

**GELENEKSEL TÜRK PEYNİRLERİNDE PROPİYONİK ASİT  
BAKTERİ TÜRLERİNİN BELİRLENMESİ VE BAZI PROBİYOTİK  
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Derya ÖNAL DARILMAZ**

**DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ŞUBAT 2010  
ANKARA**

Derya ÖNAL DARILMAZ tarafından hazırlanan Geleneksel Türk Peynirlerinde Propiyonik Asit Bakteri Türlerinin Belirlenmesi ve Bazı Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması adlı bu tezin Doktora tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Yavuz BEYATLI .....  
Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

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

Prof. Dr. Necdet SAĞLAM .....  
Biyoloji Eğitimi, Hacettepe Üniversitesi

Prof. Dr. Yavuz BEYATLI .....  
Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ .....  
Moleküler Biyoloji, Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Belma ASLIM .....  
Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ .....  
Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Tarih: 19/02/2010

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

Prof. Dr. Bilal TOKLU .....  
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.

Derya ÖNAL DARILMAZ

**GELENEKSEL TÜRK PEYNİRLERİNDE PROPİYONİK ASİT BAKTERİ  
TÜRLERİNİN BELİRLENMESİ VE BAZI PROBİYOTİK  
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI  
(Doktora Tezi)**

**Derya ÖNAL DARILMAZ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Şubat 2010**

**ÖZET**

Bu çalışmada, Türkiye'nin ev yapımı geleneksel peynirlerinden 29 adet propiyonibakteri izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen propiyonibakterilerin tanımlamasında klasik biyokimyasal testler, API 50 CHL, 20E ve 20 kitleri kullanılmıştır. Tanımlama sonuçları nümerik taksonomi programında değerlendirilmiş olup, sonuçlar *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* (15 suş)'nin predominant olduğunu göstermiştir. Suşların Skim Milk besiortamında ürettikleri asit miktarları %0,07-%0,99, YEL sıvı besiortamı %0,08-0,21 ile karşılaştırıldığında genel olarak daha yüksek bulunmuştur. Antimikrobiyal aktivite sonuçlarına göre, propiyonibakteri suşlarının %91'i *Escherichia coli* ATCC 11229, %56'sı *E. coli* ATCC 35218, %56'sı *E. coli* O157:H7, %50'si *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, %29'u *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 , %59'u *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, %53'ü *Bacillus cereus* RSKK 863, %91'i *Shigella sonnei* Mu:57, %35'i *Micrococcus luteus* NRLL B-4375 ve %76'sı *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 inhibisyon etkisi göstermiştir. Suşların antibiyotiklere karşı dirençliliği ise en düşük streptomisin (%29), gentamisin (%24), kanamisin (%20), rifampisin (%26), polimiksin (%24) antibiyotiklerine en yüksek ise nalidiksik asite (%100) antibiyotiğine karşı tespit edilmiştir. Propiyonibakterilerin EPS üretimi ile asit direnci ( $p<0,05$ ), safra toleransı ( $p<0,05$ ), otoagregasyon ve

koagregasyonları ( $p<0,05$ ) arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO7, *P. jensenii* BDP11 ve *P. thoenii* AKP1 suşlarının otoagregasyon (%39-98) ve koagregasyon (%33-61) değerlerinin yüksek olduğu, hem yüksek asit üretimi hemde yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Suşların tümü etil asetat ile hidrofobisite göstermiştir (%25-61). *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO7, *P. jensenii* BDP11 ve *P. thoenii* AKP1 suşlarının taşıdığı bütün bu özelliklerinden dolayı sindirim sisteminde canlı kalarak konukçu için yararlı olabileceği düşünüldüğünden, probiyotik bakteri olarak kullanımları önerilmektedir.

**Bilim Kodu** : 203.1.023  
**Anahtar Kelimeler** : *Propionibacterium* spp., Probiyotik, Asit, Antibiyotik, Antimikrobial, EPS üretimi, Otoagregasyon, Koagregasyon, Hidrofobisite  
**Sayfa Adedi** : 176  
**Tez Yöneticisi** : Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

**DETERMINATION OF PROPIONIC ACID BACTERIAL SPECIES IN  
TRADITIONAL TURKISH CHEESES AND SEARCHING SOME OF THEIR  
PROBIOTIC PROPERTIES**

**(Ph.D. Thesis)**

**Derya ÖNAL DARILMAZ**

**GAZİ UNIVERSITY  
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

**February 2010**

**ABSTRACT**

In this study, twenty-nine (29) strains of Propionibacteria were isolated from home-made traditional Turkish cheeses. Classical Biochemical tests, API 50 CHL, 20E and 20 kits were used in identification of propionibacteria strains. Identification results were assessed with numeric taxonomy program and showed that *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* was the predominant species (15 strains). When compared with acid production in YEL medium %0,08-0,21, acid production of strains in skim milk medium %0,07-%0,99 was determined to be high. Propionibacteria strains showed an inhibitory effect of %91 on *Escherichia coli* ATCC 11229, %56 on *E. coli* ATCC 35218, %56 on *E. coli* O157:H7, %50 on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, %29 on *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, %59 on *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, %53 on *Bacillus cereus* RSKK 863, %91 on *Shigella sonnei* Mu:57, %35 on *Micrococcus luteus* NRLL B-4375 and %76 on *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Antibiotic susceptibility of strains were determined to be lowly resistant to streptomycin (29%), getamicin (24%), kanamycin (20%), rifampicin (26%), polymyxin (24%) and highest resistance to nalidixic acid (100%). Positive correlations have been obtained between production of exopolysaccharide and tolerance to bile salts ( $p<0.05$ ) or resistance to low pH ( $p<0.05$ ) or autoaggregation and coaggregation ( $p<0.05$ ). *P. freudenreichii*

subsp. *freudenreichii* DO7, *P. jensenii* BDP11 and *P. thoenii* AKP1 strains showed high autoaggregation (39-98%) and coaggregation (33-61 %) activities and also high acid production and antimicrobial activities. All strains showed hydrophobicity with ethyl acetate (25-61%). Because of having all of these properties, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO7, *P. jensenii* BDP11 and *P. thoenii* AKP1 strains can survive in the gastrointestinal system and also could show beneficial effects on the host. Hence, this study can suggest the use of *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO7, *P. jensenii* BDP11 and *P. thoenii* AKP1 strains as probiotic bacteria.

**Science Code : 203.1.023**

**Key Words : *Propionibacterium* spp., Probiotic, Acid production, Antibiotic, Antimicrobial, EPS production, Autoaggregation, Coaggregation, Hydrophobicity**

**Page Number: 176**

**Adviser : Prof. Dr. Yavuz BEYATLI**

## TEŞEKKÜR

2005-2010 yılları arasında Gazi Üniversitesi, Biyoloji Bölümü'nde Prof. Dr. Yavuz BEYATLI danışmanlığında yürütülen bu çalışma doktora tezi olarak hazırlanmıştır. Tez çalışmamın başından sonuna kadar ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, çalışmalarım boyunca değerli katkılarıyla ve bilgileriyle beni yönlendiren Sayın Hocam Prof. Dr. Yavuz BEYATLI'ya, tez çalışmamda tecrübe ve yardımlarından faydalandığım tez izleme komitesi üyesi Sayın, Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ ve Prof. Dr. Belma ASLIM'a ve yine önemli deneyimleri ile her zaman yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ'a, deneysel çalışmalarım esnasında yardımlarından faydalandığım Yeşim GÜMÜŞTEKİN'e, tüm Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışanlarına, maddi ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan anneme, babama ve kardeşlerime, tezimin her aşamasında bana yardımcı olan eşim Mustafa Cemal DARILMAZ'a ve oğlum Mustafa Hakan DARILMAZ'a teşekkür ederim.

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 05/2006-31 kodlu proje ve TÜBİTAK tarafından 107T486 kodlu proje desteklenmiştir.



## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER .....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ .....	xiii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....	xv
RESİMLERİN LİSTESİ .....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xix
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	4
2.1. Ülkemize Özgü Peynirler ve Propiyonik Asit Bakterilerin Peynirlerdeki Önemi .....	4
2.2. Propiyonik Asit Bakterileri .....	6
2.2.1. Genel özellikleri .....	6
2.2.2. Propiyonik asit bakterilerinin habitatları.....	10
2.2.3. Propiyonibakterilerin metabolizma ve besin gereksinimleri .....	11
2.2.4. Propiyonibakterilerin tanımlanması .....	13
2.2.5. Propiyonibakterilerin starter özellikleri .....	15
2.3. Probiyotikler.....	16
2.3.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar .....	16
2.3.2. Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine etkisi ve etki mekanizmaları .....	17
2.3.3. Probiyotik mikroorganizmalarda bulunması gereken özellikler .....	19

**Sayfa**

2.4. Propiyonibakterilerin Probiyotik Önemi.....	21
2.4.1. Propiyonibakterilerle yapılan bazı probiyotik çalışmalar .....	23
2.4.2. Propiyonibakterilerin insan probiyotiği olarak kullanımı .....	24
2.5. Propiyonibakterilerin Güvenirliği .....	25
2.6. Propiyonibakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri .....	26
2.6.1. Propiyonik asit .....	27
2.6.2. Bakteriyosin .....	28
2.7. Antibiyotik Dirençliliğinin Probiyotik Önemi .....	28
2.8. Bakteriyel Eksopolisakkaritlerin (EPS) Starter ve Probiyotik Önemi .....	29
2.9. Mide-Bağırsak Sistemi Koşulları ve Bu Koşulların Propiyonik Asit Bakteriler Üzerindeki Etkisi.....	32
2.10. Agregasyon ve Hidrofobisite.....	33
3. MATERYAL VE METOT .....	36
3.1. Materyaller .....	36
3.1.1. Peynir örnekleri.....	36
3.1.2. Besiyerleri .....	36
3.1.3. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları.....	39
3.1.4. Test bakterileri .....	40
3.2. Metot .....	41
3.2.1. Propiyonibakterilerin izolasyonu .....	41
3.2.2. Bakterilerin muhafazası .....	41
3.2.3. Peynirlerde propiyonibakterilerin sayımı.....	42
3.2.4. Propiyonibakterilerin klasik tanımlanması .....	42

**Sayfa**

3.2.5. API (50 CHL, 20 E ve 20 A) kitlerinin tanımlamada uygulamaları .....	50
3.2.6. Klasik ve API tanımlama sonuçlarının nümerik taksonomi programında değerlendirilmesi .....	51
3.2.7. Propiyonibakterilerin asit üretimleri .....	52
3.2.8. Propiyonibakterilerin antimikrobiyal aktiviteleri.....	53
3.2.9. Propiyonibakterilerin antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi.....	54
3.2.10. Propiyonibakterilerin eksopolisakkarit (EPS) üretimlerinin belirlenmesi .....	55
3.2.11. Propiyonibakterilerin farklı pH değerlerine toleransının belirlenmesi .....	56
3.2.12. Propiyonibakterilerin farklı safra konsantrasyonlarına toleransının belirlenmesi .....	57
3.2.13. Propiyonibakterilerin agregasyon özelliklerinin tespiti .....	57
3.2.14. Propiyonibakterilerin hücre yüzeyinin hidrofobik yapısının belirlenmesi .....	59
3.2.15. İstatistiksel analizler.....	59
4. DENEYSEL BULGULAR .....	60
4.1. Propiyonik Asit Bakterileri İzolatları.....	60
4.2. Peynirlerde Propiyonik Asit Bakterileri Sayımları .....	63
4.3. Peynirlerden İzole Edilen Propiyonik Asit Bakterilerinin Tanımlanması .....	65
4.3.1. Klasik tanımlama sonuçlarının değerlendirilmesi.....	65
4.3.2. API (50 CHL, 20 E ve 20 A) tanımlama sonuçlarının değerlendirilmesi.....	71
4.4. Tanımlama Testlerinin Nümerik Taksonomi Programında Değerlendirilmesi.....	76
4.4.1. Klasik tanımlama sonuçlarının değerlendirilmesi.....	76

**Sayfa**

4.4.2. API tanımlama sonuçlarının değerlendirilmesi.....	79
4.5. Propiyonibakterilerin Asit Üretimleri .....	83
4.5.1. Nicel asit tayini .....	83
4.5.2. Nitel asit tayini .....	91
4.5.3. Propiyonibakterilerin HPLC analizi ile propiyonik, asetik ve laktik asit üretimleri .....	96
4.6. Propiyonibakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri .....	103
4.7. Propiyonibakterilerin Antibiyotik Duyarlılıkları .....	109
4.8. Propiyonibakterilerin Eksopolisakkarit (EPS) Üretimleri .....	114
4.9. Propiyonibakterilerin Farklı pH Değerlerine Toleransı .....	119
4.10. Propiyonibakterilerin Farklı Safra Konsantrasyonlarına Toleransı .....	123
4.11. Propiyonibakterilerin Agregasyonu .....	127
4.11.1. Otoagregasyon .....	127
4.11.2. Koagregasyon.....	131
4.12. Propiyonibakterilerin Hücre Yüzeyinin Hidrofobik Yapısı.....	133
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	135
KAYNAKLAR .....	158
ÖZGEÇMİŞ .....	173

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. <i>Propionibacterium</i> türlerinin iki grubunun üyeleri.....	8
Çizelge 2.2. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar .....	17
Çizelge 2.3. Probiyotiklerin potansiyel klinik amaçları ve etkileri.....	19
Çizelge 3.1. YELN katı ve sıvı besiyeri.....	36
Çizelge 3.2. YEL katı ve sıvı besiyeri.....	37
Çizelge 3.3. MRS besiyeri .....	38
Çizelge 3.4. Plate Count Agar.....	38
Çizelge 3.5. Nutrient sıvı besiyeri.....	39
Çizelge 3.6. Test bakterilerinin temin edildiği kaynak .....	40
Çizelge 3.7. Arjinin hidrolizi besiyeri.....	46
Çizelge 4.1. İzolasyon yapılan peynirler ve bu peynirlerden izole edilen propiyonibakteri suşlarının kodları ve morfolojileri .....	61
Çizelge 4.2. Peynirlerde <i>Propionibacterium</i> spp., toplam bakteri ve diğer starter bakterilerin sayımları (kob/ g).....	64
Çizelge 4.3. Propiyonibakteri suşlarının biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçları ..	67
Çizelge 4.4. API tanımlanması sonucunda izole edilen propiyonibakterilerin adlandırılması ve % benzerlik oranları .....	75
Çizelge 4.5. Propiyonibakterilerin YEL, Skim Milk, Glukozlu ve Laktozlu YEL sıvı besiyortamlarında ürettikleri % asit miktarları ve son kültür pH'ları .....	86
Çizelge 4.6. Propiyonibakteri suşlarının bromcresolpurple agarda nitel asit üretimleri (mm) .....	93
Çizelge 4.7. Propiyonibakterilerin asit üretimlerinin HPLC analiz sonuçları .....	98
Çizelge 4.8. Peynirlerden izole edilen propiyonibakteri suşlarının bağırsak patojenleri ve gıda kontaminantları üzerine antimikrobiyal aktivite sonuçları (zon çapı, mm).....	106

<b>Çizelge</b>	<b>Sayfa</b>
Çizelge 4.9. CLSI kriterlerine göre antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi.....	110
Çizelge 4.10. Peynirlerden izole edilen propiyonibakteri suşlarının antibiyotiklere gösterdiği duyarlılık test sonuçları.....	111
Çizelge 4.11. Propiyonibakteri suşlarının antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları .....	112
Çizelge 4.12. Propiyonibakteri suşlarının EPS üretimleri .....	116
Çizelge 4.13. Propiyonibakteri suşlarının farklı pH değerlerine toleransı.....	121
Çizelge 4.14. Propiyonibakteri suşlarının farklı safra konsantrasyonlarına toleransı.....	125
Çizelge 4.15. Propiyonibakteri suşlarının anaerobik, aerobik (çalkalamasız) ve aerobik çalkalamalı ortamlarda agregasyonu.....	128
Çizelge 4.16. Propiyonibakteri suşlarının % hidrofobisiteleri.....	134

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Propiyonik asit fermentasyon döngüsü.....	13
Şekil 2.2. Probiyotik mikroorganizmaların seçim kriterleri .....	21
Şekil 4.1. Peynirlerde <i>Propionibacterium</i> spp., toplam bakteri ve diğer starter bakterileri sayıları (kob/g).....	65
Şekil 4.2. Peynirlerden izole edilen propiyonibakterilerin klasik yöntemlerle tanımlama dendrogramı .....	78
Şekil 4.3. Klasik tanımlama sonuçlarının PCA ile değerlendirilmesi.....	79
Şekil 4.4. Peynirlerden izole edilen propiyonibakterilerin API 50 CHL, 20E ve 20A kitleri ile tanımlama dendrogramı .....	81
Şekil 4.5. API 50 CHL, API 20 E ve API 20 A sonuçlarının PCA ile değerlendirilmesi.....	82
Şekil 4.6. Peynirlerden izole edilen propiyonibakterilerin % tür dağılımları .....	83
Şekil 4.7. Propiyonibakterilerin YEL sıvı besiyerinde % asit üretimleri.....	88
Şekil 4.8. Propiyonibakterilerin Skim Milk besiyerinde % asit üretimleri .....	89
Şekil 4.9. Propiyonibakterilerin YEL, Skim Milk, Glukozlu ve Laktozlu YEL sıvı besiyerlerinde % asit üretimleri .....	90
Şekil 4.10. Propiyonibakterilerin bromkresolpurple agarda nitel asit üretimleri (mm) .....	94
Şekil 4.11. Propiyonibakterilerin YEL ve Skim Milk sıvı besi ortamlarında propiyonik ve asetik asit üretimleri.....	99
Şekil 4.12. <i>P. jensenii</i> DO6 suşunun skim milk besiyerindeki laktik, asetik ve propiyonik asit üretim kromatogramı (Kırmızı pik: Standart, Siyah pik: DO6) .....	100
Şekil 4.13. <i>P. jensenii</i> DO4 suşunun skim milk besiyerindeki laktik, asetik ve propiyonik asit üretim kromatogramı (Kırmızı pik: Standart, Siyah pik: DO4) .....	101

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.14. <i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP2 suşunun YEL sıvı besiyerindeki laktik, asetik ve propiyonik asit üretim kromatogramı (Kırmızı pik: Standart, Siyah pik: SP2) .....	102
Şekil 4.15. Propiyonibakteri suşlarının antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları .....	113
Şekil 4.16. Propiyonibakterilerin YEL besiyerinde EPS üretimleri .....	117
Şekil 4.17. Propiyonibakterilerin Skim Milk besiyerinde EPS üretimleri.....	118
Şekil 4.18. Propiyonibakteri suşlarının anaerobik, aerobik (çalkalamasız) ve aerobik çalkalamalı ortmalarda otoagregasyon.....	129
Şekil 4.19. Propiyonibakteri suşlarının anaerobik, aerobik, aerobik ve çalkalamalı ortamlarda koagregasyon.....	132
Şekil 4.20. Propiyonibakteri suşlarının % hidrofobisiteleri.....	134



## RESİMLERİN LİSTESİ

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 2.1. Kars yöresine ait Kars Gravyer Peyniri .....	5
Resim 2.2. Balıkesir yöresine ait Sepet Mihaliç Peyniri.....	5
Resim 4.1. Kars Gravyerinden izole edilen propiyonibakterilerin YELN katı besiyerinde koloni morfolojisi .....	63
Resim 4.2. <i>P. jensenii</i> BDP6 suşunun YEL katı besiyerindeki koloni morfolojisi (solda) ve pigmentasyonu (sağda).....	72
Resim 4.3. <i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP4 suşunun YEL katı besiyerindeki koloni morfolojisi (solda) ve pigmentasyonu (sağda) .....	73
Resim 4.4. Referans kültür olarak kullanılan <i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DSMZ 20271 ve <i>P. jensenii</i> DSMZ 20235 türlerinin YEL katı besiyerindeki koloni morfolojisi ve pigmentasyonu .....	73
Resim 4.5. <i>P. thoenii</i> AKP1 ve SMP1 suşlarının mikroskobik morfolojileri .....	74
Resim 4.6. <i>P. jensenii</i> DO3 ve DO4 suşlarının mikroskobik morfolojileri .....	74
Resim 4.7. <i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP2 ve SP5 suşlarının mikroskobik morfolojileri .....	74
Resim 4.8. <i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DO8 suşunun glukozlu (A) ve laktozlu (B) YEL agar ortamlarında asit üretimleri.....	95
Resim 4.9. <i>P. thoenii</i> SMP1 suşunun glukozlu (A) ve laktozlu (B) YEL agar ortamlarında asit üretimleri .....	95
Resim 4.10. Sodyum laktatlı YEL katı besi ortamında zon oluşturmayan <i>P. jensenii</i> SP8 suşu .....	96
Resim 4.11. Propiyonibakteri suşlarının antimikrobiyal aktiviteleri .....	108
Resim 4.12. <i>P. thoenii</i> AKP1 suşunun antibiyotiklere göstermiş oldukları disk difüzyon sonuçları.....	112
Resim 4.13. <i>P. thoenii</i> AKP1 suşunun otoagregasyonun ışık mikroskobu görüntüsü.....	129

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 4.14. Anaerobik koşullarda orta düzey otoagregasyon gösteren <i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DO7 suşu ve aerobik koşullarda düşük otoagregasyon gösteren <i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP3 suşunun ışık mikroskobu görüntüsü .....	130
Resim 4.15. Otoagrege olmuş <i>P. thoenii</i> AKP1 ve otoagrege olmamış <i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP3 .....	130
Resim 4.16. <i>E. coli</i> ATCC 11229 ile <i>P. thoenii</i> AKP1 suşunun anaerobik (A) ve aerobik (B) koagregasyonu .....	132
Resim 4.17. <i>E. coli</i> ATCC 11229 ile koagrege olmuş <i>P. thoenii</i> AKP1 ve koagrege olmamış <i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP3 .....	133

## SİMGELER VE KISALTMALAR

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

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
cm	Santimetre
g	Gram
g/l	Gram/Litre
M	Molar
Mm	Milimolar
mg/ml	Miligram/Mililitre
ml	Mililitre
nm	Nanometre
N	Normal
pH	Asitlik bazlık birimi
rpm	Dakikada devir sayısı
spp	Species (Türleri)
subsp	Subspecies (Alt tür)
U	Unit (Birim)
$\mu\text{g/ml}$	Mikrogram/Mililitre
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
$\mu\text{m}$	Mikrometre
%	Yüzde

**Kısaltmalar****Açıklama****API**

Analitik Profil İndeks

**ATTC**

American Type Cultur Collection

**Caco-2 cell**

Colon Adeno Carcinoma Cell

**Cfu**

Colony Forming Units

**CLSI**

Clinical and Laboratory Standards Institute

**Dk**

Dakika

**DSMZ**Deutsche Sammlung von Mikroorganismen  
und Zellkulturen**Eş**

Eşitlik

**HCl**

Hidrojen klorür

**HPLC**

High Performans Liquid Chromatography

**Kob**

Koloni oluşturan birim

**NaCl**

Sodyum klorür

**NaOH**

Sodyum hidroksit

**NH<sub>3</sub>**

Amonyak

**OD**

Optikal dansite

**RSSK**Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı  
Kültür Koleksiyonu**Sn**

Saniye

**TBAG**

Temel Bilimler Araştırma Grubu

**TÜBİTAK**Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma  
Kurumu

## 1. GİRİŞ

Ülkemizde dünya peynirleri ile rekabet edecek damak zevki ve çeşitliliğine sahip 40'a yakın yöresel peynir çeşidi bulunmaktadır. Bu peynir çeşitlerini yapıldıkları yöreler ile birlikte, büyük şehirlerde birçok süper markette bulmak mümkün olmaktadır. Mandıralarda peynir yapımında ticari olarak hazırlanan starter laktik asit bakteri kültürleri kullanılmaktadır. Ancak, geleneksel yöntemlerle yapılan peynirlerde kullanılan starter kültürler bilinmemekle birlikte, bu peynirlerin mayalanmasını sağlayan bakterilerin süttten ve çevreden kontaminasyonla gelen doğal bakteriler olduğu düşünülmektedir.

