococcus* spp. ve *Pediococcus* spp. suşlarının 173-378 mg/L arasında EPS ürettiklerinin rapor etmişlerdir.

Son zamanlarda araştırmacılar probiyotik meyve sularında lezzeti arttırmak için çok sayıda çalışma yürütmektedirler. Wang ve ark., hint dutunun meyve suyuyla yaptıkları çalışmalarında *B. longum* ve *L. plantarum*, taze nar sularında ise *L. plantarum*, *L. delbruekii*, *L. paracasei*, *L. acidophilus* laktik asit bakterilerinin uygun olduğunu bildirmişlerdir. *L. plantarum* ve *L. delbruekii* izolatlarının nar suları için uygun olduğunu, mikrobiyal büyüme sağlandığını tespit etmişlerdir. *L. casei* izolatının ise kaju meyvesinin elde edildiği elma sularında uygunluk

gösterdiği probiyotik bir üretim sağlandığı tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2009; Mousavi ve ark., 2011; Pereira ve ark. 2011).

Probiyotik tayin testleri tamamlanan laktik asit bakterilerinin, 3 farklı kontrol grubuna ayrılmış olan nar suları içerisine aşılama yapılmıştır. 5 gün süresince 5°C, 25°C ve 30°C %5 CO₂ içeren ortam koşullarında inkübe olan nar sularının pH'ları günlük olarak ölçülmüş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. pH değerlerinin 2,76-3,14 arasında değiştiği görülmektedir. Cemeroğlu ve ark. (2004) 120 çeşit nar örneğiyle yaptıkları çalışmalarında nar sularının pH değerlerini minimum 2.40 maksimum 3.53 olarak belirlemişlerdir. Tabur ve ark. (1987) nar suyunun pH değerinin 2,9-3,7 arasında dağılım gösterdiğini bulgulamışlardır. Tüfekçi ve Fenercioğlu (2010) yaptıkları çalışmada inceledikleri nar sularının pH değerinin 3.39-3.57 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada örneklerin bu değer aralıklarına sahip olduğu gözlenirse de literatür verilerinde de görüldüğü üzere nar sularının pH aralığı geniş aralıklarda değişim göstermektedir. Bu fark, narın çeşidine ve olgunluğuna göre değişiklik göstermektedir. Çalışmada kullanılan izolatların optimum pH 2,5-3,5 aralığında gelişim gösterdiği göz önünde bulundurulduğunda nar suyunun pH 'sı izolatlar için uygun bir ortam oluşturmuştur. Farklı sıcaklık koşullarında gruplandırılan nar suyu örneklerinin pH 'sının, içlerinde laktik asit bakterileri bulunan nar sularına göre daha düşük değerlere sahip olduğu görülmektedir. Bu durum izolatların ürettikleri laktik asitten kaynaklanabilmektedir. Apaydın (2008) nar suyu konsantrelerini 5°C, 12°C ve 20°C sıcaklıklarda 8 ay depolayarak yaptığı çalışmada sıcaklığın, pH ve titrasyon asitliği üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını bildirmiştir. Bizim çalışmamızda da sıcaklıkların pH ve titrasyon asitliği üzerinde dikkate değer bir farklılık oluşturduğu görülmemiştir.

Nar sularına günlük olarak uygulanan bir diğer analiz titrasyon asitliği olmuştur. Çalışmada alınan örneklerin değerleri incelendiğinde en düşük 2,68 ve en yüksek 5,12 g/L olduğu görülmüştür. Tehranifar ve ark. (2010), nar sularının titrasyon asitliği değerlerini 0.33-2.44g/100mL olarak belirlemişlerdir. Yine aynı yıllarda Tüfekçi ve Fenercioğlu (2010) nar sularının titrasyon asitliğini 7,6-9,4 g/L değer aralıklarında olduğunu ortaya koymuşlardır. Hicaz narları üzerine yapılan bir araştırmada ise toplam asitlik miktarının 19.46g/L olduğu bildirilmiştir (Kelebek

ve Canbaş 2010). TS 12918 Nar Suyu Standardı'na göre nar sularında bu değerin en az 4.0 g/L olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada elde edilen değerler literatür verileri sınırları ierisindeedir.

Briks değerleri 14-18,4 aralığında tespit edilmiştir. Gölükçü ve Tokgöz (2008) yaptıkları bir çalışmada nar sularının briks değerinin 13-17,18 arasında değiştiğini, Karaca (2011) bu değerleri ortalama 16.45±0.7 olarak elde ettiğini bildirmiştir. Çalışmamızda elde edilen değerlerin verilen oranlara benzer olduğu görülmektedir. Günlük olarak yapılan bu ölçümlerde sıcaklığın ve srenin verilerde bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Laboratuvar ortamına getirilen nar suyu, toplam kuru madde tayini için vakumlu etüve konulmuş ve elde edilen değer 17,9 g/100 ml, yüzde hesabı olarak % 17,9 bulunmuştur. ztan (2006), ticari nar suyunu % 17.6 taze nar suyunun toplam kuru madde miktarını ise % 15.8 olarak bildirmiştir. Çalışmamızda elde edilen toplam kuru madde miktarının literatür verisiyle benzer olduğu görülmüştür.

