

**BALIKESİR YÖRESİNE AİT PEYNİRLERDEN İZOLE EDİLEN  
*LACTOBACILLUS* BAKTERİLERİNİN STARTER VE PROBİYOTİK  
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Kübra DİKBAŞ YILDIZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MART 2013**

**ANKARA**

Kübra DİKBAŞ YILDIZ tarafından hazırlanan “BALIKESİR YÖRESİNE AİT PEYNİRLERDEN İZOLE EDİLEN *LACTOBACILLUS* BAKTERİLERİNİN STARTER VE PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cumhuriyet ÇÖKMÜŞ

Biyoloji Anabilim Dalı, A.Ü.

Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü.

Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ

Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü.

Tez Savunma Tarihi: 08/03/2013

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Kübra DİKBAŞ YILDIZ

**BALIKESİR YÖRESİNE AİT PEYNİRLERDEN İZOLE EDİLEN  
LACTOBACILLUS BAKTERİLERİNİN STARTER VE PROBİYOTİK  
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI  
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Kübra DİKBAŞ YILDIZ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Mart 2013**

**ÖZET**

Laktik asit bakterileri doğada yaygın bulunurlar ve *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinsleri laktik asit bakterileri temsilcileridir. Laktik asit bakterileri topraktan, sudan, bitkilerden, atık ürünlerden ayrıca hayvanların ve insanların bağırsaklarından izole edilebilir. Bu bakterilerin yaptığı laktik asit fermantasyonu, farklı gıda maddelerinin yapımında uzun zamandan beri insanlar tarafından kullanılmıştır. Laktik asit tüm süt ürünleri, sosis, turşu, boza gibi birçok yiyecek ve içeceklerin üretiminde önemli rol oynar. Bu çalışmada, Balıkesir yöresi peynirlerinden izole edilen 15 adet laktik asit bakterisinin bazı teknolojik ve fonksiyonel özellikleri, farklı tuz ve pH konsantrasyonlarında gelişme yetenekleri, laktik asit üretim yetenekleri, antimikrobiyal aktiviteleri, antibiyotik duyarlılıkları, antioksidan ve antikolesterol aktiviteleri, EPS üretimleri incelenmiş ve 16S rRNA dizi analizleri yapılarak bakteriler tanımlanmıştır.

**Bilim Kodu** : 203.1.023  
**Anahtar Kelimeler** : *Lactobacillus* spp., Probiyotik, Starter özellikler.  
**Sayfa Adedi** : 83  
**Tez Yöneticisi** : Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

**STUDIES OF SOME STARTER AND PROBIOTIC PROPERTIES OF  
*LACTOBACILLUS* BACTERIA ISOLATED FROM CHEESE IN BALIKESİR  
REGION**

**(M. Sc. Thesis)**

**Kübra DİKBAŞ YILDIZ**

**GAZİ UNIVERSITY  
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

**March 2013**

**ABSTRACT**

Lactic acid bacteria are widely found in the nature. In this group are representatives of the Lactic acid bacteria *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* and *Leuconostoc*. They can be isolated from soils, waters, plants, waste products, and also from the intestinal tract of animals and humans. The lactic acid fermentation, which perform has long been known and applied by the humans for making different food stuffs. It plays an essential role in the production of all dairy products and is involved in the production of many other foods and drinks, sausages, pickles, boza etc. Of the fifteen lactic acid bacteria isolated from Balıkesir region cheeses some technological and functional properties, at the ability to grow different pH and salt concentrations, the ability of producing lactic acid, antimicrobial activity, antibiotic sensitivity, antioxidan and anticholesterol activities, EPS production are examined and bacteria is defined by performing 16S rRNA sequence analysis.

**Science Code : 203.1.023**  
**Key Words : *Lactobacillus* spp., Probiotic, Starter Properties.**  
**Page Number : 83**  
**Adviser : Prof. Dr. Yavuz BEYATLI**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca değerli ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, tecrübe ve eşsiz bilgilerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Yavuz BEYATLI' ya sonsuz teşekkür ederim. Kıymetli bilgilerinden faydalandığım sayın hocalarım Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ, Dr. Derya Önal DARILMAZ ve Arş.Gör.Betül AYDIN' a, tez çalışmalarım boyunca desteğini, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen , tüm Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışanlarına, manevi ve maddi destekleriyle hayatım boyunca yanımda olan annem ve babama, bana her zaman destek veren kardeşlerime, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, tüm sıkıntılarımı paylaşan eşime teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ .....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ .....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xiii
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	4
2.1. Peynirlerin Yapısı ve Laktik Asit Bakterilerinin Peynirdeki Önemi .....	4
2.2. Probiyotikler .....	6
2.2.1. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar .....	6
2.2.2. Probiyotik Mikroorganizmaların Seçim Kriterleri .....	8
2.2.3. Laktik asit bakterileri .....	9
2.2.4. <i>Lactobacillus</i> bakterilerinin genel özellikleri .....	10
2.2.5. Probiyotik bakterilerin etki mekanizmaları .....	12
2.3. <i>Lactobacillus</i> 'ların Farklı pH Değerlerinde Gelişme Yetenekleri .....	14
2.4. <i>Lactobacillus</i> 'ların Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Yetenekleri ..	15
2.5. Laktik Asit Üretimi .....	15
2.6. <i>Lactobacillus</i> 'ların Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimleri .....	16
2.7. <i>Lactobacillus</i> 'ların Antikolesterol Aktivitesinin Belirlenmesi .....	17
2.8. <i>Lactobacillus</i> 'ların Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi .....	19

**Sayfa**

2.9. <i>Lactobacillus</i> 'ların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi .....	20
2.10. <i>Lactobacillus</i> 'ların Antimikrobiyal Aktiviteleri .....	20
2.11. 16S rRNA Dizi Analizi .....	23
3. MATERYAL VE METOT .....	24
3.1. Materyal .....	24
3.1.1. Bakteri kültürleri .....	24
3.1.2. Besiyerleri .....	25
3.1.3. Bakterilerin muhafazası .....	26
3.1.4. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları .....	26
3.1.5. Araştırmada kullanılan test bakterileri .....	26
3.2. Metot .....	27
3.2.1. Bakterilerin muhafazası .....	27
3.2.2. <i>Lactobacillus</i> 'ların farklı pH değerlerinde gelişme yetenekleri .....	28
3.2.3. <i>Lactobacillus</i> 'ların farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme yetenekleri. 28	
3.2.4. <i>Lactobacillus</i> 'ların asit üretimi .....	28
3.2.5. <i>Lactobacillus</i> 'ların ekzopolisakkarit (EPS) üretimleri .....	29
3.2.6. <i>Lactobacillus</i> 'ların antikolesterol aktivitesinin belirlenmesi .....	30
3.2.7. <i>Lactobacillus</i> 'ların antioksidan aktivitesinin belirlenmesi .....	31
3.2.8. <i>Lactobacillus</i> 'ların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi .....	33
3.2.9. <i>Lactobacillus</i> 'ların antimikrobiyal aktiviteleri .....	34
3.2.10. 16S rRNA dizi analizi .....	35
4. DENEYSEL BULGULAR .....	36
4.1 16S rRNA Dizi Analizi ile <i>Lactobacillus</i> ların Tanımlanması .....	36
4.2 <i>Lactobacillus</i> 'ların Farklı pH Değerlerinde Gelişme Yetenekleri .....	39



**Sayfa**

4.3. <i>Lactobacillus</i> 'ların Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Yetenekleri ..	42
4.4. <i>Lactobacillus</i> 'ların Asit Üretimi .....	45
4.5. <i>Lactobacillus</i> 'ların Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimleri .....	46
4.6. <i>Lactobacillus</i> 'ların Antikolesterol Aktivitesinin Belirlenmesi .....	48
4.7. <i>Lactobacillus</i> 'ların Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi .....	52
4.8. <i>Lactobacillus</i> 'ların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi .....	53
4.9 <i>Lactobacillus</i> 'ların Antimikrobiyal Aktiviteleri .....	56
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	60
KAYNAKLAR .....	69
ÖZGEÇMİŞ .....	83

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar .....	7
Çizelge 2.2. Probiyotik mikroorganizmaların seçim kriterleri.....	9
Çizelge 2.3. Probiyotiklerin etkileri.....	12
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan laktik asit bakterisi kültürleri .....	24
Çizelge 3.2. MRS besiyeri .....	25
Çizelge 3.3. Nutrient sıvı besiyeri (Merck).....	25
Çizelge 3.4. Test bakterileri, temin edildiği kaynaklar ve inkübasyon sıcaklığı .....	27
Çizelge 4.1. Tanımlanan <i>Lactobacillus</i> 'ların peynir kaynakları.....	36
Çizelge 4.2. 16S rRNA analiz sonuçları .....	37
Çizelge 4.3. <i>Lactobacillus</i> 'ların farklı pH değerlerinde gelişme değerleri.....	40
Çizelge 4.4. <i>Lactobacillus</i> 'ların farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme değerleri..	43
Çizelge 4.5. <i>Lactobacillus</i> 'ların asit üretim miktarları .....	45
Çizelge 4.6. <i>Lactobacillus</i> 'ların MRS besi ortamında EPS üretimleri (mg/L).....	47
Çizelge 4.7. <i>Lactobacillus</i> 'ların % kolesterol giderim değerleri .....	50
Çizelge 4.8. <i>Lactobacillus</i> 'ların antioksidan aktivitesi .....	52
Çizelge 4.9. <i>Lactobacillus</i> 'ların CLSI kriterlerine göre antibiyotik duyarlılıkları ....	54
Çizelge 4.10. <i>Lactobacillus</i> 'ların antimikrobiyel aktivitesi sonucu zon çapları.....	58

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Mide-bağırsak sisteminde bulunan bakteriler.....	8
Şekil 3.1. DPPH reaktifinin kimyasal yapısı.....	31
Şekil 4.1. 16S rRNA analizi sonucu suşların tür dağılımını gösteren grafik.....	38
Şekil 4.2. <i>Lactobacillus</i> 'ların farklı pH değerlerinde gelişme grafiği .....	41
Şekil 4.3. <i>Lactobacillus</i> 'ların farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme grafiği .....	44
Şekil 4.4. <i>Lactobacillus</i> 'ların asit üretim miktarları grafiği.....	46
Şekil 4.5. <i>Lactobacillus</i> 'ların MRS besi ortamında EPS üretim miktarları grafiği ...	48
Şekil 4.6. <i>Lactobacillus</i> 'ların % kolesterol giderim değerleri grafiği.....	51
Şekil 4.7. <i>Lactobacillus</i> 'ların antioksidan aktivitesi grafiği .....	53
Şekil 4.8. Antibiyotiklere direnç gösteren <i>Lactobacillus</i> sayıları.....	58

**RESİMLERİN LİSTESİ**

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 2.1. Balıkesir Tulum Peyniri.....	5
Resim 2.2. Ayvalık Sepet Peyniri .....	5
Resim 2.3. Balıkesir Kelle Mihaliç Peyniri .....	5
Resim 2.4. <i>Lactobacillus brevis</i> .....	11
Resim 2.5. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	11
Resim 2.6. <i>Lactobacillus helveticus</i> .....	11
Resim 2.7. <i>Lactobacillus fermentum</i> .....	12
Resim 3.1. Antioksidan özellikli çözeltinin DPPH' in mor rengini yok etmesi .....	32
Resim 4.1. <i>Lactobacillus helveticus</i> suşunun penisilin duyarlılığı .....	55
Resim 4.2. <i>Lactobacillus fermentum</i> suşunun penisilin duyarlılığı .....	55
Resim 4.3. <i>L. rhamnosus</i> bakterisinin <i>B. cereus</i> üzerine antimikrobiyal etkisi .....	59
Resim 4.4. <i>L. helveticus</i> bakterisinin <i>E. coli</i> üzerine antimikrobiyal etkisi .....	59

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılan bazı simgeler ve kısaltmalar, aşağıda açıklamaları ile birlikte sunulmuştur.

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
cm	Santimetre
et al.	Ve arkadaşları
g	Gram
l	Litre
mL	Mililitre
mg	Miligram
mm	Milimetre
nm	Nanometre
$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
pH	Asitlik Bazlık Birimi
sp	Species
subsp	Subspecies (Alt Tür)
vd	Ve diğerleri
vs	Ve saire
%	Yüzde
<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
Bkz.	Bakınız
CPS	Capsular polysaccharides
dak.	Dakika
dev.	Devir
Eş.	Eşitlik

**Kısaltmalar****EPS****HePS****kob****L.****LAB****M.Ö.****MRS****OD****PAS****PBS****rpm****Açıklama**

Ekzopolisakkarit

Heteropolysaccharide

Koloni oluşturan birim

*Lactobacillus*

Laktik Asit Bakterileri

Milattan Önce

Man Rogosa Sharp besiyeri

Optikal Dansite

Peynir Altı Suyu

Fosfat Tampon Çözeltisi

Dakikada Devir Sayısı

## 1. GİRİŞ

Probiyotik fermente gıdalar gün geçtikçe önemini arttırmakta ve bu konuda yoğun araştırmalar sürdürülmektedir. Bu gıdaların besin ve sağlık değerlerinin yüksek nitelikte olduğu çalışmalarla kanıtlanmıştır. Birçok ülkede yeni geliştirilen probiyotik fermente süt ürünlerin üretiminde doğal kaynaklardan elde edilen üstün nitelikte starter ve probiyotik özelliği gösteren bazı *Lactobacillus* bakteri türlerinden yararlanılmaktadır. Birçok ülkede endüstriyel probiyotik peynirlerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Ülkemizde probiyotik peynirlerin üretimi, geliştirilme çalışmaları sınırlıdır. Ülkemizde geleneksel olmayan peynir çeşitlerinin üretiminde yurt dışından temin edilen starter bakteriler kullanılmaktadır. Geleneksel peynirlerin üretiminde starter bakterileri kullanılmamakta, sütte doğal kontaminant laktik asit bakterileri ile üretim sağlanmaktadır. Bu tip peynirlerde birçok farklı laktik asit bakterileri özellikle *Lactobacillus*'lar görev almaktadır. Ülkemizde tüm peynir çeşitlerin üretiminde 11 milyon ton süt kullanılmaktadır. Geleneksel olmayan peynirlerin üretimi %10-15 oranında olup, üretimde starter laktik asit bakterileri (LAB)'ler kullanılmamaktadır. Bu tip peynirlerin üretiminde standart üretim modeli uygulanmamakta ve peynir üretimi çiğ süttten gerçekleştirilmektedir. Bu tip peynirler kendisine özgün tad ve aroma göstermektedir ve yaklaşık olarak ülkemizde 160 çeşidi vardır [2].

Geleneksel peynirlerin üretiminde çiğ süte bulaşan birçok kontaminant ve *Lactococcus*, *Tetracoccus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* cinslerine dahil olan pek çok laktik asit bakteri (LAB) türleri bulunmaktadır.

Probiyotik mikroorganizmalar, konak için tehdit oluşturan viral, bakteriyel yada fungal etkilere karşı bir bariyer olarak işlev görür. Bağırsakta bulunan probiyotik laktik asit bakterilerinin çeşitli hastalıklara karşı vücudu koruduğu bilinmektedir. Sindirim sistemindeki probiyotik bakteriler tarafından üretilen laktik asit ve asetik asitten dolayı pH' nın düşmesi, patojen bakteriler üzerinde bakterisidal veya bakteriostatik etki yapar [1].

Probiyotik kelimesi Yunanca’ da “yaşam için” anlamına gelmektedir. İlk kez 1965 yılında Lilly ve Stillwell tarafından, bir protozoa tarafından sentezlenen, bir diğer protozoanın gelişimini teşvik eden bir maddeyi tanımlamak için kullanılmıştır. Genel anlamıyla probiyotikler, insan ve hayvanların doğal mikroflorasına ait özellikleri geliştiren, tüketimleri sonucunda ağızda, sindirim sisteminde, üst solunum yollarında ya da ürogenital kanallarda yararlı etkileri ile konakçının sağlığını koruyan, buralarda oluşan enfeksiyonların iyileşmesine katkıda bulunan, tek veya karışık mikroorganizma kültürleridir [3].

Probiyotikler, bağırsak florasına faydalı olmak ve bağışıklık sistemini aktive etmek amacıyla insan ve hayvanlar tarafından tüketilen canlı mikroorganizmalardır. Peynir gibi fermente ürünler ile birlikte tüketilen probiyotik bakteriler bağırsak mikroflorasının düzenlenmesinde en ideal yol olarak düşünülmüştür. [4].

Probiyotik bakterilerin insan sağlığına faydalı olabilmesi için bağırsak epiteline kolonize olabilmeleri gerekir. Laktik asit bakterileri, birbirlerine ve epitele tutunarak patojenlerin epitele tutunmasını ve kolonize olmasını engelleyen bir biyolojik bariyer oluştururlar. Bunun yanında birçok LAB’si patojenlerle koagregasyon olabilmektedir. Böylece, patojenlere daha kolay etki ederek bağırsağa bu bakterilerin kolonize olmasını ve üremesini engellemiş olurlar. Mikroorganizmalarda, otoagregasyon ve koagregasyon mekanizmaları ve etki eden faktörler, birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Mikroorganizmaların hücre duvarı ve yüzeyinde bulunan bir polimer olan ekzopolisakkarit (EPS), agregasyondan sorumlu olduğu birçok kaynakta bildirilmektedir [5,6].

Bir bakterinin probiyotik olarak kullanılabilmesi için; konakçının mide-bağırsak sistemindeki olumsuz koşullarında (asit, safra tuzları) yüksek seviyede canlılığını koruyabilmeli ve epitel yüzeye tutunabilme yeteneğinin yüksek olmalıdır. Probiyotik kültürlerin özellikle bağırsak sistemi için risk oluşturan patojen bakteriler üzerine inhibisyon ve koagregasyon özelliğine sahip olması, probiyotik kültürlerin kolonizasyonuna ve ortamdaki olumsuz şartlara karşı direnç sağlaması, antikolestrol ve antitümör etkileri bakımından önemli olan EPS’yi yüksek oranda üretmesi tercih



edilmektedir. Ayrıca starter ve probiyotik bakteri kültürlerinin gelişimini olumsuz etkilediği düşünölen ve klinikte kullanımı yaygın olan bazı antibiyotiklere karşı dirençli olması gereklidir. Bu çalışmada *Lactobacillus* cinsi bakterilerin probiyotik özellikleri incelenecektir.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Peynirlerin Yapısı ve Laktik Asit Bakterilerin Peynirlerdeki Önemi

Genel bir tanımla peynir, sütün ısıtılması, starter kültür ilave edilmesi, proteolitik enzimlerle muamele edilerek pıhtılaştırılması, pıhtının süzülerek peynir altı suyundan (PAS) ayrılması, telemenin tuzlanarak ve baskılanarak şekillendirilmesi ile elde edilen, taze veya olgunlaşmış halde tüketilen besleyici bir süt ürünüdür. Her peynir çeşidinin kendine özgü renk, koku, tat, yapı, gözenek, kabuk gibi özelliklerinin oluşmasında bazı unsurlar vardır. Bunlar kullanılan ham madde, uygulanan tekniklerdir.

Jamal S.Y. Haddadin, (2005) yaptıkları çalışmalarında 18 adet geleneksel beyaz peynirlerde bulunan heterofermentatif *Lactobacillus* türlerinin bulunma sıklıklarını ve starter olma özelliklerini araştırmışlardır. Bu peynirlerde bulunan bakterilerin *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei* ve *Lactococcus lactis* bakterileri olduğunu belirtmişlerdir [7]. Olgunlaşma; çeşitli enzimlerin ve mikroorganizmaların etkisiyle karmaşık biyokimyasal reaksiyonların gerçekleştiği bir süreçtir [8].

Salamura beyaz peynir koyun sütünden, koyun ve inek sütü karışımından yapılabildiği gibi sırf inek sütünden de üretilebilir. Son yıllarda inek sütü kullanımı daha yaygındır [9].

Araştırmalarda pastörize süttten elde edilen peynirlerin üretiminde starter olarak *Lactobacillus paracasei* + *Lactobacillus plantarum* karışık kültürlerin kullanımı araştırılmıştır. Elde edilen serbest amino asitler ile uçucu aromatik bileşiklerin olumlu yönde arttığını gözlemlemişlerdir [10]. Kaşar peynirlerde rastlanılan *Lactobacillus* bakterilerin varlığı üzerinde de yapılan bir araştırmada 60 adet *Lactobacillus* cinsine dahil olan bakteriler kaşar peynirlerden izole edilmiştir.

Bu izolatların 40 adedi *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* olarak tanımlanırken, diğ er 20 adedi *Lb. casei*, *Lb. paracasei* ve *Lb. coryniformis* olarak belirlenmiştir [11].



Resim 2.1. Balıkesir Tulum Peyniri



Resim 2.2. Ayvalık Sepet Peyniri



Resim 2.3. Balıkesir Kelle Mihaliç Peyniri

## **2.2. Probiyotikler**

‘‘Probiyotik’’ terimi ilk olarak 1954 yılında Ferdinand Vergin tarafından antibiyotik ve flora üzerindeki diğer antimikrobiyal maddelerin patojen olmayan bakterilerin yararlı etkileriyle ilişkisinin anlatıldığı ‘‘Anti-und Probiotika’’ isimli makalede kullanılmıştır [12,13].

Probiyotiklerin en çok kabul gören tanımları Roy Fuller (1989) tarafından ‘tüketici sağlığına, bireylerin bağırsak mikrobiyal dengesini koruyarak veya geliştirerek yararlı olan canlı mikrobiyal gıda katkılarıdır’ şeklinde yapılmıştır [13].

‘‘Probiyotik ürün’’ tanımı ise; içerisinde konakçı sağlığı üzerine olumlu etkileri olan mikroorganizmaları içeren, çeşitli enzim, vitamin ve aroma bileşenleri ile desteklenerek doğrudan kapsül veya tablet haline getirilmiş diyet destekleyiciler (farmasötikaller) anlaşılmaktadır [14-16].

Fermente gıdalar ile sağlıklı yaşam arasındaki bu bağlantı bulunmuştur ve günümüzde de geçerliliğini korumaktadır. [15,16].

Geleneksel olarak probiyotikler yoğurtla birleştirilmiştir ama son zamanlarda süt, dondurma, peynir ve peynirden elde edilen ürünler ve süt ürünlerinin yanı sıra mayonez, et, sosis, salam, meyve suları ve yulafli ürünler gibi bir çok gıda maddesine katılmıştır [17].

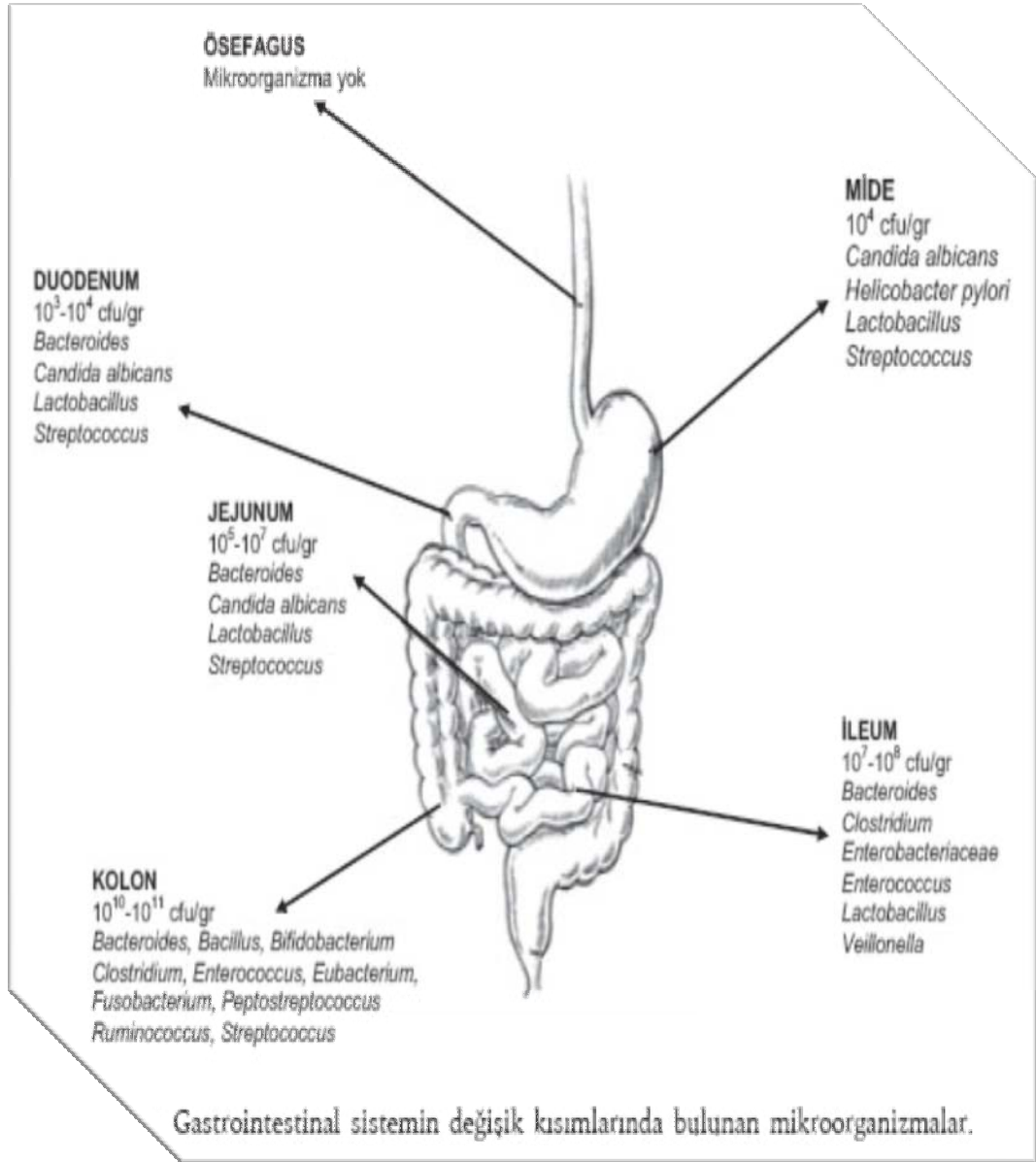
### **2.2.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar**

Probiyotiklerin en yaygın olarak kullanılanları bifidobakteriler ve laktik asit bakterileridir. Özellikle laktobasiller birinci sırada probiyotik olarak kullanılan bakterilerdir [18-20,22].

Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar Çizelge 2.1.’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1.Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar

Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar						
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Pediococcus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.	Diğerleri
<i>Lactobacillus delbreckii</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Streptococcus cremoris</i>	<i>Pediococcus cerevisiae</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Lactobacillus ellobiosus</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Lactococcus</i> subsp. <i>Cremoris</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bacteriodes apillous</i>
<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Streptococcus intemedius</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>			<i>Leunostoc mesenteroides</i>
<i>Lactobacillus cidophilus</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Streptococcus lactis</i>				<i>Escherichia coli</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>				<i>Propionobacterium shermanii</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>					
<i>Lactobacillus casei</i>						
<i>Lactobacillus curvatus</i>						
<i>Lactobacillus fermentum</i>						
<i>Lactobacillus plantarum</i>						
<i>Lactobacillus helveticus</i>						

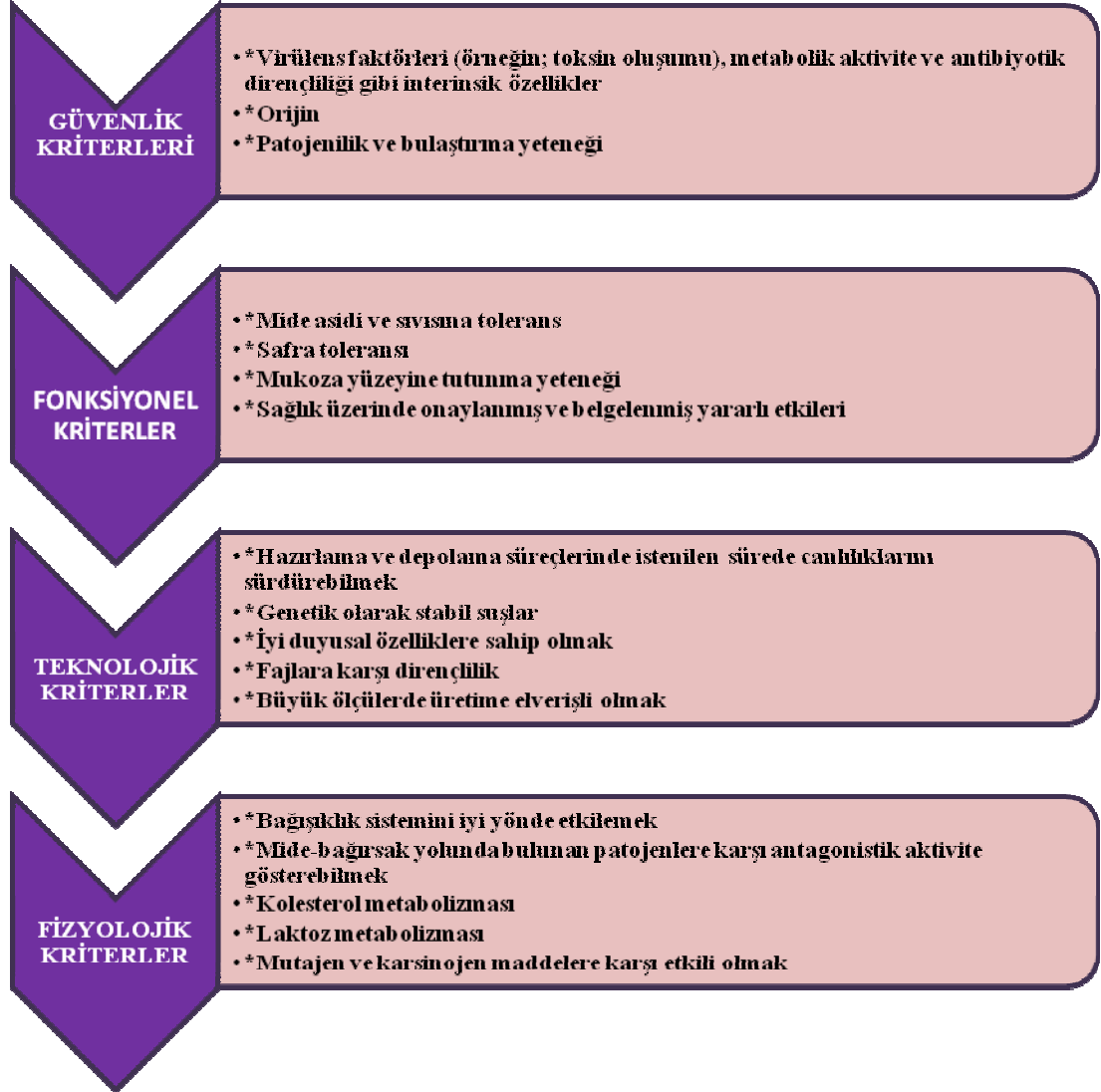


Şekil 2.1. Mide-bağırsak sisteminde bulunan bakteriler [21].

### 2.2.2. Probiyotik mikroorganizmaların seçim kriterleri

Probiyotik mikroorganizmaların seçiminde önemli olan kriterler güvenlik, fonksiyonel, teknolojik, fizyolojik kriterler olmak üzere dört ana gruba ayrılmıştır. Probiyotik mikroorganizmaların seçim kriterleri Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir [23,24].

Çizelge 2.2. Probiyotik mikroorganizmaların seçim kriterleri



### 2.2.3. Laktik asit bakterileri

Fermente gıda üretimi çok eski bir yöntemdir. Ancak buna rağmen, 1861 yılında mikroorganizmaların fermantasyon ile olan ilişkisi Louis Pasteur tarafından pastörizasyonun bulunmasıyla anlaşılmıştır [25].

Fermente gıdaların elde edilmesinde mikroorganizmalar önemli rol oynamaktadır. Bakterilerin gıda fermantasyonu ile olan ilişkisinin anlaşılmasından itibaren laktik asit bakterilerine olan ilgi artmıştır [26].

Laktik asit bakterileri, gram pozitif, spor oluşturmeyan, katalaz negatif, sitokroma sahip olmayan, asidi tolere edebilen ve karbohidrat fermentasyonu sırasında başlıca son ürünü laktik asit olan bakterilerdir. [27].

Laktik asit bakterileri (LAB) içerisinde *Streptococcaceae* familyasına ait *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* ve *Pediococcus* cinsi ile *Lactobacillaceae* familyasındaki *Lactobacillus* türleri bulunur [28,29].

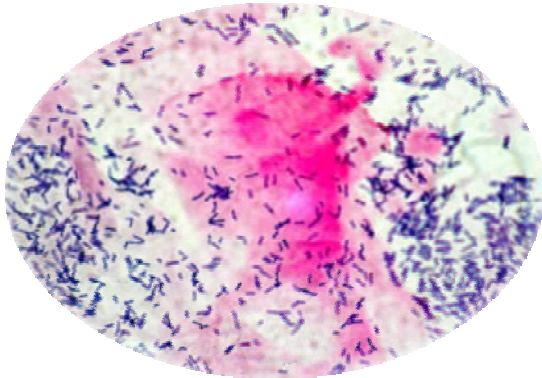
#### **2.2.4. *Lactobacillus* bakterilerinin genel özellikleri**

*Lactobacillus* cinsleri çomak şeklinde hürelere sahiptir. Hücreler düzgün veya hafif kıvrık, bazı türlerde T, Y ve V şeklindedir. Çomakların uçları düzgünce yuvarlanmış, uzun kenarlar birbirine paralel durumdadır. Hücreler türe göre tek veya çift olarak bulunabilmekte, bazılarında kısa veya uzun zincirlere rastlamak da mümkün olmaktadır [30].

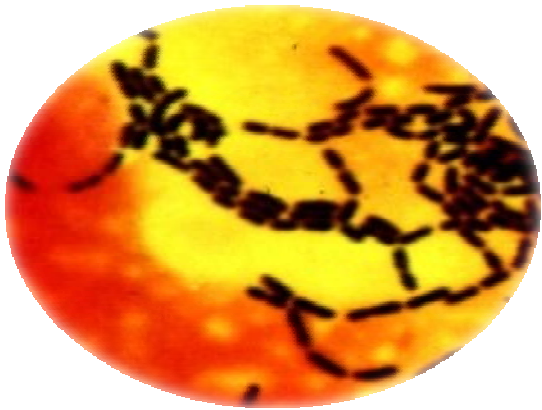
*Lactobacillus* cinsleri fermentasyon karakterlerine göre zorunlu homofermantatif, zorunlu heterofermantatif ve fakültatif heterofermantatif olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır [31].

*Lactobacillus* cinslerinin gelişme sıcaklıkları 2-53 °C, optimum gelişme sıcaklıkları ise 30-40 °C arasındadır. Optimum pH'ları 5,5-6,2'dir. Bununla birlikte gelişmenin 5,0 veya altındaki pH'larda gerçekleştiği görülür. Alkali pH'larda gelişme yetenekleri düşüktür [32].

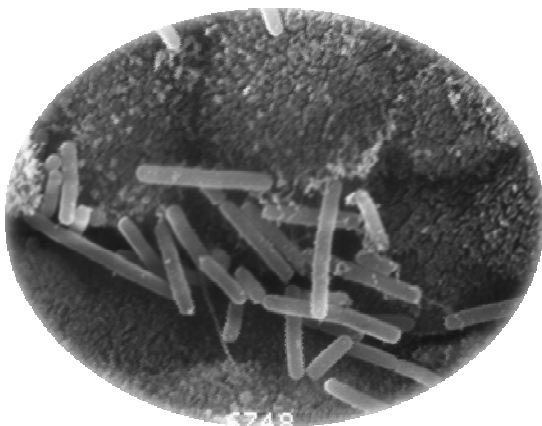




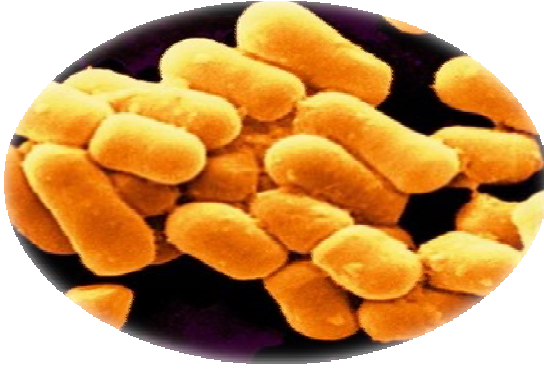
Resim 2.4. *Lactobacillus brevis* [67]



Resim 2.5. *Lactobacillus rhamnosus* [68]



Resim 2.6. *Lactobacillus helveticus* [69]

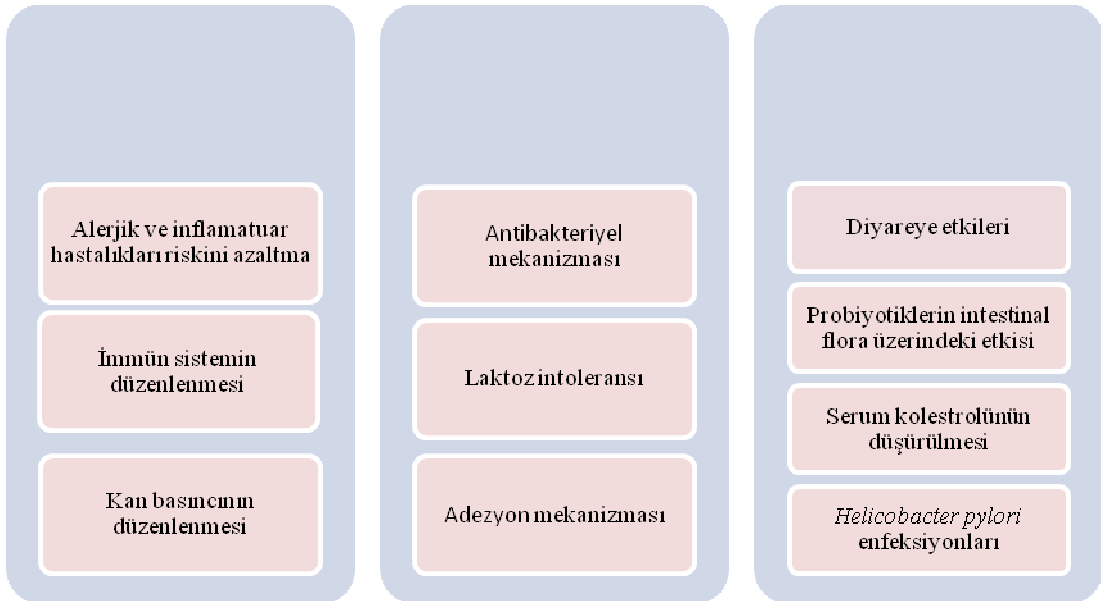


Resim 2.7. *Lactobacillus fermentum* [70]

### 2.2.5. Probiyotik bakterilerin etki mekanizmaları

Probiyotik bakterilerin ürettikleri organik asitler, bakteriyosin, hidrojen peroksit gibi etken maddeler üretebilme, kolonize olabilme, mikrobiyal toksinlerin etkilerini inhibe edebilme gibi özelliklerinden dolayı insan sağlığı üzerine olumlu etkileri vardır. Probiyotik bakterilerin sağlık üzerindeki yararlı etkilerinden bazıları Çizelge 2.3.'te gösterilmiştir [33,34].

Çizelge 2.3. Probiyotiklerin etkileri



Probiyotikler konakçının ağız ve sindirim sistemi dâhil, üst solunum yolu ve ürogenital sistem mukozal yüzeyini etkileyerek sağlığı geliştirici, hastalık riskini azaltıcı potansiyel etkiye sahip olduğu bilinmektedir [35].

Yaşlı hipertansif bireyler üzerinde yapılan çalışmalarda 8 hafta süreyle fermente edilmiş süt tüketiminin sistolik ve diastolik kan basıncını önemli derecede azalttığı bildirilmiştir. Bu çalışmalar sonucu probiyotik bakterilerin hipertansiyonu düşürmek için alternatif bir yaklaşım olabileceği belirlenmiştir [15].

Bazı kan lipidlerinin yüksek düzeye varması kalp damar hastalıkları açısından risk faktörü oluşturabilir. Araştırmalar, kültürlü fermente süt ürünleri tüketiminin, serum kolesterol değerinin düşmesine yardımcı olduğunu göstermiştir [15,36].

Laktoz direkt olarak bağırsaktan absorbe edilemediğinden, glukoz ve galaktoz gibi basit şekerlere hidrolize olması gerekmektedir. Laktoz intoleransı olan kişiler yoğurt ve ayranı daha rahat tüketebildikleri gibi probiyotik mikroorganizma içeren süt ürünlerini de kullanabilirler. *Lactobacillus acidophilus* içeren sütle beslenmenin laktozun sindirilmesinde etkili olduğu ve bununla *L. acidophilus*' un bağırsaktaki işlevinden kaynaklandığı bildirilmiştir [37].

*Helicobacter pylori*, insan ve diğer primatların midesine yerleşen kronik gastrit ve peptik ülser hastalıklarına neden olan bir bakteridir [38]. Bazı laktik asit bakterileri, ile fermente edilen süt, *H. pylori* üzerinde antibakteriyel etkiye sahiptir [39].

Probiyotiklerin antibiyotik kullanımına bağlı gelişen diyareye engel olduğuna dair bilgiler mevcuttur. Probiyotikler, kolondaki florayı düzelterek ve immun sistemi stimüle ederek antibiyotiğe bağlı diyarenin önlenmesinde etkili olurlar [40].

Probiyotik suşlar hidrojen peroksit, organik asit, bakteriosin gibi maddeler salgılayarak, patojen mikroorganizmaların çoğalmasını inhibe ederler [41,42].

Probiyotiklerin patojen mikroorganizmalara karşı intestinal sistemde bir bariyer oluşturarak, epitelyum hücrelerinin bu mikroorganizmalarla bağlanma derecesini azalttığı düşünülmektedir [41].

Probiyotikler mukus katmanı ve epitelyal hücrelerdeki sınırlı sayıdaki yerler için ayrıca besin maddeleri için patojen bakterilerle yarışmalar [43].

### 2.3. *Lactobacillus*'ların Farklı pH Değerlerinde Gelişme Yetenekleri

Her mikroorganizmanın gelişebildiği bir optimum, minimum, maksimum pH değeri vardır. Mikroorganizmaların gelişebildiği pH aralığı türlere, ortama, çevre faktörlerine bağlı olarak değişmektedir. *Lactobacillus* türleri gelişme ortamındaki sitrik, hidroklorik, fosforik ve tartarik asitlerin varlığında, asetik asit ve laktik asit varlığına kıyasla daha düşük pH değerlerinde gelişebilmektedir. Uygun olmayan pH değerlerinde mikroorganizmaların hücre geçirgenliğini, Deoksiribonükleik asit (DNA), Ribonükleik asit (RNA) ve bazı enzimlerin fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilemektedir [71].

Adnan ve Tan (2007), iki geleneksel Malezya ürününden ve kırmızı biber püresinden izole edilen laktik asit bakterileri arasında, pH 4,5, pH 7,0 ve pH 9,0'da *L. brevis* ve *L. plantarum* türlerinin geliştiğini belirtmişlerdir [72].

Kıran (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, hazır gıdalardan izole edilen ve çeşitli kültür koleksiyonlarından temin edilen laktik asit bakterilerinden hiçbirinin pH 2.0 ve pH 3,0'da gelişemediği; pH 4,0, pH 5,0 ve pH 6,0'da hepsinin geliştiği belirtilmiştir. pH 9,6'da *P. pentocaceus* türlerinin bir kısmının geliştiği bazılarının zayıf gelişme gösterdiği, *L. plantarum*, *L. brevis* ve *L. fermentum* türlerinin geliştiği; *Leuconostoc* suşlarının ise zayıf gelişme gösterdiği belirtilmiştir [73].

Tangüler (2010) tarafından şalgam suyundan izole edilen *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* cinslerinin pH 4,0'da gelişme gösterdiği fakat pH 9,6'da hiçbir bakterinin gelişme gösteremediği belirtilmiştir. [74]

#### 2.4. *Lactobacillus*'ların Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Yetenekleri

Tuz konsantrasyonu, fermantasyonun gidişini yönlendiren ve son ürün kalitesini etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Düşük tuz konsantrasyonlarında (% 5-8) fermantasyon hızlı gerçekleşirken, yüksek tuz konsantrasyonlarında (% 10 ve üzeri) yavaş olarak gerçekleşir veya hiç gerçekleşmez.

Tuz konsantrasyonunun fermantasyonda rol alan mikroorganizmaların faaliyetleri üzerine etkisi seçici özellik göstermektedir. Bu bakımdan ürüne ve uygulamaya göre ayarlanması önem taşır. Tuzlama işlemi doğrudan ya da salamura şeklinde uygulanmaktadır [75].

Kıran (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, hazır gıdalardan izole edilen ve çeşitli kültür koleksiyonlarından temin edilen laktik asit bakterilerinin, % 4 tuzda hepsinin geliştiği, % 6,5 tuzda 5 tanesi hariç diğerlerinin geliştiği, % 12 tuzda 4 tanesinin zayıf gelişme gösterdiği diğerlerinin gelişemediği, % 18 tuz konsantrasyonunda ise hiçbirinin gelişemediği belirtilmiştir [73].

Bulut (2003) tarafından yapılan çalışmada, 9 adet *Lactobacillus* cinsinin % 6,5 tuz konsantrasyonunda gelişebildiği belirtilmiştir [27].

İşleroğlu vd. (2008), probiyotik bakterilerin % 3, % 4 ve % 6,5 tuz konsantrasyonlarında gelişebildiğini fakat % 10 tuz konsantrasyonunda gelişemediği belirtmişlerdir. [76].

#### 2.5. Laktik Asit Üretimi

Laktik asit; LAB' lerinin en önemli son ürünlerinden biri olup laktik asit fermantasyonu sırasında oluşan temel bir metabolittir. Düşük pH değerlerinde, fazla miktarda laktik asit dissosiyeye olmamış yapıda bulunmaktadır ve bu nedenle birçok bakteri, küf ve maya için toksik etki göstermektedir. Farklı mikroorganizmalar laktik aside karşı değişik duyarlılık gösterebilmektedir. Örneğin, pH 5.0 değerinde laktik

asit spor formunda bakterilere inhibitör etki gösterirken, maya ve küflere karşı etkisiz olabilmektedir.

Laktik asit bakterileri tarafından karbohidratlar fermente edilerek laktik asit oluşturulmaktadır [64].

## **2.6. *Lactobacillus*'ların Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimleri**

LAB'lerin ürettiği bazı EPS' nin, bağışıklık sistemi uyarıcısı, anti-ülser ve kolesterol düşürücü aktiviteler gibi sağlığa yararlı özellikler de gösterdiği belirtilmiştir [77].

Belirli LAB'leri, hücre yüzeyine kuvvetlice bağlanan kapsüler polisakkaritler (CPS, capsular polysaccharides) ve hücre dışı ortamına salgılanan eksopolisakkaritler (EPS) olarak iki grup altında toplanan EPS'ler üretmektedirler. Eksopolisakkaritler yapısal olarak homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler (HePS) olarak iki gruba ayrılırlar. Yapısında sadece bir tür monosakkarit içeren polimerler, homopolisakkarit ve iki veya daha fazla monosakkarit türü içeren polimerler ise heteropolisakkarit (HePS) olarak adlandırılmıştır [78].

LAB'lerin ürettiği eksopolisakkaritler diğer polisakkaritler gibi viskozite arttırıcı, stabilizator, jel oluşturucu ve su toplama özelliklere sahiptir. Bundan dolayı farklı gıdaların üretiminde rol alarak, gıdalara arzu edilen özellikleri kazandırmaktadırlar. Diğer taraftan, eksopolisakkarit üretimi probiyotiklerin bağırsak yüzeyine kolonize olup canlılığını devam ettirebilmesini sağlayan önemli bir özelliktir. *Lactobacillus* bakterileri de diğer birçok bakteri gibi eksopolisakkarit üretme yeteneğine sahiptirler [77-79].

EPS üretebilen suşlar epitele yüksek kapasitede yapışma özelliğini taşımaktadırlar. EPS'yi enerji kaynağı olarak kullanamazlar. Bakteriler tarafından üretilen EPS'lerin bazı türlerde kromozomal DNA kaynaklı, bazı türlerde ise plazmid DNA tarafından kodlandığı saptanmıştır [80-85].