İsviçre tipi peynirlerin delikli yapısı ve karakteristik tadından sorumlu olan klasik propiyonik asit bakterileri büyük teknolojik öneme sahiptir [1]. Klasik propiyonik asit bakterileri uzun yıllar boyunca İsviçre tipi peynirlerin (Emmental, Gouda vb.) yapımında kullanılmıştır. Propiyonik asit bakterileri bu peynirlerde fermentasyon sonucu ürettikleri ürünler ile fındıksı tadın oluşumundan ve yine ürettikleri karbondioksit ile bu peynirler için karakteristik olan delikli yapının oluşumundan sorumludurlar. Ülkemize özgü olan 40'a yakın yöresel peynir içinde İsviçre peynirlerinde olduğu gibi delikli yapıya sahip Mihaliç Peyniri, Sepet Peyniri, Dil Peyniri, İzmir Tulum Peyniri, Kars Gravyeri, Afyon Peyniri gibi birçok peynir çeşidi bulunmaktadır. Bu peynirlerde yapılan mikrobiyolojik çalışmalar starter olarak kullanılan laktik asit bakterileri ve peynirlerde bulunan patojen bakterilerle sınırlı kalmıştır [2, 3,4]. Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde geleneksel peynirlerimizde bulunan propiyonik asit bakterine yeterli ilginin gösterilmediği ve mikrofloradaki durumunun belirlenmediği ortaya çıkmaktadır. Propiyonik asit bakterileri ile yapılan çalışmalar İsviçre peynirlerinde ve çiğ sütte yapılan çalışmalarla literatürlerde yerini almış, seçilen starter kültürlerle üretilen İsviçre peynirleri birçok ülkede satışa sunulmuş ve sergiledikleri probiyotik özelliklerle de bu bakterilere duyulan ilgi artmıştır. Ülkemizdeki peynir çeşitliliği dikkate alındığında yöresel peynirlerimiz yalnızca ülkemiz sınırları içerisinde bir pazar payı bulmuş, dünya pazarında adını duyuramamıştır. Geleneksel Türk peynirlerinde bulunan propiyonik asit bakterilerinin peynir mikroflorasındaki durumunun belirlenmesi ile görüntü

bozuklarına neden olan ve çiğ süttten gelen kontaminant ve patojen bakterilerin kontrol altına alınarak, ekonomik kayıpların önlenmesinde yardımcı olacaktır. Bu sonuçlar doğrultusunda peynir üreticilerinin istenilen özelliklerdeki kültürlerin seçimi ve buna bağlı üstün kalitede peynirlerin üretimi mümkün olacaktır.

*Propionibacterium* cinsine ait bazı klasik türlerin insanlar ve hayvanlar için probiyotik olarak kullanılabilceği bildirilmiştir [5]. Klasik propiyonik asit bakterilerine duyulan ilgi bu bakterilerin probiyotik olarak kullanılabilceğinin belirlenmesi ile artmıştır. Son yıllarda probiyotik ürünlerin elde edilmesine yönelik çalışmaların ciddi artışına rağmen, Ülkemizde yapılacak bu çalışma ile yöresel peynirlerdeki propiyonik asit bakterilerinin belirlenerek probiyotik özelliklerinin incelenmesi önemli kazanımları olacaktır. Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak kullanılabilmesi için; konakçının mide-bağırsak sistemindeki olumsuz koşullarında (asit, safra tuzları) yüksek seviyede canlılığını koruyabilmeli ve bağırsak sisteminin peristaltik hareketlerinden korunmak için dominant olarak kolonize olabilmelidir veya epitel yüzeye tutunabilme kabiliyeti 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 ekzopolisakkaritleri (EPS) yüksek oranda üretiyor olması tercih edilmektedir.

Araştırmanın amacı; araştırmada Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden temin edilen delikli yapıya sahip geleneksel peynirlerimizden farklı örnekler alınarak peynirlerde bulunan propiyonik asit, starter ve toplam bakteri sayımlarının yapılarak propiyonibakterilerin izole edilmesi, izole edilen propiyonibakterilerin klasik yöntemlerle (biyokimyasal ve fizyolojik testlerle tanımlama) ve API kitleri ile tanımlanarak elde edilen sonuçların nümerik taksonomi programında değerlendirilmesi, tanımlanan suşların nicel ve nitel asit üretimlerinin belirlenerek yüksek asit üretimi gösteren suşların ürettikleri asitin HPLC ile araştırılması, probiyotik olarak kullanımı araştırılan propiyonibakterilerin gıda veya bağırsak kaynaklı bazı patojen mikroorganizmaları inhibe etme özelliklerinin belirlenmesi,

starter ve probiyotikbakteri kùltùrlerinin gelişimini olumsuz etkilediği düşünùlen klinikte kullanımı yaygın olan bazı antibiyotiklere karşı dirençliliklerinin test edilmesi, eksopolisakkarit üretimlerinin belirlenerek, propiyonik asit bakterilerinin asit ve safra koşullarındaki dirençlilikleri ve bu dirençliliğin EPS ile olan ilişkisi araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca EPS üretiminin, otoagregasyon, koagregasyon ve hidrofobisite ile olan ilişkisi ortaya konacaktır. Propiyonibakterilerin EPS üretimleri bu yönüyle bugüne kadar incelenmemiştir.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Ülkemize Özgü Peynirler ve Propiyonik Asit Bakterilerin Peynirlerdeki Önemi

Ülkemizin kendine özgü 40'a yakın bilinen peynir çeşidi (Cevizli, zeytinli-biberli çeşitleriyle Adapazarı'nın İslî Çerkez ve Abaza, Antakya'nın Kare Kesme, Sürk ve Sünme, Trabzon'un Koloti ve Tel, Erzurum'un Civil ve Tel, Bursa'nın Mihaliç, Kazdağı'nın Keçi, Edremit'in Sepet, Diyarbakır'ın Lavaş, Kars'ın Kaşar ve Gravyeri (Resim 2.1), Çorum'un Kargı Tulumu, Balıksesir Sepet Mihaliç Peyniri (Resim 2.2) gibi) bulunmaktadır [6]. Ülkemizdeki peynir çeşitliliği dikkate alındığında bunların bir kısmı halen çeşitli yörelerimizde geleneksel yöntemlerle sınırlı miktarda yapılarak ait olduğu yörede satışa sunulurken bir kısmı ticari olarak üretilerek bugün büyük marketlerde satışa sunulmaktadır.

İsviçre tipi peynirlerin delikli yapısı ve karakteristik tadından sorumlu “mandıra” ya da diğer adı ile “klasik propiyonik asit bakterileri” büyük ekonomik öneme sahiptir [7]. Bu bakteriler fermentasyon endüstrisinde B<sub>12</sub> vitamini ve propiyonik asit üretimi için kullanılmaktadır [8]. İsviçre tipi peynirlerin yapımında iki adet fermentasyon olayı gerçekleşir. Peynir yapımı sırasında laktik asit bakterileri (LAB) özellikle *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* ve *L. delbrueckii* subsp. *lactis* türleri laktozu laktata çevirir. Peynirin olgunlaşması sırasında ise propiyonik asit bakterileri (PAB) laktatı propiyonik asit, asetik asit ve karbondioksit (CO<sub>2</sub>) dönüştürür. Olgunlaşma sürecinde oluşan CO<sub>2</sub> delikli yapının oluşumundan, propiyonik asit ise İsviçre tipi peynirleri için karakteristik olan fındıksı tadın oluşumundan sorumludur. Propiyonik asit bakterileri ile laktik asit bakterilerinin arasındaki bu ilişkiyi gösteren bilgiler tam olarak tanımlanmamıştır. Bu nedenle peynir yapımı ve sert peynirlerin kalitesini geliştirmek için doğru PAB'lerinin belirlenmesi gerekmektedir [9].

*Propionibacterium* cinsine ait 4 tür, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, *P. jensenii*, *P. thoenii*, *P.*



*acidipropionici* çevresel kontaminasyon sonucu çiğ sütte 10-10.000 cfu/ml arasında bulunduğu tespit edilmiştir. PAB peynirlerde geniş çatlakların oluşumu ve pigmentli türlerin (*P. thoenii* ve *P. jensenii*) ‘brown spot’ olarak adlandırılan kahve renkli lekelerle neden olabileceği bildirilmiştir [7]. Peynirlerde bulunan propiyonibakterilerin doğru tanımlanması, son ürünün kalitesini geliştirmek için önemlidir [10]. Ülkemizin kendine özgü birçok peynir çeşidi bulunmakla birlikte, geleneksel yöntemlerle yapılan bu peynirlerde bulunan, propiyonibakterilerin türleri bilinmemektedir.



Resim 2.1. Kars yöresine ait Kars Gravyer Peyniri [6]



Resim 2.2. Balıkesir yöresine ait Sepet Mihaliç Peyniri [6]

## 2.2. Propiyonik Asit Bakterileri

Propionibacterineae, Actinobacteria sınıfının 10 alt takımından birisidir. Propionibacterineae alt takımı Propionibacteriaceae familyası ile birlikte *Propionibacterium*, *Luteococcus*, *Micrococcus* ve *Propioniferax* cinslerini içerir. Propionibacteriaceae familyasına son zamanlarda *Friedmanniella*, *Tessaracoccus*, *Micropruina* ve *Propionimicrobium* cinsleri de eklenmiştir [11].

### 2.2.1. Genel özellikleri

Propiyonik asit bakterileri, gram pozitif, sporsuz ve hareketsizdirler. Çubuk şeklinde olabildikleri gibi pleomorfik şekilli hücreleri de vardır. Tekli uçları yuvarlanmış difteroid veya sopa şeklinde, diğerleri ucu sivri veya nokta şeklindedir. Bazı kültürlerde hücrelerin kokoid, elongad, bifid veya dallı görünüşü vardır. Bilinen hücreler tekli, ikili V veya Y şeklinde zincir veya Çin alfabesi harflerini andırırlar. Kemoorganotrofturlar. Metabolize karbonhidrat, pepton, pirüvat veya laktatı kullanırlar. Fermentasyon ürünleri propiyonik, asetik asit ve sıklıkla az miktarda izovalerik, formik, süksinik asit, laktik asit ve CO<sub>2</sub>'tir. Tüm türler glukozdan asit oluşturur. Anaerob oldukları gibi aerob ortamda da yaşayabilirler. Bu cinse ait birçok suş anaerob koşulda çok hızlı üreme gösterir. Birçok suşun gelişmesini Tween 80 stimüle eder. 30-37 °C'de çok hızlı gelişirler, bazıları 25' ten 45 °C'ye kadar gelişme gösterir. pH isteği 7,0 civarındadır. Birçok suş % 20 safra tuzlu veya % 6,5 NaCl'lü besiyerinde ürerler. Proteinli maddelerden NH<sub>3</sub> üretirler. Hippurat'ı hidrolize edemez, neutral kırmızısını indirgeyemezler. Gelişmiş koloniler beyaz, gri, pembe, kırmızı, sarı veya portakal rengindedir. DNA'daki %G+C oranı 59-66 mol'dür. İnsan ve hayvanların sindirim sisteminden, insan derisinden veya süt ürünlerinden izole edilebilirler [12].

*Propionibacterium* cinsinin üyeleri yaşadıkları habitata göre, 'Deri' ve 'Klasik' *Propionibacterium* olmak üzere iki temel gruptan oluşur. İlk grubun üyeleri 'Deri' *Propionibacterium*'lar olarak adlandırılır ve insan derisinin mikrobiyal florasının baskın üyeleridir. Bu gruptaki *Propionibacterium*'lar çoğunlukla fırsatçı olarak

dikkate alınmasına rağmen, son yıllarda yapılan çalışmalarda bunların aslında primer patojen olabilecekleri gösterilmiştir. Deri florasında rastlanan propiyonik asit bakterileri; *P. acnes*, *P. avidum*, *P. granulosum*, *P. lymphophilum*, *P. propionicus* olarak bildirilmiştir. Buna karşılık ikinci grubun üyesi olan ‘klasik’ *Propionibacterium*’lar İsviçre tipi peynirlerin yapımında kullanılırlar ve bu peynirlerde tadın oluşumundan sorumlu starter kültürler olarak mandıra endüstrisinde geniş ölçüde kullanılmaktadırlar. Bu peynirlerin karakteristik tadı; propiyonik asit, asetik asit, diasetil ve çeşitli amino asitlerin, özellikle de lösin ve prolin amino asitlerinin üretilmesi sonucu oluşmaktadır. Üretilen organik asitler aynı zamanda doğal antibakteriyel ve antifungal maddeler olarak bilinmekte ve dayanıksız gıda ürünlerinde kullanılabilir. ‘Klasik’ *Propionibacterium*’ların peynir yapımındaki rollerine ilaveten, doğal olarak fermente edilmiş gıdalarda hatta anaerobik sindirim yollarında rastlanılmaktadır. Fermente süt ürünlerinde bulunan klasik propiyonik asit bakterileri ise, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, *P. jensenii*, *P. thoenii*, *P. acidipropionici*’dir (Çizelge 2.1) [13, 14].

Son yapılan çalışmalarda bozulmuş portakal suyu, zeytin yapımı sonucunda oluşan kara su ve granullardan oluşan sığır lezyonları gibi yeni habitatlardan *P. cyclohexanicum*, *P. microaerophilum* ve *P. australiense* olarak tanımlanan propiyonibakterilerin üç farklı türü izole edilmiştir. 16S rRNA sekansları *P. cyclohexanicum* ve *P. australiense*’ın filogenetik olarak *P. freudenreichii*’ye, *P. microaerophilum*’un ise *P. acidipropionici*’ye benzer olduğunu göstermiştir (Çizelge 2.1). Ancak bu üç yeni türün hiçbirine süt ürünlerinde rastlanılmamıştır [15].

Çizelge 2.1. *Propionibacterium* türlerinin iki grubunun üyeleri

<b>Klasik Türler</b>	<b>Deri Türler</b>
<i>P. acidipropionici</i>	<i>P. acnes</i>
<i>P. australiense</i>	<i>P. avidum</i>
<i>P. cyclohexanicum</i>	<i>P. granulosum</i>
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	<i>P. lymphophilum</i>
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	<i>P. propionicus</i>
<i>P. jensenii</i>	
<i>P. thoenii</i>	
<i>P. microaerophilum</i>	

*Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*

İlk olarak 1928 yılında İsviçreli bakteriyolog Edouard Von Freudenreich izole etmiştir ve van Niel tarafından isimlendirilmiştir. At kanı katı besiyerinde gelişen kolonileri (2 günlük), 0,2-0,5 µm, yuvarlak, tam, konveks, yarı opak, kaygan, griden beyaza kadar değişen renktedir. Koloniler katı besiyerinin dip kısmında, mercimek tanesi şeklinde, 4 mm'ye kadar beyaz kahverengi veya pembe renktedir. Glukoz buyyonunda kültürleri pürüzsüz veya granül sedimentler içerir veya granül sedimenti berraktır. Son gelişme pH'sı 4,5-4,9'dur. Anaerobdan oksijenli ortama kadar değişik ortamlarda gelişme gösterir. Seyrek olarak katı besiyerinin yüzeyinde aerob gelişir. Gelişme, buyyonun dibinde, aerobik inkübasyonla olur fakat anaerob ortamından çok daha yavaştır. Hücre duvarında, meso-diaminopimelik asit, önemli miktarda galaktoz ve orta seviyede mannoz ve ramnoz bulunurken glukoz içermez. DNA'sındaki %G+C 64-67 mol'dür. Çiğ süttten, İsviçre tipi peynirden ve diğer süt ürünlerinden izole edilebilir. *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* ve *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* suşlarının ayırımında en önemli parametre NO<sub>3</sub> indirgeme, laktozdan asit üretme ve sütü pıhtılaştırma gücüdür [12, 16].

*P. freudenreichii* İsviçre tipi peynirlerin olgunlaşmasında starter olarak kullanılan temel türdür. Bu tür yüz yıllar öncesinde Emmental peynirinden izole edilmiş ve bu peynirdeki delikli yapının ve karakteristik tadının oluşmasında laktik asiti propiyonik asit, asetik asit ve CO<sub>2</sub>'e dönüştürerek anahtar rolü almıştır. Yapılan son

çalışmalarda; lösin ve isolösin katabolizmasından türevlenen dallanmış zincirlerin, lipolizden türevlenen serbest yağ asitlerinin oluşumunda *P. freudenreichii*'in predominant olarak görev aldığı gösterilmiştir [15].

#### *Propionibacterium jensenii*

At kanı katı besiyerinde, yüzeyde 2 günlük kültürlerde nokta formunda, daire şeklinde, yuvarlak, tam, konveks, yastık şeklinde, kaygan, yarı opak ve beyaz veya pembe koloniler oluşturur. 13 suşdan bir tanesi beta hemolitiklidir. Koloniler dipte 4 mm'ye varan büyüklükte, mercimek tanesi şeklinde, beyaz, pembe veya kırmızı-kahverengindedir. Glukoz buyyonunda gelişen kültürleri, bulanık veya hafif bulanık granüler veya ipliksi sedimentlidir. Son gelişme pH'sı 4,4-4,9'dur. Bazı suşları anaerob ve aerob koşulda da gelişir. Gelişme için pantotenik asit, biotin veya para-aminobenzoik asite gereksinim duyar. Major uzun zincirli yağ asitlerini tioglikolatlı katı besiyerinde 13-metil tetradekanoik asit ve 12-metil tetradekanoik asite (%17) dönüştürür. Hücre duvarı L-diaminopimelik asit ve bir miktar glukoz ile iz miktarda mannoz ve galaktoz içerir. DNA'sındaki %G+C oranı 65-68 moldür [12, 16].