Nar sularında elde edilen renk ölçümlerinin 5 gün süresince 1- 3,19 aralığında olduğu tespit edilmiştir. Alper ve Acar (2004) yaptıkları çalışmada 1,5-2,00 arasında değişen değerler elde etmişlerdir. Bizim alışmamızda elde edilen verilerin literatür kaynağına yakın olduğu görülmektedir. Zamanla renk kaybı yaşayan normal nar sularının, probiyotik laktik asit bakterilerinin aşılandığı nar sularına oranla renklerinin daha cansız olduğu görülmüştür.

Toplam antosiyanin içeriği tespiti ilk nar suyu örneğine ve 5 günün sonunda elde edilen son ürünlere uygulanmıştır. İlk üründe elde edilen miktar 206,34 mg/L iken son üründe bu değer 218,82 mg/L olarak değişim göstermiştir. *L. brevis* ES6 ve *E. faecium* DZ2 izolatlarının aşılandığı ve 5 gün süresince inkübe olan nar suyu örneklerinin son ürünlerinde bulunan antosiyanin miktarının, normal nar suyunun antosiyanin miktarından daha fazla olduğu görülmüştür. Nar suyunun antosiyanin miktarının narın çeşidine göre farklılık gösterdiği ve 10 mg/L ile 700 mg/L arasında veri eldesi olabileceği bildirilmiştir (Vardin, 2000; zkan 2002). Gil ve ark., (2000) 161.9 ila 387.4 mg/L arasında, Aviram ve ark., (2005) narda bulunan antosiyanin miktarını 121 mg/L olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Kelebek (2010) hicaz narlarıyla yaptığı çalışmasında ise toplam antosiyanin miktarını

273.8mg/L olarak bulmuştur. Çalışmada nar suyu örneklerinin, literatür veri değer aralıklarında olduğu görülmektedir.

Çalışmada kullanılan nar sularının toplam fenolik madde miktarı micro MTP yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen veriler tannik asit kullanılarak oluşturulan standart eğriye göre değerlendirilmiş %0.930 ile 0.052 arasında değerler olduğu gözlenmiştir. Öztan (2006) yaptığı bir çalışmada nar suyunun toplam fenolik madde miktarını 5.79 mg GA/g, ticari nar suyunda ise 3.56 mg GA/g olarak bildirmiştir. Ülkemizde nar çekirdekleri kullanılarak yapılan bir başka araştırmada ise; nar çekirdeklerinin 1535 ile 3701 mg/kg aralığında toplam fenolik madde içeriği hesaplanmıştır (Gölükçü ve ark. 2007). Attard (2013) yürüttüğü bir çalışmada toplam fenolik madde miktarını %1.000- 0.167 aralığında bulunduğunu bildirmiştir. Elde edilen veriler literatür sınırları içerisinde bulunmuştur.

Nar sularının antioksidan tayinleri ilk ürün ve 5. günün sonundaki son ürüne uygulanmıştır. ABTS+ radikali yakalama metodu ile yapılan antioksidan aktivitesi ölçümünde sonuçlar yüzde ABTS olarak elde edilmiştir. Yapılan çalışmada ilk ürün ile son ürün arasında dikkate değer bir farklılık olmadığı, değerlerin %98,47 ile 99,84 arasında değiştiği görülmüştür. Bakteri ilaveli nar sularında da belirgin bir farklılık elde edilmemiş yine aynı şekilde en düşük değerlerin yaklaşık %98 olduğu tespit edilmiştir. Öztan (2006) nar suyu örnekleriyle yaptığı çalışmada 0,05 ml/ml konsantrasyonda %100 inhibasyon sağlamıştır. Meyvelerin antioksidan aktivitelerinin büyük bir bölümü, yapılarında ki fenolik maddelerden ortaya çıkmaktadır. Bu düşüşün askorbik asit ve fenolik madde miktarındaki düşüşten kaynaklandığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda antioksidan aktivitede dikkate değer bir düşüş yaşanmamış olması 5 günlük süreden kaynaklanmaktadır.

DPPH radikali yakalama metodu kullanılarak yapılan antioksidan ölçümünde çalışma (1,2,3,4,5 mg/ml) olarak farklı konsantrasyonlarda yapılmış, sonuçlar yüzde DPPH olarak hesaplanmıştır. İlk ürün ve son ürüne uygulanan bu testte 5 gün sonunda az bir oranda düşüş olduğu görülmüştür. Antioksidan aktivite miktarı nar suyu konsantrasyonunun artmasıyla yükseliş göstermiştir. 1 mg/ml'de %55.63, 2 mg/ml'de %75.13, 3 mg/ml'de %82.27, 4 mg/ml'de %95.35 ve en yüksek değer %99.88 ile 5 mg/ml deney setinde elde edilmiştir. He ve ark. 0.5, 1, 2 ve 4 mg/ml

konsantrasyonlarını kullanarak yaptıkları çalışmada 0.5 mg/ml'de %40.30, 1 mg/ml'de %53.10, 2 mg/ml'de %75.63 ve 4 mg/ml'de %93.36 değerlerini elde etmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen verilerin literatür verileriyle benzer değerlere sahip olduğu görülmüştür. Gil ve ark. (2000) DPPH yöntemini kullanarak, ticari nar sularının antioksidan aktivite miktarının kırmızı şarap ve yeşil çay örneklerinden 3 kat daha fazla olduğu bilgisini elde etmişlerdir. Ayrıca Singh ve ark. (2002) nar kabuğu ve tohumunun ekstraktlarında DPPH yöntemi ile antioksidan aktivite testi yapmışlar, 50 ppm de nar kabuğunun metanol ekstraktının antioksidan aktivitesini %81 ve 100 ppm de ise % 23.2 olarak bildirmişlerdir.