## 2.7. *Lactobacillus*'ların Antikolesterol Aktivitesinin Belirlenmesi

Yüksek kolesterol kalp-damar hastalıkları ile bağlantılıdır. Bu nedenle, serum kolesterol seviyelerinin düşürülmesi, kalp-damar hastalıklarının önlenmesi bakımından büyük önem taşımaktadır [86]. Bugüne kadar gerçekleştirilen çeşitli çalışmalar, bağırsaktaki *L. acidophilus*, *B. bifidum* ve *L. bulgaricus* bakterilerinin kolesterol seviyelerini belirgin bir şekilde düşürdüğünü göstermiştir [87]. Laktik asit bakterilerinin serum kolesterol konsantrasyonlarının azalttığına dair olumlu sonuçlar elde edilmiştir [88]. Probiyotiklerin kolesterol konsantrasyonunu azaltabilmelerini sağlayan mekanizma tam olarak belirlenememekle birlikte, bu konuda çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür [89].

Probiyotik seçiminde kullanılan diğer bir kriter ise suşların safra tuzlarına direnç özellikleridir [90]. Safra, gerektiği zaman doğrudan safra kanalı yoluyla karaciğerden onikiparmak bağırsağına geçer veya sindirim için hemen gereksinim yoksa safra kesesinde depolanabilir. Bağırsakta yağları çözücü ajanlar olarak işlev görebilirler. Böylece diyetle alınan lipitlerin, pankreasın sindirim enzimleri tarafından yıkılması için yardımcı olurlar [91].

Safra tuzları kolesterolün suda çözünebilen son ürünüdür [92]. Safra asitleri karaciğerde, kolesterolden sentezlenerek safra kesesine iletilmekte, oradan da konjuge formunda, günde 500-700 mL miktarında ince bağırsağa salgılanmaktadır. Daha sonra safra asitleri kalın bağırsağa geçip orada mikrobiyal aktivite sonucu tamamen kimyasal değişimlere uğramaktadır [93].

Yapılan in vitro çalışmalarla bifidobakterler ile laktobasillerin safra tuzlarına dirençleri karşılaştırıldıklarında bifidobakterlerin daha dirençli oldukları ancak direncin türe bağlı olarak değiştiği belirtilmektedir. Charteris ve ark., [1998] ise *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*'un probiyotik olabilecek suşlarının bağırsak sisteminden geçiş toleranslarını in vitro olarak inceledikleri araştırmalarında; gastrik ortamda pH 2'de, sadece bir laktobasil suşunun (*L. fermentum*) dirençli olduğunu

ancak, ortama süt proteinleri katılarak yapılan denemede ise *L. casei* 2123 ve *B. infantis* 25962 suşlarının %100 geçiş toleransı gösterdiklerini belirlemişlerdir [94].

Vinderola ve Reinheimer [2003]'a göre, safra tuzlarının varlığı probiyotik organizmalara göre laktik asit bakterileri için daha fazla inhibe edici etkiye sahiptir. *Lactococcus lactis* suşları %1 safra tuzuna az ya da çok dirençli bulunmuştur. *L. acidophilus* en iyi gelişimi gösterirken, bunu *L. casei*, *L. rhamnosus* ve bifidobakterler takip etmektedir. Safra tuzuna tolerans suşların ince bağırsağın üst kısımlarında canlılığı ve gelişimi açısından önemlidir. [95].

Probiyotik bakterilerin serum kolesterolünü düşürücü etkileri ve mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Probiyotik bakteriler ile üretilen fermente süt ürünlerinin veya bu bakterilerin canlı hücrelerinin vücuda alınması ile insanlarda düşük kolesterol düzeyinin oluşturmasının  faktörden kaynaklandığı bildirilmiştir; [96,97].

- Bazı bağırsak bakterileri gıdalarla alınan kolesterolü metabolize ederek, kana geçişini azaltmaktadır.
- Bakteriler bağırsaklarda kolesterol öncül maddelerini veya kolesterolü azaltmaktadır.
- Bazı laktobasillerin safra tuzlarını parçalamasıyla safra tuzlarının karaciğer tarafından emilmesi engellenmektedir. Böylece safra tuzu absorbe edemeyen karaciğerin, safra tuzu sentezlemek için fazla miktarda serum kolesterolünü kullanması sonucunda serumda kolesterol miktarı azalmaktadır.

Sindirim sisteminde bulunan mikroorganizmalar, lipitlerin sindiriminde ya direkt olarak lipit içeren besinler üzerinde lipolitik aktiviteleriyle veya endojen lipitler indirekt olarak safra tuzlarını ve kolesterol metabolizmasını modifiye ederek aktivite gösterirler [98,99].

Yapılan bir çalışmada *E. faecium* ve *Lactobacillus jugurti* suşlarının bir arada kullanılması laboratuvar ortamında kolesterol düzeyinin %43 oranında düşmesine neden olmuştur [100].



## 2.8. *Lactobacillus*'ların Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi

Antioksidanlar, diğ er molekül lerin oksidasyonunu engelleyen veya geciktiren bileşik ler olup bunu, oksitleyici zincir reaksiyonlarının başlam asını veya çoğ almasını engelleyerek gerçekleştirirler .Antioksidan özellik gösteren bir kimyasal bileşik, diğ er kimyasala oksijen bağ lanmasına engel olur veya kimyasalın elektron kaybetmesini engeller. Antioksidanlar oksitlenmeye karşı koruma sağ lar. Bu nedenle antioksidanlara kısaca “indirgeyici ajanlar” da denilmektedir [101].

Antioksidanlar biyolojik sistemlerde çok düşük deriş imlerde bile lipit, protein, DNA ve karbonhidrat gibi okside olabilen substrat ile karşı laşt ığında substratın oksidasyonunu geciktiren veya önleyen madde olarak tanımlanmaktadır [102]. Antioksidanlar lipit oksidasyonunda serbest radikal içeren yağ lara elektron veya hidrojen vererek veya yağ zinciri ile bir serbest radikal arasında kompleks oluşturarak serbest radikal zincirine son veren bileşik ler olarak da tanımlanırlar [103].

Canlılarda, kimyasal süreçler, özellikle oksitlenme, serbest radikallerin oluş masına neden olur. Yüksek derecede reaktif olan serbest radikaller farklı moleküller ile kolayca reaksiyona girebilir ve böylece hücrelere, canlıya zarar verebilirler [104].

Antioksidanlar, kendi elektronlarını vererek serbest radikalleri nötrale eder ve elektron verdikleri halde kendileri serbest radikallere dönüşmezler, çünkü antioksidanlar her iki formda da kararlıdırlar [105]. Antioksidanlar gıda endüstrisinde oksidasyon prosesini geciktirmek için kullanılmaktadır [106]. Antioksidanların kullanımı ile aktivasyon enerjisini antioksidan molekülü kullanmakta, bu enerjiyi baş ka moleküllere aktaramamaktadır. Antioksidan moleköl ünün araya girmesi ile oksidasyon yavaş lamış kısmen durdurulmuş olmaktadır [107,108]. Antioksidanlar, lipit oksidasyonu boyunca metal iyonlarını bağ layarak, radikalleri gidererek ve peroksitleri bozarak değ iş ik şek ilerde hareket ederek oksidasyonu durdurmakta veya önlemektedirler [109]. Antioksidan aktivite yaşamımız için önemli olan temel bir özelliktir ve birçok biyolojik fonksiyon kaynağ ını bu özellikten almaktadır [110].

Yapılan bir çalışmada soya sütlü kefir, önemli antimitojenik ve antioksidan aktivite özellikleri sergilemiştir [111]. Laktik asit bakterileri süperoksit anyonunu ve hidrojen peroksidi indirgeme özelliğine sahiptirler [113].

Virtanen ve ark., (2006) süt serumunun 25 farklı laktik asit bakterilerinin suşları ile fermentasyonu sırasındaki antioksidan aktivite gelişimini incelemiştir. Kullanılan tüm laktik asit bakteri suşları radikal indirgeme aktivitesi sergilemiştir. Bunlardan *Lactobacilli* ve *Leuconostoc* genel olarak *Lactococci* suşlarından daha yüksek aktivite göstermiştir [114].

Kudoh ve ark. (2001)'nin yürüttüğü başka bir çalışmada *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* IFO 13953 ile fermente edilmiş süttten izole edilen  $\kappa$ -kazeinin özellikle Ala-Arg-His-Pro-His-Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met dizilimindeki peptidinin DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) radikalini indirgeme aktivitesi sergilediği rapor edilmiştir [115].

## **2.9. *Lactobacillus*'ların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi**

Probiyotiklerin bağırsak sisteminde bulunabilen patojen bakteriler üzerinde antagonistik etkileri önemlidir. Probiyotik bakterilerin bağırsak sisteminde yaşam ve bulunabilmeleri önemlidir. Bu bakterilerin pH, safra tuzlarına karşı tolerans ve dayanıklılıkları ile birlikte çeşitli antibiyotiklere karşı dirençlilikleri de seçimde önemli görülmektedir [116]. Probiyotik bakterilerinin doğal insan florasındaki olumlu etkileri düşünüldüğünde üstün özelliklere sahip bazı suşların hastalıkların tedavisinde antibiyotiklere alternatif olarak kullanılması düşünülmektedir [15].

## **2.10. *Lactobacillus*'ların Antimikrobiyal Aktiviteleri**

Gıdalarda, sadece gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaları inhibe etmek veya raf ömrünü uzatmak için kullanılan ve gıdanın duyuşal özelliklerinde değişime sebep olmayan antogonistik kùltürlere koruyucu kùltürler denilmektedir [117].

Laktik asit bakterilerinin diğerk mikroorganizmalara karşı gösterdikleri antagonistik aktivite, ürettikleri laktik asit, asetik asit, hidrojen peroksit, bakteriyosin, diasetil, alkol ve karbondioksit gibi metabolitlerden kaynaklanmaktadır. LAB'ın temel antimikrobiyel etkisi laktik asit üretimi ile pH'daki düşüş olarak belirtilmektedir [118].

Erdoğrul vd. (2002) tarafından fermente sucuklardan izole edilen 4 adet *L. pentocaceus* türünün genel inhibisyon etkileri incelenmiş; yalnızca bir türün *Bacillus subtilis* üzerinde etkili olduğu gözlenmiş, dört suşun da *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatus*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir [119].

### Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Antimikrobiyel Bileşikler

#### Organik asitler

Organik asitlerin mikroorganizmalar üzerine inhibitör olarak tesir etmesi, asitin sahip olduğu farklı üç potansiyel etkiye bağlanmaktadır:

1. Güçlü asitler, hücre yüzeyinde var olan enzimler üzerinde de düşük pH nedeniyle, enzimleri denatüre ederek inhibitör etkide bulunabilmektedir
2. Zayıf asitler; sitoplazmik pH'yı düşürürler ve doğrudan disosiyeye olmamış yapılar da metabolizma üzerine özel inhibitör etkiye sahiptir.
3. Süfit, nitrat, karbonat gibi asit potansiyelli iyonlar düşük pH'da potansiyel inhibitördür [118,120].

Lindgren ve Dobrogosz (1990) tarafından yapılan bir çalışmada, farklı pH aralıklarında disosiyeye olmamış yapıda olan laktik asidin *Enterobacter* sp., *Clostridium tyrobutyricum* ve *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*'ye karşı minimum inhibitör konsantrasyon değerlerinin farklı olduğu belirtilmiştir [121].

### Karbondioksit

LAB tarafından üretilen karbondioksit anaerobik bir ortam oluşturarak, enzimatik dekarboksilasyonu inhibe etmekte, lipit membran yapısında birikerek, bu yapının geçirgenlik fonksiyonunu kaybetmesine neden olmaktadır

### Diasetil

Süt ürünlerinin kendine özgü lezzet ve aroması bulunmaktadır. [84]. Starter kültürlerinin önemli işlevlerinden birisi de kullanıldıkları süt ürünlerinde lezzet ve aromayı oluşturmalarıdır. Süt ürünlerinde tat ve kokuyu oluşturan diasetil ve asetaldehit, karakteristik aroma bileşikleridir [122].

### Reuterin

Reuterin; antimikrobiyel özellikte, gliserolün fermantasyonu sırasında oluşan ara bir bileşiktir [121].

*Lactobacillus reuteri* insan ve hayvan kaynaklı bir heterofermantatif laktik asit bakterisidir [123]. Reuterin, bazı *Lactobacillus reuteri* suşları tarafından üretilmektedir. Reuterin gıda kaynaklı patojenler üzerinde antimikrobiyel aktivite göstermektedir [121].

### Etil alkol

Heterofermantatif laktik asit bakterileri tarafından şekerlerin fermantasyonu sonucu üretilen alkol orta etkinlikte bir antimikrobiyel bileşiktir ve patojen bakterilerin büyük çoğunluğuna karşı bakterisit etki göstermektedir. Alkollerin bakteriosidal etkisinin mekanizması proteinleri denatüre etmek özelliklerine dayandırılmaktadır. Ayrıca, sitoplazma zarındaki lipit yapmayı bozup zarın işlevine etki ettiği de belirtilmektedir [118].

### Hidrojen peroksit

LAB tarafından üretilen oksitleyici bir bileşik olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin mikroorganizmalar üzerine inhibisyon etkisi, metabolik işlemlerde esansiyel olan enzimlerin sülfidril gruplarını etkileyerek, disülfid köprüleri oluşturmaya bağlanmaktadır. [121]. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin hücreler üzerine inhibitör etkisi onun konsantrasyonu ve muamele süresi ile mikrobiyel yük, sıcaklık, pH, inorganik iyonlar, UV veya diğer koruyucularla muamele edilmiş olması gibi faktörlerden etkilenmektedir [118].

### Bakteriyosinler

Birçok LAB, tarafından sentezlenen protein yapısındaki bileşikler olan bakteriyosinler çeşitli fermente olan ve olmayan gıdalarda bulunmaktadır [124]. Bakteriyosinler, duyarlı mikroorganizmalar üzerinde farklı etki mekanizmalarına sahiptirler. Hücrenin sitoplazmik zarına bağlanarak, hücre içerisine girip, zarı gözenekler oluşturmaktadır. Böylece düşük molekül ağırlığına sahip hücre bileşenlerinin hücre dışına sızmasına yol açmaktadır. DNA ve RNA gibi hücre için hayati önemi olan makro moleküllerin degradasyonuna, bu moleküllerle birlikte protein ve peptidoglikan gibi biyolojik yapıların bozulmasına yol açmaktadır [125]. Bakteriyosinler bütün duyarlı türler üzerinde aynı etkiye sahip değildir. Ortam pH'sı ve kritik inhibisyon konsantrasyonu gibi faktörlerden etkilenmektedir [124].

Bakteriyosinlerin gıdalarda koruyucu olarak ilk kullanımları, resmî olarak 1951 yılı olmasına rağmen, insanoğlu 8000 yıldır (peynir ve diğer fermente gıdaları üretmeye başladığından beri) farkında olmadan bakteriyosinlerden faydalanılmaktadır [126,127].

### **2.11. 16S rRNA Dizi Analizi**

Yapılan birçok araştırmada *Lactobacillus* cinsine ait farklı türlerin filojenik akrabalıklarını bulmak amacıyla karşılaştırmalı 16S rRNA dizi analizi uygulanmıştır. [157].

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1 Bakteri kültürleri

Çalışmada Türkiye'nin Balıkesir yöresi civarında üretilen beyaz peynirlerinden daha önceden izole edilmiş 15 adet bakteri materyal olarak kullanılmıştır. Beyaz peynirlerden izole edilmiş olan suşların izolasyon kaynakları ve kodları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan laktik asit bakterisi kültürleri

Çalışma Kodu	İzole Edildiği Kaynak
ACS1	Ayvalık Cunda Sepet Peyniri
ACS5	Ayvalık Cunda Sepet Peyniri
BAT2	Balıkesir tulum Peyniri
BT8	Balıkesir Tulum Peyniri
BTM1	Balıkesir Tulum Peyniri 2
BTM3	Balıkesir Tulum Peyniri 2
BTM4	Balıkesir Tulum Peyniri 2
EDS4	Edremit Sepet Peyniri
KMP2	Balıkesir Kelle Mihaliç Peyniri
MP1	Balıkesir Mihaliç peyniri
MP4	Balıkesir Mihaliç peyniri
BT1	Balıkesir Tulum Peyniri
KMP1	Balıkesir Kelle Mihaliç Peyniri
MNK3	Manyas Kelle Peyniri
BSP1	Balıkesir Sepet Peyniri

### 3.1.2. Besiyerleri

*Lactobacillus* suşlarını üretmek amacıyla MRS besiyeri kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. MRS besiyeri (Man Rogosa and Sharpe) (Merck)

Maddeler	g/L	Maddeler	g/L
Pepton	10,0	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0
Beef ekstrakt	8,0	Sodyum asetat.3 H <sub>2</sub> O	5,0
Yeast ekstrakt	4,0	di-Amonyum hidrojen sitrat	2,0
Glukoz	20,0	MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,2
Tween 80	1,0 mL	MnSO <sub>4</sub> .4 H <sub>2</sub> O	0,04

Yukarıdaki çizelgedeki miktarlara uygun olacak şekilde maddeler tartılıp bir miktar distile su da eritilip 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Gerektiğinde deneyin amacına göre besiyerine %1,5 oranında agar ilave edilerek katı besiyeri hazırlanmıştır. 0,01 M HCl ve/veya 0,01 M NaOH pH ayarlamak için kullanılmış ve pH 6,2±0,2' ye ayarlanarak, besiyeri 121 °C'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir [46].

Araştırmada kullanılan kontaminant ve patojen test bakterilerin aktifleştirilmesinde ise Nutrient sıvı besiyeri kullanılmıştır [47].

Çizelge 3.3. Nutrient sıvı besiyeri (Merck)

Maddeler	g/L
Lab-Lemco Powder	1,0
Yeast ekstrakt	2,0
Pepton	5,0
Sodyum klorür	5,0

Maddeler yukarıdaki çizelgede belirtilen miktarlarda olacak şekilde tartılıp bir miktar distile su da eritilip 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

Deneyin amacına göre besiyerine %1,5 oranında agar ilave edilerek katı besiyeri hazırlanmıştır. 0,01 M HCl ve/veya 0,01 M NaOH kullanılarak pH  $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlanarak, 121 °C'de 15 dak otoklavda sterilize edilmiştir. [47]. Araştırmada dilüsyon için kullanılan serum fizyolojik çözeltisi, 0,875 g sodyum kloritin tartılarak 100 mL'ye distile su ile tamamlanmasıyla hazırlanmıştır. Daha sonra dilüsyon çözeltisi 121°C'de 15 dak otoklavda steril edilmiştir.

### **3.1.3. Bakterilerin muhafazası**

1,5 mL' lik ağız kapaklı tüplere yaklaşık 800 µL gliserol aktararak, 121 °C' de 15 dak. sterilize edilmiştir. Bakteriler uygun sıvı besiyerinde iki kez ard arda aktifleştirilip, aktif kültürlerden 200 µL gliserol içeren steril tüplere paralelli olarak aktarılmıştır. Suşlar derin dondurucuda -80 °C' de muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar iki ayda bir aktifleştirilerek yenilenmiştir [48].

### **3.1.4. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları**

*Lactobacillus*'ların geliştirilmesi ve aktifleştirmesinde MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır. Tüm deneysel çalışmalar bakterilerin  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 18-24 saat inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir [44,49,50].

### **3.1.5. Araştırmada kullanılan test bakterileri**

Araştırmada kontaminant ve patojen test bakterileri olarak *Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus* RSKK 863, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 kullanılmıştır. Test bakterileri uygun sıvı besiyerinde 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Test bakterilerin temin edildikleri kaynak ve inkübasyon dereceleri Çizelge 3.4'de verilmiştir.



Çizelge 3.4. Test bakterileri, temin edildiği kaynaklar ve inkübasyon sıcaklığı

	Bakteriler	Temin Edildiği Kaynak	İnkübasyon Sıcaklığı
Patojen ve Kontaminant Bakteriler	<i>Bacillus cereus</i> RSKK 863	R.S.K.K	37°C
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	R.S.K.K	37°C
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	A.Ü.G.M	37°C
	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	A.Ü.G.M	37°C
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	H.Ü	37°C
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	A.Ü.G.M	37°C
	R.S.K.K.: Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Kültür Koleksiyonu. A.Ü.G.M: Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü. H.Ü.: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı.		

### 3.2. Metot

#### 3.2.1. Bakterilerin muhafazası

*Lactobacillus* bakterileri MRS sıvı besiyerinde iki kez aktifleştirilmiştir. 800 µl gliserol kapaklı cryo tüplerine ilave edilerek, otoklavda 121°C’ de 15 dak. sterilize edilmiştir. 2. aktifleştirmeden sonra aktif kültürlerden 200 µl alınarak steril gliserol içeren ortama ilave edilmiştir. Daha sonra gliserol içindeki bakteriler -80 °C’ de muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar altı ayda bir yenilenmiştir [44,52,53].

### 3.2.2. *Lactobacillus*'ların farklı pH değerlerinde gelişme yetenekleri

*Lactobacillus*'ların farklı pH değerlerinde gelişebilme yeteneklerini belirlemek amacıyla, kültürler MRS sıvı besiyerinde 30 °C'de 48 saat süre ile aktifleştirilmiştir. MRS sıvı besiyerlerinin pH değerleri 2 M NaOH ve 2 M HCl çözeltileri kullanılarak pH 2,0, pH 3,0, pH 4,0, pH 5,0, pH 6,5, pH 9,6 olarak ayarlanmıştır. Besiyerlerinin pH'ı ayarlandıktan sonra, besiyerlerine aktif kültürlerden % 0,1 oranında 2 tekrarlı ekim yapılmış, 30 °C' de 48 saat gelişmeye bırakılmıştır. Gelişme sonrası, spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda kültürlerin okuması yapılmıştır.

### 3.2.3. *Lactobacillus*'ların farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme yetenekleri

*Lactobacillus*'ların farklı tuz konsantrasyonlarında gelişebilme yeteneklerini belirlemek amacıyla, bakteriler MRS (Merck) sıvı besiyerinde 48 saat süre ile aktifleştirilmiştir. MRS sıvı besiyerinin tuz konsantrasyonu ; % 0, % 3, % 4, % 6,5, % 10 ve % 12 olacak şekilde ayrı ayrı hazırlanmıştır. Tuz yüzdeleri MRS sıvı besiyerine NaCl eklenerek ayarlanmıştır. Besiyerleri 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Daha sonra içerisinde steril besiyeri bulunan tüplere, aktif kültürlerden % 0.1 oranında aşılansak 30 °C'de 7 gün gelişmeye bırakılmıştır. Gelişim sonrası, kültürlerin spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri OD<sub>600</sub> olarak ifade edilmiştir.

### 3.2.4. *Lactobacillus*'ların asit üretimi

*Lactobacillus*'ların asit üretim yeteneklerinin belirlenmesi amacı ile kültürler MRS (Merck) sıvı besiyerinde 30 ± 1°C' de 48 saat süre aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerden 10 mL' lik MRS (%10' luk) besiyerine %2 oranında aşılansak, 30 ± 1°C' de 18-20 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 90 ml saf su içeren cam erlenlere 10 mL' lik örnek aktarılmıştır. Örneklerin üzerine indikatör olan fenolftalein 2-3 damla damlatılarak, 0,1 M NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Örneğin rengi açık pembeye dönüşüncüye kadar harcanan NaOH miktarı tespit

edilip, bakterilerin ürettiği asit miktarı aşağıdaki formüle göre yüzde asitlik olarak hesaplanmıştır [27].

$$\% \text{ Asitlik} = \text{Harcanan } 0,1\text{M NaOH (mL)} \times 0,9 / \text{Örnek (mL)} \quad (3.1)$$

<u>0,1N NaOH</u>	
NaOH	4g
Saf Su	1L

### 3.2.5. *Lactobacillus*'ların eksopolisakkarit (EPS) üretimleri

*Lactobacillus*'ların ekzopolisakkarit (EPS) üretimleri Marshall ve Rawson (1999)'un metoduna göre yapılmıştır [54,55].