#### *Propionibacterium thoenii*

İlk olarak 1928 yılında İsveçli bakteriyolog J. Thöni tarafından izole edilmiş ve van Niel tarafından isimlendirilmiştir. Yüzeyde 4 günlük kültürlerde daire şeklinde, tam, düzgün, portakal ya da kırmızı-kahverenginde koloniler oluşturular. İnsan, sığır, koyun, tavşan ve domuz kanı içeren katı besiyerinde beta hemolitiklidir. Sıvı kültürlerde kahverengi-kırmızı ya da turuncu-kırmızı renkte bulanıklık oluşturur. Glukoz içeren sıvı kültürlerinde son kültür pH'sı 4,7-4,9'dur. Tip türlerine göre daha az zorunlu anaerobtur. Gelişme için pantotenik asit ve biotine gereksinim duyar. Bazı türlerin gelişmesi için para-aminobenzoik asit ya da tiamin gereklidir. Hücre duvarı L-diaminopimelik asit, glukoz ve galaktoz içerir. DNA'sındaki %G+C oranı 66-67 mol'dür. İsviçre'ye özgü Emmental peynirlerde bulunan kırmızı noktalardan izole edilmiştir. Diğer peynir ve süt ürünlerinde de bulunabilir. *P. thoenii* ve türlerinin koyu kırmızı ya da kırmızı kahverengi pigment üretmek dişında birçok ortak

özelliğinin olduğu belirlenmiştir. *P. rubrum* rafinoz ve mannitolü fermente edebilir ancak sorbitolü fermente edemez. *P. thoenii* ise sorbitolü fermente eder fakat rafinoz ve mannitolü fermente edemez. *P. thoenii* ve *P. rubrum* 'un yüksek DNA homolojisi göstermesi nedeniyle bu iki türün tek bir tür olarak tanımlanması tavsiye edilmiştir [12, 16]. Carvalho ve ark.'larının 1995 yılındaki yaptıkları çalışmada *P. rubrum* ATCC 4871 tip türünün 16S rRNA sekansının *P. jensenii*'nin tip türü ile aynı olduğunu bulmuşlardır. DNA hibridizasyon verileri *P. rubrum*'un *P. thoenii* türüne değil *P. jensenii* türüne ait olması gerektiğini göstermiştir. Bu çalışma ile *P. rubrum*, *P. jensenii* 'nin betahemolitik biyovaryetesi olarak yeniden tanımlanmıştır [17].

### *Propionibacterium acidopropionici*

İlk olarak 1909 yılında Orla-Jensen tarafından isimlendirilmiştir. At kanı katı besiyerinde gelişen kolonileri (2 günlük anaerobik inkübasyon) 1 mm'lik nokta şeklinde, yuvarlak, konveks, tam, yarı opak, griden beyaza kadar değişen renktedir. Genellikle non-hemolitiklidir. Koloniler katı besiyerinin dip kısmında beyaz, devam eden inkübasyonlarda ise pembe renge dönüşmektedir. Glukozlu sıvı kültürlerinde, beyaz renkli sedimentlerle bulanık ve son kültür pH'sı ise 4,1-4,9'dur. Gelişme koşulları anaerobtan aerotoleranta kadar değişmektedir. Aerob koşullarda anaerobtaki kadar iyi gelişim gösteren suşları da vardır. Gelişme için pantotenik asit ve biotine gereksinim duyar. Tiamin gelişimleri için temel değildir. Hücre duvarı L-diaminopimelik asit, glukoz ile galaktoz ya da glukoz-mannoz içerir. DNA'sındaki %G+C oranı 66-68 moldür. Süt ürünlerinden izole edilebilmektedir [12].

### **2.2.2. Propiyonik asit bakterilerinin habitatları**

PAB'ların 4 tipik klasik türü *P. freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. thoenii* ve *P. acidipropionici* süt ve peynirlerden izole edilebilmiştir. İsviçre ova sütlerinden 453 klasik PAB'lerin dört tipik türü izole edilmiştir. İzole edilen bu 453 türün; %71'nin *P. freudenreichii*'ye, %19'nun *P. jensenii*'ye, %8'nin *P. acidopropionici*'ye ve %2'sinin ise *P. thoenii*'ye ait olduğu bildirilmiştir [18]. Benzer sonuçlara İtalya'nın çiğ sütleri ile yapılan çalışmada da rastlanılmıştır. Carcano ve ark., (1995) yaptıkları

bu çalışmada ise izole ettikleri 60 PAB türünün *P. freudenreichii* (%65), *P. jensenii* (%25), *P. acidopropionici* (%5) ve *P. thoenii* (%5) olarak dağılım gösterdiğini tespit etmişlerdir [19]. *P. jensenii* Leerdammer peynir numunlerinden en sık izole edilen *Propionibacterium* türü olarak belirlenmiştir [13]. Appenzell peynirlerinde bulunan 'kahverengi noktalar'dan *P. freudenreichii*'ye ilaveten yavaş gelişen *P. acidopropionici* ve *P. jensenii* türleri de izole edilebilmiştir [20].

*P. jensenii*, *P. thoenii* ve *P. acidopropionici* fermente edilmiş ve pişmemiş taze gıdalardan da izole edilmiştir [21]. *P. freudenreichii* ve *P. jensenii* çiğ süt, asit peynir altı suyu, peynir ve besleyici un numuneleri gibi çeşitli kaynaklardan en çok izole edilen PAB'lardır [22].

*P. pentosaceum* ve *P. peterssonii*'nin topraktan, *P. zeae*'nin ise yemden izole edildiği bildirilmiş ancak referans literatürler verilmemiştir. Fermente edilmiş zeytin ve pirinç toprağından da propiyonibakterilerin izolasyonları bildirilmiştir. *P. cyclohexanicum* Japonya'da pastörize edilmiş ve bozulmuş portakal suyundan, *P. microaerophilum* ise Güney Fransa'da zeytinyağı fabrikası atık sularından izole edilmiştir [11].

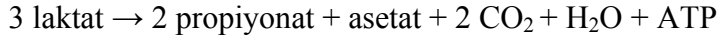
### 2.2.3. Propiyonibakterilerin metabolizma ve besin gereksinimleri

PAB'lar temel enerjilerini fermentasyonla CO<sub>2</sub>, propiyonik asit ve asetik asit üretimleri sırasında oluşan enerjiden sağlamaktadırlar [23].

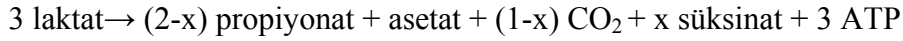


Yukarıda verilen reaksiyonla glukoz molekülü başına 4 ATP'lik enerji elde edilir. Bu şekilde elde edilen enerji laktik asit ya da asetik asit fermentasyonu ile elde edilen enerjiden daha fazladır. PAB'lar yalnız substrat düzeyinde fosforilasyonla değil oksidatif fosforilasyonla da ATP enerjisi üretebilmektedirler. PAB'leri anaerobik koşullarda laktatlı ortamlarda gelişme göstermesi bu bakterilerin selektif kültürlerinin oluşturulmasında kullanılan bir özelliktir [23].

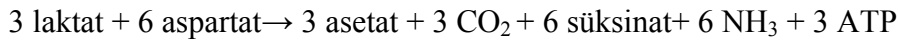
Klasik metabolik yol:



CO<sub>2</sub> fiksasyonu ile süksinat oluşumu:



Elektron alıcısı olarak aspartat:

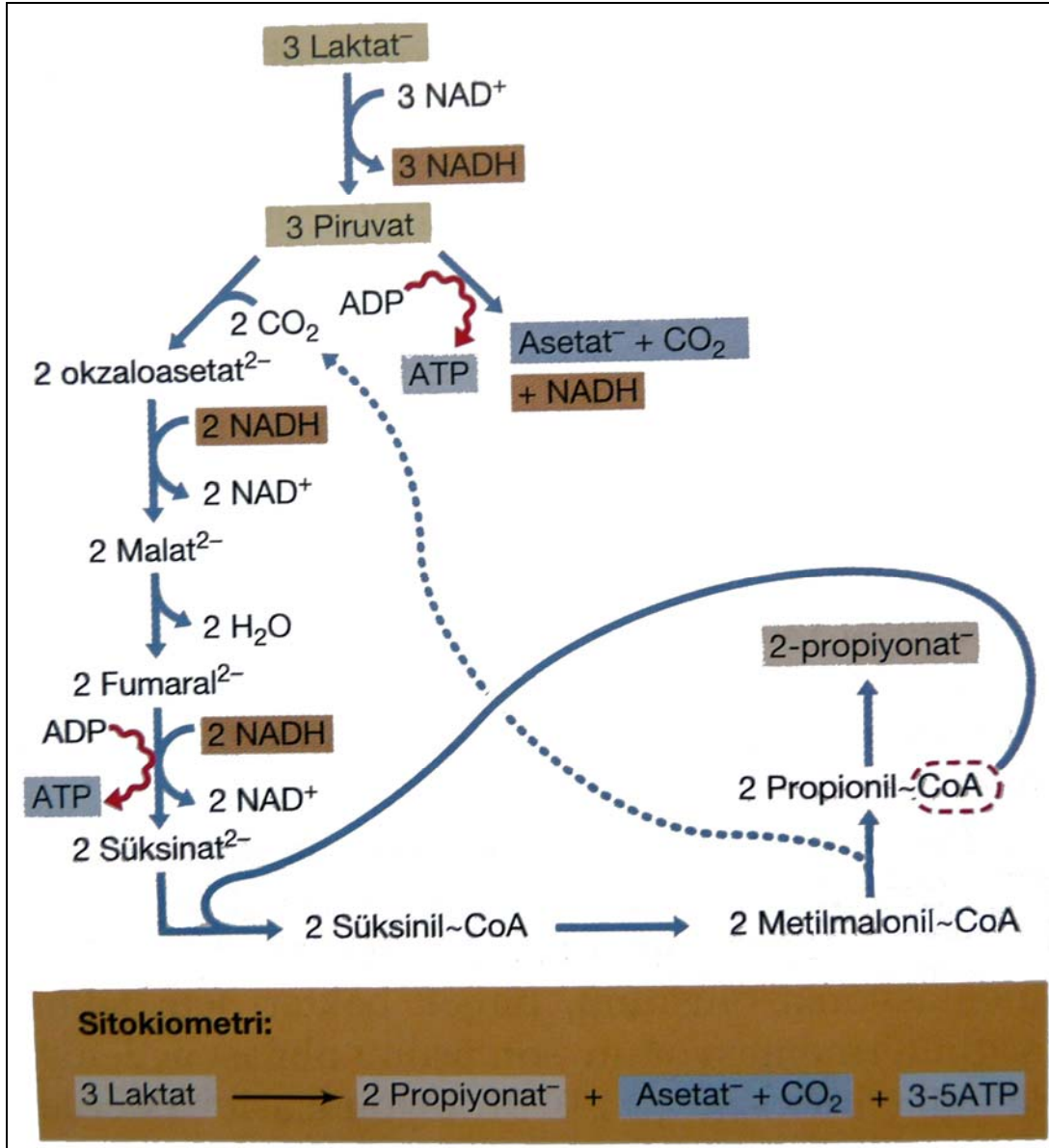


Propiyonik asit fermentasyonu için gerekli olan biotin ve vitamin B12 vitaminleri PAB'lar tarafından sentezlenebilmektedir [23].

Yüksek miktarlarda propiyonik asit üretimi propiyonibakteriler için karakteristiktir. Heksozlar, Embden-Meyerhof metabolik yolu ile piruvata dönüştürülmektedir [11]. Asetat ve propiyonat oluşum reaksiyonları Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Üretilen propiyonik asit ve asetik asit oranı 2:1 olup, bu oran 5:1 ve daha fazla da olabilmektedir. *P. cyclohexanicum* ve *P. propionicum* türleri tarafından asetik asit ve propiyonik asite ilaveten laktik asit de üretebilmektedirler. *P. australiense* türü bu asitlerin yanı sıra süksinik asit de üretebilmektedir [11].

PAB'ların her iki grubu içinde (klasik ve deri) besin gereksinimleri temel olarak benzerlik göstermektedir. Tüm türler pantotenik asit ve biotin vitaminlerine gereksinim duyarken, bazıları ayrıca tiamin ve para-aminobenzoik asite de gereksinim duymaktadırlar. Yeast ekstratın içinde bulunan bilinmeyen faktörlerin birçoğu da gelişme için gereklidir. Propiyonibakterilerin bir çok türünün, amino asit eklenmeden temel besiyerinde gelişim gösterdikleri bildirilmiştir. Ancak, gelişme propiyonibakterilerin tüm amino asit gereksinimlerini karşılayan sindirilmiş kasein eklenmesiyle artmıştır [11].





Şekil 2.1. Propiyonik asit fermentasyon döngüsü [24]

#### 2.2.4. Propiyonibakterilerin tanımlanması

Propiyonibakterilerin tanımlanmasında temel olarak biyokimyasal testlerden yararlanılmaktadır [12]. Biyokimyasal testlerde inkübasyon süresi 7 gün olup, farklı sürelerde yapılan şeker testlerinin sonuçları farklı olabilmekte ve sonuçların değerlendirilmesinde sorunlar yaratmaktadır. Britz ve Riedel (1991) 22 adedi referans olmak üzere toplam 73 propiyonik asit bakterisinin tanımlanmasında

biyokimyasal testleri ile analitik profil indeks (API) 50 CH, API 20 A ve API 20 E kitleri kullanmışlar ve sonuçları nümerik taksonomi programında değerlendirmişlerdir. Bu araştırmacılar plemorfik yapıda ve değişken karakterli olan propiyonibakterilerin biyokimyasal testlerde değişken sonuç vermelerinden dolayı testlerin en az üç kez tekrarlanarak elde edilen sonuçların çoğunluğuna göre değerlendirilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. API sisteminin veritabanında Propiyonik asit bakterileri olmamakla birlikte, API kitlerinin propiyonibakterilerin karbonhidrat profillerinin çıkarılmasında etkili ve yeterli bir sistem olduğu bildirilmiştir [13, 25].

Propiyonibakterilerin geleneksel metotlar ile tanımlaması kolay olmamakla birlikte; uzun süre gerekmektedir. Alınan değişken sonuçlarda, tür seviyesindeki tanımlamalarda sıkıntı yaratmaktadır. Yapılan son çalışmalarda bu bakterilerin tanımlanması için restriksiyon enzim analizi ve genel jel elektroforezi, rastgele olarak amplifiye edilen polimorfik DNA (RAPD) [26], pulsed field jel elektroforezi [27] ve ribotipleme [28] gibi metotlar geliştirilmiştir. *P. freudenreichii* türünün *freudenreichii* ve *shermanii* alt türleri laktoz fermentasyonu ile bir birinden ayırt edilmektedir. Bu alt türlerden yalnızca *shermanii* alt türü laktozu fermente edebilmektedir. Bu metot çoğu kez hızlı tanımlama sağlaması nedeniyle tercih edilmektedir. Çünkü protein profili, 23S rRNA gen restriksiyon analizi ya da RAPD moleküler teknikleri ile bu iki alt türün ayrımı sağlanamamaktadır [20]. Ancak *freudenreichii* alt türünün *shermanii* alt türünden ribotipleme ile ayırt edilebileceği bildirilmiştir [29]. Bu nedenle Tilsala-Timisjärvi ve ark. (2001) klasik Propiyonibakterilerin bazı türlerinin 16S-23S rRNA ve 23S-5S rRNA intergenik ara bölgelerini tespit etmişlerdir. 16S-23S rRNA ve 23S-5S rRNA bölgelerine göre tasarladıkları primerlerin güvenilirliğini 14 farklı klasik propiyonibakterinin 27 suşu ile PCR'da test ederek, tanımladıkları bu primerler ile endüstriyel fermentasyon proseslerinde, klasik PAB'ların hızlı PCR tanımlanmasının yapılabileceğini rapor etmişlerdir [30].

### 2.2.5. Propiyonibakterilerin starter özellikleri

Klasik propiyonibakteriler olan *P. acidopropionici*, *P. freudenreichii*, *P. jensenii*, ve *P. thoenii* mandıra endüstrisi için önemli türlerdir. *P. freudenreichii* suşları genellikle homofermentatif laktobasiller ve streptokoklar ile birlikte İsviçre tipi peynirlerin üretiminde starter olarak kullanılmaktadır. Klasik PAB'lar peynir koşullarında otolitiktir ve peynirde bulunan amin ve peptitleri degrades ederler. Bu proteolitik aktivite ile peynirde bulunan serbest prolin miktarı artar ve PAB içeren peynirlerin karakterisitik tadının oluşumuna katkı sağlar. Peynir yapımı sırasında peynirde bulunan starter bakterilerinin ürettikleri laktat, PAB'lar tarafından kullanılarak İsviçre peynirlerinin tadını oluşturan maddelerden biri olan propiyonik aside dönüştürülür. Bu peynirlere tadını veren dallanmış zincirli yağ asitleri ise PAB'ların amino asit katabolizması ile oluşturulur. PAB'lar aynı zamanda sütte eksopolisakkarit üretmektedirler. Üretilen bu eksopolisakkaritler PAB'ları içeren fermente ürünlerin reheolojik tatlarının oluşumunda pratik olarak uygulanabilmektedir [31].

Propiyonik asit bakterileri aynı zamanda çiğ süttede bulunmaktadır ve bazı türleri peynirde aroma ve doku noksanlıklarına neden olmaktadır. Peynir yapımında kullanılan propiyonik asit bakterilerinin sütte bulunması ve peynir yapımındaki rolü için; farklı kaynaklardan elde edilen süt örneklerinde propiyonik asit bakterilerinin sayı ve bulunma sıklığı, gelişmeleri için gerekli olan pH aralığı, besiortamında bulunan sodyum klorür miktarı ve inkübasyon sırasında gerekli olan sıcaklık derecelerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bütün bu faktörler standart peynir yapımında, propiyonik asit bakteri florasının kontrolü için modifiye edilebilir [19].

Süt yağı, yağ asitlerinin trigliseritlerinden oluşmaktadır. Sütteki yağ asitlerinin konsantrasyonunu etkileyen çok sayıda faktör (özellikle, süt salgılama aşaması, hayvan türleri ya da hayvanların besinleri) belirlenmiştir. Mevsimlere göre süt yağının bileşimindeki değişiklikler peynir yapımında da etkili olmaktadır. Sütte bulunan yağ miktarı reheolojik özellikleri, tadı ve peynire geçen mikrobiyal

populasyonu etkilemektedir. Serbest yağ asitleri gelişmeyi artırıcı veya durdurucu etki gösterebilmektedir [32].

### **2.3. Probiyotikler**

Probiyotik kelimesi Yunanca kökenli olup “yaşam için” anlamına gelen ve uzun yıllardan beri çeşitli şekillerde kullanılan bir kelimedir [33]. ‘Probiyotik’ terimi ilk olarak 1954 yılında Ferdinand Vergin tarafından antibiyotik ve flora üzerinde etkili diğer antimikrobiyal maddelerin, patojen olmayan bakterilerin yararlı (‘Probiotika’) etkileriyle ilişkisinin anlatıldığı ‘Anti-und Probiotika’ isimli makalede kullanılmıştır [34]. Lilly ve Stillwell (1965) tarafından ise, diğer mikroorganizmaların gelişimini destekleyen maddeleri tanımlamak için kullanılmıştır [35]. Yine ilk olarak hayvan büyümesini destekleyici yem katkıları olarak 1970’li yıllarda kullanılmış ve ‘hayvanların bağırsak mikrobiyal dengesini geliştirerek, onlara yararlı olan canlı mikrobiyal yem katkıları olarak tanımlanmışlardır [36]. 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 [37]. Bu tanım Salminen ve ark., (1998) tarafından ‘insan ve hayvanların sağlığını geliştirmek için tasarlanan gıda, yem ya da besinsel katkılardaki canlı mikrobiyal preparatlar’ olarak değiştirilmiştir [38].

#### **2.3.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar**

Fermente gıdaların metabolizma üzerindeki faydalı etkileri ile sağlıklı yaşam arasındaki ilişki Elie Metchnikoff’un ilk incelemelerine bağlı olarak günümüzde hala doğruluğunu korumaktadır. Ancak, son yıllarda probiyotikler üzerine yapılan araştırmalar, fermente süt ürünlerinden izole edilen bakteriler dışında bağırsak kökenli bakterilerin de bu özelliklere sahip olduğunu göstermiştir [39].

Farklı cinslere ait birçok mikroorganizma probiyotik olarak kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılan suşlar ise laktik asit bakterilerinin, enterokoklar, laktobasiller ve bifidobakterileri kapsayan heterojen bir grubundan oluşmaktadır.

Özellikle laktobasiller probiyotik olarak kullanılan bakterilerin başında gelmektedir. Ancak, günümüzde diğer mikroorganizmalar da probiyotikler arasına girmiştir [40]. Laktik asit bakterileri dışında probiyotik olarak kullanılan diğer organizmalar arasında *Bacillus* spp., mayalar (*Saccharomyces cerevisiae* ve *S. boulardii*) ve filamentöz fungusler (*Aspergillus oryzae*) yer almaktadır [41]. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların; *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Bacillus* ve *Propionibacterium* cinslerine ait olan bazı türler olarak bildirilmiştir [43]. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 2.2’de verilmiştir [40-42].

Çizelge 2.2. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar [40-42]

Laktik Asit Bakterileri				Diğerleri
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. cremoris</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. boulardii</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricu</i>	<i>B. animalis</i>		<i>S. diacetylactis</i>	<i>E. coli</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. infantis</i>		<i>S. intermedius</i>	<i>P. freudenreichii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. thermophilum</i>			<i>A. oryzae</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>			
<i>L. lactis</i>				
<i>L. plantarum</i>				
<i>L. reuteri</i>				
<i>L. brevis</i>				

### 2.3.2. Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine etkisi ve etki mekanizmaları

Probiyotiklerin bağırsak fizyolojisi üzerine dolaylı veya doğrudan etkide bulunarak immün sistemi uyardığı, bu çerçevede konakçının ağız ve sindirim sistemi dâhil, üst solunum yolu ve ürogenital sistem mukozal yüzeyini etkileyerek iyi hal ve sağlığı geliştirici, hastalık riskini azaltıcı potansiyel etkiye sahip olduğu bilinmektedir [44].