Nar sularından alınan örneklerin mineral madde içerikleri belirlenmiştir. (B) değeri 2.15, (Ca) değeri 18.75, (Cu) değeri 0.22 , (K) değeri 29,280, (Mg) değeri 63.24, (Mn) değeri 0.28, (P) değeri 136.5 ve (Zn) değeri 1.66 olarak bulunmuştur. Karaca (2011)'nin verilerine göre (Cu) 0.51, (K) 2648, (Mg) 73.04, ve (Zn) 5.59 değerleri çalışmamızda elde edilen verilerle uyumludur. (Ca) değerinin literatür değerinden düşük olduğu görülmüştür.

Nar sularına aşılana laktik asit bakterilerinin canlılığı test edilmek için günlük yapılan ekimler sonucu 6 izolatında 48 saat canlılığını koruduğu gözlenmiştir. *L. brevis* (ES6) izolatının 22×10^2 olan bakteri sayımı 15×10^2 'a , *L. plantarum* A6 izolatının 24×10^2 olan bakteri sayımı 28×10^2 'a, *L. brevis* A6X izolatının 29×10^2 olan bakteri sayımı 23×10^2 'a, *L. plantarum* A4 izolatının 20×10^2 olan bakteri sayımı 29×10^2 'a, *L. plantarum* MT4 izolatının 16×10^2 olan bakteri sayımı 20×10^2 'a ve *E. faecium* DZ2 izolatının 25×10^2 olan bakteri sayımı 12×10^2 'a düştüğü görülmüştür.

Probiyotik bakterilerin gıda alanında kullanımı dünyada çok yaygın olmasına rağmen ülkemizde bu düzeyde yaygın değildir. Bir çok olumlu etkisi olduğu bilinen bu bakterilerin gıdalarda doğal katkı maddesi olarak kullanılması ve bu ürünlerin yaygınlaştırılması gerekmektedir. Bu çalışmada fermente gıdalardan izole edilmiş ve yüksek tannaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiş izolatlar seçilerek probiyotik özellikleri test edilmiştir. Antimikrobiyal aktiviteleri ve bunların kaynakları, pH ve lizozim dirençlilikleri, safra tuzu toleransları, agregasyon yetenekleri ve antibiyotik dirençlilikleri belirlenmeye çalışılmıştır. Nar suyunun zengin bir antioksidan

olması, önemli miktarlarda polifenol, şeker ve vitamin içermesi nedeniyle önemi giderek artmaktadır. Ancak nar suyunun buruk bir tada sahip olması tüketimini sınırlandırmaktadır. Çalışmada probiyotik özellikleri test edilen ve tannaz aktivitesine sahip laktik asit bakterileri taze sıkılmış doğal nar suyuna ilave edilerek hem probiyotik bir ürün elde etmek hemde doğal olarak buruk tadın giderilmesi amaçlanmıştır.

Ancak tüm izolatların 48. saatten sonra canlılığını yitirmesi probiyotik ürün açısından bu izolatların uygun olmadıklarını ortaya koymuştur. Diğer taraftan yapılan duyu analizlere göre 25°C’de inkübe edilen *L. plantarum* A4 izolatının ilave edildiği nar suyuna dikkate değer bir aroma sağladığı ve normal nar suyuna kıyasla daha az burukluğa, acılığa ve ekşiliğe sahip olduğu görülmüştür. İzolatların yüksek tannaz aktivitesine sahip olması tanen miktarını etkileyerek hoş bir aroma sağlayıcı olarak kullanılmasına olanak sağlayabilmektedir.

Probiyotik ürün açısından ise başka izolatların denenmesinde yarar olacaktır. Ayrıca probiyotik özelliklerini belirlediğimiz bu laktik asit bakterileri diğer probiyotik meyve sularının üretilmesinde özellikle buruk bir tada sahip olan gliaburu üretiminde denenebilir.

KAYNAKLAR

- Aguilar, C.N., Rodriguez, R., Gutierrez S.G., Augur, C., Favela, T.E., Prado B.L.A., Ramirez C.A., Contreras E.J.C. (2007), "Microbial tannases:Advances and Perspectives." Appl. Microbiol. Biotechnol. 76: 47-59
- Aguilar, C.N. ve Gutierrez S.G., (2001a), "Review: Sources, Properties, Applications and Potential Uses of Tannin Acyl Hydrolase." Food Science Tech. International, 7(5): 373-382.
- Akardere, E. (2012), *Zeytinyağı Fabrikası Sıvı Atığının Biyoarıtımında Fenol Fenol Parçalayıcı Enzim Aktivitelerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara
- Akçelik, M., Ayhan, K., Çakır, İ., Doğan, H.B., Gürgün, V., Halkman, A., Kaleli, D., Kuleaşan, H., Özkaya, D.F., Tunail, N., Tükel, Ç. (2000), Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Birimi, Ankara, 2. Baskı, 229-275, 514-515.
- Akçelik , M., Şanlıbaba, P., Tükel, Ç., Tuncer, Y. (2001), 'Laktokoklarda Endüstriyel Açıdan Önem Taşıyan Özelliklerin Genetik Determinantları,' Turk J Vet Anim Sci, 25, 615-621
- Akkoç, N., Şanlıbaba, P. ve Akçelik, M., (2009), Bakteriyosinler:Alternatif Gıda Koruyucuları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25(1-2), 59-70,
- Alp, G. ve Aslim, B., (2009), Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of Bifidobacterium spp. isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe*, 16(2), 101-105. <http://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.06.006>
- Anandharaj, M., Sivasankari, B., (2014), Isolation of Potential Probiotic *Lactobacillus oris* HMI68 From Mother's Milk With Cholesterol-Reducing Property, Journal of bioscience and bioengineering 118 (2), 153-159
- Anonim (1997), Disk Diffusion Susceptibility Testing (Kirby-Bauer Method), <http://www.addl.purdue.edu/newsletters/1997/spring/dds.shtml>
- Anonim, (2003), TS 12918, Nar Suyu Standardı, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara
- Anonymus, (2005), Tarımsal Yapı (Üretim, Fiyat, Değer). Devlet İstatistik Enstitüsü.
- Apaydın, E. (2008), *Nar Suyu Konsantresi Üretim ve Depolama Sürecinde Antioksidan Aktivitedeki Değişimler.*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara

- Arıcı, M. (2008), *Gıda Koruyucusu Olarak Mikrobiyal Kaynaklı Organik Asitler ve Önemi.*, Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum.
- Arslankoz, N. (2011), *Ankara Çubuk Yöresi Turşularından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Teknolojik Ve Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara
- Aslım, B. (1994), *Lactobacillus bulgaricus ve Streptococcus thermophilus Bakterilerinin Metabolik ve Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Bazı Fiziksel ve Kimyasal Mutajenlerin Etkisi*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Aslım, B., Beyatlı, Y., & Halkman, K. (2000), *Yoğurt Starter Kültür Metabolitlerinin İnhibisyon Etkisi. Turk J Biol, 24, 65–78*, TÜBİTAK
- Attard, E., (2013), A rapid microtitre plate Folin-Ciocalteu method for the assessment of polyphenols, *Cent. Eur. J. Bio. 8(1)*, 48-53.
- Aviram, M., Rosenblat M., and Gaitini, D., (2005), Pomegranate juice improves carotid artery health and lowers blood pressure in patients with carotid artery stenosis. *Herbal Gram, 65:28-30*.
- Badis, A., Guetarni, D., Moussa-Boudjemâa, B., Henni, D. E., Tornadijo, M. E., & Kihal, M. (2004), *Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties Food Microbiology, 21(3), 343–349.* [http://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00072-8](http://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00072-8)
- Başbülbul, G., & Bıyık, H. H. (2010), Ekstremofilik Mikroorganizmalar Tarafından Üretilen Bakteriyosinler. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi, 8(2)*, 26–34.
- Begley, M., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2005), The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews, 29(4)*, 625–651. <http://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.09.003>
- Belmares, R., Contreras-Esquivel, J. C., Rodriguez-Herrera, R., Coronel, A. R., Aguilar, C. N. (2004), “Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry,” *Lebensm.-Wiss. U.-Technology, 37: 857-864*.
- Bennik, M. H. J., Verheul, A., Abee, T., Naaktgeboren-Stoffels, G., Gorris, L. G. M., & Smid, E. J. (1997), Interactions of nisin and pediocin PA-1 with closely related lactic acid bacteria that manifest over 100-fold differences in bacteriocin sensitivity. *Applied and Environmental Microbiology, 63(9)*, 3628–3636.
- Bhat, T. K., Singh, B., Sharma, O. P. (1998), “Microbial Degradation of Tannins; A Current Perspective”, *Biodegradation, 9: 343-357*.

- Ceylan, N., & Alıç, H. (2012), Bağırsak Mikroflorası ve Probiyotikler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5(1), 107–113.
- Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A., Özkan, M., (2004), Meyve ve sebzelerin bileşimi. Meyve ve Sebze işleme teknolojisi, Cilt I, Cemeroğlu, B. (ed.), s.1-188, Bizim Büro Basımevi, Ankara.
- Choi, H. J., Lee, H. S., Her, S., Oh, D. H., & Yoon, S. S. (1999), Partial characterization and cloning of leuconocin J, a bacteriocin produced by *Leuconostoc* sp. J2 isolated from the Korean fermented vegetable Kimchi. *Journal of applied microbiology*, 86(2), 175–81. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00471.x>
- Chung, K.-T., Wei, C.-I., & Johnson, M. G. (1998), Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends in Food Science & Technology*, 9(4), 168–175. [http://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00028-4](http://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00028-4)
- Chung, K.-T., Wong, T. Y., Wei, C.-I., Huang, Y.-W., & Lin, Y. (1998), Tannins and Human Health: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(6), 421–464. <http://doi.org/10.1080/10408699891274273>
- Coşkun, F., (2006), Gıdalarda Bulunan Doğal Koruyucular. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, (2) 27-33.
- Çotuk, A., Küçüker, M. (1992), Biyologlar için Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu, İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 127–12
- Çam, M. (2008), *Tanenler: Sınıflandırma, Yapıları ve Sağlık Üzerine Etkileri Haluk*. Erzurum.
- Damiani, P., Gobbetti, M., Cossignani, L., Corsetti, a., Simonetti, M. S., & Rossi, J. (1996). The Sourdough Microflora. Characterization of Hetero- and Homofermentative Lactic Acid Bacteria, Yeasts and Their Interactions on the Basis of the Volatile Compounds Produced. *LWT - Food Science and Technology*, 29(1-2), 63–70. <http://doi.org/10.1006/fstl.1996.0009>
- Darılmaz, D. O., Beyatlı, Y., & Yüksekdağ, Z. N. (2012). Aggregation and hydrophobicity properties of 6 dairy propionibacteria strains isolated from homemade Turkish cheeses. *Journal of food science*, 77(1), M20–4. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02438.x>
- Dinçer, E., (2007), *Et ve Et Ürünlerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Bunların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Eskişehir
- Dinçer, E., Kıvanç, M., & Karaca, H. (2009), *Biyokoruyucu Olarak Laktik Asit Bakterileri ve Bakteriyosinler*.