Laktobasillerin MRS sıvı besi ortamında  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ' de 24 saat inkübe edilerek iki kez ard arda aktifleştirilmiştir. 24 saat sonunda aktif hale gelen kültürlerin yoğunlukları spektrofotometrede 600 nm de  $0,6 \pm 0,2$ 'ye ayarlandıktan sonra 5 mL' lik MRS sıvı besi ortamına ikişer paralelli olarak %2 oranında ekim yapılmış ve  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ' de 18-20 saat geliştirilmiştir. Örneklerden 1 ml ependorf tüplerine aktarılmış daha sonra  $100^\circ\text{C}$ ' de 10-15 dak. kaynatıldıktan sonra oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutulmuştur. 1 mL örnek üzerine %85' lik Trikloroasetik asit (TCA)' dan %0,17 oranında ilave edilerek, 14 000 rpm' de 20 dak. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant başka bir ependorf tüpüne alınarak üzerine eşit hacimde etanol ilave edilmiş, 14 000 rpm' de 20 dak. santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülerek ikinci etanol presipitasyonu 14 000 rpm' de 20 dak. santrifüj ile yapılmıştır. Pelletler 1 ml steril saf suda çözüldükten sonra örnekler fenol tüplerine konularak; fenol sülfürik asit metodu aşağıda anlatıldığı biçimde uygulanmıştır: Örneklerin üzerine 0,5 mL fenol ve daha sonra hızlı bir şekilde 5 mL sülfürik asit ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 10 dak. bekletildikten sonra iyice çalkalanarak,  $25-30^\circ\text{C}$ ' de 10-20 dak. bekletilmiştir. Süre bitiminden sonra örneklerin OD değerleri 490 nm dalga boyunda

iki paralelli olarak okumaları yapılmıştır. Bulunan sonuçlar standarda göre hesaplanmıştır (mg/L). EPS üretim miktarlarını belirlemek için 5-100 mg/L arasında değişen oranlarda glikoz kullanılarak fenol sülfürik asit metodu kullanılarak standart bir eğri çıkarılmıştır. Bu standarda göre örneklerin EPS miktarları mg/L olarak belirlenmiştir [54].

### 3.2.6. *Lactobacillus*'ların antikolesterol aktivitesinin belirlenmesi

Çalışmamızda *Lactobacillus*'ların kolesterol giderimlerinin belirlenmesinde “o-fitalaldehit” metodu kullanılmıştır.

Kültürler MRS sıvı besiyerinde 48 saat süre boyunca 2 kez 30 °C'de aktifleştirilmiştir. OD'leri  $0,6 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış olan aktif kültürlerinden 5 mL'lik 100 µg/mL oranında kolesterol ile %0,15 ve 0,30 konsantrasyonlarında safra (Sigma) içeren MRS sıvı besiyerine %2 oranında inoküle edilerek, 30 °C'de aerobik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnokülasyon yapılmamış 100 µg/mL oranında kolesterol içeren MRS sıvı besiyerini kontrol olarak kullanılmıştır. İnkübasyon sonrasında örnekler 10000 rpm'de 20 dak santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda elde edilen berrak kısma serbest hücre ekstraktı (SHE) adı verilmiştir. Dipte kalan kısma pellet denilmiştir. Hücre pelleti orijinal besiyerine eşit hacimde (5 mL) olsun diye pellet üzerine distile su ilave edilip ardından vortekslenmiştir. SHE ve distile su ile süspansiyon edilen hücre pelletindeki kolesterol miktarının belirlenmesi için örneklerden 0,5 mL alınarak temiz uzun cam tüplere dağıtılmıştır. Her bir örnek üzerine 3 mL %95'lik etanol ilave edilmiş ve vortekslenerek iyice karıştırılmıştır. Ardından örneklerin üzerine 2 mL %50'lik KOH ilave edilmiş ve vortekslenerek iyice karışması sağlanmıştır. Örnekler 60°C'lik su banyosunda 10 dk ısıtılmış ve ardından soğutulmuştur. Örneklerin üzerine 5 mL hekzan ilave edilerek 20 sn boyunca vorteks ile iyice karıştırılmıştır. Ardından örneklerin üzerine 3 mL distile su ilave edilerek tekrar karıştırılmıştır. Fazların ayrımını sağlamak için örnekler oda sıcaklığında 15 dak. bekletilmiştir. Fazların ayrılması sonucunda oluşan hekzan tabakasının 2,5 mL'si temiz test tüplerine alınmıştır. Her bir tüpteki hekzan 60°C'lik su banyosunda tamamen buharlaştırılmıştır. Her bir tüpün üzerine 4 mL o-

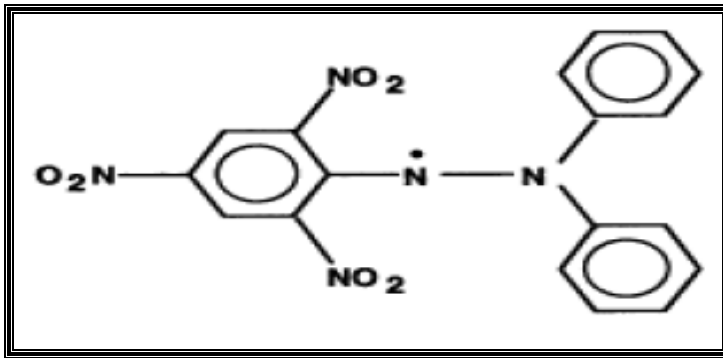
fitalaldehit reagent ilave edilmiştir. o-Fitalaldehit reagent 1 mL glasiyel asetik asit içerisinde 0,5 mg o-fihalaldehit (Sigma) içermektedir. Örnekler oda sıcaklığında 10 dak bekletilmiştir. Örneklerin üzerine yavaşça 2 mL saf sülfürik asit ilave edilmiştir. Örnekler vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında tekrar 10 dak bekletilmiştir. Örneklerin optikal yoğunluklarının okunup belirlenmesi 550 nm dalga boyundaki spektrofotometrede yapılmıştır [56,57].

Suşların % kolesterol giderim değerlerinin hesaplama formülü: ( 3.2 )

$A = 100 - [(B / C) \times 100]$
A: Kolesterolün giderimi (%).
B: İnokülasyon yapılan besiortamındaki kolesterol miktarı ( $\mu\text{g}$ ).
C: İnokülasyon yapılmayan (kontrol) besiortamındaki kolesterol miktarı ( $\mu\text{g}$ ).

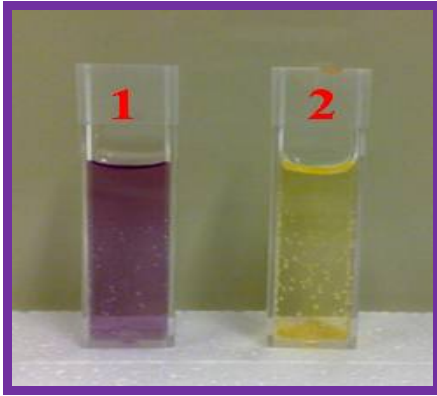
### 3.2.7. *Lactobacillus*'ların antioksidan aktivitesinin belirlenmesi

Blois (1958) antioksidan moleküllerin tayininde DPPH (1,1-difenil-2-pikril hidrazil) (Şekil 3.1) radikallerinin kullanılabileceğinin önermiştir. Lin ve Chang (2000) ise bu yöntemi geliştirmiştir. Bu çalışmada Laktobasillerin antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde Lin ve Chang (2000) tarafından modifiye edilen Shimada ve ark.'nın (1992) da uyguladığı DPPH metodu kullanılmıştır.



Şekil 3.1. DPPH reaktifinin kimyasal yapısı

Yöntemin esası DPPH içeren çözelti ile hidrojen atomu verme eğilimi olan bir molekülün (antioksidan) çözeltisinin karıştırılması sonucu DPPH radikalinin indirgenmesine ve çözeltinin başlangıçta mor olan renginin kaybolmasına dayanır. (Resim 3.1.) Mor renkli çözeltinin 520 nm civarındaki absorbansının azalması ölçülerek reaksiyon takip edilir.



Resim 3.1. Antioksidan özellikli çözeltinin DPPH'ın mor rengini yok etmesi

Yöntemin uygulaması;

- *Lactobacillus* suşları MRS sıvı besiyerinde 2 kez 30 °C'de 24 saat inkübe edilerek aktiveleştirilmiştir.
- İnkübasyon sonunda örnekler 10000 rpm'de 15 dak. santrifüj edilmiş, elde edilen pelletler fosfat tamponu (PBS; %0,02 KCl, %0,144 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, %0,8 NaCl, %0,024 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH:7,0) ile 3 kez yıkanmış ve 1 mL PBS ile resüspanse edilmiştir.
- Hücre yoğunlukları 0,5 nolu Mc Farland standartına göre ayarlanmıştır. 0,5 Mc Farland yoğunluğuna ayarlan bakteri süspansiyonundan 800 µL alınıp 1 mL 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) çözeltisi (%0,008 DPPH, metanolde çözülmüştür) ile muamele edilmiş ve karanlıkta 30 dk bekletilmiştir.
- Örneklerin optikal yoğunlukları 517 nm dalga boyundaki spektrofotometrede ölçülmüştür.
- Kontrol olarak 800 µL boş PBS ile 1 mL DPPH çözeltisi kullanılmıştır.

Suşların % DPPH radikalini gidermesinin hesaplanması: ( 3.3 )

$$A = [ 1 - (B_{517} / C_{517}) ] \times \%100$$

A	: % Antioksidan aktivite
B <sub>517</sub>	: Suşlarla muamele edilen DPPH örneklerinin yoğunluğu
C <sub>517</sub>	: Kontrol grubu (Boş PBS ve DPPH çözeltisi)

### 3.2.8. *Lactobacillus*'ların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

*Lactobacil* bakterileri üzerinde protein sentezi inhibitörü Gentamisin (CN) 10 µg , antimikrobiyal etkiye sahip Nitrofurantoin (F) 300 µg , hücre duvar sentezini inhibe eden Penisilin (P) 10 U , Sitoplazmik zar sentezi inhibitörü Polimiksin (PB) 300 U , Nükleik asit sentezi inhibitörü Ofloksasin (OFX) 5 µg antibiyotiklerinin inhibisyon etkileri disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir [58,59].

Yöntem şu şekilde uygulanmıştır:

İlk olarak bakteriler MRS sıvı besiortamında 18-20 saat 30±1°C' de aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerden MRS besiortamına ikişer paralelli olarak ekim yapıp, 30±1°C' de 18-20 saat geliştirilmiştir. Hazırlanan MRS agar petrilere 20 ml aktarılıp, oda sıcaklığında donmaya bırakılmıştır. Aktif kültürlerin yoğunlukları 0,5 McFarland bulanıklığına eşdeğer olarak ayarlandıktan sonra 100 µl alınıp, MRS plaklarına aktarılmış ve homojen bir şekilde yayılması sağlanmıştır. Antibiyotik diskleri petri kutusunun kenarından 10 mm ve birbirinden 15 mm uzaklıkta olacak şekilde steril olarak besiortamının üzerine yerleştirilmiştir. Petriler 30°C' de 18-20 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde antibiyotik disk çevresinde oluşan zonların çapı kumpas ile milimetrik olarak ölçülmüştür. *Lactobacillusların* duyarlılık testlerinin sonuçları Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterlerine göre değerlendirilmiştir [60,61].

### 3.2.9. *Lactobacillus*'ların antimikrobiyal aktiviteleri

Çalışmada kullanılan *Lactobacillus*'ların antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi Reinheimer ve arkadaşları'nın (1990) metoduna göre yapılmıştır [62,63].

*Lactobacillus* bakterilerin aktif kültürlerinden MRS broth besiyerine ekim yapıp,  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 18-20 saat inkübe edilmiştir. Aktif kültürlerin hücre yoğunluğu 5 McFarland yoğunluğuna ayarlanmıştır. Aktif kültürler 5000 dev/dak.' da 15 dak. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant adı verilen berrak kısım steril şartlar altında  $0,45\ \mu\text{m}$ ' lik steril filtre kullanılarak mikrofiltrasyon yolu ile sterilize edilmiştir.

Araştırmada test bakterileri olarak *E. coli* ATCC 11229, *E. coli* O157:H7, *B. cereus* RSKK 863, *S. enteritidis* ATCC 13076, *S. aureus* ATCC 25923 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşları kullanılmıştır.

Test bakterilerinin aktifleştirilmesi Nutrient sıvı besiyerinde 24 saat  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta yapılmıştır. Aktifleştirilen test bakterilerinin hücre yoğunlukları 0,5 McFarland standartına göre ayarlanmıştır. Bu kültürlerden steril plaklara 100  $\mu\text{l}$  aktarılmıştır. Plaklar üzerine sterilize edilmiş ve  $50^{\circ}\text{C}$ ' ye kadar soğutulmuş Nutrient agar besiyerinden 20 ml ilave edilip, homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. Homojenlik sağlandıktan sonra petri kabı içerisindeki besiyerinin donması için beklenilmiştir. Donan besiyeri üzerinde 0,6 cm çapında steril ortamda kuyucuklar açılmıştır. Daha önceden mikrofiltrasyon' la steril edilmiş *Lactobacillus* bakteri filtratlarından 100  $\mu\text{l}$  kuyucuklara konulup, uygun inkübasyon sıcaklığında, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucukların çevresinde oluşan inhibisyon zonların çapı kumpas yardımı ile ölçülmüştür [61].



### **3.2.10. 16S rRNA dizi analizi**

Çalışmada kullanılan bakterilerin hangi türlere ait olduklarını tespit etmek için 16S rRNA dizi analizleri Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne (MOBAM) yaptırılmıştır.

## 4.DENEYSEL BULGULAR

### 4.1. 16S rRNA Dizi Analizi ile *Lactobacillus*'ların Tanımlanması

Bu çalışmada, izolasyonu daha önce Darılmaz (2010), tarafından yapılmış *Lactobacillus*'ların tanımlaması MOBAM'A yaptırılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

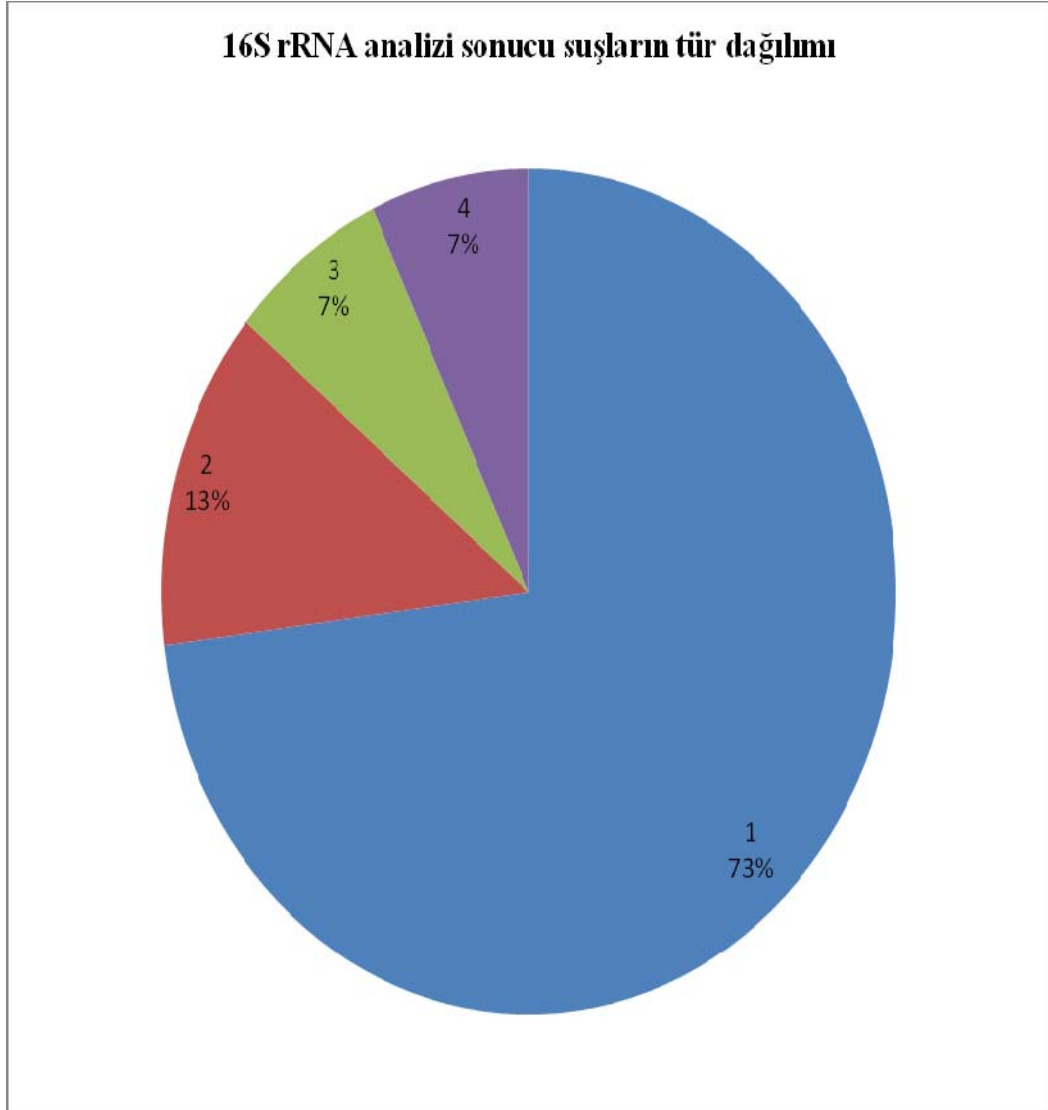
Çizelge 4.1. Tanımlanan *Lactobacillus*'ların peynir kaynakları

Laktik Asit Bakterisi	Çalışma Kodu	İzole Edildiği Kaynak
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ACS1	Ayvalık Cunda Sepet Peyniri
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ACS5	Ayvalık Cunda Sepet Peyniri
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	BAT2	Balıkesir tulum Peyniri
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	BT8	Balıkesir Tulum Peyniri
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	BTM1	Balıkesir Tulum Peyniri 2
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	BTM3	Balıkesir Tulum Peyniri 2
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	BTM4	Balıkesir Tulum Peyniri 2
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	EDS4	Edremit Sepet Peyniri
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	KMP2	Balıkesir Kelle Mihaliç Peyniri
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MP1	Balıkesir Mihaliç peyniri
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MP4	Balıkesir Mihaliç peyniri
<i>Lactobacillus brevis</i>	BT1	Balıkesir Tulum Peyniri
<i>Lactobacillus brevis</i>	KMP1	Balıkesir Kelle Mihaliç Peyniri
<i>Lactobacillus helveticus</i>	MNK3	Manyas Kelle Peyniri
<i>Lactobacillus fermentum</i>	BSP1	Balıkesir Sepet Peyniri

16S rRNA analizi sonucu *Lactobacillus* cinsi bakterilerin türü tespit edilmiştir. Sonuçlara göre suşlardan 11 tanesi *Lactobacillus rhamnosus*, 2 tanesi *Lactobacillus brevis*, 1 tanesi *Lactobacillus helveticus*, 1 tanesi *Lactobacillus fermentum* türüne benzerlik göstermiştir.

Çizelge 4.2. 16S rRNA analiz sonuçları

<b>No</b>	<b>Bakteri suşları</b>	<b>16S rRNA analizi sonucu</b>
1	ACS1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
2	ACS5	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
3	BAT2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
4	BT8	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
5	BTM1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
6	BTM3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
7	BTM4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
8	EDS4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
9	KMP2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
10	MP1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
11	MP4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
12	BT1	<i>Lactobacillus brevis</i>
13	KMP1	<i>Lactobacillus brevis</i>
14	MNK3	<i>Lactobacillus helveticus</i>
15	BSP1	<i>Lactobacillus fermentum</i>



1: *Lactobacillus rhamnosus*

2: *Lactobacillus brevis*

3: *Lactobacillus fermentum*

4: *Lactobacillus helveticus*

Şekil 4.1. 16S rRNA analizi sonucu suşların tür dağılımını gösteren grafik

#### 4.2. *Lactobacillus*'ların Farklı pH Değerlerinde Gelişme Yetenekleri

Bakterilerin en iyi gelişebildikleri pH değeri optimum pH değeridir. *Lactobacillus*'ların pH 2,0, pH 3,0, pH 4,0, pH 5,0, pH 6,5, pH 9,6 değerlerinde gelişme yetenekleri 3.2.2. kısmında anlatıldığı gibi incelenmiştir.

Bakterilerin en iyi üredikleri pH değerleri incelendiğinde bakterilerin tümünün en iyi gelişmeyi pH 5 ve pH 6,5 aralığında gösterdiği gözlenmiştir. *Lactobacillus fermentum* (BSP1) suşunun pH 3-6,5 değerleri arasında en yüksek üreme değerlerine sahip olduğu (pH 3'te 1,63, pH 4'te 1,88, pH 5'te 1,85, pH 6,5'ta 1,89 ) ve *Lactobacillus fermentum*'un pH toleransı en fazla olan suş olduğu gözlenmiştir.

pH 2.0'da genel olarak tüm suşların zayıf gelişme göstermiştir, bunlardan *L. brevis* BT1, 0,010, KMP1 0,010 suşlarının zayıf gelişme gösterdiği, *L.rhamnosus* (BAT2 0,052, BTM1 0,052) suşlarının en yüksek gelişme gösterdiği gözlenmiştir.

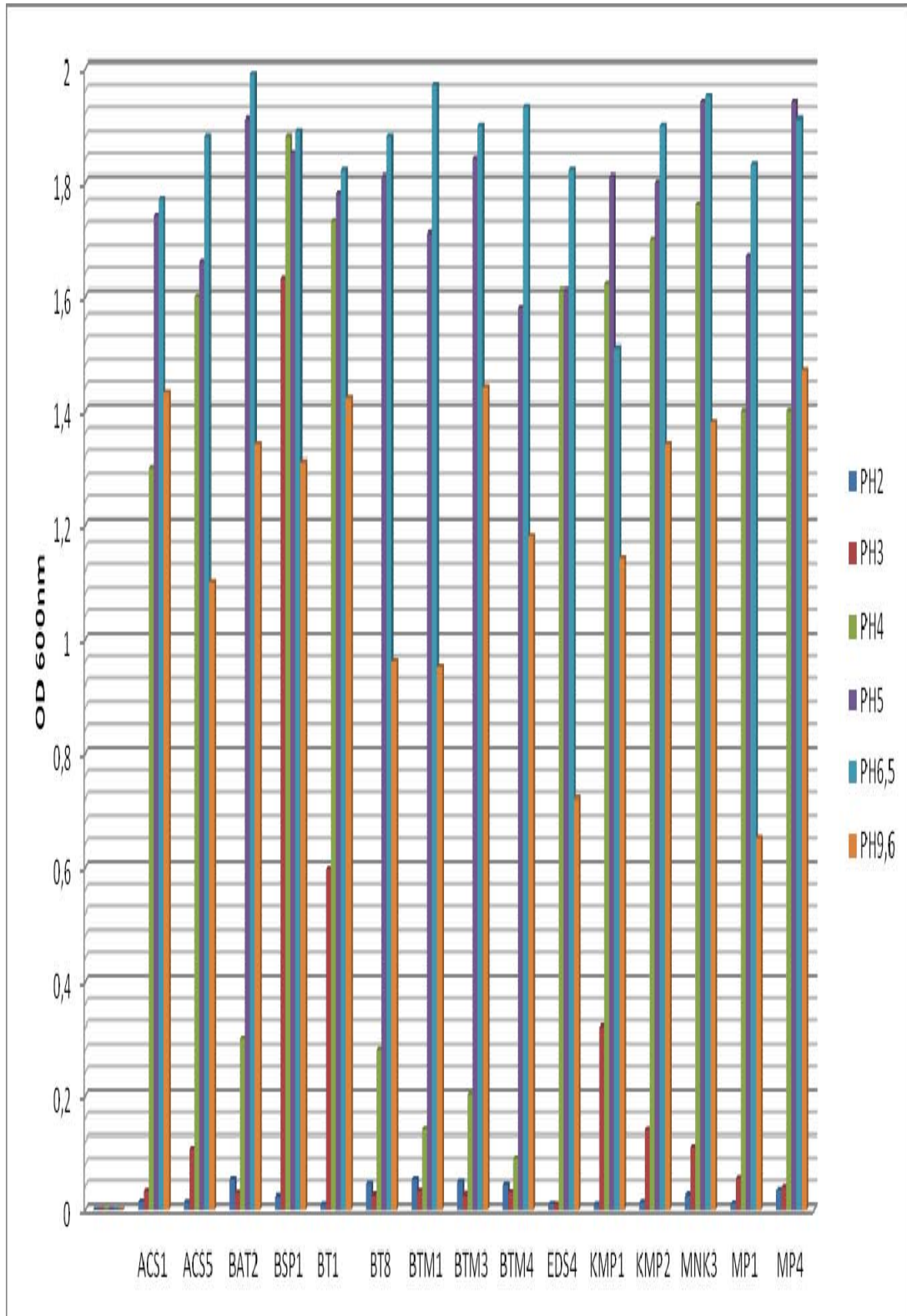
pH 3.0'da suşların genel olarak zayıf gelişme gösterdiği gözlenmiştir.

pH 4.0'da en iyi gelişmeyi *L.fermentum* BSP1, 1,88 , *L. brevis* BT1,KMP1, *L. helveticus* MNK3 suşlarının da iyi gelişme gösterdiği,diğer bakterilerin ise zayıf gelişme gösterdiği gözlenmiştir.

pH 5.0 ve pH 6.5'de tüm bakterilerin geliştiği, pH 9.6'da bakterilerin genel olarak iyi gelişme gösterdiği gözlenmiştir. (Çizelge 4.3, Şekil 4.2.).