Probiyotiklerin etki mekanizmasına yönelik çalışmalar, bağırsak florasının düzensizliğiyle ortaya çıkan mide-bağırsak sistemindeki bozukluklara dayanarak yapılmaya başlanmıştır [45]. Patojen mikroorganizmalar üzerine direkt antagonistik etki yaparlar: Probiyotik bakteriler, patojen bakterilerin üremesini engelleyen inhibitör antimikrobiyal peptid (mikrosin, bakteriyosin) üretirler. Yapılan çalışmalarda, *Saccharomyces boulardii*'nin, *Candida albicans*, *Salmonella typhi*, *Shigella* ve *E. coli*'nin üremesini baskıladığı gösterilmiştir. Patojenlerin adezyonunu önlerler; sayı ve hacim avantajları ile bağırsak ve ürogenital sistem epitel hücrelerinde, patojenlerin girmesini zorlaştırırlar. Epitelyal bariyeri güçlendirerek, patojenlerin translokasyonunu önlerler. Patojenlerin üremek için gereksinim duydukları besin maddelerini tüketerek, üremelerini inhibe ederler; *S. boulardii*, *Clostridium difficile*'nin gereksinim duyduğu monosakkaridleri tüketerek bu türün üremesini önler [45, 46].

Bağırsak enzim aktivitesine etki ederler: Probiyotik bakteriler, laktaz, maltaz, sükröz aktivitesini arttırlar. *S. boulardii* poliaminleri, aminopeptidazların olgunlaşmasını sağlar [46].

Toksin ve toksin reseptörlerine etki ederler: *S. boulardii* 54 kDa proteini proteaz aktivitesinde olup, *C. difficile* toksin A üzerine direkt olarak veya toksinin reseptöre bağlanmasını önleyerek etki eder. Hayvan modellerinde, 120 kDa proteinin etkisi ile cAMP, adenilat siklaz aktivitesi azalarak, su-sodyum hiper sekresyonunun azaldığı gösterilmiştir [47].

İmmün sistem üzerine etki ederler: Antibiyotik verilen *Lactobacillus casei* ve *Lactobacillus bulgaricus* ile beslenen farelerde lamina propriada lenfosit proliferasyonu saptanmış, plazma hücrelerinin sayısı artmıştır. *Bifidobacterium breve* ile yapılan hayvan deneyinde, peyer plaklarında antikor üretiminin arttığı saptanmıştır. *L. casei* shirota suşu verildiğinde, T-helper sayısında artma, IgE düzeyinde azalma görülmüştür. Probiyotikler, proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin salınımını aktive ederek immün sisteme düzenleyici etki gösterirler [47].

Probiyotiklerin, hayvan modellerinde, dışkıda karsinojenleri aktive eden bakteriyel enzimleri inhibe ederek; karsinojenlerin yapısını bozarak anti-karsinojen etkilerinin olduğu gösterilmiştir [47]. Bu mikroorganizmaların, diyarelerin önlenmesi, laktozun sindirimine katkı, ince bağırsakta arzu edilmeyen bakteri gelişiminin engellenmesi, enterik patojenlere etkileri, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, kandaki kolesterol seviyesinin düşürülmesi ve *Helicobacter pylori* enfeksiyonlarının önlenmesi gibi sağlık üzerinde birçok önemli etkisinin olduğu bildirilmiştir [48-52]. Probiyotiklerin potansiyel klinik amaçları ve etkileri Çizelge 2.3’de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Probiyotiklerin potansiyel klinik amaçları ve etkileri [53]

<b>Probiyotiklerin Etkisi</b>	<b>Probiyotiklerin Mekanizması</b>
Akut diyarenin besinsel olarak düzenlenebilmesi	Bağırsak mikrobiyal florasının düzenlenmesi, rotavirüs yayılım süresinin kısaltılması
Alerjik ve inflamatuvar bağırsak hastalıklarının besinsel düzenlenmesi	Musin sentezinde artış, lokal ve sistemik inflamatuvar cevabın, gut bariyer fonksiyonun ve mikrobiyal floranın özelliklerinin iyileştirilmesi
Enfeksiyon hastalıkları riskini azaltma	Rotavirüse karşı IgA salgısının ve musin sentezinin artışı
Alerjik ve inflamatuvar hastalıkları riskini azaltma	Bağırsak bariyer fonksiyonu, antinflamatuvar etki, inflamatuvar moleküllerinin düzenlenmesi immün sistemin gelişiminin teşvik edilmesi

### 2.3.3. Probiyotik mikroorganizmalarda bulunması gereken özellikler

Probiyotik preparatlarında bulunan mikroorganizmalar, büyük bir grup olan bağırsak sistemi florası ile rekabet etmek zorundadır. Bu sistemde bulunan mikrobiyal flora üzerine bir etki yapabilmesi için de herhangi bir probiyotik preparatında bulunan mikroorganizmaların bazı karakteristik özelliklere sahip olmaları gerekmektedir (Şekil 2.2) [38]. Birçok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarda probiyotik mikroorganizmaların taşınmaları gereken özellikler belirlenmiştir. Bunlar:

- Güvenilir olmalıdır. Kullanım sonucu insan veya hayvanlarda yan etkisi olmamalıdır.

- İnsanlar için kullanılacak olan suşların tercihen insan kaynaklı olması gereklidir.
- Sağlıklı insanın mide-bağırsak sisteminden izole edilmelidir.
- Stabil olmalıdır.
- Düşük pH ve safra tuzlarına karşı dayanıklı olmalıdır. Mide ve bağırsak kanalından geçişleri sırasında canlı kalabilmelidirler.
- Epitel yüzeylere tutunmayı sağlayan maddeler (Ekzopolisakkarit, lektin vb.) bulundurmamalıdır.
- Bakteri yüzeyi hidrofobik yapıda olmalıdır.
- Agregasyon ve koagregasyon yeteneğine sahip olmalıdır.
- Bağırsak hücrelerine tutunabilmeli, kolonize ve metabolize olabilmelidir.
- Patojen bakterilere karşı antagonistik etkileri olmalıdır. Bakteriyosin, hidrojen peroksit, laktik asit ve propiyonik asit gibi organik asitler sentezleyebilmelidir.
- Kısa yağ asitlerini sentezlemesi ve bağırsak hastalıklarını engelleyebilmelidir.
- *Helicobacter pylori*'nin gelişimini engelleyebilmelidir.
- Antikarsinojenik aktivite gösterebilmelidir.
- Kan basıncı ve serumda kolesterol konsantrasyonunu düşürebilmelidir.
- İnsan ve hayvan sağlığında çeşitli nedenlerden dolayı kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli olmalıdır.
- Konakçı hücrelerde fazla sayıda bulunabilmelidir.
- Bakterilerin üretim ve depolama aşamalarında canlılığını ve aktivitelerini koruyabilmelidir.
- Patojenik olmamalı ve toksik madde üretmemelidir [54-61].





Şekil 2.2. Probiyotik mikroorganizmaların seçim ölçütleri [62]

#### 2.4. Propiyonibakterilerin Probiyotik Önemi

İnsan vücudu dinamik bir ekosistem olup, trilyonlarca mikroorganizmanın konakçısı durumundadır. Bu ekosistemde bulunan mikroorganizmalar, temelde faydalı ve zararlı olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Sağlıklı bir konakçıda bu iki grup dinamik bir denge halinde olup, yararlı mikroorganizmalar baskın mikroflorayı oluşturmaktadır. Bağırsak ekosisteminin fizyolojik dengesi hastalık, yaşlılık, antibiyotik veya ilaç kullanımı, diyet alışkanlıklarının değiştirilmesi, iklim koşullarında meydana gelen değişimler ve çevresel toksik maddeler gibi faktörlerden doğrudan veya dolaylı olarak etkilenebilmektedir. Bağırsak sisteminin dengesinde

meydana gelen bu düzensizlikler sonucu bağırsak mikroflorasının dengesi bozulur ve faydalı mikroorganizma sayısında azalmalar başlar [48]. Son yıllarda yapılan çalışmalara göre, bu mikroflora dengesizliğinin dışarıdan yapılacak mikroorganizma desteği ile aşılabileceği belirtilmiştir. Probiyotik adı verilen bu mikroorganizmalar ürettikleri maddeler yardımıyla gıdaların sindirimine, vitamin üretimine ve zararlı mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların önlenmesine yardımcı olarak doğal flora dengesinin korunmasında etkili olduğu bildirilmiştir. Bu özelliklerinden dolayı son yıllarda faydalı bakteriler, yoğurt ve peynir gibi fermente süt ürünlerine ilave edilerek, probiyotik ürün olarak piyasaya sunulmaktadır [55].

Son yıllarda geleneksel yöntemler kullanılarak elde edilen gıdalarda bulunan mikroorganizmaların probiyotik potansiyellerine ilgi artmıştır. Tüketilen bakterinin insan sağlığı üzerine yararlı etkisi için yapılan çalışmalar daha çok ilgi çekmektedir. Çünkü canlı bakteriler için fermente edilmiş süt ve peynir başlıca kaynağı oluşturur ve asıl ilgi çekici olan da bu bakterilerin mandıra orijinli olmasıdır. Propiyonibakteriler İsviçre tipi peynirlerde canlı formda yüksek sayılarda bulunur ve aynı zamanda diğer fermente edilmiş ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Bu bakteriler ilginç probiyotik potansiyeli sergilemekte ve insanlardaki probiyotik formulasyonlarda kullanılmaktadır. Propiyonik asit bakterilerinin iddia edilen probiyotik özellikleri;

- B12 vitamini üretimi,
- Bağırsak mikroflorasını düzenlemesi,
- $\beta$ -galaktosidaz enzim aktivitesine sahip olması ve bu özelliği ile bağırsakta safra tuzlarının emilimini kolaylaştırması,
- Bifidobakterilerin gelişimini sitümüle ederek kolon hareketini düzenlemesi,
- Laktoz sindirimini kolaylaştırması,
- Ürettikleri bakteriosin ile *Listeria monocytogenes* ve *Yersinia enterocolitica* gibi fermente sütte rastlanılabilen patojenlere karşı antimikrobial aktivite göstermesidir. Aynı zamanda bu bakterilerin, gerekli mekanizmaları tam olarak tanımlanmamasına

rağmen, bağışıklık sistemini uyardığı ve kanser gelişimini sınırlandırdığı düşünülmektedir.

#### **2.4.1. Propiyonibakterilerle yapılan bazı probiyotik çalışmalar**

PAB'ların normal bağırsak florasının bir üyesi olup olmadığı henüz tam belirlenmemiştir. Yapılan bazı çalışmalar deri PAB'ların bağırsakta bulunduğunu gösterirken [64], başka çalışmalar ise PAB'ların bağırsakta bulunmadığını ya da çok az bulunduğunu göstermiştir [65, 66]. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların genellikle bağırsak orijinli olması nedeniyle, bağırsakta bulunan deri PAB'ların probiyotik olarak kullanılması tavsiye edilmemektedir. Deri PAB'ların probiyotik olarak kullanılmamalarının nedeni ise hastalık etmeni olmalarıdır. Klasik PAB'ların ise probiyotik olarak kullanılmaya aday gösteren çok sayıda yararlı özelliğe sahip oldukları bildirilmiştir [66].

Laktobasiller ve bifidobakterlerle karşılaştırıldığında PAB'ların potansiyel probiyotik özellikleri üzerine yapılan çalışmalar sınırlı kalmıştır. Ancak son yıllarda PAB'ların yararlı sağlık etkileri üzerine yapılan çalışmalar artış göstermiştir.

Mide-bağırsak sisteminden geçişte canlı kalmak probiyotik seçiminde en önemli kriterdir. Bazı PAB türlerinin düşük pH'lara maruz bırakıldıklarında canlı kaldıkları tespit edilmiştir [67]. Düşük pH'nın PAB'ların canlılığını ve enzim aktivitelerini değişik ölçüde etkilediği belirlenmiş, bu etkinin matriks olarak süt ya da peynir kullanıldığında azaldığı ve bu matrislerde PAB'ların daha fazla canlı kaldığı bulunmuştur [68]. Öncelikle öldürücü olmayan pH'lara (pH 5) kısa süreli inkübasyona maruz bırakıldıktan sonra, düşük pH'a maruz bırakılan PAB'ların canlılık oranlarının arttığı gözlenmiştir. Öldürücü olmayan stres koşullarına maruz bırakılmak düşük pH'lara karşı koruyucu olabilmektedir [69]. PAB'ların aynı zamanda safra tuzlarında dirençli oldukları gözlenmiştir [67]. Safraya maruz bırakılmanın  $\beta$ -galaktozidaz üretimini uyardığı ve enziminin aktivitesini artırdığı belirlenmiştir. PAB'ların mide bağırsak sisteminden geçişte yüksek miktarda canlı

kaldıkları gözlenmiş ancak PAB'larla beslenme durduktan sonra insan bağırsak sisteminde bu bakterilerin sürekli bulunmadıkları tespit edilmiştir [70].

Probiyotik seçiminde bir diğer önemli kriter ise probiyotiklerin bağırsak mukozasına adezyonudur. Bağırsak mukozasına tutunma probiyotiklere, mide-bağırsak sisteminde daha uzun süre kalması, rekabetle patojenlerin bağırsak ortamından elimine edilmesi ve immün sistemi uyarması gibi avantajlar sağlamaktadır [71]. Bazı PAB türlerinin bağırsak mukozası modellerine tutunma yetenekleri değerlendirilmiştir. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* JS suşunun, bağırsak mukozasına ve bağırsak mukoza modellerine iyi tutunduğu bilinen *Lactobacillus rhamnosus* GG probiyotik türü kadar caco-2 bağırsak enterosit doku kültürlerine tutundukları gözlenmiştir [72]. İnsan bağırsak mukusuna PAB'larının adezyonun mukus ile olan nonspesifik etkileşimlerden dolayı düşük olduğu belirlenmiştir [70]. *Lactobacillus rhamnosus* GG ya da *Bifidobacterium lactis* Bb 12 gibi probiyotik türlerin mukusa ön adezyonları sağlandıktan sonra aynı mukusa PAB'ların iki ya da üç kat adezyonlarının arttığı gözlenmiştir [73].

Newcastle Üniversitesi'nin Avustralya'lı araştırmacıları *P. jensenii* 702 suşunun probiyotik özelliklerini araştırmışlardır. Bu araştırmacılar erkek fare modelinde *P. jensenii* 702 suşunun mide-bağırsak sisteminde canlılığını ve güvenilirliğini değerlendirmişlerdir [74]. Bir fare modeli kullanıldığında *P. jensenii* 702 suşunun tuberklosise karşı canlı aşı rolü oynadığı bildirilmiştir [75]. *P. acidopropionici* CRL 1198 suşunun hayvan modelleri kullanıldığında bağırsak enfeksiyonlarına karşı koruyucu ve bağırsıklığı uyarıcı, bağırsak florasının bileşimi ve enzim aktiviteleri üzerine pozitif etkiler gösterdikleri tespit edilmiştir [76, 77].

#### **2.4.2. Propiyonibakterilerin insan probiyotiği olarak kullanımı**

Probiyotik gıdalarda propiyonibakteriler öncelikle laktik asit bakterileri ya da bifidobakteriler ile kombine edilmektedir. Çalışmaların çoğu çocukların bağırsak sistemi ile ilgili bozuklukların giderimi ile ilgilidir. Öncelikle *Lactobacillus acidophilus* propiyonibakterilerle karışık kültürlerde kullanılmıştır.

Propiyonibakteriler ve laktik asit bakterilerinin kombinasyonun da bu bakteriler arasında etkileşim ve olası antagonistik etkiler hakkında bir sorun farklı bakış açılarıyla artmıştır. Parker ve Moon (1982)'a göre birçok nedene bağlı olarak kültürde laktobasillerin baskın olduğu görülmekte ve hatta propiyonibakterilerin gelişimini engellemektedir [78]. Karışık kültürlerde her iki cinsin gelişme oranı ve asit ile CO<sub>2</sub> üretimleri saf kültüre göre daha düşüktür. Ancak bazı *Lactobacillus/Propionibacterium* çiftlerinin her biri gelişmede diğerleri üzerinde yararlı etkiye sahiptir. İki cinsin türleri arasında büyük farklılıklar bulunmaktadır. Karasevich ve ark., (1978) propiyonibakterilerin metabolitlerinin *L. acidophilus* üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir [79]. Kaneko ve ark. (1994)'ları *P. freudenreichii* tarafından üretilen bir maddenin, bu bakterilerin probiyotik olarak kullanıldıkları zaman etkili olduğunu ve bu maddenin *Bifidobacterium adolescentis* türünün gelişimini uyardığını bildirmişlerdir. *B. adolescentis*'in tek başına kültürasyonu yapıldığında canlılık oranı  $3,7 \times 10^6$  kob/ml olarak tespit edilmiştir. *P. freudenreichii* ile karışık kültürlerinde *B. adolescentis*  $2,2 \times 10^8$  kob/ml canlılık gösterirken, *P. freudenreichii*'in canlılığının  $8,7 \times 10^7$  kob/ml'den  $4,7 \times 10^8$  kob/ml'ye yükseldiği bildirilmiştir [80].

Mantere-Alhonen (1995) %3'den %1'e kadar değişen oranda *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ve *L. acidophilus* içeren ekşi süt ürünü geliştirmeyi denemişlerdir. Bu ürün iyi duyuşal özellikler, hafif tat, iyi kıvam ve koruma kalitesi göstermiştir. Bu ürünün probiyotik etkisi oldukça yaşlı hastalar ile yapılan küçük denemelerin sonuçları ile test edilmiştir. Bu çalışmanın negatif yönü ise laktobasillerle birleştirilmeden önce propiyonibakterilerin uzun inkübasyon süresine (4-5 gün) ihtiyaç duyması olarak belirlenmiştir [21].

## 2.5. Propiyonibakterilerin Güvenirliği

Tüm *Propionibacterium* izolatlarının klinik bulguları aknes grubu denen 'deri PAB'lara aittir. Buna karşılık klasik propiyonibakterilerin gıdalarda kullanımı ile ilişkili çok sayıda literatür bulunmaktadır. Peynir yapımında kullanılan *P. freudenreichii* türleri için genel olarak güvenli (GRAS, Generally Recognized As

Safe) tanımlaması yapılmıştır. *P. thoenii* suşları ve bazı *P. jensenii* suşlarının  $\beta$ -hemolitik aktivite göstermesine rağmen klasik propiyonibakterilerin bilinen virulens faktörleri bulunmamaktadır [12]. Bazı *Propionibacterium* suşları tiamin ya da histamin oluşturabilmektedirler. İsviçre peynirlerinde (Emmental) bulunan biyojen aminlerin miktarının, bu peynirlerde bulunan ve çiğ süttten gelen laktobasil, enterokok, enetrobakterilerin aktivitesi sonucu oluşan aminlerinden dolayı arttığı bildirilmiştir. [81, 82]. Rat modellerinde *P. jensenii*'nin bir probiyotik türünü güvenilirliğini test etmek için ratlar 81 gün boyunca günde  $10^{10}$  kob/rat oranında bu bakterilerle yüksek dozda beslenmiştir. Ratların kan ve diğer dokularına propiyonibakteri hücrelerinin translokasyonla taşınması ve doz toksitesi değerlendirilmiştir. Yapılan bu çalışma *P. jensenii* probiyotik türünün, ratların genel sağlık durumu, vücut ağırlığı ya da iç organlara her hangi bir yan etkisinin olmadığını göstermiştir [74].

Klasik PAB'ların aksine deri propiyonibakterilerin çeşitli hastalıkların nedeni olduğu bildirilmiştir. Özellikle *P. acnes* türünün akne ve safra taşı oluşumuna neden olduğu tespit edilmiştir. Deri PAB'ların özellikle *P. acnes*'in ameliyat sonrası hastalarda oluşan enfeksiyonlarda fırsatçı patojen oldukları tespit edilmiştir. Deri PAB'lar diyabet, bağışıklık sisteminde yetersizlik, habis tümör ve travmaya da neden olabilmektedirler [83].

Yapılan bu çalışmalar deri PAB'ların çeşitli hastalıkların nedeni olabildiklerini gösterirken, klasik PAB'ların herhangi bir hastalık nedeni olmadıklarını ve bu bakterilerin probiyotik kullanıma aday olduklarını göstermektedir.

## 2.6. Propiyonibakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri

Antimikrobiyal maddeler, mikroorganizma gelişimini engelleyen, biyolojik kökenli, ikincil metabolitlerdir. Bunlar, mikroorganizmanın çoğalmasını engelleyici "bakteriostatik" veya "fungustatik" olabildikleri gibi; mikroorganizmanın ölümüne sebep olan "bakterisit" ve "fungisit" gibi maddeler de olabilirler. Mikroorganizmalar tarafından üretilen, düşük moleküler ağırlıklı, organik doğal ürünlerdir [84, 85].