- Drinan, D. F., Tobin, S., & Cogan, T. M. (1976), *Citric Acid Metabolism in Hetero- and Homofermentative Lactic Acid Bacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 31(4), 481–486.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956), Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* 28. 350–356.
- Duan, Y., Tan, Z., Wang, Y., Li, Z., Qoin, G, Huo, Y., Cai, Y., (2007), *Identification And Characterization Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Tibetan Qula Cheese*. *J. Gen. Microbiol.*,54,51-60.
- Evren, M., Apan, M., Tutkun, E., Evren, S., (2011), Geleneksel Fermente Gıdalarda Bulunan Laktik Asit Bakterileri, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 9 (1), 11-17
- Ergezer, H., Çam, M., (2008), Tanenlere, Sınıflandırma, Yapıları ve Sağlık Üzerine Etkileri, *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, Erzurum
- Erkkilä, S., & Petäjä, E. (2000), Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*, 55(3), 297–300. [http://doi.org/10.1016/S0309-1740\(99\)00156-4](http://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00156-4)
- Fernández, M. F., Boris, S., & Barbés, C. (2003), Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 94(3), 449–455. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01850.x>
- Fuller R., (1989) *Probiotics in man and animals*, *J Appl Bacteriol*; 66: 365-378.
- Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. a., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., & Kader, a. a. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice. *J Agric Food Chem*, 48(series 1050), 4581–4589.
- Gil-Izquierdo, A., Gil, M. I., & Ferreres, F. (2002), Effect of processing techniques at industrial scale on orange juice antioxidant and beneficial health compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(240 mL), 5107–5114. <http://doi.org/10.1021/jf020162+>
- Giusti, M.M., Wrolstad R. E., 2001. Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. R. E. Wrolstad, S. J. Schwartz (Eds), pp 1-13, John Wiley and Sons, New York.
- Gölükçü, M., Tokgöz, H., (2008), *Ülkemizde yetiştirilen önemli nar (Punicagranatum) çeşitlerine ait nar sularının bazı kalite özellikleri* . Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü-Tübitak Projesi,40 s.
- Guarner, F., Perdigon, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B., & Morelli, L. (2005), Should yoghurt cultures be considered probiotic? *The British journal of nutrition*, 93(6), 783–786. <http://doi.org/10.1079/BJN20051428>

- Gülgör, G., & Özçelik, F. (2014), *Bakteriyosin Üreten Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Amaçlı Kullanımı*. Akademik Gıda, 12(1), 63–68.
- Günay, Ö. (2012), *Türkiye Kökenli Lactococcus lactis Suşlarının Kromozomal Farklılıklarının Tanımlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara
- Gürsoy, O., & Kımık, Ö. (2005), Laktobasiller Ve Probiyotik Peynir Üretiminde Kullanım Potansiyelleri. *Mühendislik Bilimleri Dergisi* , 11(3), 361–371.
- Halami, P.M., Chandrashekar, A., Nand, K. (2000), ‘*Lactobacillus farciminis* MD, a new strain with potential for bacteriocin and antibiotic assay,’ Letters in Applied Microbiology, 30, 197-202
- Halkman, K., (1991), *Tarım Mikrobiyolojisi*, A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, No:1214, 82s., Ankara
- Huis in’t Veld JH, Havenaar R, Marteau P. (1994), Establishing a scientific basis for probiotic R&D. *Trends Biotechnol* 12: 6-8.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T. ve Williams, S.T. (2000), *Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 527-567.
- Kanmani, P., Satish Kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K. a, Pattukumar, V., & Arul, V. (2013), Probiotics and its functionally valuable products-a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(6), 641–58. <http://doi.org/10.1080/10408398.2011.553752>
- Karaca, E. (2011), *Nar Suyu Konsantresi Üretiminde Uygulanan Bazı İşlemlerin Fenolik Bileşenler Üzerine Etkisi*. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana
- Karaca, H., Dinçer, E., & Kıvanç, M. (2010), Metabolik Mühendisli ğ inde Laktik Asit Bakterileri, 8(1), 32–38.
- Karasu, N. (2006), *Turşu ve Zeytinden Antagonistik ve Probiyotik Özellikte Laktik Starter Kültür Eldesi*. Pamukkale Üniversitesi.
- Kavas G. ve Kavas N., *Biyokoruyucu olarak laktik asit bakterileri*. (y.y.). Tarihinde 26 Aralık 2015, adresinden erişildi <http://www.dunyagida.com.tr/haber.php?nid=2621>
- Kelebek, H., Canbaş, A., (2010), Hicaz nar şırasının organik asit şeker ve fenol bileşikleri içeriği ve antioksidan kapasitesi. *Gıda* 35(6):439-444
- Kılıç, S., (2001), Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 542, İzmir., 109-111.