Çizelge 4.3. *Lactobacillus*'ların farklı pH değerlerinde gelişme değerleri

	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6,5	pH 9,6
Suşlar	OD	OD	OD	OD	OD	OD
<i>L. rhamnosus</i> ACS1	0,015±0,00	0,031±0,00	1,3±0,02	1,74±0,03	1,77±0,33	1,43±0,02
<i>L. rhamnosus</i> ACS5	0,014±0,00	0,107±0,02	1,6±0,22	1,66±0,13	1,88±0,03	1,1±0,01
<i>L. rhamnosus</i> BAT2	0,052±0,02	0,028±0,00	0,3±0,07	1,91±0,02	1,99±0,02	1,34±0,05
<i>L. fermentum</i> BSP1	0,023±0,00	1,63±0,04	1,88±0,02	1,85±0,06	1,89±0,02	1,31±0,00
<i>L. brevis</i> BT1	0,010±0,00	0,597±0,02	1,73±0,02	1,78±0,02	1,82±0	1,42±0,02
<i>L. rhamnosus</i> BT8	0,044±0,00	0,025±0,00	0,28±0,16	1,81±0,14	1,88±0,13	0,96±0,12
<i>L. rhamnosus</i> BTM1	0,052±0,00	0,031±0,00	0,14±0,11	1,71±0,16	1,97±0,02	0,95±0,28
<i>L. rhamnosus</i> BTM3	0,048±0,00	0,026±0,00	0,203±0,06	1,84±0,06	1,9±0,03	1,44±0,03
<i>L. rhamnosus</i> BTM4	0,042±0,00	0,029±0,00	0,09±0,03	1,58±0,34	1,93±0,12	1,18±0,30
<i>L. rhamnosus</i> EDS4	0,011±0,00	0,01±0,00	1,61±0,08	1,61±0,01	1,82±0,11	0,72±0,13
<i>L. brevis</i> KMP1	0,010±0,00	0,32±0,10	1,62±0,04	1,81±0,06	1,51±0,07	1,14±0,14
<i>L. rhamnosus</i> KMP2	0,014±0,01	0,139±0,02	1,7±0,11	1,8±0,05	1,9±0,04	1,34±0,02
<i>L. helveticus</i> MNK3	0,025±0,01	0,11±0,07	1,76±0,06	1,94±0,01	1,95±0,05	1,38±0,07
<i>L. rhamnosus</i> MP1	0,012±0,00	0,054±0,02	1,4±0,00	1,67±0,00	1,83±0,00	0,65±0,21
<i>L. rhamnosus</i> MP4	0,033±0,03	0,038±0,01	1,4±0,17	1,94±0,07	1,91±0,03	1,47±0,04



Şekil 4.2. *Lactobacillus*'ların farklı pH değerlerinde gelişme grafiği

### 4.3. *Lactobacillus*'ların Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Yetenekleri

Kısım 3.2.11'de anlatıldığı gibi *Lactobacillus* suşlarının % 0, % 3, % 6,5, % 10 ve % 12 tuz konsantrasyonlarında gelişme yetenekleri gözlenmiştir.

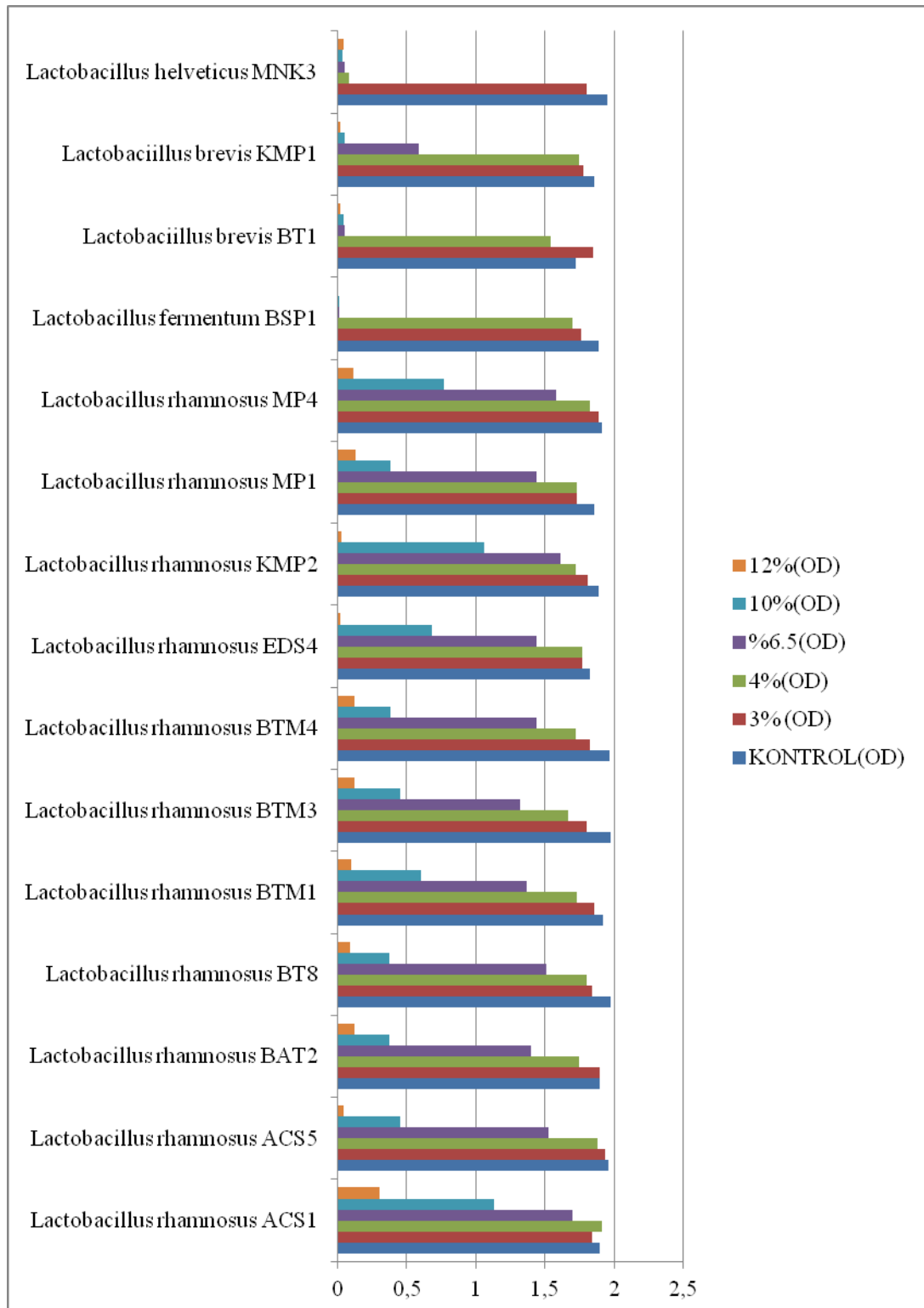
% 3 tuz konsantrasyonunda tüm bakterilerin gelişme gösterdiği, en iyi gelişmeyi *L. rhamnosus* suşlarının gösterdiği; %4 ve % 6.5 tuz konsantrasyonunda *L. helveticus* MNK3 suşunun zayıf gelişme gösterdiği, diğer tüm bakterilerin iyi gelişme gösterdiği, % 10 tuz konsantrasyonunda genel olarak bakterilerin zayıf gelişme gösterdiği ; % 12 tuz konsantrasyonunda *L. fermentum* BSP1 suşunun gelişme göstermediği diğer suşlarının ise zayıf gelişme gösterdiği tespit edilmiştir

*L.rhamnosus* ACS1 suşunun % 3 tuz konsantrasyonunda 1,84, %4 tuz konsantrasyonunda 1,91, % 6,5 tuz konsantrasyonunda 1,70, %10 tuz konsantrasyonunda 1,13, *L.rhamnosus* KMP2 suşunun % 3 tuz konsantrasyonunda 1,81, %4 tuz konsantrasyonunda 1,72, % 6,5 tuz konsantrasyonunda 1,61, %10 tuz konsantrasyonunda 1,06 yoğunluğunda üreme gösterdiği gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre *L.rhamnosus* ACS1 ve KMP2 suşlarının geniş bir tuz tolerans aralığına sahip olduğu gözlenmiştir. (Çizelge 4.4. , Şekil 4.3.).



Çizelge 4.4. *Lactobacillus*'ların farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme değerleri

SUŞLAR	Kontrol(OD)	% 3 (OD)	%(4OD)	%6.5(OD)	%10(OD)	%12(OD)
<i>L. rhamnosus</i> ACS1	1,90±0,03	1,84±0,00	1,91±0,00	1,70±0,04	1,13±0,08	0,30±0,01
<i>L. rhamnosus</i> ACS5	1,96±0,01	1,94±0,05	1,88±0,04	1,53±0,12	0,45±0,10	0,04±0,03
<i>L. rhamnosus</i> BAT2	1,90±0,00	1,90±0,01	1,75±0,00	1,40±0,03	0,37±0,22	0,12±0,00
<i>L. rhamnosus</i> BT8	1,98±0,01	1,84±0,02	1,80±0,04	1,51±0,01	0,37±0,02	0,09±0,01
<i>L. rhamnosus</i> BTM1	1,92±0,00	1,86±0,00	1,73±0,01	1,37±0,04	0,60±0,06	0,10±0,01
<i>L. rhamnosus</i> BTM3	1,98±0,00	1,80±0,02	1,67±0,11	1,32±0,08	0,45±0,05	0,12±0,01
<i>L. rhamnosus</i> BTM4	1,97±0,00	1,83±0,05	1,72±0,02	1,44±0,03	0,38±0,05	0,12±0,01
<i>L.rhamnosus</i> EDS4	1,83±0,03	1,77±0,01	1,77±0,03	1,44±0,02	0,68±0,03	0,02±0,00
<i>L.rhamnosus</i> KMP2	1,89±0,00	1,81±0,01	1,72±0,01	1,61±0,02	1,06±0,06	0,03±0,00
<i>L. rhamnosus</i> MP1	1,86±0,00	1,73±0,01	1,73±0,01	1,44±0,05	0,38±0,02	0,13±0,01
<i>L. rhamnosus</i> MP4	1,91±0,00	1,89±0,01	1,83±0,05	1,58±0,05	0,77±0,11	0,11±0,00
<i>L. fermentum</i> BSP1	1,89±0,02	1,76±0,00	1,70±0,05	0,01±0,00	0,01±0,00	0,00±0,00
<i>L. brevis</i> BT1	1,72±0,05	1,85±0,03	1,54±0,22	0,05±0,00	0,04±0,00	0,02±0,00
<i>L. brevis</i> KMP1	1,86±0,02	1,78±0,02	1,75±0,03	0,59±0,08	0,05±0,02	0,02±0,01
<i>L. helveticus</i> MNK3	1,95±0,00	1,8±0,01	0,08±0,00	0,05±0,01	0,033±0,00	0,04±0,00



Şekil 4.3. *Lactobacillus*'ların farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme grafiği

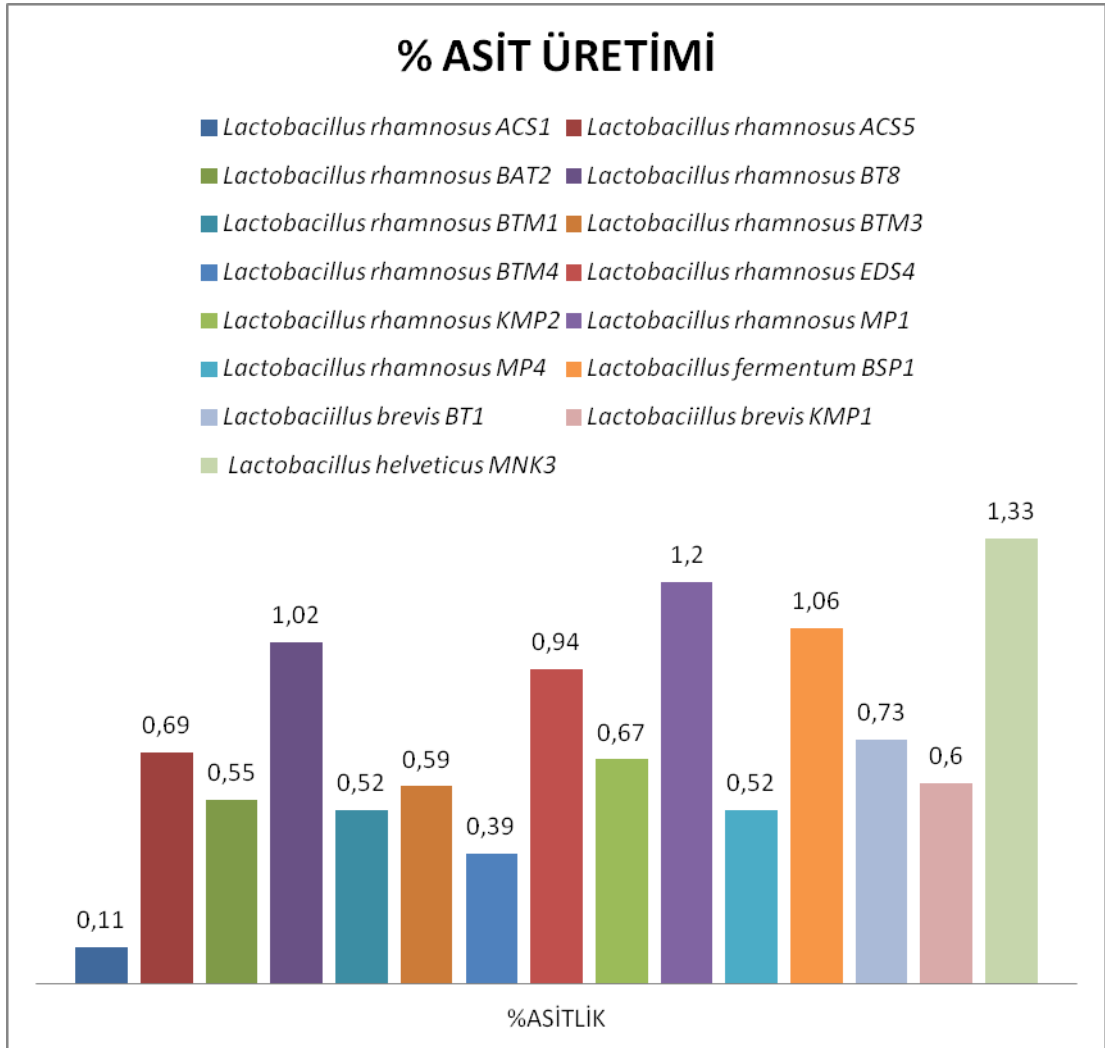
#### 4.4. *Lactobacillus*'ların Asit Üretim Yetenekleri

Tanımlanan 15 adet *Lactobacillus* kültürü MRS sıvı besiortamlarında ürettikleri yüzde asit miktarları Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi belirlenmiş olup sonuçlar Çizelge 4.5. ve Şekil 4.4.'de verilmiştir.

*Lactobacillus*'ların MRS sıvı besiortamındaki 24 saatlik kültürlerinin titre edilebilir yüzde asit miktarları en yüksekten en düşüğe doğru sıralanarak Çizelge 4.5'te verilmiştir. En düşük laktik asit üretimi %0,11 (*L.rhamnosus* ACS1) ve en yüksek %1,33 (*L. helveticus* MNK3) olarak belirlenmiştir. MRS sıvı besiortamında, *Lactobacillus rhamnosus* BT8 (%1,02), *Lactobacillus rhamnosus* MP1 (%1,20) ve *Lactobacillus fermentum* BSP1 (%1,06) *L. helveticus* MNK3 (%1,26),yüksek asit ürettikleri gözlenmiştir.

Çizelge 4.5. *Lactobacillus*'ların asit üretim miktarları

SUŞLAR	%ASİTLİK
<i>Lactobacillus helveticus</i> MNK3	1,33±0,04
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> MP1	1,20±0,01
<i>Lactobacillus fermentum</i> BSP1	1,06±0,02
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> BT8	1,02±0,03
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> EDS4	0,94±0,05
<i>Lactobacillus brevis</i> BT1	0,73±0,01
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ACS5	0,69±0,05
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> KMP2	0,67±0,02
<i>Lactobacillus brevis</i> KMP1	0,60±0,00
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> BTM3	0,59±0,05
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> BAT2	0,55±0,00
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> BTM1	0,52±0,04
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> MP4	0,52±0,05
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> BTM4	0,39±0,05
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ACS1	0,11±0,03



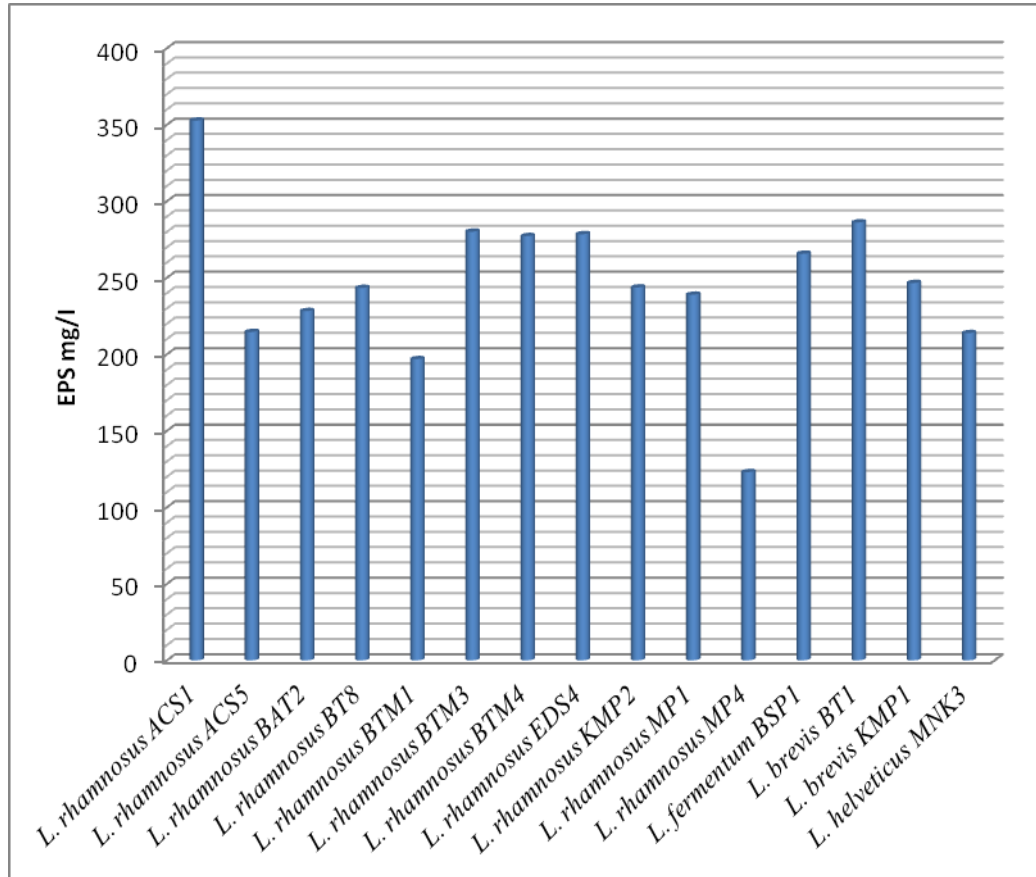
Şekil 4.4. *Lactobacillus*'ların asit üretim miktarları grafiği

#### 4.5. *Lactobacillus*'ların EPS Üretimleri

*Lactobacillus*'ların MRS besiortamındaki EPS üretim miktarları Bölüm 3.2.6.' da anlatıldığı gibi belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.6.' de en yüksek EPS üretimi yapandan en düşük olana doğru verilmiştir. En yüksek EPS üretimi *Lactobacillus rhamnosus ACS1* suşunda 352,71 mg/L olarak, en düşük EPS üretimi *Lactobacillus rhamnosus MP4* suşunda 122,98 mg/L olarak gözlenmiştir.

Çizelge 4.6. *Lactobacillus*'ların MRS besi ortamında EPS üretimleri (mg/L)

SUŞLAR	EPS mg/l
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ACS1	352,71 ± 5,18
<i>Lactobacillus brevis</i> BT1	286,15 ± 2,25
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> BTM3	280,11 ± 4,90
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> EDS4	278,44 ± 1,32
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> BTM4	277,23 ± 1,53
<i>Lactobacillus fermentum</i> BSP1	265,65 ± 0,24
<i>Lactobacillus brevis</i> KMP1	246,57 ± 0,12
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> KMP2	243,65 ± 0,47
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> BT8	243,32 ± 1,65
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> MP1	238,90 ± 2,95
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> BAT2	228,23 ± 7,19
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ACS5	214,57 ± 0,12
<i>Lactobacillus helveticus</i> MNK3	213,82 ± 0,24
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> BTM1	196,82 ± 1,65
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> MP4	122,98 ± 0,24



Şekil 4.5. *Lactobacillus*'ların MRS besi ortamında EPS üretim miktarları grafiği

#### 4.6. *Lactobacillus*'ların Antikolesterol Aktivitesinin Belirlenmesi

*Lactobacillus* suşlarının yüzde kolesterol giderimleri Bölüm 3.2.3' de anlatıldığı gibi yapılmış sonuçlar Çizelge 4.7. ve Şekil 4.6 ' de verilmiştir.

Test edilen suşların hepsi serbest hücre ekstratlarında (SHE) kolesterolü bir miktar uzaklaştırdığı gözlenmiş, ancak suşların pelette kolesterol giderimi kabiliyetleri düşük olmakla birlikte suşlar arasında farklılıklar gözlenmiştir.

Genel olarak yüksek EPS üretimine sahip olan suşların, düşük EPS üretimine sahip suşlara kıyasla besiyortamından daha fazla kolesterolü uzaklaştırabildiği gözlenmiştir. Tüm suşlar tarafından genellikle en yüksek kolesterol gideriminin %0,30 oranında safra içeren ortamda gerçekleştiği saptanmıştır. %0,15 oranında safra içeren

besiortamında safra içermeyen besiortamına göre genelde daha yüksek kolesterol gideriminin gerçekleştiği tespit edilmiştir.