Propiyonibakteriler tarafından inhibitör etkiye sahip metabolitlerin üretildiği bilinmektedir. Bu bakteriler fermentasyon prosesleri sırasında, glukoz ve laktatı propiyonat, asetat ve karbondioksite dönüştürür. Propiyonat ve asetatın inhibitörük etkisi gram negatif bakteriler üzerinedir ve İsviçre-tipi peynirlerde ve diğer fermente ürünlerde bu etki pH'nın düşmesiyle artmaktadır. Mandıra orjinli propiyonibakteriler tarafından üretilen propiyonik asit önemli bir organik asittir ve çok çeşitli endüstriyel proseslerde özellikle gıdalarda bulunan küf ve bazı bakterilerin gelişimini inhibe ederek gıdaların raf ömrünü uzatmak amacıyla gıda koruyucusu olarak kullanıldığı bildirilmiştir [86, 87]. Glukoz ve laktoz fermentasyonu sırasında oluşan polisakkaritler asetat ve karbondioksit oluşumlarının artmasıyla asit oranını değiştirir. Propiyonik asitin, gıdalarda bozulmaya neden olan asit-toleranslı mayaları ve *Salmonella*'yı laktik asite göre daha fazla inhibe ettiği bildirilmiştir [88].

Klasik PAB'ların çeşitli organik asit ve bakteriyosinler ürettikleri ve antimikrobiyal aktivite gösterdikleri bilinmektedir [89]. *P. thoenii* [90-93], *P. jensenii* [94-96], *P. freudenreichii* [97] ve *P. acidopropionici* [98] klasik türleri organik asit ve bakteriyosin üretimleri için araştırılmıştır.

### 2.6.1. Propiyonik asit

Diğer organik asitler gibi propiyonik asit de düşük pH'larda belirli bakteri ve küfleri inhibe etmektedir. PAB'lar koruyucu olarak gıdalara eklenmektedir. Propiyonik asit, mikroorganizmaların, hücre içinde birikerek veya enzim aktivitelerini engelleyerek inhibe etmektedir. PAB türleri tarafından şekerlerin fermentasyonu ile ticari olarak propiyonik asit üretimi yıllardır yapılmaktadır. Kesilmiş süt suyu *P. acidopropionici* ya da *P. freudenreichii* tarafından propiyonik asit üretiminde ucuz besiyeri olarak önerilmiştir. Propiyonik asit fermentasyonu homofermentatif *Lactobacillus* türleri gibi laktat üreten organizmalar tarafından kombine edildiğinde artış gösterebilmektedir. Ancak sıvı besiyerinde düşük asit konsantrasyonu ve uzun inkübasyon süresi asit üretimini ve geri kazanımın maliyetini artırmaktadır. Kimyasal çözücülerle asitin sürekli fermentasyon ortamından ekstraksiyonu denenmiş ancak çözücülerlerin PAB hücrelerine toksik etki gösterdiği tespit

edilmiştir. Çözücü fazının gelişme ortamından bir membran ile ayrılması bu problemi çözebilmektedir [23].

### 2.6.2. Bakteriyosin

Bakteriyosinler protein yapıda, dar inhibitörük spektrumlu maddeler olarak tanımlanmıştır. Ancak bakteriyosinlerin çoğu geniş inhibisyon spektrumu gösterebilmektedir. Bakteriyosinlerin bu özelliği gıdalarda koruyucu olarak kullanılmasını ve bakteriyosin üreten probiyotiklerle birlikte normal bağırsak florasında bariyer işlevi göstermesini sağlamaktadır [84, 85].

Leversee ve Glatz (2001) test ettikleri 52 PAB türünden yalnızca 4'ünün bakteriyosin ürettiğini tespit etmişlerdir [99]. Ancak Holo ve ark., (2002) çoğunlukla *P. acidopropionici*, *P. jensenii* ve *P. thoenii* türlerinin bakteriyosin ürettiklerini, test edilen 52 *P. freudenreichii* türünden ise sadece 6'sının bakteriyosin ürettiğini belirlemiştir [100].

PAB'lar tarafından bakteriyosinlerin oluşturulması çok yavaş gerçekleşmektedir. Propionicin T1'in oluşması için 3 gün, jenseninin G ve propionicin PLG-1'in oluşması içinde 7 ya da daha fazla inkübasyon süresi gerekmektedir. Uzun inkübasyon süresinden sonra elde edilen bakteriyosinin miktarı çok az olmakta, antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi içinde konsantre edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Karşılaşılan bu güçlükler PAB'lar tarafından üretilen bakteriyosinlerin uygulamasını sınırlamaktadır [23].

### 2.7. Antibiyotik Dirençliliğinin Probiyotik Önemi

Probiyotik bakteriler, birçok fermente gıda ürünlerinin üretiminde kullanılmaktadır. Çalışmalar, üstün nitelikte bu bakteri grubunun üretimde kullanımını önermektedir. Selekte edilen kültürler ile üretilen ürünlerde kalite yüksekliği ile birlikte bu bakteri grubunun patojenler üzerinde antagonistik etkileri önem kazanmıştır. Probiyotiklerin bağırsak sisteminde bulunabilen patojen bakteriler üzerinde antagonistik etkileri de



önemli bir yer tutmaktadır. 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 [45].

Probiyotikler özellikle organizmada, gerek sağlıklı bir gelişme gerekse hastalıkların tedavisinde antibiyotiklerin yerine, doğal biyolojik ürünleri destekleyici alternatif ürünler olarak kullanılabilir. Bu sayede mikroflorada stabilite sağlandığı gibi dışarıdan alınan diğer maddelerin (ilaç, antibiyotik vb.) olumsuz etkilerinin de önüne geçilmiş olunur. Son yıllarda biyolojik sistemlerden tıp, eczacılık, endüstri, tarım ve hayvancılıkta faydalanılmaktadır. Günümüzde hem daha güvenilir, hem de daha ekonomik olması nedeniyle her dalda biyoteknolojik çalışmalara ağırlık verilmiştir. Probiyotik bakterilerinin doğal insan florasındaki olumlu etkileri düşünülerek probiyotik teknolojisinde, üstün özelliklere sahip bazı suşların kullanılarak, hastalıkların tedavisinde antibiyotiklere alternatif olması düşünülmektedir. Probiyotiklerin yalnızca tedavi amaçlı olmayıp, tıpta koruyucu amaçlı da kullanılabileceğini, ancak bunun için seçilecek suşların antibiyotiklere ve antifungal ilaçlara dirençli olmasının önemli bir kriter olduğunu bildirilmiştir [48].

## **2.8. Bakteriyel Eksopolisakkaritlerin (EPS) Starter ve Probiyotik Önemi**

Bakteriyel polisakkaritlerin varlığı ve rolleri ilk olarak tıbbi incelemelerde ortaya konmuştur. Ancak EPS'lerin varlığı virulent karakterli bakterilere özgül değildir. Fiziksel ve kimyasal yoldan ortadan kaldırılan polisakkaritlerin bakteri çoğalmasını etkilemeksizin tekrar oluştuğu bildirilmiştir. Polisakkaritler üretici suşlar tarafından karakterize edilemediklerinden enerji kaynağı olarak kullanılamazlar. Bu polimerlere kapsül veya mikrokapsül şekline polisakkarit adı verilir. 'Slime' terimi fermente sütlerdeki termofil ve mezofil laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan polimerleri ifade eder [101]. Hücresel lokasyonları, kimyasal ve fiziksel yapı özellikleri ile fonksiyonları esas alınarak mikrobiyal ekopolisakkaritleri üç ana grup altında toplamak mümkündür. Bunlar; hücre yüzeyine kovalent bağlarla bağlı olan kapsüller polisakkaritler (CPS), hücre duvarının bir bileşeni olan polisakkaritler (LPS) ve dış

çevreye salınan ya da hücre yüzeyi ile kovalent olmayan, gevşek bağlarla ilişkilendirilmiş polisakkaritlerdir (LAM) [102]. Kapsüller ve lipo polisakkaritler genellikle üretici bakterilerin patojenitesini belirleyen yapılar olduğundan, tıbbi açıdan büyük önem taşımaktadır. LAM'nin ise gıda endüstrisinde geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. Bakteri hücre duvarının yapısal özelliği dikkate alındığında bu polimerlerin tümü yapışkan (slime) kapsüller ya da mikrokapsüller polisakkaritler olarak adlandırılmıştır. Bakteri hücre duvarının üzerinde bulunan bakteriyel polisakkaritlerin tümünü ifade eden ekzopolisakkarit (EPS) genel bir isim olarak önerilmiştir [103].

Leukonostok ve oral streptokoklar tek bir şeker içeren (dekstran,  $\alpha$ -glukanlar, fruktanlar) homopolisakkaritler üretirken, mandıra laktik asit bakterileri ve propiyonik asit bakterileri disakkaritten heptasakkarite kadar değişen ve farklı büyüklüklerdeki tekrarlayan birimleri içeren heteropolisakkaritler üretirler. Üretilen EPS'nin yüzlerce polimerizasyondan sonra moleküler ağırlığının  $1-2 \times 10^6$  olduğu bildirilmiştir [103]. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'ler düşük yağ oranlı, kaymaklı ve düşük süt oranlı yoğun yoğurtlar gibi yeni ve değeri artan ürünlerin gelişimi için teknolojik bakımdan önemli polimerlerdir. Fermentasyon koşulları (inkübasyon süresi ve sıcaklığı), besiyerinin bileşimi, üretilen polimeri ve şeker bileşimini etkilemektedir. Propiyonik asit bakterileri tarafından üretilen polisakkaritlerin bileşiminde bulunan monosakkaritlerin glukoz, galaktoz, mannoz olduğu ramnoz ve fukozun az miktarda bulunduğu bildirilmiştir [103].

Ekzopolisakkaritlerin, fermente süt ürünlerinin yapısal özellikleri üzerinde oynadıkları rol yanında antitümör, antiülser, immün sistemi uyarıcı ve kolesterol düşürücü aktivitelerinden dolayı insan sağlığını koruyucu etkileri bildirilirken propiyonik asit bakterileri tarafından üretilen EPS çalışmalarına gereken önem gösterilmemiştir. Ayrıca laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS, mikrobiyal hücreyi fagositoza, faja, antibiyotik ve toksik maddelere karşı korumaktadır [103, 104]. EPS'nin laktik asit bakterilerin sağlamış olduğu bu özellik ve avantajları dikkate alınacak olursa, EPS üretimi yüksek bir suşun hem starter hem de probiyotik olarak kullanımının çok önemli avantajı olacaktır. Propiyonik asit bakterilerinin de

EPS üretimi, mide bağırsak sisteminde maruz kaldıkları asit ve safraya yüksek direnç gösterdikleri bilinmekle birlikte bu ortamlara direnci tetikleyen unsurun özel bir protein olabileceği bildirilmiştir [42].

Eksopolisakkaritler (EPS) çok sayıda bakterinin (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) yüzeyinde bulunan ekzoselüler polimerlerdir [104]. Mikroorganizmaların çevrelerine salgıladıkları EPS moleküllerinin, hücreleri kurumadan, fagositozdan ve faj etkisinden koruduğu, yüksek oksijen gerilimi sağladığı, antibiyotiklere ve toksik maddelere (toksik metal iyonları, sülfür dioksit, etanol gibi) karşı hücreleri koruma ve yüzey tutunmasında yapıştırıcı işlevine sahip olduğu bilinmektedir [105]. Bu polimerlerin bir diğer dikkate değer özelliği gıda sanayinde kıvam artırıcı olmalarıdır [106, 107]. EPS'lerin immun sistemi teşvik ettiği, antitümoral ve kolesterol düşürücü aktiviteye sahip olduğu da saptanmıştır [108].

Genellikle güvenilir olarak (GRAS) tanımlanan laktik asit bakterilerinin EPS ürettikleri bilinmekle birlikte, propiyonik asit bakterilerinin ve bifidobakterilerin de EPS ürettikleri bildirilmiştir [31]. EPS üreten LAB suşları yoğurt, peynir, tereyağ, kefir ve geleneksel fermente süt ürünlerinin üretiminde starter kültür suşları olarak kullanılmaktadırlar [109]. Starter kültürlerin EPS oluşturma yetenekleri, üretimde kullanıldıkları fermente süt ürünlerinin yapısal, aromatik ve reholojik özellikleri üzerinde belirgin bir şekilde etki etmektedir [110].

Propiyonibakteriler tarafından üretilen EPS'lerin propiyonik asit bakterisi içeren fermente üründe reholojik özellikleri olumlu yönde modifiye ettiği bildirilmiştir [23]. Propioynibakterilerin EPS üretimine ait yayınlanmış çalışmalar [31, 103, 111] sınırlı olmakla birlikte, EPS'nin bu bakterilerdeki işlevi tam olarak bilinmemektedir. Gorret ve ark., (2001) yaptıkları çalışmada *P. acidipropionici* türünün süt mikrofiltratında EPS ve asit üretimi ile gelişmesi üzerine sıcaklığın, pH'nın ve yeast ekstratın etkisini araştırarak, üç faktöründe gelişme, asit ve EPS üretimini etkilediğini bildirmişlerdir [31]. Crow (1988) ise peyniraltı suyunda bulunan laktozun propiyonibakteriler tarafından karbon kaynağı olarak kullanarak polisakkarit, propiyonat ve asetat üretme yeteneklerini araştırmıştır [111]. Propiyonik asit ve laktik asit bakterileri

tarafından eksopolisakkarit üretildiği bildirilmiş ancak EPS üretiminin stabil olmadığı tespit edilmiştir [103].

## **2.9. Mide-Bağırsak Sistemi Koşulları ve Bu Koşulların Propiyonik Asit Bakteriler Üzerindeki Etkisi**

Midenin düşük pH'sı ve pepsinin antimikrobiyal etkisi bakterilerin bağırsak sistemine girişinde etkili bir bariyer oluşturur. Mide pH'sı 1,5 kadar düşük olmakla birlikte, tüketilen gıdaya göre pH 6 ve üzeri olabilir. Midenin pH'sı genellikle 5,5 ile 3,5 arasındadır. Midedeki gıdanın içeriği mideden geçiş sırasında midenin pH'sını etkiler. Normalde gıdalar midede 2 ile 4 saat arasında kalır. Ancak sıvı gıdalar, katılara göre mideden daha hızlı geçer ve mide boş ise midede yalnızca 20 dk kalır. Probiyotik kültürlerin asit toleransının belirlenmesinde kesinleşmiş bir kural bulunmamaktadır. Klasik propiyonibakterilerin, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* kültürlerin in vitro asit toleransının belirlenmesinde 1 ile 5 arasındaki pH değerleri ile çalışılmıştır [112].

Probiyotik bakterilerin karşısındaki bir diğer engelde, ince bağırsak sisteminde hayatta kalabilmeleridir. İnce bağırsak sistemindeki probiyotik bakteriler için uygun olmayan koşullar, safra tuzları ve pankreatin içermesidir. Gıdaların ince bağırsaktan geçiş süresi 1 ile 4 saat arasındadır. İnce bağırsak sisteminin pH'sı ise yaklaşık olarak 8'dir. Laktik asit bakterilerinin safra tuzlarına direnci, farklı konsantrasyonlardaki bu maddenin seçici besiyerinde, bakterilerin canlı kalabilmesi ile belirlenmektedir. %0,15 ile 0,3 arasındaki safra tuzu konsantrasyonu insanların kullanımına uygun probiyotiklerin seçiminde önerilmektedir [112].

Peynir yapımı sırasında peynirde bulunan mikroorganizmalar sert fiziksel strese, yüksek tuz ve sıcaklık gibi kimyasal streslere maruz kalmaktadırlar. Bu olumsuz koşulların yanı sıra probiyotik olarak insanda yararlı etkiler oluşturabilmesi için mide ve bağırsak sisteminde bulunan olumsuz koşullarda canlı kalması gerekmektedir. Mide-bağırsak sisteminden geçiş sırasında canlı kalabilmek probiyotik mikroorganizmaların seçiminde önemli bir kriterdir. Bazı propiyonibakterilerin

maruz bırakıldıkları düşük pH değerinde canlı kalabildikleri belirlenmiştir. Propiyonibakterilerin düşük pH değerlerindeki inkübasyonu, canlılığı ve enzim aktivitesini değişik ölçülerde etkileyebilmesine rağmen, bu etki matriks olarak süt ya da peynir kullanılmasında azalabilmektedir. Çünkü gıda matrikslerinde propiyonibakteriler daha fazla canlı kalabilmektedirler. Aynı zamanda propiyonibakterilerin safra tuzlarına dirençli oldukları bildirilmiştir. Safraya maruz bırakılma  $\beta$ -galaktosidaz üretimini artırarak teşvik etmektedir. Bu etki ile laktoz sindirimine katkı sağlayabildikleri bildirilmiştir [23].

Safraya tolerans, probiyotik mikroorganizmaya, incebağırsaktan geçerek kalın bağırsakta epitele ulaşma fırsatı tanıdığından probiyotik açıdan önemli bir özellik olduğu bildirilmiştir [113]. Rehberger ve Glatz (1998) klasik propiyonibakterilerden *P. jensenii* ve *P. thoenii* türlerinin düşük pH değerlerinde *P. acidopropionici* türüne göre daha fazla canlı kaldıklarını göstermişlerdir [88]. Aynı araştırmacılar yüksek asit üretimi ile düşük pH değerlerinde yaşama arasında bir ilişki olmadığını göstermişlerdir. Propiyonibakterilerin asit ve safraya karşı gösterdikleri dirençliliklerin nedeni tam anlamıyla açıklanmamıştır. Jan ve ark., (2002), Propiofidus S141 probiyotik ürününde bulunan *P. freudenreichii* türü ile yaptıkları asit ve safra stresi çalışmalarında, bu koşullara adaptasyon sırasında hücredeki normal protein sentezinin yavaşladığını ve bazı özel proteinlerin daha fazla ifade edildiğini iki boyutlu jel elektroforezi ile göstermişler ve bu tür için asit ve safra stresine adaptasyonun proteomik yapıya bağlı olabileceğini bildirmişlerdir [42].

## 2.10. Agregasyon ve Hidrofobisite

Agregasyonun, kelime anlamı, toplanma, bir araya gelme, kümeleşmedir [114]. Laktik asit bakterilerinin bu özellikleri nedeniyle bulunduğu yüzeye ve birbirlerine yapışarak biyolojik bir bariyer oluşturduğu bilinmektedir. Bakterilerin agregasyon özelliğine sahip olması bulunduğu hücelere tutunma ve dominant olarak kolonize olmasını sağlayacağından özellikle probiyotik açıdan önemli bir kriterdir [115]. Agregasyon, otoagregasyon ve koagregasyon olmak üzere iki şekilde gerçekleşir. Otagregasyon, aynı türe ait mikroorganizmaların birbirlerine tutunarak oluşturdukları

hücre kolonileri şeklinde tanımlanmaktadır. Koagregasyon, farklı türe ait iki mikroorganizmanın birbirine tutunması şeklinde tanımlanabilir. Koagregasyonun, patojenlerin doku reseptörlerine girişini engelleyen ve laktik asit bakterilerinin bulunmasında patojenlerin epitel hücrelere tutunmasını önlemede alternatif bir yol olduğu önerilmektedir. Probiyotik türler otoagregasyon yetenekleri ile bağırsak epitel hücrelerine tutunur ve koagregasyon yetenekleri ile patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu önleyen bir bariyer teşkil ederler [50, 116, 117].

Epitel yüzeye tutunmada agregasyon ile birlikte hidrofobisitenin de gerekli olduğu, ancak agregasyon ile hidrofobisite arasında doğrudan bir ilişki olmadığı belirtilmiştir. Adezyon (tutunma) olayında konak hücre yüzeyinin hidrofob oluşu, yüzey yükleri ile bağlantılıdır. Bakteri ve konak hücre yüzeyleri negatif (-) yüke sahip oldukları için bu itici güç özel etkileşimlerle aşılır [118].

Laktobasillerde gözlenen her iki tip agregasyondan otoagregasyonun epitele kolonize olmada, bağırsak patojenlerin uzaklaştırılmasında önemli olduğu tespit edilmiştir [119, 120]. Laktik asit bakterileri bu özellikleri ile buldukları epitel üzerinde biyolojik bir bariyer oluştururlar. Böylece patojenlerin epitele yerleşmesi ve burada üremesi engellenmiş olur. Bu yönü ile otoagregasyon probiyotik açıdan mikroorganizmalarda aranan bir özelliktir. Reid ve ark., (1988) *Lactobasillus* türlerinin üropatojenler ile koagregasyonunu göstermiş ve bu fenomenin sağlıklı ürogenital floranın devamlılığı ve tespitinde önemli olduğunu önermişlerdir [117]. Drago ve ark., (1997) da bağırsaktan izole ettikleri *Lactobasillus* türlerinin üropatojenik *E. coli* ATCC 25922 ve bağırsak patojeni *E. coli* ATCC 35401 türlerinin ikisi ile de farklı derecelerde koagregasyon bulmuşlardır. Bu çalışmalara göre bu fenomen şu şekilde açıklanmıştır; laktobasiller ile patojenler geniş bir etkileşim alanı geliştirdikleri ve laktobasillerin ürettiği metabolitlerin bu alana dağıldığı (mikroçevrelerin inhibe edilmesi) şeklinde açıklanmıştır. Ayrıca bakterilerin hücre yüzeyleri arasındaki bu etkileşim hücre içi metabolitlerin transfer edilmesini sağlayan iki bakteri sitoplazması arasında sürekli bir bölgeyi oluşturabilmektedir. Aynı zaman da böyle bir mekanizma ile gastrointestinal sisteminde düzenlenebileceği düşünülmüştür [121]. Probiyotiklerin

mukuzoya tutunarak kogregasyon yetenekleri ile patojenlere bariyer teşkil ettikleri bildirilmiştir [122]. *Bifidobacterium bifidum* ve *B. suis* ile yapılan çalışmada epitele tutunma ve otoagregasyon arasında ilişki olduğu, bazı laktobasillerde ise hidrofobisite ve tutunma arasında korelasyon olduğu tespit edilmiştir [113, 123].