- Kıvanç, M., Yiğit T. ve Dinçer, E., (2010), Antimicrobial activity and properties of enterococcus faecium strains isolated from kefir.1. st. International Congress on Food Tecnology 3-6 November Antalya-Turkey. pp 247.
- Krishnakumar, V., Gordon, I.R. (2001), Probiotics: Challenges and opportunities. Dairy Ind. Intl. 66(2): 38-40.
- Kurt, Ş., & Zorba, Ö. (2005), Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanım Olanakları. *YYÜ Vet Fak Derg*, 16(1), 77–83.
- Lagemaat, J., Pyle, D. L. (2005), "Modelling the uptake and growth kinetics of Penicillium glabrum in a tannic acid-containing solid-state fermentation for tannase production", *Process Biochemistry*, 40: 1773-1782.
- Lang, C., Bottner, M., Holz, C., Veen, M., Ryser, M., Reindl, A., ... Tanzer, J. M. (2010), Specific Lactobacillus/Mutans Streptococcus Co-aggregation. *Journal of Dental Research*, 89(2), 175–179. <http://doi.org/10.1177/0022034509356246>
- Lewus, C.B. Kasier, A. and Montville, T.J., (1991), Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from meat, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(6), 1683-1688.
- Lindgren, S.E. and Dobrogosz, W.J., (1990), Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations, *FEMS- Microbiol. Review.*, 87, 149-164
- Lilly DM, Stillwell RH., (1965), *Probiotics: growth-promoting factors produced by micro organisms*. Science; 147: 747-748.
- Lombardi, A., Gatti, M., Rizotti, L., Torriani, S., Andrighetto, C., Giraffa, G., (2004), *Characterization Of Streptococcus Macedonicus Strains Isolated from Artisanal Italian Rawmilk Cheeses*. *International Dairy Journal of Food Microbiology*, 14, 967-976.
- Lücke, F.K. (1996), ‘Lactic acid bacteria involved in food fermentations and their present and future uses in food industry,’ NATO ASI Series, Series H: Cell Biology, Vol 98, Springer, New York, 81–99.
- Madkor, S. A., Tong, P. S., El Soda, M. (2000), Ripening of Cheddar Cheese With Added Attenuated Adjunct Cultures of Lactobacilli. *J. Dairy Sci.* 83: 1684-1691.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., & Jimenez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727–747
- Maskan, M. (2006), Production of pomegranate (*Punica granatum L.*) juice concentrate by various heating methods: colour degradation and kinetics. *Journal of Food Engineering*, 72(3), 218–224. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.11.012>

- Messaoudi, S., Manai, M., Kergourlay, G., Prévost, H., Connil, N., Chobert, J.-M., & Dousset, X. (2013), *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiology*, 36(2), 296–304. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2013.05.010>
- Moriello VS., Lama L., Poli A., Gugliandolo C., Maugeri TL., Gambacorta A., Nicolaus B., (2003), *Production of Exopolysaccharides from a Thermophilic Microorganism Isolated from a Marine Hot Spring in Flegrean Areas*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30/2, 95-101.
- Mousavi, Z. E., Mousavi, S. M., Razavi, S. H., Emam-Djomeh, Z., & Kiani, H. (2011), Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(1), 123–128. <http://doi.org/10.1007/s11274-010-0436-1>
- Mumcu, Z.N. (1997), *Kefirden İzole Edilen Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik, Antimikrobiyal ve Plazmit DNA'larının İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I. ve Onilude, A.A. (2003), “Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG 1,” *African J. of Biotechnol.*, 2 (8), 219-227.
- Ophir T., and Gutnick D. L., (1994) A Role for Exopolysaccharides in the Protection of Microorganisms from Desiccation, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 740-745.
- Özhamamcı, İ. (2008), *Nar Suyunun Kimyasal Bileşimi ve Tanı Değerleri*.
- Özer, D.; Akın, M.S., (2000), Probiyotik Fermente Süt Ürünleri ve Prebiyotikler. (M. DEMİRCİ editör) VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı, Tekirdağ, s:273-278.
- Özkan, M., 2002. Degradation of anthocyanins in sour cherry and pomegranate juices by hydrogen peroxide in the presence of added ascorbic acid. *Food Chemistry*, 78(4), 499-504
- Öztaş, T. (2006), *Mor Havuç, Konsantresi, Şalgam Suyu, Nar Suyu ve Nar Ekşisi Ürünlerinde Antioksidan Aktivitesi Tayini ve Fenolik Madde Profiline Belirlenmesi*. İstanbul Teknik Üniversitesi.
- Parker, RB. (1974), *Probiotics, the other half of the antibiotic story*. *Anim Nutr Health*; 29: 4-8
- Patrick, W.A., Wagner, H.B. (1949), Determination of Hydrogen Peroxide in Small Concentrations, *Anal chem.* 21 (10), pp 1279–1280
- Pascual A, Hidalgo-Figueroa M, Piruat JI, Pintado CO, Gómez-Díaz R, López-Barneo J (2008) Absolute requirement of GDNF for adult catecholaminergic neuron survival. *Nat Neurosci* 11:755–761