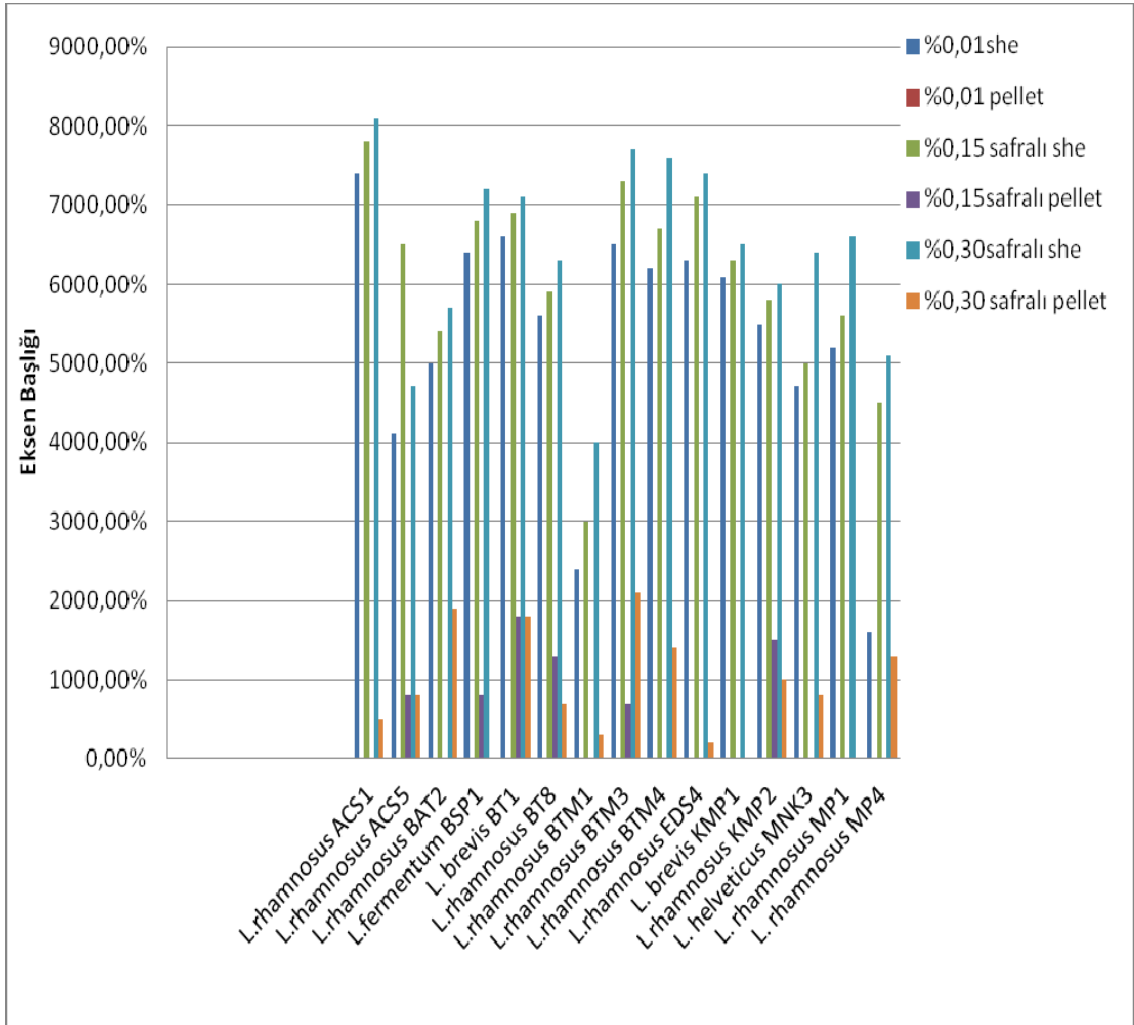
Test edilen suşlar arasında *Lactobacillus rhamnosus* (ACS1) suşunun EPS üretiminin en yüksek olduğu gözlenmiştir. *Lactobacillus rhamnosus* (ACS1) türü bakterinin kolesterol gideriminin de en yüksek olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.7. *Lactobacillus*'ların % kolesterol giderim değerleri

	EPS	% 0,01		% 0,15 safra		% 0,30safra	
	(mg/L)	SHE	Pelet	SHE	Pelet	SHE	Pelet
		%	%	%	%	%	%
<i>L.rhamnosus</i> ACS1	353±5	74±4	(-)	78±3	(-)	81±2	5±0
<i>L.rhamnosus</i> ACS5	215±0	41±6	(-)	65±4	8±0	47±1	8±3
<i>L.rhamnosus</i> BAT2	228±7	50±0	17±0	54±0	(-)	57±4	19±6
<i>L.fermentum</i> BSP1	266±0	64±0	(-)	68±0	8±3	72±2	(-)
<i>L. brevis</i> BT1	286±2	66±2	(-)	69±0	18±0	71±2	18±1
<i>L.rhamnosus</i> BT8	243±2	56±1	(-)	59±4	13±1	63±2	7±1
<i>L.rhamnosus</i> BTM1	197±2	24±0	11±0	30±2	(-)	40±4	3±0
<i>L.rhamnosus</i> BTM3	280±5	65±0	(-)	73±0	7±0	77±2	21±3
<i>L.rhamnosus</i> BTM4	277±2	62±5	21±0	67±3	(-)	76±3	14±0
<i>L.rhamnosus</i> EDS4	278±1	63±3	(-)	71±2	(-)	74±1	2±0
<i>L. brevis</i> KMP1	247±0	61±3	(-)	63±6	(-)	65±1	(-)
<i>L.rhamnosus</i> KMP2	244±0	55±4	(-)	58±0	15±0,5	60±1	10±1
<i>L. helveticus</i> MNK3	214±0	47±3	1±0	50±3	(-)	64±0	8±0
<i>L.rhamnosus</i> MP1	239±3	52±2	9±1	56±1	(-)	66±1	(-)
<i>L.rhamnosus</i> MP4	123±0	16±6	(-)	45±1	7±0	51±1	13±2

-: Kolesterol giderimi yok





SHE: Serbest hücre ekstraktı

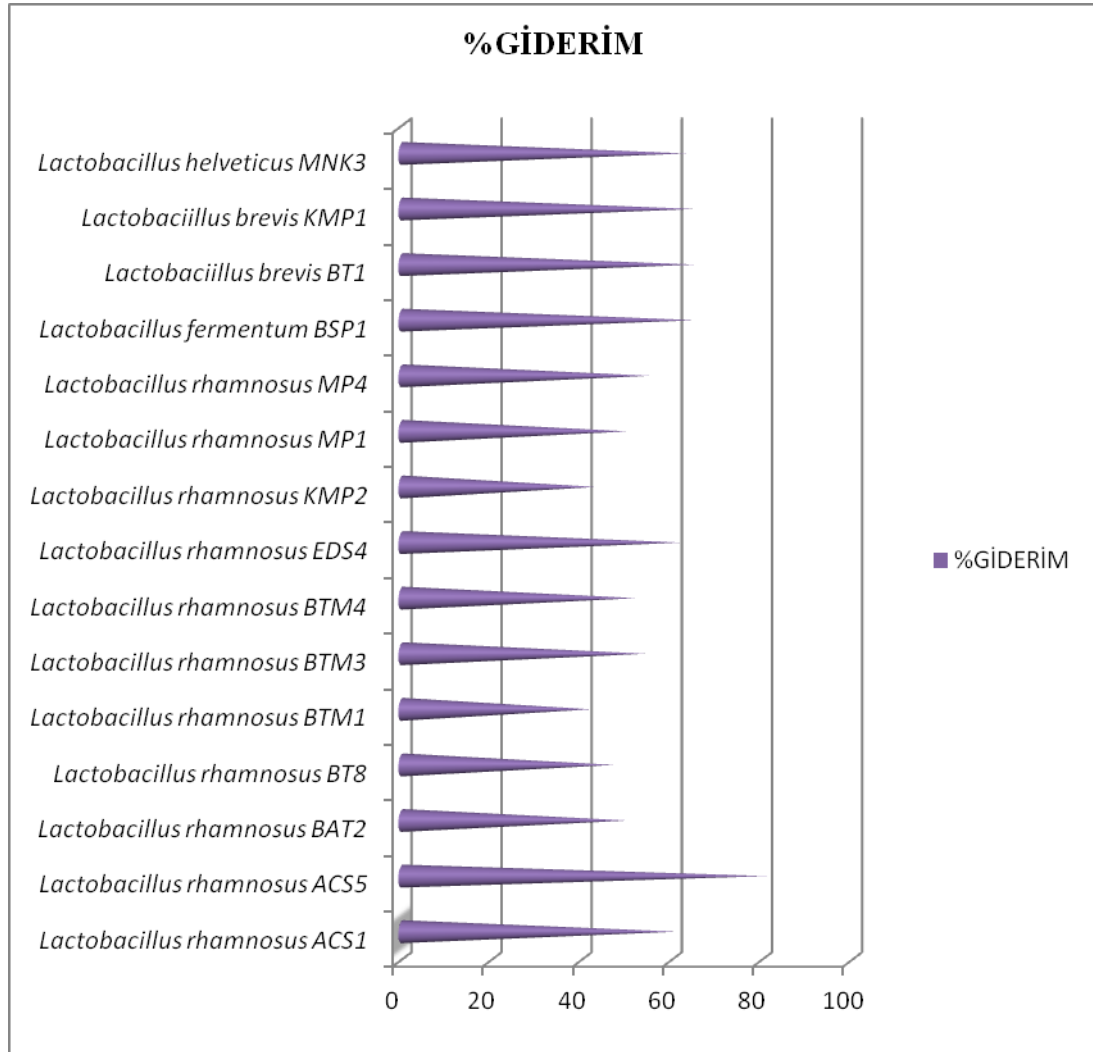
Şekil 4.6. *Lactobacillus*'ların % kolesterol giderim değerleri grafiği

#### 4.7. *Lactobacillus*'ların Antioksidan Aktivitesi

*Lactobacillus* suşlarının antioksidan aktivitesi Bölüm 3.2.9'da anlatıldığı gibi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.8. verilmiştir. Test edilen 15 suşta % antioksidan etki gözlenmiştir. Sonuçta suşlar arasındaki en yüksek aktivite *L.rhamnosus* ACS5 suşunda (%81) gözlenmiştir. En düşük aktivite ise *L. rhamnosus* BTM1 suşunda (%42) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.8. *Lactobacillus*'ların antioksidan aktivitesi

SUŞLAR	%ANTIOKSİDAN GİDERİMİ
<i>L. rhamnosus</i> ACS5	81 ± 0
<i>L. fermentum</i> BSP1	65 ± 0
<i>L. brevis</i> BT1	65 ± 0
<i>L. brevis</i> KMP1	65 ± 0
<i>L. helveticus</i> MNK3	63 ± 0
<i>L. rhamnosus</i> EDS4	62 ± 0
<i>L. rhamnosus</i> ACS1	61 ± 0
<i>L. rhamnosus</i> MP4	55 ± 0
<i>L. rhamnosus</i> BTM3	54 ± 0
<i>L. rhamnosus</i> BTM4	52 ± 0
<i>L. rhamnosus</i> MP1	50 ± 0
<i>L. rhamnosus</i> BAT2	50 ± 0
<i>L. rhamnosus</i> BT8	47 ± 0
<i>L. rhamnosus</i> KMP2	43 ± 0
<i>L. rhamnosus</i> BTM1	42 ± 0



Şekil 4.7. *Lactobacillus*'ların antioksidan aktivitesi grafiği

#### 4.8. *Lactobacillus*'ların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

*Lactobacillus*'ların protein sentezi inhibitörü gentamisin, antimikrobiyal etkiye sahip olan nitrofurantoin, hücre duvarı sentezi inhibitörü olan penisilin, sitoplazmik zar sentezi inhibitörü olan polimiksin b, nükleik asit sentezi inhibitörü ofloksasin antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları araştırılmıştır.

Farklı antibiyotiklerin *Lactobacillus*' lar üzerine inhibisyon etkisi Bölüm 3.2.5' de anlatıldığı gibi disk difüzyon yöntemi ile tespit edilmiştir. Sonuçlar CLSI standardına göre değerlendirilip, Çizelge 4.9. da gösterilmiştir.

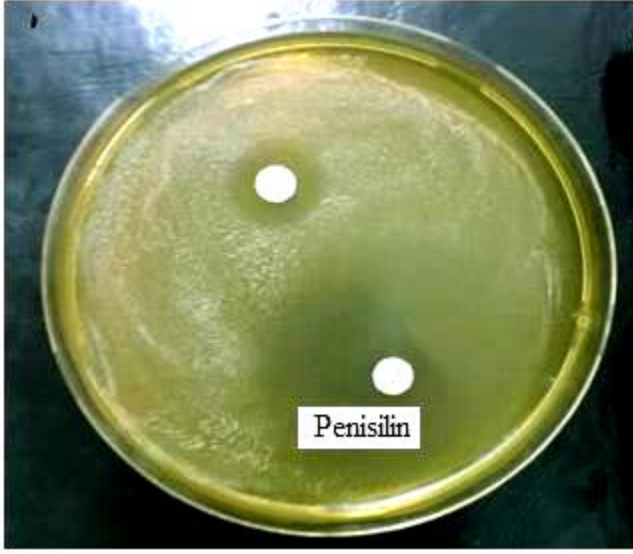
Antibiyoqram test sonuçlarına göre, *Lactobacillus* bakterileri gentamisin, nitrofurantoin, penisilin, polimiksin b ve ofloksasin antibiyotiklerine dirençlilik gösterirken, hücre duvarı sentezini inhibe eden penisilin antibiyotiğine %20 oranında dirençlilik gösterdikleri gözlenmiştir. Penisilin antibiyotiğine karşı dirençli suşlar *L. rhamnosus* BT8, *L. brevis* BT1, KMP1 suşlarıdır.

Çizelge 4.9. *Lactobacillus*'ların CLSI kriterlerine göre antibiyotik duyarlılıkları

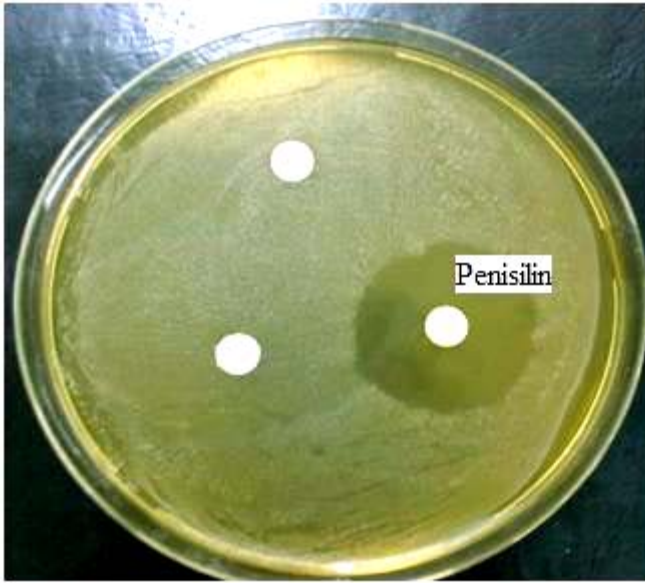
	Gentamisin (CN10) µg	Nitrofurantoin (F) 300 g	Penisilin (P) 10U	PolimiksinB (PB) 300U	Ofloksasin (OFX) 5 µg
<i>L. rhamnosus</i> ACS1	-	-	+	-	-
<i>L. rhamnosus</i> ACS5	-	-	+	-	-
<i>L. rhamnosus</i> BAT2	-	-	+	-	-
<i>L. rhamnosus</i> BT8	-	-	-	-	-
<i>L. rhamnosus</i> BTM1	-	-	+	-	-
<i>L. rhamnosus</i> BTM3	-	-	+	-	-
<i>L. rhamnosus</i> BTM4	-	-	+	-	-
<i>L. rhamnosus</i> EDS4	-	-	+	-	-
<i>L. rhamnosus</i> KMP2	-	-	+	-	-
<i>L. rhamnosus</i> MP1	-	-	+	-	-
<i>L. rhamnosus</i> MP4	-	-	+	-	-
<i>L. fermentum</i> BSP1	-	-	+	-	-
<i>L. brevis</i> BT1	-	-	-	-	-
<i>L. brevis</i> KMP1	-	-	-	-	-
<i>L. helveticus</i> MNK3	-	-	+	-	-

++ : Duyarlı, + : Orta Derece Duyarlı, - : Dirençli

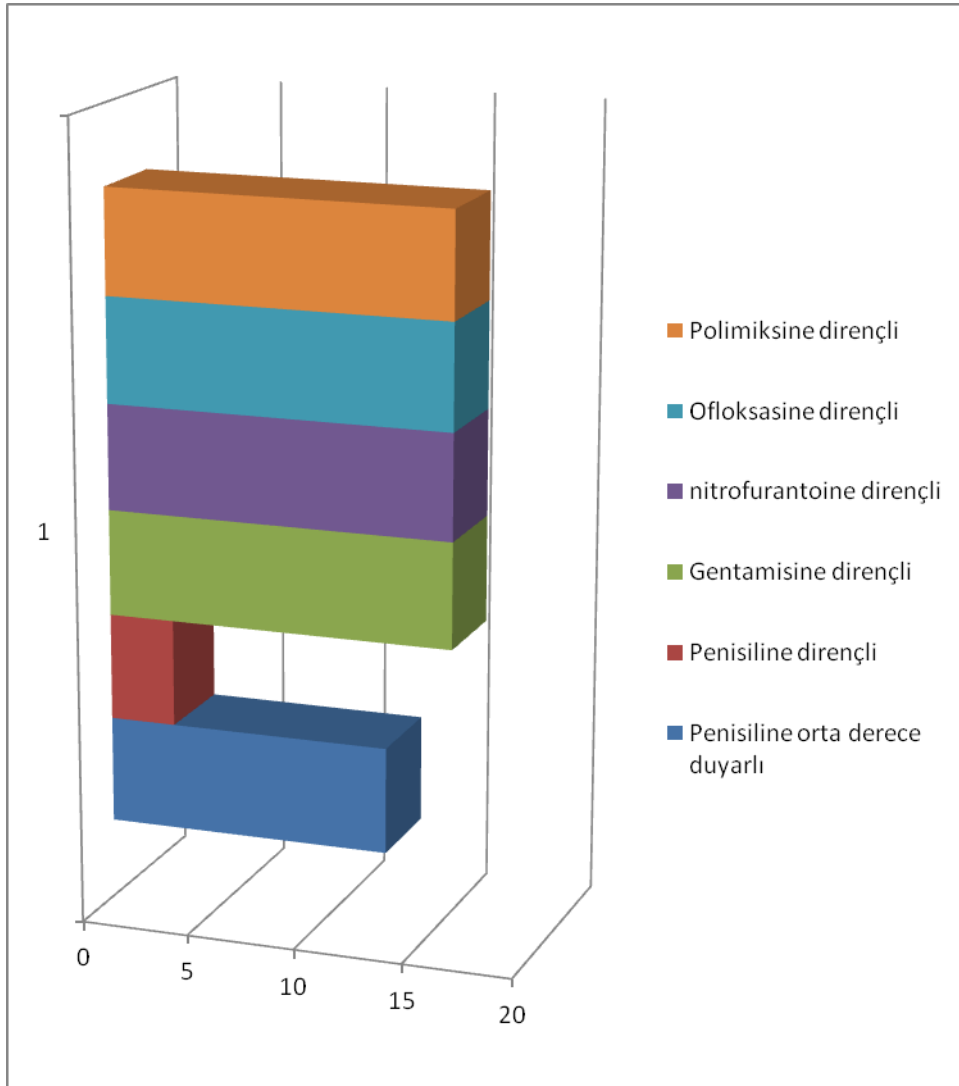
CN: Gentamisin, F: Nitrofurantoin, P:Penisilin, PB: Polimiksin B, OFX: Ofloksasin



Resim 4.1. MNK3 *Lactobacillus helveticus* suşunun penisilin duyarlılığı



Resim 4.2. BSP1 *Lactobacillus fermentum* suşunun penisilin duyarlılığı



Şekil 4.8. Antibiyotiklere direnç gösteren *Lactobacillus* sayıları

#### 4.9. *Lactobacillus*'ların Antimikrobiyel Aktiviteleri

*Lactobacillus* suşlarının patojen mikroorganizmaları inhibe etme özelliği gıdalarda veya bağırsakta patojen olan 5 referans kültür (*E. coli* ATCC 11229, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus* RSKK 863, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ) kullanılarak, bölüm 3.2.7. anlatıldığı gibi belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.10.'de verilmiştir.

Tüm suşlar *Escherichia coli* O157:H7 patojenine karşı antimikrobiyal etki gösterirken, en yüksek antimikrobiyal aktivite *L. fermentum* BSP1 (7,7 mm) suşunda gözlenmiştir.

*Lactobacillus rhamnosus* BTM1 hariç tüm suşların *E. coli* ATCC 11229 patojenine karşı antimikrobiyal etki gösterdiği gözlenmiştir.

*Bacillus cereus* RSKK 863 patojeni *L. Rhamnosus* ACS1, ACS5, BTM1, BTM3, BTM4, KMP2, MP1, MP4 suşları hariç diğer suşların antimikrobiyal etki gösterdiği gözlenmiştir.

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 patojenine karşı *Lactobacillus rhamnosus* ACS1, ACS5, BTM1, BTM3, KMP2, MP4 ve *L. brevis* BT1,KMP1 suşları hariç diğer suşların antimikrobiyal etki gösterdiği gözlenmiştir.

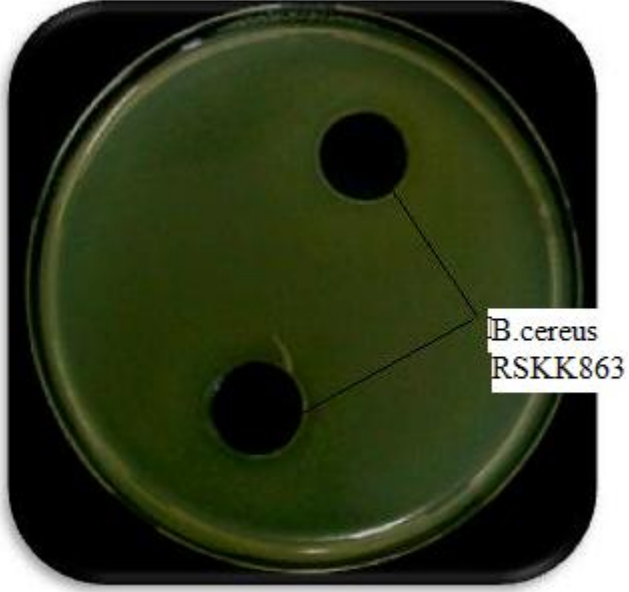
*Salmonella enteritidis* ATCC 13076 patojenine karşı *L. rhamnosus* BTM1 hariç tüm suşların antimikrobiyal etki gösterdiği gözlenmiştir.

*Listeria monocytogenesis* ATCC 7644 patojenine karşı tüm suşların çok yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği görülmüştür. 26,6 değeri ile en yüksek değer *L. rhamnosus* ACS5 suşunda gözlenmiştir.

Çizelge 4.10. *Lactobacillus*'ların antimikrobiyel aktivitesi sonucu zon çapları

Suşlar	<i>E. coli</i> O:157 H7	<i>E. coli</i> ATCC 11229	<i>B.cereus</i> RSKK 863	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>S.enteridis</i> ATCC 13076	<i>L.monocytogenes</i> ATCC 7644
<i>L.rhamnosus</i> ACS	2,8±0,0	4,4±0,6	–	–	5±0,2	21,8±1,6
<i>L.rhamnosus</i> ACS5	3,3±0,5	3,8±0	–	–	2,8±0,0	26,6±1,8
<i>L.rhamnosus</i> BAT2	4,8±0,2	5,4±0,2	4,0±1,2	2,6±0,0	6,1±0,5	22,6±0,0
<i>L.fermentum</i> BSP1	7,7±0,1	5,3±0,5	5,1±0,3	5,3±0,1	8±1,2	16,7±0,9
<i>L.brevis</i> BT1	3,3±0,5	3,6±0,2	3,8±0,0	–	3,8±0	22,7±0,9
<i>L.rhamnosus</i> BT8	3,0±0,0	3±0,2	6,7±0,9	3±0,4	2,8±0,0	22,1±0,5
<i>L.rhamnosus</i> BTM1	3,4±0,0	–	–	–	–	23,2±0,0
<i>L.rhamnosus</i> BTM3	7,4±2,2	5,2±0,4	–	–	2,8±0,0	24,4±2,2
<i>L.rhamnosus</i> BTM4	7,4±0,2	2,7±0,1	–	3,3±0,5	5,2±0,0	25,2±0,2
<i>L.rhamnosus</i> EDS4	2,7±0,1	5,2±0,0	3,8±0,0	2,7±0,1	3±0,2	24,5±0,9
<i>L.brevis</i> KMP1	3,4±0,0	3,6±0,2	3,6±0,2	–	3,8±0,0	19,6±0,8
<i>L.rhamnosus</i> KMP2	3,3±0,5	3,9±0,7	–	–	3,6±0,2	24,5±1,3
<i>L.helveticus</i> MNK3	3,6±1,0	3,8±0,0	5,4±0,2	–	2,8±0,0	22,1±0,5
<i>L.rhamnosus</i> MP1	5,7±0,1	4,4±1,2	–	3,8±0,0	5,6±0,0	23,1±0,5
<i>L.rhamnosus</i> MP4	2,8±0,0	2,8±0,0	–	–	3±0,2	23,7±0,7





Resim 4.3. *L. rhamnosus* bakterisinin *B. cereus* üzerine antimikrobiyal etkisi



Resim 4.4. *L. helveticus* bakterisinin *E. coli* üzerine antimikrobiyal etkisi

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsan vücudu dinamik bir ekosistemdir ve birçok mikroorganizmanın konakçısıdır. Bu ekosistemde bulunan mikroorganizmalar faydalı ve zararlı olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Sağlıklı bir konakçıda bu iki grup dinamik bir denge halinde olup faydalı mikroorganizmalar baskın mikroflorayı oluştururlar. Bağırsak ekosisteminin fizyolojik dengesi hastalık, yaşlılık, antibiyotik veya ilaç kullanımı, diyet alışkanlıklarının değiştirilmesi, iklim koşullarında meydana gelen değişimler ve çevresel toksik maddeler gibi birçok farklı faktörlerden doğrudan veya dolaylı olarak etkilenebilmektedir. Bağırsak sisteminin dengesinde meydana gelen herhangi bir düzensizlik sonucu bağırsak mikroflorasının dengesi bozulur ve faydalı mikroorganizma sayısında azalmalar başlar [128].