Bakterilerin farklı maddelere tutunmasında öncelikle hücre yüzeyinin fizikokimyasal özellikleri, hücre tutunması ile pozitif ilişkisi olan hidrofobisite, otoagregasyon, hemaglutinasyon gibi kesin karakterlerle belirlenmektedir. Streptokoklar, laktobasiller ve bifidobakterilerin hücre tutunması ile hücre yüzey hidrofobisitesi arasında pozitif bir ilişki gözlenmiştir. *Bifidobacterium* türlerinde enterosit benzeri hücrelere tutunmanın en iyi göstergesinin bakteriye ait otoagregasyon ve hemaglutinasyon yeteneklerinin olduğu bildirilmiştir [124]. Del Re ve ark. (1998), insan bifidobakterilerinin otoagregasyonun tutunma ile ilişkisinin güçlü olduğunu ve hücre yüzey hidrofobisitesi ile otoagregasyonun bifidobakterilerin tutunma potansiyellerini belirlemede kullanılabileceğini göstermişlerdir [123]. Zárate ve ark. (2002) klasik propiyonibakterilerin otoagregasyon, hidrofobisite, hemaglutinasyon hücre yüzey özellikleri ve epitel yüzeye tutunmalarını gösteren çalışma yapmışlar. Bu araştırmacılar; hidrofobisite, otoagregasyon, hemaglutinasyon ile tutunma yeteneği arasında hiçbir ilişki bulunmadığını ve tüm fenotiplerin iyi derecede tutunma göstermesi, tutunma işleminde kompleks bir mekanizmanın etkili olduğunu bildirmişlerdir [73]. Bifidobakteriler ve laktobasillerle kıyaslandığı zaman propiyonibakterilerin agregasyon ve hidrofobisite üzerine yapılan çalışmalar sınırlı kalmıştır. Ayrıca propiyonibakterilerin koagregasyonunu gösteren ve EPS üretimi ile otoagregasyon, koagregasyon ve hidrofobisite arasındaki ilişkiyi ortaya koyan herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyaller

##### 3.1.1. Peynir örnekleri

Ülkemizin çeşitli yörelerinden [Afyon Dinar Yöresi Köy Peyniri, Balıkesir Mihaliç Peyniri, Balıkesir Sepet Peyniri, Balıkesir Manyas Dil Peyniri, Çanakkale Ezine Koyun Peyniri, Erzurum Sünme Peyniri, İzmir Tulum Peyniri, Kars Gravyeri, Kars Kaşarı, Kayseri Tomarza Yöresi Köy Peyniri, Mihaliç Kelle Peyniri ve Van Otlu Peyniri] delikli yapıdaki 12 çeşit geleneksel yöntemlerle üretilmiş 50 adet peynir örneği propiyonibakterilerin izolasyonunda kullanılmıştır.

##### 3.1.2. Besiyerleri

Geleneksel peynirlerden propiyonibakterilerin izolasyon ve genel sayımlarını belirlemek amacıyla Yeast Ekstrat Sodyum Laktat (YEL) besi ortamına naladiksik asit ilave edilmesi ile hazırlanan YELN (Yeast Ekstrat Sodyum Laktat Naladiksik Asit) katı besiyeri kullanılmıştır [13].

Çizelge 3.1. YELN katı ve sıvı besiyeri

Maddeler	g/l
Yeast Ekstrakt	5,0
Sodyum Laktat	20 ml
Pepton (Pankreatik Enzimlerle Parçalanmış)	2,0
Dipotasyum hidrojen fosfat ( $K_2HPO_4$ )	10,0
Hemin	10,0 ml
Tween 80	1,0 ml
Agar	15



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. Besiyerinin pH'ı 0,01 N HCl ve/veya 0,01 N NaOH ile  $7,2 \pm 0,2$ 'ye ayarlanarak, 121 °C'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir. Sterilize edilmiş YEL katı besiyerine 0,45 µm por çaplı filtre ile %0,02 oranında naladiksik asit (Sigma) antibiyotiğinin ilave edilmesi ile hazırlanmıştır.

Propiyonibakterilerin aktivasyon, metabolizma ve metabolit üretiminde YEL besiyeri kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. YEL katı ve sıvı besiyeri

<b>Maddeler</b>	<b>g/l</b>
Yeast Ekstrakt	10,0
Sodyum Laktat	10,0 ml
Pepton (Pankreatik Enzimlerle Parçalanmış)	10,0
Potasyum dihidrojen fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,25
Manganez sülfat (MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O)	0,005

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 N HCl ve/veya 0,01 N NaOH ile pH  $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlanarak, 121 °C'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir. [125].

Peynirlerde bulunan propiyonibakteriler dışındaki diğer starter bakterilerin sayısını belirlemek için ise Man Rogosa ve Sharp (MRS) sıvı besiyeri içeriğinde kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. MRS besiyeri

<b>Maddeler</b>	<b>g/l</b>
Pepton	10,0
Beef Ekstrakt	10,0
Yeast Ekstrakt	5,0
Dekstroz	20,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0
Na-Asetat. 3H <sub>2</sub> O	5,0
Tri Amonyum Sitrat	2,0
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,2
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	0,05
Tween 80	1 ml

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 N HCl ve/veya 0,01 N NaOH ile pH 7,0 ± 0,2'ye ayarlanarak, 121 °C'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir. [126].

Araştırmada peynirlerde bulunan toplam bakteri sayısını belirlemek için de Plate Count Agar (PCA) besi ortamı kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. Plate Count Agar

<b>Maddeler</b>	<b>g/l</b>
Pepton (Kazeinden elde edilmiş)	5,0
Yeast Ekstrakt	2,5
D(+)-Glukoz	1,0

Besi ortamının pH'sı 0,01 N HCl ve/veya 0,01 N NaOH'le 7,0 ± 0,2'ye ayarlanmıştır. Deneyin amacına göre besiyerine %1,5 oranında agar ilave edilerek katı besiyeri hazırlanmıştır. Besiortamı 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir [127].

Araştırmada kullanılan test bakterilerinin geliştirilmesi için Nutrient sıvı besiyerinden faydalanılmıştır.

Çizelge 3.5. Nutrient sıvı besiyeri

Maddeler	g/l
Beef Ekstrakt	1,0
Yeast Ekstrakt	2,0
Pepton	5,0
Sodyum Klorit	5,0

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 N HCl ve/veya 0,01 N NaOH ile pH  $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlanarak, 121 °C'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir. [127].

Araştırmada dilüsyon için kullanılan serum fizyolojik çözeltisi, 0,875 g sodyum kloritin tartılarak 100 ml'ye distile su ile tamamlanmasıyla hazırlanmıştır. Dilüsyon çözeltisi 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

### 3.1.3. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları

Propiyonibakterilerin geliştirilmesi ve aktifleştirilmesinde YEL sıvı besiyeri kullanılmıştır. Ayrıca tüm deneysel çalışmalar karbondioksitli inkübatörde (SANYO, MCO-18AIC)  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 48-96 saat, ortama % 5 CO<sub>2</sub> salınımı ile oluşan anaerobik koşullarda geliştirilmiş ve tüm çalışmalarda iki kez aktifleştirilmiş kültürler kullanılmıştır. Propiyonibakterilerin YEL katı besiyerinde geliştirilen kültürleri ise pigment oluşumu için anaerobik jar içerisinde  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 7-10 gün, ortama %10 CO<sub>2</sub> salınımını sağlayan anaerobik kit kullanılarak (Oxoid, Anaerobik gas generating kit) geliştirilmiştir [13, 128, 129].

### 3.1.4. Test bakterileri

*Escherichia coli* ATCC 11229, *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Bacillus cereus* RSKK 863, *Shigella sonnei* Mu:57, *Micrococcus luteus* NRLL B-4375 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 test bakterisi olarak kullanılmıştır.

Test bakterileri nutrient sıvı besiortamında 24 saat inkübe edilerek 37 °C’de aktifleştirilmiştir. Test bakterilerin temin edildikleri kaynaklar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.6. Test bakterilerinin temin edildiği kaynak

Bakteri Suşları	Temin Edildiği Kaynak
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	R.S.K.K.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	R.S.K.K
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	H.Ü.
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	A.Ü.G.M
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	A.Ü.G.M
<i>Micrococcus luteus</i> NRLL-B 4375	R.S.K.K.
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	A.Ü.G.M
<i>Bacillus cereus</i> RSKK 863	R.S.K.K
<i>Shigella sonnei</i> Mu:57	M.U
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	R.S.K.K

R.S.K.K. : Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Kültür Koleksiyonu

H.Ü. : Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı

E.Ü. : Ege Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı

O.D.T.Ü. : Ortadoğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü

A.Ü.G.M : Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

M.U : Muğla Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Doç. Dr. Aysel UĞUR’dan temin edilmiştir.

Araştırmada katalaz testi için test olarak *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 (American Type Culture Collection, USA) suşu kullanılmıştır. İzole edilen suşların tanımlanmasında ve diğer tüm çalışmalarda standart DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) kültür koleksiyonundan temin

edilen *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* DSMZ 20270, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSMZ 20271 (tip tür ATCC 6207), *P. acidopropionici* DSMZ 20272 (tip tür ATCC 4875), *P. thoenii* DSMZ 20276 (ATCC 4874), *P. jensenii* DSMZ 20535 (tip tür ATCC 4868) referans suşları kullanılmıştır.

## **3.2. Metotlar**

### **3.2.1. Propiyonibakterilerin izolasyonu**

Peynir örneklerinden 25 g tartılarak 225 ml steril serum fizyolojik (%0,875) de homojenize edilerek  $10^{-4}$ 'e kadar seyreltilimler hazırlanmıştır. Her bir seyreltiden propiyonibakteriler için seçici olan YELN katı besiyeri içeren plaklara 3 paralelli ekimleri yapılarak, %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda anaerobik jar da 30°C'de 7-10 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sonra YELN besi ortamının üzerindeki kırmızı, krem, sarı, turuncu ve kahve renkli koloniler seçilerek Gram boyamaları gerçekleştirilmiştir. Seçilen kolonilerden YEL sıvı ve katı besi ortamı içeren tüplere ve plaklara ekimleri gerçekleştirilmiştir. Sıvı ortamdaki kültürler 48-96 saat %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda anaerobik inkübatörde (SANYO, MCO-18AIC) 30°C'de, plakta bulunan kültürler ise pigment oluşumu için anaerobik jarda 10 gün %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kültürlerin morfolojileri mikroskopta incelenerek Gr (+) ve X, V, Y şeklinde morfolojiye sahip olanlar propiyonibakteriler olarak değerlendirilmiştir. YEL sıvı besi ortamında aktifleştirilen izolatların tanımlamalarının yapılmasında ve çalışmalarda kullanılmak üzere stokları hazırlanmıştır. Çalışmaların tümü üçer paralelli olarak yapılmıştır [12, 13, 129, 130].

### **3.2.2. Bakterilerin muhafazası**

İzole edilen suşlar, YEL sıvı besiyerinde ard arda iki kez aktifleştirilmiştir. 0,3 ml gliserol kapaklı cryo tüplerine ilave edilerek, 121 °C'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir. Aktifleştirilen kültürlerden 0,6 ml alınarak steril gliserol içeren ortama ilave edilip, -80 °C'de muhafazaya alınmış ve stoklar altı ayda bir yenilenmiştir [10].

### 3.2.3. Peynirlerde propiyonibakterilerin sayısı

Peynirlerin dilüsyon ekimleri sonucu propiyonibakteriler için seçici besiyeri olan YELN katı besiyeri üzerinde gelişen kırmızı, krem, sarı, turuncu ve kahve renkli koloniler belirlenerek sayımları yapılmış, bakteri sayıları kob/g (koloni oluşturan birim) (cfu/g) olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, peynirlerdeki toplam bakteri ve diğer starter bakteri sayımları için aynı dilüsyonlardan Plate Count Agar (PCA) ve De Man Rogosa Sharpe (MRS) katı besiyerlerine ekimler yapılarak geleneksel peynirlerimizde bulunan propiyonibakterilerin % dağılımları tespit edilmiştir [13, 129, 131].

$Kob/g \text{ (cfu/g)} = [Koloni \text{ sayısı} \times Seyreltme \text{ faktörü} / Dilüsyon \text{ tüpünden petri kabına aktarılan örnek hacimi (ml)}]$ .

$Seyreltme \text{ faktörü} = [1 / Seyreltme \text{ oranı}]$  (3.1)

### 3.2.4. Propiyonibakterilerin klasik tanımlanması

Peynirlerden izole edilen suşların tanımlanması amacıyla çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal testlerden yararlanılmıştır. Bakterilerin morfolojileri, pigment oluşturmaları, hareket durumları ve gram reaksiyonları incelenmiştir. Bunlara ilave olarak bakterilerin sıvı besiyerindeki üreme durumu, katı besiyerindeki koloni morfolojileri ve yapıları da belirlenmiştir. İzolatların oksidaz, katalaz reaksiyonu, eskülin, arjinin, sitrat ve jelatin hidroliz reaksiyonları, %20 mg safra içeren ortamda gelişme, lizinin dekarboksilasyonu, indol, asetoin, hidrojen sülfür ve nitrat indirgeme testleri yapılmıştır. Ayrıca izolatların glukozdan gaz oluşturma durumları ile 24 adet farklı karbohidratları (amigdalın, arabinoz, sellobiyoz, eskülin, fruktoz, galaktoz, glukoz, gliserol, inulin, laktoz, maltoz, mannitol, meleziyoz, melibiyoz, rafinoz, ramnoz, D-riboz, salisin, sorbitol, sorboz, sükroz, trehaloz, ksiloz, nişasta) ferment etme özellikleri incelenmiştir [12, 13, 25].

### Karbohidrat testleri

İzolatların monosakkaritlerden (polihidroksilik aldehitler ve ketonlar) D-riboz, ksiloz, ramnoz, arabinoz, fruktoz, galaktoz, glukoz ve sorboz, disakkaritlerden sukroz, laktoz, maltoz, sellobiyoz, trehaloz, melibiyoz; trisakkaritlerden melizitoz ve rafinoz; polisakkaritlerden inulin ve nişasta; polihidrikalkollerden mannitol, gliserol ve sorbitol; glukozitlerden amigdalin, eskülin, salisin şekerlerini içeren besiortamlarındaki kullanımları test edilmiştir.

Şeker testleri için YEL sıvı besiortamından sodyum laktat, hemin ve tween 80 çıkarılmıştır [88]. 1000 ml'lik besiortamına %0,02 g brom krosol purple ilave edilmiştir. Besiortamı 2'şer ml olarak tüplere dağıtılmış, 0,5 atm basınçta 15 dk sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra tüplere şekerlerin %10'luk ana stoğundan %1 oranında ilave edilmiştir. Aktif kültürler 15 000 x g'de 10 dk santrifüj edilmiş, elde edilen pelet %0,875'lik serum fizyolojik çözeltisi ile 2 defa yıkanarak resüspanse edilmiştir. Aktif kültürler %1 oranında besiortamlarına inoküle edilerek, 30°C'de 7 gün %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası bakterilerin besiortamlarındaki üreme durumları besiortamının renk değişimine göre değerlendirilmiştir [13, 25].

Değişken karakterli olan propiyonibakterilerin biyokimyasal testlerde de farklı sonuç vermelerinden dolayı testler en az üç kez tekrarlanarak elde edilen sonuçların çoğunluğuna göre değerlendirilmiştir. İzole edilen suşların tanımlanmasında standart DSMZ kültür koleksiyonundan temin edilen *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* DSMZ 20270, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSMZ 20271 (tip tür ATCC 6207), *P. acidopropionici* DSMZ 20272 (tip tür ATCC 4875), *P. thoenii* DSMZ 20276 (ATCC 4874), *P. jensenii* DSMZ 20535 (tip tür ATCC 4868) referans suşları kullanılmıştır. İzolatların tanımlama sonuçları referans bakterilerinin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca yapılan testlerin doğruluğunu test etmek amacıyla SNEATH'ın benzerlik formülünden yararlanılmıştır (Eş. 3.2). Tanımlama testlerinde hata olasılığını belirleyebilmek amacıyla rastgele 5 suş

seçilmiş farklı bir isimle kodlanarak dublike suş olarak adlandırılmış ve tüm testler dublike suşlarada uygulanmıştır [25].

$$\text{Benzerlik indeksi (\%S)} = \left[ \frac{N_{sp}}{N_{sp} + N_d} \right] \times 100 \quad (3.2)$$

$N_{sp}$ : Her iki suşta benzer olan karakterler.

$N_d$ : Birinde pozitif, diğerinde negatif olan karakterler [132].

### Pigmentasyon

Propiyonibakterilerin aktif kültürlerinden YEL katı besiyeri üzerinde çizgi ekimleri yapılarak, pigment oluşumu için 30°C'de 10 gün %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bakterilerin kırmızı, krem, turuncu ve kahverengi pigment oluşturmaları değerlendirilmiştir [25].

### Besiyerinde hareket testi

Yarı katı MRS besiyeri içeren tüplere iğne uçlu öze ile aktif kültürlerden ekimler yapılarak, 30°C'de %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 10 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bakterilerin gelişmeleri tüm besiyeri boyunca ve ekim hattının etrafında çatlaklar oluşturduğunda hareket pozitif, sadece ekim hattı boyunca üreme olduğunda ise hareket negatif olarak değerlendirilmiştir [133].

### Oksidaz testi

Propiyonibakterilerin YEL katı besi ortamında çizgi ekimleri yapılarak, 30°C'de %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 10 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde ortamdan bir koloni alınmış, oksidaz (BioMérieux) test solüsyonundan 1 damla damlatılarak nemlendirilen Whatman no: 42 filtre kâğıdı üzerine konulmuştur. Koloninin filtre kâğıdı üzerinde öze ile homojen bir şekilde yayılımı sağlanmıştır. Whatman kâğıdı üzerinde mavi-mor renk oluşumu pozitif, rengin oluşmaması ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve



negatif kontrol olarak da *Escherichia coli* ATCC 35218 bakterileri kullanılmıştır [134].

#### Katalaz testi

Katalaz enzimi ortamdaki hidrojen peroksiti su ve oksijene ayırır. Bu amaçla izolatlar YEL katı besiyerinde çizgi ekim ile geliştirilmiştir. İnkübasyon bitiminden sonra üreyen kolonilerden bir koloni lam üzerine alınarak üzerine katalaz (ID-ASE) (BioMérieux) test solüsyonundan 1 damla damlatılmıştır. Sıvı ve koloni öze ile homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Test sonuçları örneklerde gaz oluşumuna göre değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak olarak *Lactobacillus delbruckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 suşu kullanılmıştır [134].

#### Eskülin hidrolizi

Eskülin hidrolizi testinde aşağıdaki besiortamından yararlanılmıştır.

Peptonlu su; 10 g pepton ve 5 g NaCl olacak şekilde tartılarak 1000 ml'de çözülerek hazırlanmıştır.

Eskülin besiyeri; 1 g eskülin ve 0,5 g ferik sitrat olacak şekilde tartılarak 1000 ml peptonlu suda çözülerek hazırlanmıştır. Besiortamı 121 °C'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir. Aktif propiyonibakteriler %1 oranında ortama inoküle edilerek, 30°C'de %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 7 gün inkübe edilmiştir. Eskülinin hidrolizi ile sıvı ortamdaki siyahlaşma durumu kontrol edilmiştir [134].

### Arjinin hidrolizi

Çizelge 3.7. Arjinin hidrolizi besiyeri

<b>Maddeler</b>	<b>g/l</b>
Pepton	1,0
NaCl	5,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3
Fenol Red	0,01
Arjinin	10
Agar	0,06

Olacak şekilde tartılıp bir miktar distile su da eritilip 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Besi ortamı tüplere 2'şer ml olarak dağıtılmış 121 °C'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir. İki kez aktifleştirilen kültürlerden besiyerine ekim yapılmıştır. Kültür 30°C'de %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 7 gün inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda besiyerindeki renk değişimi değerlendirilmiştir [135].

### Sitrat testi

Tüplerdeki steril yatık Simmons Sitrat Agar besiyerine (4–5 ml, pH 6,9 ve yeşil renkte) propiyonibakterilerin aktif kültürlerinden yüzeysel ekimler yapılmıştır. Kültürler 30°C'de %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda besiyeri renginin koyu maviye dönüşü pozitif, yeşil renkte kalması ise negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Sitrat testinde pozitif kültür olarak *Enterobacter aerogenes* ve negatif bakteri olarak da *E. coli* ATCC 35218 kullanılmıştır [136].

### Jelatin hidrolizi

Jelatin hidrolizini saptamak için % 10 jelatin (pH: 7,2) YEL sıvı besiyerine ilave edilmiş, otoklavda 115 °C'de 20 dk sterilize edilerek hazırlanmıştır. Sterilizasyon sonunda dik konumda dondurulan besiyerine propiyonibakterilerin aktif

kültürlerinden inokülasyon yapılmış, 30°C'de %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 15 gün inkübe edilmiştir. Ekim yapılmayan besiyeri kontrol olarak kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler buzdolabı sıcaklığında 1–2 saat bekletilmiştir. Buzdolabından alındıktan sonra sıvı durumundaki örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir [135].