- Pereira, A. L. F., Maciel, T. C., & Rodrigues, S. (2011). Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*, 44(5), 1276–1283. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.035>
- Pfeiler, E. a., & Klaenhammer, T. R. (2007), The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology*, 15(12), 546–553. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2007.09.010>
- Pigeon, RM, Cuesta EP, Gilliland SE. (2002), *Binding of free bile acids by cells of yogurt starter culture bacteria*, *J Dairy Sci* 85: 2705
- Poyrazoğlu, E., Gökmen, V., & Artuk, N. (2002), Organic Acids and Phenolic Compounds in Pomegranates (*Punica granatum L.*) Grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(5), 567–575. <http://doi.org/10.1006/jfca.2002.1071>
- Prescott, C.S. and Dunn, G.C., (1987), *Industrial Microbiology*, Published on Distributors, Delhi, India, pp.882.
- Raffle, E.J Lancet, RefiRasic J.Lj. ve Kurmann, J.A. (1956), “Yoghurt Scientific Grounds, Techonology, Manufacture and Preparations” 1, 2, 206, Denmark.
- Rodríguez, H., Rivas, B. D. Las, Gómez-Cordovés, C., & Muñoz, R. (2008), Degradation of tannic acid by cell-free extracts of *Lactobacillus plantarum*. *Food Chemistry*, 107(2), 664–670. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.063>
- Rollins, M., Joseph, S.W. (2000), BSCI 424 — Pathogenic Microbiology, Antibiotic Disk Susceptibilities (Kirby-Bauer Disk-Diffusion Method), <http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/LabMaterialsMethods/AntibioticDisk.htm>
- Ryan, M. P., Rea, M. C., Hill, C., & Ross, R. P. (1996), An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 612–619.
- Sabir, F., Beyatli, Y., Cokmus, C., & Onal-Darilmaz, D. (2010), Assessment of Potential Probiotic Properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., and *Pediococcus* spp. Strains Isolated from Kefir. *Journal of Food Science*, 75(9), 568–573. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01855.x>
- Sağdıç, O., Küçüköner, E., & Özçelik, S. (2004), Probiyotik ve Prebiyotiklerin Fonksiyonel Özellikleri. *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 35(3-4), 221–228.
- Salminen, S. Deighton, M.A., Benno, Y. and Gorbach, S.L. (1998), *Lactic acid bacteria in health and disease*. In: Salminen S., von Wright, A. ads. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc. pp. 211-254

- Salminen, K., Rautelin H., Tynkkynen, S., Poussa, T., Saxelin, M., Valtonen, V., (2004), *Lactobacillus Bacteremi, Clinical Significance and Patient Outcome with Special Focus on Probiotic L. Rhamnosus GG*, Tampere, Finland
- Sarikaya, Ö. (2005), "Funguslar ile Gallik Asit Üretiminde Çeşitli Bitkisel Atıkların Kullanılabilirliğinin Araştırılması," Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Eskişehir.
- Shortt, C., (1999), *The Probiotic Century: Historical and Current Perspectives. Trends in Food Science & Technology*, 10:411-417.
- Serdaroğlu, M., & Özsumer, M. S. (2000), *Et ve Et Ürünlerinde bakteriosinlerin Önemi. Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 6(2-3), 211–217.
- Song, D., Ibrahim, S., Hayek, Saeed, (2012), *Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science* <http://dx.doi.org/10.5772/50121>
- Soomro, A.H., Anwaar, M., Anwar, K. (2002), 'Role of Lactic Acid Bacteri (LAB) in Food Preservation and Human Health,' *Pakistan Journal of Nutrition*, 1 (1), 20-24.
- Speck, M.L. (1976), *Compendium Of Methods For The Microbiological Examination Of Foods*, American Public Health Association, Washington, DC, 89
- Stanton, C., Gardiner, G., Lynch, P. B., Collins, J.K., Fitzgerald, G., Ross, R. P. (1998), *Probiotic Cheese. Int. Dairy Journal*, 8: 491-496.
- Shwartz, E., Glazer, I., Bar-ya'akov, I., Matityahu, I., Bar-ilan, I., Holland, D., Amir, R., (2008), *Changes in chemical constituents during the maturation and ripening of Tao commercially important pomegranate accessions. Food Chemistry*, 115:965–973.
- Şimşek, Ö. (2003), *Uşak ve Yöresi Ekşi Hamurlarından İzole Edilen Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması ve Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi.*, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, 90s
- Tamime, A.Y.; Marshall, V.M.E., (1997), *Microbiology and Technology of Fermented Milk*, (editör B.A. LAW). *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, Blackie Academic & Professional Publ., London, p: 153-192.
- Tehranifar, A., Zarei, M., Nemati, Z., Esfandiyari, B., & Vazifeshenas, M. R. (2010), *Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (Punica granatum L.) cultivars. Scientia Horticulturae*, 126(2), 180–185. <http://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.07.001>
- Temel, O. (2012), *Laktik Asit Bakterilerinin Tannaz Üretim Yeteneklerinin Araştırılması*. Anadolu Üniversitesi.