Son yıllarda yapılan çalışmalara göre, bu mikroflora dengesizliğinin dışarıdan yapılacak mikroorganizma takviyesi ile aşılabileceği belirtilmiştir. Dışarıdan takviye edilen, probiyotik adı verilen bu mikroorganizmalar ürettikleri maddeler yardımıyla gıdaların sindirimine, ve zararlı mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların önlenmesine, vitamin üretimine yardımcı olarak bağısağın doğal floranın dengesini korur. Bu özelliklerinden dolayı son yıllarda faydalı bakteriler, yoğurt ve peynir gibi fermente süt ürünlerine katılarak, probiyotik ürün olarak piyasaya sunulmaktadır [129].

Probiyotik kelimesi Yunanca’ da “yaşam için” anlamına gelir. Genel anlamıyla probiyotikler, insan ve hayvanların doğal mikroflorasına ait özellikleri geliştiren, tüketimleri sonucunda ağızda, sindirim sisteminde, üst solunum yollarında ya da ürogenital kanallarda yararlı etkileri ile konakçının sağlığını koruyan, buralarda oluşan enfeksiyonların iyileşmesine katkıda bulunan, tek veya karışık mikroorganizma kültürleridir [3].

Fermente süt ürünleri, probiyotik bakterilerle zenginleştirilmiş fonksiyonel gıdalar olarak kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır [130,131].

Fermente süt ürünleri arasında canlı probiyotik bakteri taşıyıcısı olarak en uygun ürünün peynir olduğu ispatlanmıştır. Peynirin katı yapısı, yüksek pH' sı, tampon kapasitesi ve yağ içeriği, bakterileri bağırsakta yararlı olacakları bölgeye varıncaya kadar sıvı yapıda olan süte göre daha iyi korur [132]. Probiyotik bakterilerin mide-bağırsak yolunda canlılıklarını sürdürebilmeleri, ortamda kolonize olabilmeleri için midenin asidik pH'larına (2,5-3,5) ve bağırsağın safralı ortamına tolerans gösterebilmeleri önemli özelliklerindedir [133]. Mide pH'sı gıda alımı sonrasında 6,0'ya kadar artmasına rağmen, genellikle 2,5 ile 3,5 arasında değişmektedir. Midede açlık ile pH 1,5'a kadar düşebilir. Bu aşırı asidik koşullarda hayatta kalma probiyotiklerin karşılaştığı ilk fizyolojik sorunlardan biridir [134].

Hwanhlem ve ark. (2010)'nın yaptıkları çalışmada, 274 adet LAB'nin mide-bağırsak ortamına gösterdikleri tolerans, 3 mg/mL pepsin içeren yapay mide sıvısında (pH 3,0) 37°C'de 4 saat inkübe edilerek incelenmiştir. Test edilen LAB'lerinden yalnız 10 adet suşda %50'nin üzerinde canlılık oranı tespit edilirken, pH 2,5'de aynı suşların canlılık oranlarında daha fazla azalma rapor edilmiştir [135].

Mide sıvısının pH'sı 1,0 civarında olmasına rağmen yemeklerden ve özellikle süt ürünlerinin tüketiminden sonra ortam pH' sı 3,0'e ve hatta daha yüksek bir değere ulaşır, bu yüzden LAB'lerinin pH 3,0'te canlılıklarını koruyabildikleri görülmüş ve bu bakteriler probiyotik açıdan önem kazanmıştır [136].

Mishra ve Prasad (2005)'in yaptıkları çalışmada, test edilen 7 adet LAB'sinden yalnız 3 suşun pH 2,0 veya 3,0'e dirençlilik gösterdiği rapor edilmiştir [137].

Probiyotik bakterilerin canlılık oranındaki azalma, pepsin enziminden dolayı veya pepsin ve yüksek pH'nın birlikte etkilerinden dolayı olabilir. Diğer taraftan, süt proteinleri bakteriler üzerinde koruyucu etki göstererek, midenin asidik ortamında bakterilerin canlı kalmalarını sağlamaktadır. Bu nedenden dolayı, probiyotik bakterilerin genellikle süt veya etli gıdalarla birlikte kullanıldığında daha etkili oldukları bildirilmiştir [138].

Bu çalışmada da probiyotiklerin midenin yüksek asitli ortamından bağırsaklara ulaşabilme yeteneğini belirlemek amacıyla mide sıvısı koşullarına benzer bir ortam oluşturulmaya çalışılmış ve Laktobasillerin pH 2,0, pH 3,0, pH 4,0 değerlerine ayarlanan besiortamlarındaki gelişimleri gözlenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde pH 2,0'de tüm suşlar zayıf gelişme göstermiştir. pH 3,0'da suşların genel olarak zayıf gelişme gösterdiği gözlenmiştir. pH 4,0'da en iyi gelişmeyi *L. fermentum* BSP1, *L. brevis* BT1,KMP1, *L. helveticus* MNK3 suşlarının gösterdiği, diğer bakterilerin ise zayıf gelişme gösterdiği gözlenmiştir. Ortamdaki asitlik oranının yükselmesi ile bakterilerin üreme yoğunluğunda azalma meydana gelmiştir.

Probiyotik bakterilerin diğer özelliklerinden biri bakterilerin mide sıvısından sonra ince bağırsak sıvısı ortamına da dirençlilik gösterebilmeleridir. Mide geçişini takiben ince bağırsak gastrointestinal sistemde ikinci büyük engeldir. İnce bağırsağın pH'ı bakterilerin yaşamasına daha uygun olmasına rağmen, pankreatin ve safra tuzları varlığı olumsuz etki yapabilir. Bu amaçla *Lactobacillus* bakterileri bağırsak sıvısına benzer bir ortama maruz bırakılmıştır ve pH 5.0 ve pH 6.5 değerlerine ayarlanan besiortamlarındaki gelişimleri gözlenmiştir. pH 5.0 ve pH 6.5'de tüm bakterilerin geliştiği, pH 9.6'da bakterilerin genel olarak iyi gelişme gösterdiği gözlenmiştir.

Bu sonuçlara göre çalışmada kullanılan suşların mide ve bağırsak koşullarında canlılıklarını sürdürebilecekleri, dolayısı ile probiyotik özelliklerini sergileyebileceklerini düşünmekteyiz (Bkz. Çizelge 4.3, Şekil 4.2.).

Yüzyıllardır tuz koruyucu özelliğinden dolayı gıda işleminde kullanılır. Tuzun gıdalar üzerindeki etkisini birçok değişik faktör belirlemektedir [139]. Bakteriler gıdanın içerisinde yüksek tuza maruz kalmaktadır. Bu durumlarda, özellikle hidrasyon (su kaybetme) bakteriler için çok önemlidir [140].

Tuzun mikroorganizmalar üzerindeki en önemli etkisi osmotik basıncı artırması ve böylece hücre geçirgenliğini artırarak mikroorganizma etkinliğinin azaltması veya önlemesidir. Ancak; bunun için gerekli olan tuz konsantrasyonunu pH, sıcaklık, protein oranı ve protein niteliği, karbohidrat miktarı, metal iyonları varlığı gibi çeşitli

faktörlerden etkilenmektedir. Bizim çalışmamızda da *Lactobacillus* suşlarının % 0, % 3, % 6,5, % 10 ve % 12 tuz konsantrasyonlarında gelişme yetenekleri gözlenmiştir.

% 3 tuz konsantrasyonunda tüm bakterilerin gelişme gösterdiği, en iyi gelişmeyi *L. rhamnosus* türlerinin gösterdiği; %4 ve % 6,5 tuz konsantrasyonunda *Lactobacillus helveticus* MNK3 suşunun zayıf gelişme gösterdiği, diğer tüm bakterilerin iyi gelişme gösterdiği, % 10 tuz konsantrasyonunda genel olarak bakterilerin zayıf gelişme gösterdiği ; % 12 tuz konsantrasyonunda *Lactobacillus fermentum* BSP1 suşlarının gelişme göstermediği diğer suşların ise zayıf gelişme gösterdiği tespit edilmiştir ( Bkz. Çizelge 4.4. , Şekil 4.3.) .

Laktik asit üreten starter kültürler, fermente süt, et ve bitki ürünlerinin üretiminde kullanılır. Fermantasyon sonucu oluşan laktik asit, ürünlerin raf-ömrü, tadı, aroması, kıvamı ve kalitesi bakımından daha iyi ve gelişmiş bir ürünün oluşmasında etkili olmuştur. Laktik asit ortamın pH'ını düşürmesi nedeniyle gıdalardaki kontaminant ve patojen bakterilerin inhibisyonuna neden olur.

Fermantasyon sürecinde oluşan organik asitlerin miktarı ve türü (örneğin; laktik asit, formik asit, vb.) fermantasyon yapan LAB' lerinin türüne, kültür içeriğine ve üreme şartlarına göre farklılık gösterir [44,135].

Bu çalışma sonucunda *Lactobacillus'* ların MRS sıvı besi ortamındaki 24 saatlik kültürlerinin titre edilebilir yüzde asit miktarları en düşük *L. rhamnosus* ACS1 %0,11 ve en yüksek *L. helveticus* MNK3 %1,26 olarak belirlenmiştir. MRS sıvı besi ortamında, *Lactobacillus rhamnosus* BT8 %1,02, *Lactobacillus rhamnosus* MP1 %1,20, %1,17 ve *Lactobacillus fermentum* BSP1 %1,06, *L. helveticus* MNK3 %1,26, yüksek asit ürettikleri gözlenmiştir. Çalışmada *L. helveticus* suşunun asit üretimlerinin diğer bakterilerinden daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Ekzopolisakkarit (EPS) üretimi bakteriler için mideden sonra bağırsağa geçtiklerinde probiyotik özellik gösterebilmelerinde en büyük avantajlı özelliktir [141].

Bakteriler tarafından üretilen polisakkaritler kıvam artırıcı özellikleri nedeniyle starter kültürlerde aranan özelliklerdendir. Probiyotik açıdan ise antibiyotiklerin toksik etkisinden, mide bağırsak koşullarının olumsuz etkilerinden korunmak ve bağırsakta kolonizasyonu artırmak gibi probiyotik suşa çeşitli avantajlar kazandırmaktadır. Ekzopolisakkaritlerin, fermente süt ürünlerinin yapısal özellikleri üzerinde oynadıkları rol yanında antitümör, antiülser, immün sistemi uyarıcı ve kolesterol düşürücü aktivitelerinden dolayı insan sağlığını koruyucu etkileri bildirilmiştir.

Cerning ve ark. (1992), *L. bulgaricus* suşlarının 55-150 mg/L aralığında EPS ürettiklerini bildirmişlerdir [ 66,142 ]. Araştırmacılar EPS üretimlerinin türler ve hatta suşlar arasında farklı olmasında, fermentasyon şartlarının (sıcaklık, inkübasyon, süre ve pH) ve besiyeri bileşenlerinin (karbon ve nitrojen kaynağı) etkili olabileceğini bildirmişlerdir [143,144].

Laktik asit bakterileri 2 çeşit EPS üretebilirler. Bunlardan birincisi hücre yüzeyine kuvvetlice bağlanan kapsüler polisakkaritler (CPS, capsular polysaccharides), diğeri ise hücre dışı ortama salgılanan ekzopolisakkaritler (EPS) olarak bilinir. Eksopolisakkaritler de yapısal olarak 2 gruba ayrılırlar. Sadece bir tür monosakkarit içeren polimerler homopolisakkarit ve iki veya daha fazla monosakkarit türü içeren polimerler ise hetropolisakkarit (HePS) olarak adlandırılmıştır [145].

Bu çalışmada, *Lactobacillus*' ların EPS üretim miktarları MRS besiortamında belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.5, Şekil 4.4). En yüksek EPS üretimi *Lactobacillus rhamnosus* ACS1 suşunda, en düşük EPS üretimi *Lactobacillus rhamnosus* MP4 suşunda gözlenmiştir. Sonuç olarak deneyimizde kullandığımız *Lactobacillus* suşlarının hepsinde türlerinin de özelliği olduğu gibi EPS üretimi gözlenmiştir. Çalışmamızda kullandığımız *Lactobacillus* suşları içerisinde EPS üretmeyen bakteriye rastlanmamıştır.

Tüm suşların kolesterol giderimleri incelendiğinde genellikle en yüksek kolesterol gideriminin %0,30 oranında safra içeren ortamda gerçekleştiği saptanmıştır. (Bkz.

Çizelge 4.6, Şekil 4.5). Probiyotik mikroorganizmaların konak için yararlı etkiler gösterebilmesi, ince bağırsakta canlı kalabilmesi ve kolonize olabilmesi için safra toleransı önemlidir. Bu çalışmada da kullandığımız bakterilerin safra toleranslarının genel olarak yüksek olduğunu ve probiyotik olarak kullanılmaya uygun olduğunu gözledik.

Ayrıca safraya toleranslı türlerin seçimi laktoz intoleransı olan insanlarda laktozu sindirimini düzenlemesi açısından önemli olduğu bildirilmiştir [146].

Bu nedenlerle safraya tolerans aslında probiyotik seçiminde temel kriterlerden birini oluşturmaktadır. Safra yağları parçalayarak bağırsaklardan emilimlerine yardımcı olmak üzere karaciğerden ince bağırsağa salgılanır. Ancak safra bakterilerin büyük oranda lipit ve yağ asidi içeren hücre membranlarına zarar vererek bunlar üzerinde inhibitör etki yaparlar. [147-149].

İnsan kullanımı için probiyotiklerin seçimindeki safra toleransı çalışmalarında % 0,15 ve % 0,30 konsantrasyonlarında safranın kullanılması önerilmektedir [150].

Gilliand ve ark., 1985 yılında yaptıkları bir in vitro çalışmada, belirli *Lactobacillus acidophilus* suşlarının anaerobik koşullar altında ve safra varlığında, besiyerindeki kolesterol miktarını azaltabildiğini göstermişlerdir. Bu koşullar, bağırsaklarda mevcut koşullar ile aynı olduğu için, yazarlar, bu olayın, diyetle alınan kolesterolün en azından bir kısmının kana karışmasını engelleyebileceği sonucuna varmışlardır. Ancak, safra varlığında üreme ve besiyerindeki kolesterolü uzaklaştırabilme kabiliyeti suşlara bağlı olarak farklılık göstermiştir [151,152].

Yapılan bu çalışmada tüm suşlar tarafından genellikle en yüksek kolesterol gideriminin %0,30 oranında safra içeren ortamda gerçekleştiği saptanmıştır. %0,15 oranında safra içeren besiortamında safra içermeyen besiortamına göre genelde daha yüksek kolesterol gideriminin gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Antioksidanlar, DPPH gibi serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek veya mevcut radikalleri süpürerek hücrenin zarar görmesini engelleyen ve yapısında genellikle fenolik fonksiyon taşıyan moleküllerdir [153,154]. Vücutta kalkan görevi yapan antioksidanlar, kendi elektronlarını vererek serbest radikalleri nötralize ederler. [155]. Örneğin; DPPH kararlı bir serbest radikaldir. Kararlı bir diamanyetik molekül oluşturmak için bir elektron veya hidrojen radikalini bünyesine kabul eder. Antioksidan ile DPPH'in oluşturduğu reaksiyon karışımının gösterdiği absorbans ne kadar düşük ise antioksidanın serbest radikal giderme aktivitesi o kadar yüksek demektir. DPPH'in ortamdaki miktarının azalması ile absorbansın azalması belli bir antioksidan derişimine kadar doğru orantılıdır. Absorbansın düşmesinin sebebi radikal ile antioksidan moleküllerin reaksiyonu sonucu hidrojen bağlanması ile radikalın giderilmesidir.

Bu çalışmada *Lactobacillus* suşlarının hepsinin %40 üzerinde bir antioksidan giderimi gösterdiği belirlenmiştir. (Bkz. Çizelge 4.8, Şekil 4.7). Sonuçta suşlar arasındaki en yüksek aktivite ACS5 suşunda (%81) gözlenmiştir. En düşük aktivite ise BTM1 suşunda (%42) tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, *Lactobacillus* bakterilerinin antibiyotiklere karşı duyarlılıkları araştırılmıştır. Farklı antibiyotiklerin *Lactobacillus*' lar üzerinde inhibisyon etkisi disk difüzyon yöntemi ile tespit edilmiştir. Sonuçlar CLSI standardına göre değerlendirilmiştir (Bkz. Çizelge 4.9).

Antibiyogram test sonuçlarına göre, *Lactobacillus* bakterileri gentamisin ,nitrofurantoin , penisilin , polimiksin , ofloksasin antibiyotiklerine %100 dirençlilik gösterirken, hücre duvarı sentezini inhibe eden penisilin antibiyotiğine %20 oranında dirençlilik gösterdikleri gözlenmiştir. Penisilin antibiyotiğine karşı dirençli suşların *Lactobacillus rhamnosus* BT8, *Lactobacillus brevis* BT1,KMP1 olduğu belirlenmiştir.

Bazı araştırmacılar mide-bağırsak enfeksiyonlarında kullanılan antibiyotiklere karşı, probiyotik bakterilerin gösterdikleri dirençliliğin yararlı olabileceği düşünülmektedir.



Dolayısıyla, bazı antibiyotiklere dirençli olan Lactobaciller, antibiyotik tedavisi yapılan süreçte ve tedaviden sonra bağırsağın doğal mikroflora dengesini etkili bir şekilde koruyabilir.

*Lactobacillus* suşlarının gıda patojeni ve kontaminant bakterilere karşı gösterdikleri antimikrobiyal aktivite, peynir üretiminde koruyucu kültürler olarak değerlendirilebileceği düşünülmüştür [4].

Bir araştırmada, LAB' lerle aynı kültürü paylaşan *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* ve *Salmonella* sp. bakterilerin gelişmesinde ilk 12 saat artış gözlenirken, 48 saat inkübasyondan sonra pH' nin düşmesiyle birlikte patojen bakterilerin gelişiminde çok hızlı bir düşüşün olduğu rapor edilmiştir [135].

Genellikle, ortam pH' sı 4,4' ün altına düştüğünde *E. coli* ve *Salmonella* sp.' lerin 12-24 saat içinde gelişmelerinin inhibe olduğu gösterilmiştir [156]. *S. aureus* ve *B. cereus* bakterilerinin sırasıyla pH 3,7 ve 4,0' den düşük pH' larda 24 saat sürede inhibe oldukları bildirilmiştir [120].

Starter, yardımcı-starter veya probiyotik kültürlerin seçiminde, antimikrobiyal maddelerin üretimi bakterilerin önemli özelliklerindedir. Gıdaların mikrobiyolojik dengesini koruma amacıyla bazı antimikrobiyal maddeler üreten LAB' leri gibi mikroorganizma kültürleri "koruyucu kültürler" olarak bilinmektedirler. Bu kültürler gıda kaynaklı patojen ve kontaminant bakterilerin üreme riskini azaltmaktadırlar [100].

Tüm suşların *Escherichia coli* O157:H7 patojenine karşı antimikrobiyal etki gösterdiği, en yüksek antimikrobiyal aktivite *Lactobacillus fermentum* (BSP1) suşunda gözlenmiştir.

Çalışmamızda kullanılan suşların antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirildiğinde en fazla etkiyi *Listeria monocytogenesis* ATCC 7644 patojenine karşı gösterdikleri gözlenmiştir. *E. coli* ATCC 11229 patojenine karşı da bakterilerin tamamının antimikrobiyal etki gösterdiği gözlenmiştir.

*Lactobacillus* bakterilerinin *Bacillus cereus* RSKK 863, patojenine karşı *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 patojenine karşı da antimikrobiyal etki gösterdikleri gözlenmiştir. Bakteriler en az antimikrobiyal etkiyi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterisine karşı göstermiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bu sonuçların daha sonraki probiyotik araştırmalarına katkı sağlayacağını bu özelliklere sahip probiyotik kültürlerin farklı alanlarda ve uygulamalarda kullanılabilineceğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. De Vuyst, L., Avonts, L., Makras, E., “Probiotics, prebiotics and gut health”, Remacle, C., Reusens, B., “Functional Foods, Ageing and Degenerative Disease”, **Woodhead Publishing Ltd.**, Cambridge, United Kingdom, 416-482 (2004).
2. McFarland, L.V., “Normal flora: diversity and functions”, **Microb. Ecol. Health Dis.**, 12: 193-207 (2000).
3. Klaenhammer, R.T., Kullen, J.M., “Selection and design of properties” , **Int. J. of Food Microbiol.**, 50:45-57 (1999).
4. Fuller, R., “What is probiotic?”, **Biologist.**, 51:232 (2004).
5. Korakli, M., Gaonzle, M.G., Vogel, R.F., “Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*”, **J. Appl. Microbiol.**, 92: 958-965 (2002).
6. Roos, S., Lingren, S., Jonsson, H., “Autoaggregation of *Lactobacillus reuteri* is mediated by putative DEAD-box helicase”, **Molecular Microbiol.**, 32: 427-436 (1999).
7. Jamal, S.Y.H., “Kinetic Studies and Sensorial Analysis of Lactic Acid Bacteria Isolated from White Cheese Made from Sheep Raw Milk”, **Pakistan Journal of Nutrition** 4 (2): 78-84 (2005).
8. Durlu, Ö. F., “Salamura beyaz peynirden izole edilen bazı laktokok, enterokok ve laktobasil suşlarının proteolitik aktivite, bakteriyosin etkenliği ve biyogen amin oluşumu açısından karşılaştırılması”, Doktora Tezi, **Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 1-25 (2001).
9. Abdi, R., Sheikh, Z. M., Soleimani, Z. S., “Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian Lighvan cheese”, **Pakistan J. Biological Sci.**, 9: 99-103 (2006).
10. Irigoyen, A., Ortigosa, M., Juansaras, I., Oneca, M., P. Torre. “ Influence of an adjunct culture of *Lactobacillus* on the free amino acids and volatile compounds in a Roncal-type ewe’s-milk cheese **Food Chem.** ”, 100 (1), 71-80 (2007).
11. Valerie, G., Sylvie, L., “Autolysis and related proteolysis in Swiss cheese for two *Lactobacillus helveticus* strains”, **Journal of Dairy Research** , 67: 261-271 (2000).

12. Corthier, G., "The Health Benefits of Probiotics", *Danone Nutritopics*, 29 (2004).
13. Fuller, R., "Probiotics in man and animal" , *J. Appl. Bacteriol.*, 66: 365-378 (1998).
14. Yücesan, S., "Probiyotikler ve sağlık üzerine etkileri", *Türk Diyetisyenler Derneği Bülteni*, 2: 1-13 (2002).
15. Çakır, İ., "Lactobacillus ve Bifidobacterler' de bazı probiyotik özelliklerin incelenmesi", Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 4-39 (2003).
16. Bozkurt, H., Aslım, B., "İmmobilizasyonun Probiyotik Kültürlerde Kullanımı", *Orlab On-Line Mikrobioloji*, 2:1-14 (2004).
17. Ong, L., Henriksson, A., Shah, N. P., "Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid", *Int. Dairy J.*, 16: 446-456 (2006).
18. Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G.R., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M., Rowland, I., "Functional Food Science and Gastrointestinal Physiology and Function", *British Journal of Nutrition* 80:147-171 (1998).
19. Salminen, S., Ouwehand, A. C., Isolauri, E., "Probiotics: an overview of beneficial effects" , *Anton Leeuw.*, 82: 279-289 (2002).
20. Jan, G., Leverrier, P., Proudly, I., Roland, N., "Survival and beneficial effects of propionibacteria in the human gut: in vivo and in vitro investigations" , *Lait.*, 82:131-144 (2002).
21. İnternet: Gonenli Balıkesir Peynircisi, Özel Beyaz Peyniri, "Images", (2011). <http://www.google.com/imgres?imgurl=http://www.gonenlipeynirci.com>
22. İnternet: Different Balıkesir Natural Cheese Series Images, "images", (2011). <http://www.google.com/imges>, <http://tpkorean.files.wordpress.com>
23. Morelli, L., "In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality", *Int. Dairy J.*, 17: 1278-1283 (2007).
24. Shah, N. P., "Functional cultures and health benefits. In Scientific and technological challenges in fermented milk", *Dairy sci. technol. week*, 35-36 (2006).