#### %20 mg Safra içeren ortamda gelişme

Ana stok: 50 mg safra (Sigma) 100 ml distile suda çözülerek 0,45 µm'lik filtre ile sterilize edilmiştir.

Tüplerde 1,2 ml YEL içeren besiyeri sterilize edilerek, üzerine %50'lik safra ana stoğundan 800 µl ilave edilmiştir. Bu şekilde %20 mg safra içeren 2 ml'lik YEL sıvı besiyerleri hazırlanmıştır. Propiyonibakterilerin aktif kültürlerinden %1 oranında safralı ve kontrol (safra içermeyen) besiyerlerine inoküle edilmiş, 30°C'de %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kontrol ile karşılaştırılarak safraya dirençli bakteriler pozitif (+), olmayanlar ise negatif (-) olarak değerlendirilmiştir [137].

#### Lizin dekarboksilaz testi

Oxoid marka tablet şeklindeki lizin dekarboksilaz besiyeri kullanılmıştır. Tabletler 5 ml saf su içinde çözülerek, 121°C'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir. Propiyonibakterilerin aktif kültürlerinden %1 oranında besiyerine inoküle edilerek, 30°C'de %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda besiyeri renginin mordan sarıya dönüşümü pozitif olarak değerlendirilmiştir [134].

#### İndol testi

İndol besiyeri (g/l); Tripton 10 g, Sodyum klorür 5 g, DL-triptofan 1 g, 1000 ml'ye distile suya tamamlanarak, pH'sı 6,9±0,2'ye ayarlanmıştır. Besiyeri tüplere 5 ml dağıtılarak, 121 °C'de 15 dk sterilize edilmiştir. Propiyonibakterilerin aktif kültürlerinden %1 oranında besiyerine inoküle edilerek, 30 °C'de %10 CO<sub>2</sub>'li

ortamda 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerin üzerine kovacs ayracından 0,5 ml ilave edilerek, iyice karıştırılmıştır. Tüplerin üst kısmında bir iki dk sürede kırmızı bir halkanın oluşması pozitif (indol oluşumu), sarımsı halka ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada indol pozitif bakteri kontrolü olarak *E. coli* ATCC 35218 kullanılmıştır [127].

#### Asetoin testi (Voges - Proskauer (VP) testi)

*O'mera reaktifi*: 40 g potasyum hidroksit (KOH) 100 ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

*Barrit ( $\alpha$ -naftol) reaktifi*: 0,5 g  $\alpha$ -naftol 10 ml etanolde çözülerek hazırlanmıştır.

MR-VP sıvı besiyeri (Metil Red-Voges Proskauer) hazırlanarak, tüplere 5 ml olacak şekilde dağıtılmış ve 121 °C'de 15 dk sterilize edilmiştir. Propiyonibakterilerin aktif kültürlerinden %1 oranında MR-VP besiyerine inoküle edilmiş, 30 °C'de %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda MR-VP besiyerinden 1 ml alınarak küçük test tüplerine aktarılmıştır. Üzerine 0,6 ml Barrit ( $\alpha$ -naftol) reaktifi ilave edilerek karıştırıldıktan sonra üzerine 0,2 ml %40 KOH çözeltisinden ilave edilmiştir. Tüpler dört saat bekletildikten sonra vişneçürüğü rengin oluşumu pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir. VP testinde negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 35218, pozitif kontrol olarak da *E. aerogenes* bakterileri kullanılmıştır [127].

#### Hidrojen sülfür testi

Bu test, mikroorganizmaların, sülfür içeren bazı aminoasitleri (sistin, sistein, metionin, glutation) veya bileşikler (sülfatları) ayrıştırarak hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S) oluşturmalarını belirlemek için yapılmaktadır.

Bu amaçla Merck'ten ticari olarak temin edilen Triple Sugar Iron Agar besiyeri (TSI) kullanılmıştır. Propiyonibakterilerin aktif kültürlerinden yatık TSI agar besiyerine yüzeysel ekim yapılarak, 30°C'de %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 7 gün inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda bakterinin oluşturduğu H<sub>2</sub>S, besiyerinin bileşimindeki demir ile birleşerek siyah renkli demir sülfüre dönüşür. Buna göre besiyeri renginin siyaha dönüşmesi H<sub>2</sub>S oluştuğunu gösterir. H<sub>2</sub>S testinde pozitif kontrol olarak *Salmonella* spp., ve negatif kontrol ise *E. coli* ATCC 35218 bakterileri kullanılmıştır [127].

### Nitrat testi

Bazı bakteriler nitratları (NO<sub>3</sub>) redükte ederek nitritlere (NO<sub>2</sub>) (nitrifikasyon) ve hatta daha ileri basamaklara [amonyak (NH<sub>3</sub>) ve nitrojen gazı (N<sub>2</sub>) bileşimlerine] kadar ayırıştırabilirler (denitrifikasyon). Bu olay bakterilerde genellikle anaerobik koşullarda ve redüktaz enzimlerinin katalitik etkisiyle gerçekleşir.

*Griess-Illosvay ayıracı: A+B*

*A ayıracı:* 0,5 g alfa naftilamin 100 ml %30 asetik asit içinde çözülerek hazırlanmıştır.

*B ayıracı:* 0,8 g sülfanilik asit 100 ml %30 asetik asit içinde çözülerek hazırlanmıştır.

İçinde Durham tüpleri bulunan ve % 0,1 oranında potasyum nitrat (KNO<sub>3</sub>) içeren YEL sıvı besiyeri (pH 7,0; 5 ml) hazırlanmıştır. Propiyonibakterilerin aktif kültürlerinden %1 oranında nitratlı sıvı besiyerine inoküle edilmiş, 30 °C'de %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda Durham tüpleri içinde gazın oluşumuna dikkat edilmiştir. Tüplere Griess-Illosvay ayıraçlarından (A+B) 5'er damla ilave edilmiştir.

*Değerlendirme:*

1) Tüplerde gaz oluşumu (N<sub>2</sub>) denitrifikasyonu göstermekte, pozitif olarak kabul edilmektedir. Bu tüplere Griess-Illosvay ayıracının A ve B solüsyonlarından 5'er damla aktarıldıktan sonra hafifçe çalkalanmıştır. Bir iki dakika içinde kırmızı rengin

meydana gelmesi ile nitratların nitritlere kadar redükte olduğunu göstermektedir (pozitif reaksiyon).

2) Tüplerde gaz gözlenmediği durumlarda da ayıraç damlatılmıştır. Bir iki dakika içinde kırmızı rengin meydana gelmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3) Herhangi bir reaksiyonun oluşmadığı durumlarda (sonuç negatif) ise ya nitratlar hiç ayrışmamıştır veya nitratların ayrışması nitrit safhasından da daha ileri (amonyak veya nitrojen gazına) aşamalara kadar ayrıştığını göstermiştir. Bu durumda, ayıraç ilave edilen tüplere çinko tozu (15–20 mg) ilave edilmesinden sonra kırmızı rengin meydana gelmesi (nitrat nitrite redükte olduğunu) sonuç negatif olarak değerlendirilmiştir. Kırmızı renk oluşmaması durumunda ise, nitratların nitritten de daha ileri safhalara redükte olduğunu göstermektedir (pozitif reaksiyon) [138, 139].

#### Glukozdan gaz oluşumu

İçinde durham tüpü bulunan 10 ml'lik YEL sıvı besiyeri hazırlanmış, 121 °C'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir. Daha önceden aktifleştirilen kültürlerden %1 oranında besiyerine inoküle edilmiş, 30 °C'de %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda durham tüplerinde meydana gelen gazlar (H<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub>) gözlenmiştir [135].

#### **3.2.5. API (50 CHL, 20 E ve 20 A) kitlerinin tanımlamada uygulamaları**

API (Analitik Profil İndeks) sisteminin veritabanında Propiyonik asit bakterileri olmamasına rağmen, API kitlerinin bu bakterilerin karbonhidrat profillerinin çıkarılmasında etkili ve yeterli bir sistem olduğu bildirilmiştir. API testlerinden elde edilen sonuçlar referans kültürlerle karşılaştırılarak benzerlik oranları tespit edilmiştir. Bu çalışmada peynirlerden izole edilen propiyonibakterileri kültürlerinin biyokimyasal testlerinin yapılmasında minyatürize edilmiş (API 50 CHL, API 20E ve API 20 A, bioMERIEUX) biyokimyasal test kitleri kullanılmıştır. API 50 CHL

sistemi 49 adet, API 20 E sistemi 20 adet ve API 20 A ise 20 adet minyatürize edilmiş biyokimyasal test içeren mikrotüplerden oluşmaktadır [13, 25].

YEL sıvı besi ortamında 4 gün 30 °C de anaerobik koşullarda geliştirilen propiyonibakteriler 5000 rpm de 15 dk santrifüj edilerek, elde edilen peletleri steril serum fizyolojik çözeltilerde (%0,875) 2 defa yıkanmıştır. Peletler 2 ml süspansiyon içeren besiortamlarında çözülmüştür. Bu süspansiyonlardan diğer 5 ml'lik süspansiyon içeren ortamlara damlatılarak, 3 Mc Farland bulanıklığında homojen bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Damlatılan miktarın 2 katı kadarı da API 50 CHL besi ortamına ilave edilmiştir. Steril pipet kullanılarak aktif kültürler API test mikrotüplerine hava kalmayacak şekilde ekimleri gerçekleştirilmiştir. API 20E ve 20 A kitlerinde bulunan tüplere 3 Mac Farland bulanıklığına ayarlanan bakteri süspansiyonundan direk olarak aşılanmıştır. Ekimi yapılan tüpler üzerine mineral oil damlatılarak hava ile teması engellenmiştir. Mikrotüplerden oluşan striplerin kapakları kapatılmıştır. Suşlar 30 °C'de 7 gün anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde mikro tüplerdeki besi ortamında bulunan bromkresol purple mor renginin sarıya dönüşümü pozitif, renk dönüşümünün oluşmaması negatif ve az renk dönüşümünün de zayıf pozitif veya zayıf negatif olarak değerlendirilmiştir [13, 25].

### **3.2.6. Klasik ve API tanımlama sonuçlarının nümerik taksonomi programında değerlendirilmesi**

Klasik tanımlama yöntemi ve API test kitleri ile yapılan karbohidrat ve fizyolojik test sonuçları NTSYSpc, Numerical Taxonomy System, version 2.10q nümerik taksonomi programına uygulanmış ve elde edilen dendrogramlar değerlendirilmiştir. Nümerik taksonomi programının (NTSYSpc) Principal Coordinates Analysis (PCA) özelliği kullanılarak tanımlama testlerinden elde edilen sonuçların üç boyutlu grafikleri çizilmiştir.

### 3.2.7. Propiyonibakterilerin asit üretimleri

#### Nicel asit üretimi

Propiyonibakterilerin aktif suşlarından 10 ml'lik YEL, %10'luk skim milk ve YEL sıvı besi ortamının bileşiminde bulunan laktat çıkarılarak otoklavda steril edilmiş, sterilazasyon sonrası filtre (0,45 µm por çaplı) ile steril edilen glukoz ve laktozdan aynı oranda ilave edilmesiyle hazırlanan besiyortamlarına %2 oranında inoküle edilerek, 30 °C'de 8 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 10 ml'lik kültür mezürlere aktarılarak, distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Titrasyon için 250 ml'lik cam erlene aktarılan örnekler üzerine 2-3 damla fenolfitaleyn indikatörü damlatılarak, 0,1 N NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Bakterilerin ürettiği asit titre edilebilir yüzde asitlik olarak hesaplanmıştır [140].

$$\% \text{ Asitlik} = \text{Harcanan } 0,1 \text{ N NaOH (ml)} \times 0,9 / \text{örnek (ml)} \quad (3.3)$$

#### *Fenolfitaleyn*

0,1 gram fenolfitaleyn %60'lık etil alkolde çözülerek hazırlanmıştır.

#### *Skim Milk*

Skim milk (Oxoid) hazır besiyortamından %10 oranında hazırlanarak, otoklavda 121°C'de 5 dk steril edilerek kullanılmıştır.

#### Nitel asit tayini

İzole edilen Propiyonibakterileri suşlarının nitel asit üretimlerinin tespitinde YEL katı besiyerinde bulunan %1 oranındaki sodyum laktat çıkarılarak, ayrı ayrı %1 oranında laktoz ve %1 oranında glukoz ile bromkresolpurple indikatörü ilave edilerek besiyerleri hazırlanmıştır. Hazırlanan glukozlu, laktozlu ve sodyum laktatlı YEL katı ortamlarına suşların spot ekimler yapılarak, petriler anaerobik koşullarda



30 °C’de 8 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde ortamın pH değişimine bağlı olarak spot ekimlerin etrafında oluşan sarı renkli zonların çapları kumpas ile ölçülerek suşların asit üretimleri nitel olarak belirlenmiştir [88].

#### Propiyonibakterilerin HPLC analizi ile propiyonik, asetik ve laktik asit tayini

Yüzde titre edilebilir asit üretimleri yüksek olarak belirlenen DO1, DO3, DO4, DO6, SP2, SP9, BDP5, BDP7, AKP1 izolatları ile referans kültür olarak kullanılan *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* DSMZ 20270, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSMZ 20271, *P. acidopropionici* DSMZ 20272, *P. thoenii* DSMZ 20276, *P. jensenii* DSMZ 20535 kültürlerinin YEL sıvı besiyeri ve skim milk besi yerinde ürettikleri propiyonik asit, asetik asit ve laktik asit miktarları HPLC analizinde Lind ve ark. (2005)’e göre ODTÜ Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Ar-Ge Merkezinde yaptırılmıştır. Analizler Varian ProStar model HPLC’de yapılmıştır. MetaCarb 87H (300 x 7,8 mm) (VARIAN, Part No: A5210, Serial No: 05511338) tipinde kolon kullanılmıştır. Mobil faz, 0,008 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>’den oluşmuştur. 35 °C sıcaklıkta, 0,5 ml/dk’lık akım hızında ve 210 nm absorbansda okunmuştur. Örnekler PDA Dedektör (VARIAN ProStar, Model 330) tipinde detektör ve VARIAN ProStar 410 tipi otomatik örnekleyici kullanılarak analiz edilmiştir. Enjeksiyon hacmi 25 µl’dir. Analiz için gerekli olan asit standartların HPLC’ye belli miktarlarda saf konsantrasyon serileri verilerek, standart konsantrasyon doğruları elde edilmiştir. (Standartlar: 5 – 2,5 – 1 – 0,5 – 0,25 – 0,1 – 0,05 – 0,025 mg/ml’lik laktik, asetik, propiyonik asitler distile suda çözülerek hazırlanmıştır) [89].

#### **3.2.8. Propiyonibakterilerin antimikrobiyal aktiviteleri**

Propiyonibakterilerin gıda veya bağırsakta patojen olan bazı mikroorganizmalar üzerindeki inhibitörük etkisi Warminska-Radyko ve ark. 2002’ye göre belirlenmiştir [67]. *Propionibacterium* spp. suşlarının antimikrobiyal etkisini belirlemek için, %1 yeast extract ve %0,5 glukoz içeren %10’luk modifiye edilmiş skim milk besiyeri kullanılmıştır. Propiyonibakteri izolatlarının aktif kültürlerin OD değerleri 600 nm de 0,6±0,2’ye ayarlanarak modifiye skim milk besi ortamına %2 oranında ekilmiş ve

anaerobik koşullarda 30 °C'de 8 gün inkübe edilmiştir. Aktif kültürler 5000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan berrak kısım (süpernatant) steril şartlar altında 0,45 µm'lik tek kullanımlık steril filtre ile mikrofiltrasyon yolu ile sterilize edilmiştir.

İnhibisyon zonuunun tespiti için, test bakterileri olarak *Escherichia coli* ATCC 11229, *Escherichia coli* ATCC 35218, *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Bacillus cereus* RSKK 863, *Shigella sonnei* Mu:57, *Micrococcus luteus* NRLL B-4375 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır.

Test bakterileri Nutrient sıvı besiortamında aktifleştirilmiş ve 37°C ±1'de geliştirilmiş 24 saat'lik aktif kültürler %0,875'lik serum fizyolojik ozeltisi ile 2 kez yıkanarak hücre yoğunlukları 0,5 nolu Mc Farland standartına göre ayarlanmıştır. 0,5 Mc Farland yoğunluğuna ayarlan bakteriyspansiyonundan steril plaklara 100 µl aktarılmıştır. Bu işlemden sonra daha önceden hazırlanıp, 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edilmiş olan ve yaklaşık olarak 50 °C'ye kadar soğutulmuş olan Nutrient katı besiyerinden 20 ml ilave edilip, besiortamı ve test bakterilerinin homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Homojenlik sağlandıktan sonra petri kabı içerisindeki Nutrient katı besiyerinin donması için buzdolabında 2 saat süre bekletilmiştir. Donan katı besiyeri üzerinde 0,6 cm çapındaki steril çubukla kuyular açılmıştır. Kuyuların tabanları steril agarla tekrar sıvanmış ve bu kuyulara propiyonibakteri izolatlarının mikrofiltrasyona tabi tutulmuş süpernatantından 100 µl ilave edilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyu çevresinde oluşan zonların çapı kumpas ile llmştir [67].

### **3.2.9. Propiyonibakterilerin antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi**

Çalışmada starter ve probiyotik bakteri kültürlerinin gelişimini olumsuz etkilediği düşünülen ve klinikte kullanımı yaygın olan antibiyotikler kullanılmıştır. İzole edilen suşların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır [67]. İzole edilen propiyonibakterilerin hücre duvar sentezini inhibe

eden penisilin (10 unit) ve ampisilin (10 µg); protein sentezini inhibe eden streptomisin (10 µg), gentamisin (10 µg), kloramfenikol (30 µg) ve kanamisin (30 µg); nükleik asit sentezini inhibe eden nalidiksik asit (30 µg), ofloksasin (5 µg) ve rifampisin (5 µg), sitoplazmik zar sentezini inhibe eden polimiksin (300 U) antibiyotikleri ile furan türevlerinden nitrofurantoin (300 µg) antibiyotiklerine duyarlılıkları test edilmiştir.

İzole edilen propiyonibakterilerin 30 °C’de anaerobik koşullarda iki kez ard arda aktifleştirilmiştir. 121 °C’de 15 dk otoklavda steril edilmiş olan Mueller-Hinton katı besiyerinden steril petri kaplarına konulmuştur ve donması için oda sıcaklığında bekletilmiştir. Donan besiyerine üzerine  $10^5$  kob/ml’lik aktif kültürlerden (600 nm de  $0,6 \pm 0,2$  optikal yoğunluğunda) 100 µl aktarılmıştır ve steril drigalski spatülü ile besiyerine üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Besiyeri ve bakteri içeren petri üzerine denenecek olan antibiyotik diskleri steril koşullarda yerleştirilmiştir ve 30 °C’de anaerobik koşullarda 4-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda antibiyotik disk çevresinde oluşan zonların çapı kumpas ile milimetrik olarak ölçülmüştür. Sonuçlar CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) kriterlerine göre değerlendirilmiştir [141].

### **3.2.10. Propiyonibakterilerin eksopolisakkarit (EPS) üretimlerinin belirlenmesi**

Propiyonibakterilerin eksopolisakkarit üretimleri peynirde kıvam oluşturması ve probiyotik açıdan önemi nedeni ile araştırılmıştır. İzole edilen propiyonibakteriler 30 °C’de iki kez ard arda YEL sıvı besi ortamında aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerin optikal yoğunlukları spektrofotometrede 600 nm de  $0,6 \pm 0,2$ ’ye ayarlanmıştır. OD değerleri ayarlanan propiyonibakteri izolatlarından 5 ml’lik YEL ve skim milk sıvı besi ortamlarına ikiye paralelli olarak %2 oranında inoküle edilerek, 30 °C’de anaerobik koşullarda 8 gün inkübe edilmiştir. Kültürlerin EPS üretimleri Marshall ve Rawson (1999)’e göre yapılmıştır [142]. Sonuçlar standart glukoza göre belirlenmiştir (mg/l). Standart 1 ml steril saf suda çözülerek hazırlanan farklı

konsantrasyonlardaki glukoz esas alınarak, fenol sülfürik asit metodu ile çıkarılmıştır [143].

Fenol- sülfürik asit metodu;

Örneklerin üzerine 0,5 ml fenol (Sigma) ve 5 ml saf sülfürik asit eklenerek, 10 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra iyice karıştırılmıştır. Karıştırılan örnekler 30°C’de 15–20 dk. bekletildikten sonra, optik yoğunlukları 490 nm’de spektrofotometrik (Digilab Hitachi U–1800) olarak ölçülmüştür.

EPS üretim miktarlarını belirlemek için 5–100 mg/l arasında değişen oranlarda glukoz kullanılarak standart bir eğri çıkarılmıştır. Bu standarda göre örneklerin EPS miktarları mg/l olarak belirlenmiştir [143].