- Tok, E., & Aslım, B. (2007), Probiyotik olarak kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyonu ve safra tuzları dekonjugasyonundaki rolleri. *Türk Mikrobiyol Cem Dergisi*, 37(1), 62–68.
- Tsai, J. S., Lin, Y. S., Pan, B. S., & Chen, T. J. (2006), Antihypertensive peptides and γ -aminobutyric acid from prozyme 6 facilitated lactic acid bacteria fermentation of soymilk. *Process Biochemistry*, 41(6), 1282–1288. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.12.026>
- Tuorila, H., & Cardello, A. V. (2002), Consumer responses to an off-flavor in juice in the presence of specific health claims. *Food Quality and Preference*, 13(7-8), 561–569. [http://doi.org/10.1016/S0950-3293\(01\)00076-3](http://doi.org/10.1016/S0950-3293(01)00076-3)
- Turchi, B., Mancini, S., Fratini, F., Pedonese, F., Nuvoloni, R., Bertelloni, F., ... Cerri, D. (2013), Preliminary evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Italian food products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(10), 1913–1922. <http://doi.org/10.1007/s11274-013-1356-7>
- Turantaş, F. (2007), ‘Laktik Asit Bakterileri Tarafından Hidrojen Pereoksit Üretimi,’ <http://www.fulyaturantas.com/Bilimsel/H2O2.doc>
- Turgut, D. Y., & Seydim, A. C. (2013), Akdeniz Bölgesi’nde yetiştirilen bazı Nar (*Punica granatum L.*) çeşit ve genotiplerinin organik asit ve şeker kompozisyonu. *Akademik Ziraat Dergisi*, 2(1), 35–42.
- Tükel, Ç., & Akçelik, M. (2000), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Suşlarında Laktoz Plazmidlerinin Tanımlanması. *Türk J Biol*, 24, 405–424.
- Türk Standartları Enstitüsü, (1991), TS8979, Laktik Asit-Sanayide Kullanılan, Ankara
- Uymaz, B. (2010), Probiyotikler ve Kullanım Alanları. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(1), 95–104.
- Uzuner, S. (2008). *Nar Suyunda Farklı Üretim ve Depolama Koşullarında Ellajik Asit ve Toplam Antioksidan Aktivitelerindeki Değişimler*. Hacettepe Üniversitesi.
- Ünlütürk, A., (1999), Mikrobiyal gelişmenin inhibiyonu, Gıda Mikrobiyolojisi, Mengi Tan Basımevi, 2. Baskı, 171-225s, İzmir
- Ünlütürk, A., Turantaş, F., (1998), Gıda Mikrobiyolojisi, Mengi Tan Basımevi, Çınarlı-İzmir,605s
- Van Calsteren, M.-R., Pau-Roblot, C., Bégin, A., & Roy, D. (2002), Structure determination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains RW-9595M and R. *The Biochemical journal*, 363(Pt 1), 7–17. <http://doi.org/10.1042/0264-6021:3630007>
- Vaughan, E.E., Mollet, B. (1999), Probiotics in the new millennium. *Nahrung* 43 (3) 148-153.

- Vardin, H., (2000), Harran ovasında yetiştirilen değişik nar çeşitlerinde gıda sanayinde kullanım olanakları üzerine bir çalışma. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana
- Verbeke, W. (2006), Functional foods: Consumer willingness to compromise on taste for health? *Food Quality and Preference*, 17(1-2), 126–131. <http://doi.org/10.1016/j.foodqual.2005.03.003>
- Vinderola, C.G. and Reinheimer, J.A. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: A comparative in vitro study of probiotic characteristics and biological resistance. *Food Research International* 36: 895-904.
- Visser, R., Holzapfel, W.H., Bezuidenhout, J.J., Kotze, J.M. (1986), ‘Antagonism of Lactic Acid Bacteria against Phytopathogenic Bacteria,’ *Applied and Environmental Microbiology*, 52 (3), 552–555
- Wang, C.-Y., Ng, C.-C., Su, H., Tzeng, W.-S., & Shyu, Y.-T. (2009), Probiotic potential of noni juice fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(s6), 98–106. <http://doi.org/10.1080/09637480902755095>
- Wang, Y.-C., Yu, R.-C., & Chou, C.-C. (2002), Growth and survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured soymilk drinks. *Food Microbiology*, 19, 501–508. <http://doi.org/10.1006/yfmic.506>
- Yetişmeyen, A., (1995), Süt Teknolojisi, A.Ü. Ziraat Fak Yayınları, No:1420, 229s., Ankara.
- Yılsay, T.Ö.; Kurdal, (2000), Probiyotik Süt Ürünlerinin Beslenme ve Süt Sağlık Üzerindeki Etkisi. (M. DEMİRCİ editör) VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı, Tekirdağ, s:279-286
- Yılmaz, M., & Çelik, G. Y. (2007), Bakteriye Ekstraselüler Polisakkaritler. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 5(2), 7–13.
- Yiğit, T., (2009), Süt ve süt ürünlerinden probiyotik bakterilerinin izolasyonu ve tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü Eskişehir.
- Yoon, K. Y., Woodams, E. E., & Hang, Y. D. (2006), Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, 97(12), 1427–1430. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.06.018>
- Yörük, G. N., & Güner, A. (2011), Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması ve Weissella Türlerinin Gıda Mikrobiyolojisinde Önemi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 6(2), 163–176.
- Yurdakök, M. (2013), Yoğurdun Öyküsü, Probiyotiklerin Tarihi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, (56), 43–60.

- Yüksekdağ, Z. N., Beyatlı, Y., & Aslim, B. (2004), Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. *LWT - Food Science and Technology*, 37(6), 663–667. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.02.004>
- Yüksekdağ, Z. N., & Beyatlı, Y. (2003), Kefir Mikroflorası ile Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik , Antimikrobiyal ve Genetik Özellikleri Kefirin Tanımı ve Tarihçesi Kefir Tanesinin Yapısı ve Kefirin Mikroflorası. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(2), 49–69.
- Zago, M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Burns, P., Suárez, V., Vinderola, G., ... Giraffa, G. (2011), Characterization and Probiotic Potential of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated From Cheeses. *Food Microbiology*, 28(5), 1033–1040. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.009>
- Zhu, W. M., Liu, W., & Wu, D. Q. (2000), Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7. *Journal of Applied Microbiology*, 88(5), 877–886. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01027.x>