25. Ross, R., Morgan, S., Hill, C., “Preservation and Fermentation: Past, Present, Future”, *International Journal of Food Microbiology*, 79: 3-16 (2002).
26. Karovicová, J., Kohajdová, Z., “Lactic Acid –Fermented Juices – Palatable and Wholesome”, *Foods. Chem. Pap.*, 59 (2): 143-148 (2005).
27. Bulut, Ç., “Isolation and Molecular Characterization of Lactic Acid Bacteria from Cheese”, Yüksek Lisans Tezi. *İzmir Teknoloji Enstitüsü*, 102s., İzmir. (2003)
28. Tekinşen, O.C., Atasever, M., “Süt ürünlerinde starter kültür”, *Selçuk Üni. Veterinerlik Fak.*, 150-151 (1994).
29. Halkman, K., Halkman, Z., “Kaşar peyniri starter kültür kombinasyonları üzerinde bir araştırma”, *Gıda*, 16 (2): 99-105 (1991).
30. Şahin, İ., “Endüstriyel Mikrobiyoloji”, Yüksek Lisans Tezi, *Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Bursa, 64-65 (2003).
31. Stiles, M.E., Holzapfel, W.H., “Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy”, *International Journal of Food Microbiology* 36: 1-29 (1997).
32. Şen, A., Toprak, N., Güneş, E., Halkman, K., “Probiotics”, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1-6 (2004).
33. Salminen, E. I., Ouwehand A. C., “Probiotics”, *Clin Gastroenterol.*, 18: 299-313 (2004).
34. Vasiljevic, T., Shah, N.P., “Probiotics-from Metchnikoff to bioactives”, *Int. Dairy J.*, 18: 714-728 (2008).
35. Sillanpää, J., “Tissue-Adherence in Lactic Acid Bacteria: Identification and Characterization of the Collagen Binding S-Layer Protein of *Lactobacillus crispatus*”, *University of Helsinki*, Helsinki, 7-11 (2001).
36. Shah, N.P., “Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods”, *J. Dairy Sci.*, 83: 894-907 (2000).
37. Yücesan, S., “Probiyotikler ve sağlık üzerine etkileri”, *Türk Diyetisyenler Derneği Bülteni*, 2: 1-13 (2002).
38. Zubillago, M., Weill, R., Postaine, E., Goldman, C., Caro, R., Boccio, J., “Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases”, *Nutrition Research*, 21: 569-579 (2001).

39. Rolfe, R.D., "The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health", *J. Nutr.*, 130: 396-402 (2000).
40. Kaleli, İ., "Probiyotiklerin Etki Mekanizması", *Ankem*, 21:238-242 (2007).
41. Servin, A.L., Coconnier, M.H., "Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens", *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 17:741-754 (2003).
42. Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Shortt, C., "Probiotics: mechanisms and established effects", *Int. Dairy J.*, 9:43-52 (1999).
43. Morita, H., He, F., Fuse, T., Ouwehand, A.C., Hashimoto, H., Hosoda, M., "Adhesion of lactic acid bacteria to caco-2 cells and their effect on cytokine secretion", *Microbiol. Immunol.*, 46:293-297 (2002).
44. Wijaya, A., "Investigation into the influence of a bacteriocin-producing *Enterococcus* strain on the intestinal microflora", Ph.D Thesis, *University of Karlsruhe, Fakultät für Chemie und Biowissenschaften*, Germany, 34-39 (2003).
45. Hwanhlem, N., Watthanasakphuban, N., Riebroy, S., Benjakul, S., H-Kittikun, A., Maneerat, S., "Probiotic lactic acid bacteria from Kung-Som: isolation, screening, inhibition of pathogenic bacteria", *Int. J. Food Sci. and Technol.*, 45: 594-601 (2010).
46. DeMan, J. C., Rogosa, M., Sharpe, M. E., "A medium for the cultivation of lactobacilli", *J. Bacteriol.*, 23: 130 (1960).
47. Anonymous, Halkman, A.K., "Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları", *Başak Matbaacılık Ltd. Şti.*, Ankara, 243-261 (2005).
48. Sağlam, Ö. F., "Türk Gıda Mevzuatı", *Semih Ofset*, 51-53 (2000).
49. Lopes, M.F.S., Pereira, C.I., Rodrigues, F.M.S., Martins, M.P., Mimoso, M.C., Barros, T.C., Figueiredo Marques, J.J., Tenreiro, R.P., Almeida, J.S. Barreto Crespo, M.T., "Registered designation of origin areas of fermented food products defined by microbial phenotypes and artificial neural networks", *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 4484-4489 (1999).
50. Franz, C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancanneyt, M., Swings, J., Holzappel, W.H., "Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food", *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 4385-4389 (2001).

51. De Vuyst, L., Foulquie' M., Revets, H., "Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins", *Int. J. Food Microbiol.*, 84: 299-318 (2003).
52. Ambadoyiannis, G., Hatzikamari, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., "Probiotic and technological properties of enterococci isolates from infants and cheese", *Food Biotechnol.*, 18: 307-325 (2004).
53. Baer, A., Ryba, I., "Serological identification of propionibacteria in milk and cheese samples", *Inter. Dairy J.*, 2: 299-310 (1992).
54. Marshall, V. M., Rawson, H. L., "Effects of Exopolysaccharide Producing strains of thermophilic lactic acid bacteria an texture of sirred yoghurt", *Int. J. Food Sci. Technol.*, 34: 137-143 (1999).
55. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Peters, P.A., Smith, F., "Colorimetric method for determination of sugars and related substances", *Anal. Chem.*, 28: 350-356 (1956).
56. Gilliland, S.E., Nelson, C.R., Maxwell, C., "Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*". *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 377 (1985).
57. Rudel, L.L., Morris, M.D., "Determination of cholesterol using ophthalaldehyde", *J. Lipid Res.*, 14: 364-366 (1973).
58. Sanchez, J., Basanta, A., Gómez-Sala, B., Herranz, L.M., Cintas, C., Hernández, P.E., "Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*)", *Int. J. Food Microbiol.*, 117: 295-305 (2007).
59. Koluman, A, Akan, L.S., Çakiroğlu, F.P., "Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods", *Food Control*, 20: 281-283 (2009).
60. CLSI, "Clinical and Laboratory Standards Institute. Document M-100-S9. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 12 th" *Informational Supplement. M100-S12 CLSI*, 210-230 (2005).
61. Warminska-Radyo, I., Laniewska-Moroz, L., Babuchowski, A., " Possibilities for stimulation of *Bifidobacterium* growth by propionibacteria", *Lait.*, 82: 113-121 (2002).
62. Gonzalez, L., Sandoval, H., Sacristan, N., Castro, J.M., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., "Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity", *Food Control*, 18: 716-722 (2007).

63. Reinheimer, J.A., Demkow, M.R., Condioti, M.C., “Inhibition of Coliform bacteria by lactic cultures”, *The Aust. J. Dairy Technol.*, 5-9 (1990).
64. Rodríguez-Couto, S., Sanromán M., “Application of Solid-State Fermentation to Food Industry Journal of Food Engineering”, 76, 291-302 (2006).
65. Ruas-Madiedo P., Gueimonde M., Margolles A., Reyes-Gavilan C.G., Salminen S., “Exsopolisaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to Human intestinal Mucus”, *J. Food Protect* , 69(8): 201-205 (2006).
66. Cerning, J., Bouillanne C., London M., Desmazeaud M., “Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria”, *J. Dairy Sci.*, 692-699 (1992).
67. Fernandez, M. F., Boris, S., Barbés, C., “Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract”, *J. Appl. Microbiol.*, 94: 449-455 (2003).
68. deMan, J. C., Rogosa, M., Sharpe, M. E., “A medium for the cultivation of lactobacilli”, *J. Bacteriol.*, 23: 130 (1960).
69. Tunail, N., “Mikrobiyoloji” , *Pelin Ofset Tipo Matbaacılık.*, Ankara, 186 (2009).
70. İnternet: BioGaia Probiotic Products “2009 Effectiveness redefined probiotic” <http://www2.uol.com.br/sciam/reportagens/img/fisiologiabox3bola.jpg>
71. Lu, Z., Breidt, F., Fleming, H.P, Altermann, E., “Isolation and Characterization of a *Lactobacillus plantarum* Bacteriophage, øJL-1, From a Cucumber Fermentation”, *Int. J. Food Microbiol.* 84: 225-235 (2003).
72. Adnan, A.F.M., Tan, I.K.P., “Isolation of Lactic Acid Bacteria from Malaysian Foods and Assessment of The Isolates for Industrial Potential”, *Bioresource Technology*, 98: 1380-1385 (2007).
73. Kıran, F., “Hücre Duvarı Protein Profilleri ve Pilazmid İçeriklerine Göre Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Tanısı” Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi*, Ankara, 130-142 (2006).
74. Tangüler, H., “Şalgam Suyu Üretiminde Etkili Olan Laktik Asit Bakterilerinin Belirlenmesi ve Şalgam Suyu Üretim Tekniğinin Geliştirilmesi”, Doktora Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, 341-352 (2010).
75. Aktan, N., Yücel, U., Kalkan, H. “Turşu Teknolojisi”, *Ege Üniversitesi Basımevi*, Bornova- İzmir, 138-153 (1998).



76. İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., Yıldırım, M. “Yöresel Peynirden Antimikrobiyel Aktiviteye Sahip Laktik Asit Bakterisinin İzolasyonu ve Tanısı”, **G.O.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi**, 25 (1): 1-6 (2008).
77. Van C.M., Pau-Roblot, C., Begin, A., Roy, D., “Structure determination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains RW-9595M and R”, **Biochem J.**, 363: 7-17 (2002).
78. Duboc, P., Mollet, B., “Applications of exopolysaccharides in the dairy industry”, **Int. Dairy J.**, 11: 759-768 (2001).
79. Ruas-Madiedo P., De los R.G., “Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria”, **J. Dairy Sci.**, 88: 843-856 (2005).
80. Böke, H., “*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait susların bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesi ve tutuklamanın bu özellikler üzerine etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü** Ankara, 4-52 (2005).
81. Tyvaert, G., Morel, C., Joly, J.P., Decaris, B., Charron-Bourgoin, F., “The EPS locus of *Streptococcus thermophilus* IP6757 is not involved in exopolysaccharides production”, **Int. Dairy J.**, 16: 467-473 (2006).
82. Timmerman, H.M., Koning, C.J.M., Mulder, L., Rombouts, F.M., Beynen, A.C., “Monostrain, multistrain and multispecies probiotics, A comparison of functionality and efficacy”, **Int. J. Food Microbiol.**, 96: 219-233 (2004).
83. Duboc, P., Mollet, B., “Applications of exopolysaccharides in the dairy industry”, **Int. Dairy J.**, 11: 759-768 (2001).
84. De Vuyst, L., Degeest, B., “Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria”, **FEMS Microbiol. Reviews**, 23: 153-177 (1999).
85. Lim, H., Kim, S., Lee, W., “Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use”, **J. Vet. Sci.**, 5: 391- 395 (2004).
86. Ma, H., “Concept and protocol to isolate cholesterol-reducing bacteria from carnivores”, **Nature end Science**, 2: 11-17 (2004).
87. Roos, N. M., Katan, M.B., “Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998”, **Am. J. Clin. Nutr.**, 71: 405-11 (2000).

88. Jackson , K.G., Lovergrove, J.A., “Functional foods, blood lipids and coronary heart disease”, *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 1-11 (2002).
89. Lee, Y., Salminen, S., “The coming of age of probiotics”, *Trends in Food Science & Technology*, 6: 241-245 (1995).
90. Champe, P. C., Harvey, R. A., Tokullugil, A., Dirican, M. and Ulukaya, E., “Biyokimya”, *Nobel Tip Kitabevi*, İstanbul, 45-58 (1997).
91. Patel, H. M., Pandiella, S. S., Wang, R. H., Webb, C., “Influence of malt, wheat, and barley extracts on the bile tolerance of selected strains of lactobacilli”, *Food Microbiology*, 21: 83-89 (2004).
92. Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O’Mahony, L., O’Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E. M. M., O’Sullivan, G. C., Shanahan, F., Collins, J. K., “Probiotics: From myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials”, *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 279- 292 (1999).
93. Tahri, K., Grill, J. P. and Schneider, F., “Involvement of trihydroxconjugated bile salts in cholestrol assimilation by *Bifidobacteria*”, *Curr. Microbiol.*, 34: 79-84 (1997).
94. Vinderola, C. G., Reinheimer, J. A., “Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative ‘in vitro’ study of probiotic characteristic and biological barrier resistance”, *Food Research Int.*, 36: 895-904 (2003).
95. Murray, F., “Characterization of the microbial ecosystem of cereal fermentation using molecular biological methods”, Ph. D. Thesis, *Technischen Universität*, München, 145 (1998).
96. Rolfe, R.D., “The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health”, *J. Nutr.*, 130: 396-402 (2000).
97. Rossi, E. A., Vendramini, R. C., Carlos, I. Z., Pei, Y. C., DeValdez, G. F., “Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties”, *Eur. Food. Res. Technol.*, 209: 305-307 (1999).
98. Kılıç, S., “Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri”, *Ege Üni. Ziraat Fak. Yay.*, 542 (2001).
99. Yoon, M.Y., Kim, Y.J., Hwang, H.J., “Properties and safety aspects of *Enterococcus faecium* strains isolated from Chungkukjang, a fermented soy product”, *LWT*, 41: 925-933 (2008).

100. Velioglu, S., "Doğal antioksidanların insan sağlığına etkileri", *Gıda*, 25: 167-176 (2000).
101. Frankel, E.N., Meyer, A.S., "The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants", *J. Sci. Food Agric.*, 80: 1925-1941 (2000).
102. Yen, G.C., Duh, P. D., "Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free radical and active oxygen", *J. of Agricult.l and Food Chem.*, 42: 629-632 (1994).
103. Nayir, S.M., "Sütün yoğurda dönüşümü sırasında içerdiği fenolik antioksidan maddelere probiyotik bakteri etkisinin incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Edirne, 7 (2008).
104. Kaur, C., Kapoor, H.C., "Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health", *Int. J. of Food Sci. and Technol.*, 36: 703-725 (2001).
105. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 28: 25-30 (1995).
106. Shahidi, F., "Antioxidant in food and food antioxidants". *Nahrung*, 44: 158-163 (2000).
107. Şengün, P., "Süperkritik CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile elde edilmiş biberiye ekstraktının ayçiçeği yağındaki antioksidan aktivitesinin araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üni. Fen Bilimleri Ens.,Gıda Müh. Ana Bilim Dalı*, İzmir, 71 (2001).
108. Aruoma, O. I., "Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75: 199-212 (1998).
109. Cook, N. C., Samman, S., Condioti, M.C., "Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources", *Nutritional. Biochemistry*, 66-76 (1996).
110. Liu, J.R., Chen, M.J., Lin, C.W., "Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir", *J. of Agricult. and Food Chem.*, 53: 2467-2474 (2005).
111. Kaizu, H., Sasaki, M., Nakajima, H. and Suzuki, Y., "Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E", *Journal of Dairy Science*, 76: 2493-2499 (1993).

112. Miller, R.A., Britigan, B.E., “Role of oxidants in microbial pathophysiology”, *Clin. Microbiol. Rev.*, 10: 1–18 (1997).
113. Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., Korhonen, H., “Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria”, *Journal of Applied Microbiol.*, 106-115 (2006).
114. Kudoh, Y., Matsuda, S., Igoshi, K., Oki, T., “Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO13953”, *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*, 48: 44–55 (2001).
115. Klaenhammer, R. T., Kullen, J. M., “Selection and design of properties” , *Int. J.Food Microbiol.*, 50: 45-57 (1999).
116. İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., Yıldırım, M., “Yöresel Peynirden Antimikrobiyel Aktiviteye Sahip Laktik Asit Bakterisinin İzolasyonu ve Tanısı”, *GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25: 1-6 (2008).
117. Çon, A.H., Gökalp, H.Y. “Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyel Metabolitleri ve Etki Şekilleri”, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 30: 180-190 (2000).
118. Erdoğan, Ö.T., Çetin, Ö., Ergün, Ö., “Fermente Sucuklardan İzole Edilen *Pediococcus pentosaceus* Suşlarının Bazı Metabolik ve Antimikrobiyel Aktiviteleri Üzerine Çalışmalar” *İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi* 28: 249-254 (2002).
119. Yang, Z., “Antimicrobial Compounds and Extracellular Polysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria: Structure and Properties. Academic Dissertation. Department of food technology”, *University of Helsinki*, 61 (2000).
120. Lindgren, S. E., Dobrogosz, W.J., “Antagonistic Activities of Lactic Acid Bacteria in Food and Feed Fermentations”, *FEMS Microbiol.Rev*, 87: 149-164. (1990).
121. Jay, J. M. “Antimicrobial Properties of Diacetyl”, *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 525- 532 (1982).
122. Cleusix, V., Lacroix, C., Vollenweider, S., Duboux, M., Gwenaelle, L. B. “Inhibitory Activity Spectrum of Reuterin Produced by *Lactobacillus reuteri* Against Intestinal Bacteria”, *BMC Microbiology*, 101 (2007).
123. Cleveland, J., Montville T.J., Nes I.F., Chikindas M. L. “Bacteriocins: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation” *International Journal of Food Microbiology*, 71: 1–20 (2001).

124. Kurt, Ş., Zorba, Ö., “Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanım Olanakları”, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 16 (1): 77-83 (2005).
125. Hampikyan, H., Çolak, H., “Nisin ve Gıdalardaki Antimikrobiyel Etkisi”, *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 6 (2): 142-147 (2007).
126. Akkoç, N., Şanlıbaba, P., Akçelik, M., “Bakteriosinler: Alternatif Gıda Koruyucuları”, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 59– 70 (2009).
127. Çakır, İ., “*Lactobacillus* ve Bifidobacterler’ de bazı probiyotik özelliklerin incelenmesi”, Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 35-39 (2003).
128. Yılsay, T.Ö., Kurdal E., “Probiyotik süt ürünlerinin beslenme ve sağlık üzerindeki etkisi”, VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, *Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri*, Tekirdağ, 279-294 (2000).
129. Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., de Vos, W., “Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms”, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 16: 1-8 (2005).
130. Mucchetti, G., Neviani, E., “Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia”, *Qualità e Sicurezza Tecniche Nuove*, 124 (2006).
131. Settanni, L., Moschetti, G., “Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits”, *Food Microbiology*, 27: 691-697 (2010).
132. Klare, I., Konstabel, C., Badstübner ,D., Werner, G., Witte, W., “Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*”, *Int. J. Food Microbiol.*, 88: 269- 290 (2003).
133. Masco, L., Crockaert, C., Hoorde, V.K., Swings, J., Huys, G., “In vitro assessment of the gastrointestinal transit tolerance of taxonomic reference strains from human origin and probiotic product isolates of *Bifidobacterium*”, *J.of Dairy Sci.*, 90: 3572-3578 (2007).
134. Giraffa, G., Olivari, A.M., Nevianie, E., “Isolation of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* from Italian Cheeses”, *Food Microbiol.*, 17: 671-677 (2000).
135. Mainville, I., Arcand, Y., Farnworth, E., “A dynamic model that stimulates the upper gastro-intestinal tract for the study of probiotics”, *Int. J. Food Microbiol.*, 99: 287-296 (2005).

136. Mishra, V., Prasad, D.N., “Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics”, *Int. J. Food Microbiol.*, 103: 109-115 (2005).
137. Fernández, M. F., Boris, S., Barbés, C., “Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract”, *J. of Appl. Microbiol.*, 94: 449-455 (2003).
138. Aktan, N., Yücel, U., Kalkan, H., “Turşu Teknolojisi ”, *Ege Üniversitesi Basımevi*, Bornova- İzmir, 138 (1998).
139. Dikici, A., “Çevresel Stres Faktörlerine Karşı Bakteriyel Adaptasyonlar ve Mekanizmaları”, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 4 (3): 59-68 (2009).
140. Böke, H., “*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait suşların bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesi ve tutuklamanın bu özellikler üzerine etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 4-52 (2005).
141. Hosono, A., Lee, J., Amentoni, A., Natsume, M., Hirayama, M., Adachi, T., Kaminogawa, S., “Characterization of a water-soluble polysaccharides fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis*, M 101-4” , *Biosci. Biochem.*, 61: 312-316 (1997).
142. Desai, K. M., Akolkar, S. K., Badhe, Y. P., Tambe, S. S., Lele, S. S., “Optimization of fermentation media for exopolysaccharide production from *Lactobacillus plantarum* using artificial intelligence-based techniques”, *Process Biochem.*, 41: 1842-1848 (2006).
143. Sanchez, J. I., Martinez, B., Guillen, R., Jimenez-Diaz, R., Rodriguez, A., “Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26”, *Appl. Environ. Microb.*, 72: 7495-7502 (2006).
144. Mozzi, F., Vaningelgem, F., Hebert, E., Van der Meulen, R., Foulquie Moreno, M.R., Font de Valdez, G., De Vuyst, L., “Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 4431-4435 (2006).
145. Zárata, G., Pérez Chaia, A., González, S., Oliver, G., “Viability and  $\beta$ -galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids” , *J. Food Protect.*, 63: 1214-1221 (2000).
146. Dunne, C., Myrphy, L., Flynn, S., O’Mahony, L., O’Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G, Daly, C., Kiely, B., Quigley, E. M. M., O’sullivan, G. C., Shanahan, F., Collins, J. K., “Probiotics: From myth to

- reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials”, *Anton. Leeuw. Int. J. G.*, 76: 279-292 (1999).
147. Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacifino, F., Coppola, R., “Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolates from Parmigiano Reggiano cheese”, *Fems Microbiol. Lett.*, 244: 129-137 (2005).
  148. Lin, S. Y., Ayres, J. W., Winkler, W., Sandine, W. E., “*Lactobacillus* effects on cholesterol: In vitro and in vivo results”, *J. Dairy Sci.*, 72: 2885-2899 (1988).
  149. Huang, Y., Adams, M. C., “In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria” , *Int. J. Food Microbiol.*, 91: 253-260 (2004).
  150. Gilliland, S.E., Nelson, C.R., Maxwell, C., “Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*”. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 377 (1985).
  151. Walker, D.K., Gilliland, S.E., “Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*”, *J. Dairy Sci.*, 76: 956 (1993).
  152. Kahkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., Heinonen, M., “Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3954-3962 (1999).
  153. Prior, R. L., Cao, G. H., “Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity”, *Journal of AOAC International*, 83 : 950-956 (2000).
  154. Nagai, T., Myoda, T., Nagashima T., “Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) *Equisetum arvense*”, *Food Chemistry*, 91: 389-394 (2005).
  155. Alvarado, C., Garcia, A.B.E., Martin, S.E., Regalado, C., “Food-associated lactic acid bacteria with antimicrobial potential from traditional Mexican foods”, *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, 48: 260-268 (2006).
  156. Badgley, B.D., Nayak, B.S., Harwood, V.J., “The importance of sediment and submerged aquatic vegetation as potential habitats for persistent strains of enterococci in a subtropical watershed”, *Water Research*, 12: 1-10 (2010).
  157. Campos, C.A., Rodriguez, O., Calo-Mata, P., Prado, M., Barros-Velazquez, J., “Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*)”, *Food Res. Int.*, 39: 356-364 (2006).

158. Önal D. D., “Geleneksel Türk Peynirlerinde Propiyonik Asit Bakteri Türlerinin Belirlenmesi ve Bazı Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması”, ***Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Doktora Tezi Ankara, 41 (2010).



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : DİKBAŞ YILDIZ, Kübra  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 25.09.1987 Altındağ  
Medeni hali : Evli  
e-mail : kdikbas@hotmail.com

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji Bölümü	2012
Lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2010
Lise	Gölbaşı Anadolu Lisesi	2005

### Yabancı Dil

İngilizce

### İş Deneyimi

Gölbaşı Kız Teknik ve Meslek Lisesinde Biyoloji, Gölbaşı Şahin Sevin İlkokulunda ve Gökçehöyük Ortaokulunda Fen ve Teknoloji Öğretmenliği