**3.2.11. Propiyonibakterilerin farklı pH değerlerine toleransının belirlenmesi**

İzole edilen propiyonibakteriler 30 °C’de iki kez ard arda YEL sıvı besi ortamında aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerin optikal yoğunlukları spektrofotometrede 600 nm de  $0,6 \pm 0,2$ ’ye ayarlanmıştır. OD değerleri ayarlanan propiyonibakteri izolatlarından %2 oranında, pH’sı 4N HCl ile 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 ve 7,0 (kontrol)’a ayarlanan YEL sıvı besiyerlerine inoküle edilerek 30 °C’de anaerobik koşullarda 96 saat inkübe edilmiştir. Hücre gelişimi 96 saat sonrasında spektrofotometrede 600 nm de ölçülmüştür. Elde edilen OD değerleri kontrol grubu (pH’sı 7,0 olan YEL sıvı besiyerinde gelişen kültürün yoğunluğu) ile karşılaştırılarak farklı pH değerlerinin *Propionibacterium* spp. suşları üzerindeki yüzde inhibisyon değeri hesaplanmıştır [137].

$$\% \text{ İnhibisyon: } \frac{OD_1 - OD_2}{OD_1} \times 100 \quad (3.4)$$

OD<sub>1</sub>: Kontrol

OD<sub>2</sub>: Suşların farklı pH ortamlarında gelişme oranı

### 3.2.12. Propiyonibakterilerin farklı safra konsantrasyonlarına toleransının belirlenmesi

İzole edilen propiyonibakteriler 30 °C’de iki kez ard arda YEL sıvı besi ortamında aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerin optikal yoğunlukları spektrofotometrede 600 nm de  $0,6\pm 0,2$ ’ye ayarlanmıştır. OD değerleri ayarlanan propiyonibakterileri izolatlarından %2 oranında, %0,0 (kontrol), %0,06; %0,15 ve %0,30 oranlarında safra (sığır safrası, Sigma) içeren YEL sıvı besiyerlerine inoküle edilerek 30 °C’de anaerobik koşullarda 96 saat inkübe edilmiştir. Hücre gelişimi 96 saat sonrasında spektrofotometrede 600 nm de ölçülmüştür. Elde edilen OD değerleri kontrol grubu (%0,0 safra içeren YEL sıvı besiyerinde gelişen kültürün yoğunluğu) ile karşılaştırılarak farklı safra konsantrasyonlarının propiyonibakteri. suşları üzerindeki yüzde inhibisyon değeri hesaplanmıştır [137].

$$\% \text{ İnhibisyon: } OD_1 - OD_2 / OD_1 \times 100 \quad (3.5)$$

OD<sub>1</sub>: Kontrol

OD<sub>2</sub>: Suşların farklı safra ortamlarında gelişme oranı

### 3.2.13. Propiyonibakterilerin agregasyon özelliklerinin tespiti

Propiyonibakterilerin YEL sıvı besiyerinde anaerobik olarak 30°C’de 48 saat aralıklarla ard arda iki kez aktifleştirilmiş kültürleri 5000 X g’de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelet 0,01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> fosfat tamponu (fosfat tamponu; %0,8 NaCl, %0,2 KCl, pH:7,2) ile 2 kez yıkanarak aynı tamponda yeniden süspanse edilerek OD’si spektrofotometrede 600 nm de  $0,6\pm 0,02$ ’ye ayarlanmıştır. Test bakterisi olarak kullanılan ve Nutrient sıvı besi ortamında 37°C’de 24 saat inkübasyonla geliştirilen *E. coli* ATCC 11229 içinde aynı işlemler uygulanmıştır [118].

#### Otoagregasyon

Optikal yoğunluğu (OD) 600 nm de  $0,6\pm 0,02$ ’ye ayarlanan suşlardan 2 ml ve üçer paraleli olarak temiz tüplere alınmış anaerobik, aerobik çalkalamasız ve aerobik

çalkalamalı koşullarda 37 °C’de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde üsteki fazdan 0,1 ml alınmış ve optikal yoğunluğu spektrofotometrede 600 nm de ölçülmüştür. Eş. 3.6’da verilen formül kullanılarak otoagregasyon yüzdeleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{Otoagregasyon} = [(OD_1 - OD_2) / OD_1] \times 100 \quad (3.6)$$

OD<sub>1</sub>: İlk optikal dansite

OD<sub>2</sub>: 4 saat sonraki optikal dansite.

Dört saatlik otoagregasyon süresi sonunda tüplerin alt kısımlarından 20 µl’lik örnekler alınarak preparatlar hazırlanmıştır. Tespit edilen preparatlar gram boyama yöntemi ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenmiştir [123].

### Koagregasyon

OD’si 600 nm de 0,6±0,02’ye ayarlanan suşlardan 2 ml ve 2 ml *E. coli* ATCC 11229 test bakterisinden alınarak ayrı bir tüp içinde 10-15 sn vortekslendikten sonra 37 °C’de 3’er paralelli olarak anaerobik, aerobik çalkalamasız ve aerobik çalkalamalı koşullarda 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde üsteki fazdan 0,1 ml alınmış ve optikal yoğunluğu spektrofotometrede 600 nm’ de ölçülmüştür. Eş. 3.7’de verilen formül kullanılarak koagregasyon yüzdeleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{Koagregasyon} = [(OD_1 + OD_2) - 2(OD_3)] / (OD_1 + OD_2) \times 100 \quad (3.7)$$

OD<sub>1</sub>: *Propionibacterium* spp. suşlarının optikal dansitesi

OD<sub>2</sub>: *E. coli* ATCC 11229’un optikal dansitesi

OD<sub>3</sub>: Karışımın 4 saat sonundaki optikal dansitesi

Dört saatlik koagregasyon süresi sonunda tüplerin alt kısımlarından 20 µl’lik örnekler alınarak preparatlar hazırlanmıştır. Tespit edilen preparatlar gram boyama yöntemi ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenmiştir [144].

### 3.2.14. Propiyonibakterilerin hücre yüzeyinin hidrofobik yapısının belirlenmesi

*Propionibacterium* spp. suşlarının hidrokarbonlara mikrobiyal tutunması Zárate ve ark. (2002)'a göre belirlenmiştir [73]. İzole edilen propiyonibakteri suşları YEL sıvı besiyerlerinde, 30 °C'de 48 saat aralıklarla ard arda iki kez aktifleştirilmiş kültürleri kullanılmıştır. Aktif kültürler, 10 000 rpm'de 15 dk santrüfjü edilmiştir. Elde edilen pelet, iki kez fosfat tamponu (pH 7,2) ile yıkanmış ve 0,1 M KNO<sub>3</sub> (pH 6,2) tamponu içinde tekrar çözülerek spektrofotometrede OD'si 600 nm de 0,6±0,02'ye ayarlanmıştır (OD<sub>1</sub>). Bakteri süspansiyonundan 2 ml alınarak, 0,5 ml p-ksilen (polar olmayan nötral çözücü), kloroform (monopolar asidik çözücü), etil asetat (monopolar bazik çözücü) hidrokarbonlarının üzerine konulmuş ve oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir. Oda sıcaklığında 10 dk'lık ön inkübasyondan sonra ayrılan iki faz 2 dk vorteks ile karıştırılır ve tekrar oda sıcaklığında 4 saat inkübe edilir. İnkübasyondan sonra sulu fazın OD'si spektrofotometrede (600 nm) ölçülmüştür (OD<sub>2</sub>). Propiyonibakteri suşlarının hidrokarbonlara mikrobiyal tutunma yüzdesi Eş. 3.8'de verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{Hidrofobisite} = \left[ \frac{\text{OD}_1 - \text{OD}_2}{\text{OD}_1} \times 100 \right] \quad (3.8)$$

### 3.2.15. İstatistiksel analizler

Tüm çalışmalarda üç farklı paralelin ortalaması verilmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS 11.0 Windows<sup>TM</sup> programı kullanılmıştır. One-way ANOVA korelasyonuna göre, susların EPS üretimi-farklı pH'lara direnç, EPS üretimi- safra toleransı, EPS-otoagregasyon ve EPS-koagregasyon arasındaki ilişki araştırılmıştır.

## **4. DENEYSEL BULGULAR**

### **4.1. Propiyonik Asit Bakterileri İzolatları**

Ülkemizin çeşitli yörelerinden [Afyon Dinar Yöresi Köy Peyniri, Balıkesir Mihaliç Peyniri, Balıkesir Sepet Peyniri, Balıkesir Manyas Dil Peyniri, Çanakkale Ezine Koyun Peyniri, Erzurum Sünme Peyniri, İzmir Tulum Peyniri, Kars Gravyeri, Kars Kaşarı, Kayseri Tomarza Yöresi Köy Peyniri, Mihaliç Kelle Peyniri ve Van Otlu Peyniri] delikli yapıdaki 12 çeşit geleneksel yöntemlerle üretilmiş 50 adet peynir örneği propiyonibakterilerin izolasyonunda kullanılmış ve izolasyon Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Türkiye’nin çeşitli bölgelerinden temin edilen 12 çeşit ve toplam 50 adet yöresel peynirden ancak 8 çeşidinden 29 adet propiyonibakteri izolasyonu yapılabilmektedir. İzole edilen propiyonibakteri suşlarının izolasyon kaynakları, mikroskopik morfolojileri ve koloni morfolojileri ile koloni pigment oluşturma özellikleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. Propiyonibakterilerin izolasyon besiyeri olan YELN katı besiyerinde üremesi Resim 4.1’de gösterilmiştir.



Çizelge 4.1. İzolasyon yapılan peynirler ve bu peynirlerden izole edilen propiyonibakteri suşlarının kodları ve morfolojileri

No	İzolasyon Yapılan Peynirler	Mikroskopik Morfoloji	Koloni Morfolojisi (Pigmenti)	Suş Kodu
1	Afyon Dinar Yöresi Köy Peyniri	Gr(+), kısa kalın çubuk X, V, Y şeklinde	Kırmızı	AKP1
2	Balıkesir Manyas Dil Peyniri	Gr(+), pleomorfik çubuk X, V, Y şeklinde	Turuncu	BDP2
3	Balıkesir Manyas Dil Peyniri	Gr(+), pleomorfik çubuk X, V, Y şeklinde	Turuncu	BDP4
4	Balıkesir Manyas Dil Peyniri	Gr(+), pleomorfik çubuk X, V, Y şeklinde	Kahverengi	BDP5
5	Balıkesir Manyas Dil Peyniri	Gr(+), pleomorfik çubuk X, V, Y şeklinde	Kahverengi	BDP6
6	Balıkesir Manyas Dil Peyniri	Gr(+), pleomorfik çubuk X, V, Y şeklinde	Kahverengi	BDP7
7	Balıkesir Manyas Dil Peyniri	Gr(+), pleomorfik çubuk X, V, Y şeklinde	Kahverengi	BDP11
8	İzmir Tulum Peyniri	Gr(+), kısa ince çubuk V ve Y formuna dönüşüyor	Kahverengi	ITP1
9	İzmir Tulum Peyniri	Gr(+), kısa kalın çubuk V ve Y formuna dönüşüyor	Kahverengi	ITP2
10	İzmir Tulum Peyniri	Gr(+), kısa kalın çubuk X, V, Y şeklinde	Kahverengi	ITP3
11	Kars Gravyeri	Gr(+), pleomorfik çubuk X, V, Y şeklinde	Turuncu	DO1
12	Kars Gravyeri	Gr(+), pleomorfik çubuk X, V, Y şeklinde	Turuncu	DO2
13	Kars Gravyeri	Gr(+), pleomorfik çubuk X, V, Y şeklinde	Turuncu	DO3
14	Kars Gravyeri	Gr(+), pleomorfik çubuk X, V, Y şeklinde	Kahverengi	DO4
15	Kars Gravyeri	Gr(+), kısa ince basil	Turuncu	DO5
16	Kars Kaşarı	Gr(+), koktan pleomorf V,Y dönen çubuk şeklinde	Turuncu	DO9
17	Balıkesir Mihaliç Peyniri	Gr(+), pleomorfik çubuk X, V, Y şeklinde	Kahverengi	DO6
18	Balıkesir Mihaliç Peyniri	Gr(+), pleomorfik çubuk X, V, Y şeklinde	Turuncu	DO7

Çizelge 4.1. (Devam) İzolasyon yapılan peynirler ve bu peynirlerden izole edilen propiyonibakteri suşlarının kodları ve morfolojileri

No	İzolasyon Yapılan Peynirler	Mikroskopik Morfoloji	Koloni Morfolojisi (Pigmenti)	Suş Kodu
19	Balıkesir Mihaliç Peyniri	Gr(+), pleomorfik çubuk X, V, Y şeklinde	Kahverengi	DO8
20	Mihaliç Kelle Peyniri	Gr(+),kısa kalın çubuk X, V, Y şeklinde	Kırmızı	SMP1
21	Balıkesir Sepet Peyniri	Gr(+), pleomorfik çubuk X, V, Y şeklinde	Turuncu	SP1
22	Balıkesir Sepet Peyniri	Gr(+), pleomorfik çubuk X, V, Y şeklinde	Turuncu	SP2
23	Balıkesir Sepet Peyniri	Gr(+), pleomorfik çubuk X, V, Y şeklinde	Turuncu	SP3
24	Balıkesir Sepet Peyniri	Gr(+), pleomorfik çubuk X, V, Y şeklinde	Turuncu	SP4
25	Balıkesir Sepet Peyniri	Gr(+), pleomorfik çubuk X, V, Y şeklinde	Kahverengi	SP5
26	Balıkesir Sepet Peyniri	Gr(+), pleomorfik çubuk X, V, Y şeklinde	Kahverengi	SP6
27	Balıkesir Sepet Peyniri	Gr(+), pleomorfik çubuk X, V, Y şeklinde	Turuncu	SP7
28	Balıkesir Sepet Peyniri	Gr(+), pleomorfik çubuk X, V, Y şeklinde	Turuncu	SP8
29	Balıkesir Sepet Peyniri	Gr(+), pleomorfik çubuk X, V, Y şeklinde	Turuncu	SP9



Resim 4.1. Kars Gravyerinden izole edilen propiyonibakterilerin YELN katı besiyerinde koloni morfolojisi

#### 4.2. Peynirlerde Propiyonik Asit Bakterileri Sayımları

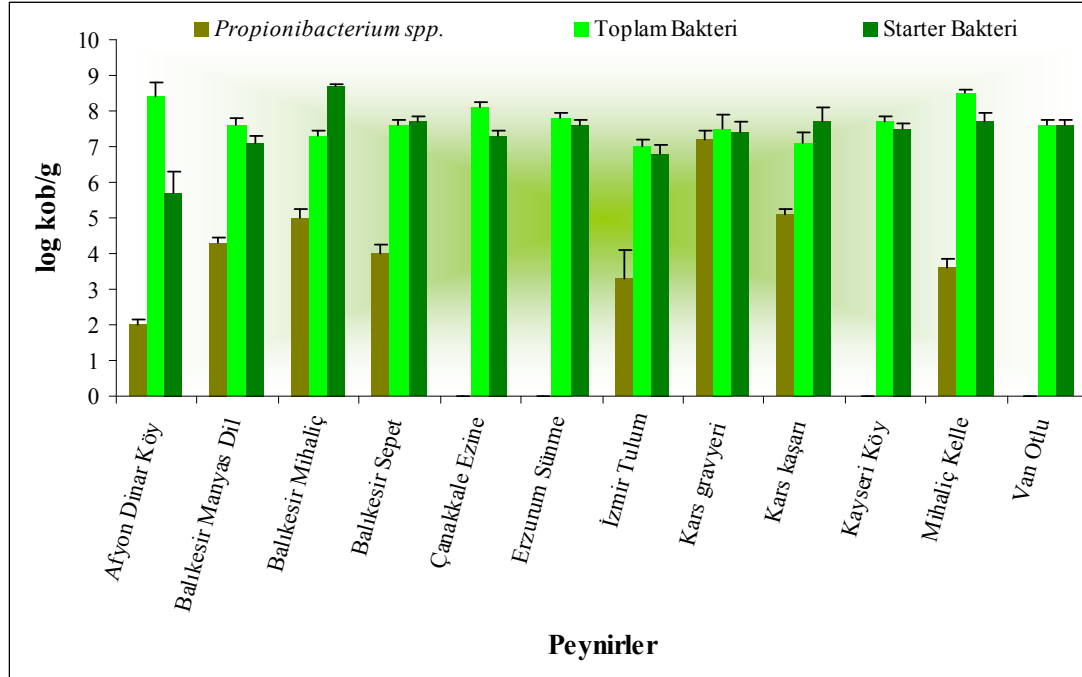
Peynirlerde propiyonik asit bakterilerinin sayımı Bölüm 3.2.3’de anlatıldığı gibi belirlenmiştir. Peynirlerde bulunan propiyonibakterilerin sayımı için YELN katı besiyeri, toplam bakteri ve diğer starter bakteri sayımları için ise sırasıyla PCA ve MRS katı besiyerleri kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan 50 adet peynir numunesinden propiyonibakterilerin izolasyonu yapılan 12 çeşit peynirdeki toplam bakteri ve starter bakteri sayımları kob/g olarak Çizelge 4.2 ve Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

Çalışmada kullanılan peynirlerden en fazla propiyonibakteri kolonisine rastlanan peynir çeşidinin Kars Gravyer Peyniri ( $7,2\pm 0,24$  log kob/g), en az rastlanan peynir çeşidinin ise Afyon Dinar Yöresi Köy Peyniri ( $2,0\pm 0,13$  log kob/g) olduğu tespit edilmiştir. Çanakkale Ezine Koyun Peyniri, Erzurum Sünme Peyniri ve Kayseri Tomarza Yöresi Köy Peynirlerinde ise propiyonibakteri kolonisine rastlanılmamıştır.

Toplam bakteri sayımı en fazla olan peynir çeşidinin ise en az propiyonibakteri izolasyonu yapılan Afyon Dinar Yöresi Köy Peyniri ( $8,4\pm 0,41$  log kob/g) olduğu belirlenmiştir. Starter bakteri bakımından en zengin peynir çeşidinin ise Balıkesir Mihaliç Peyniri ( $8,7\pm 0,07$  log kob/g) olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.2. Peynirlerde *Propionibacterium* spp., toplam bakteri ve diğer starter bakterilerin sayımları (kob/g)

Peynirler	<i>Propionibacterium</i> spp. YELN	Toplam bakteri (PCA)	Starter Bakteri (MRS)
Afyon Dinar Yöresi Köy Peyniri	2,0±0,13	8,4±0,41	5,7±0,60
Balıkesir Manyas Dil Peyniri	4,3±0,14	7,6±0,19	7,1±0,21
Balıkesir Mihaliç Peyniri	5,0±0,27	7,3±0,13	8,7±0,07
Balıkesir Sepet Peyniri	4,0±0,23	7,6±0,15	7,7±0,14
Çanakkale Ezine Koyun Peyniri	0	8,1±0,14	7,3±0,14
Erzurum Sünme Peyniri	0	7,8±0,17	7,6±0,14
İzmir Tulum Peyniri	3,3±0,80	7,0±0,19	6,8±0,23
Kars gravyeri	7,2±0,24	7,5±0,41	7,4±0,32
Kars kaşarı	5,1±0,17	7,1±0,32	7,7±0,41
Kayseri Tomarza Yöresi Köy Peyniri	0	7,7±0,17	7,5±0,14
Mihaliç Kelle Peyniri	3,6±0,24	8,5±0,12	7,7±0,23
Van Otlu Peyniri	0	7,6±0,14	7,6±0,15



Şekil 4.1. Peynirlerde *Propionibacterium spp.*, toplam bakteri ve diğer starter bakterileri sayıları (kob/g)

### 4.3. Peynirlerden İzole Edilen Propiyonik Asit Bakterilerinin Tanımlanması

#### 4.3.1. Klasik tanımlama sonuçlarının değerlendirilmesi

Pleomorfik yapıda ve değişken karakterli olan propiyonik asit bakterilerinin biyokimyasal testlerde değişken sonuç vermelerinden dolayı tanımlama testleri en az üç kez tekrarlanmıştır. Sekiz adet yöresel peynirden izole edilen 29 adet suşu tanımlamak için 24 adet şeker testi ile eskülin hidrolizi, jelatin hidrolizi, indol üretimi, nitrat indirgeme, katalaz testi, oksidaz testi, glukozdan gaz üretimi, hareketlilik testi, asetoin üretimi, %20 safra ortamında gelişme, pigmentasyon, H<sub>2</sub>S üretimi, sitrat testi, lizin dekarboksilaz, arjinin hidrolizi ve hareketlilik olmak üzere toplam 39 test 29'u izolat, 5'i referans ve 5'i dublike olmak üzere 39 suşa 3 kez Bölüm 3.2.4'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Üç kez uygulanan 39 testin ortalama sonuçları Çizelge 4.3'de verilmiştir. Referans türlerle karşılaştırılan sonuçlar SNEATH'ın benzerlik formülü ile izole edilen propiyonibakterilerin yüzde benzerlikleri tespit edilmiş, sonuçlar Çizelge 4.4'de verilmiştir

Tanımlama için yapılan 39 testin sonuçları referans kültürlerle karşılaştırılarak yüzde benzerlikleri tespit edilmiştir. Buna göre; DO2, DO5, DO7, DO8, DO9, SP1, SP2, SP3, SP4, SP5, SP9, BDP2, BDP4, ITP1 ve ITP3 suşları %67-85 oranında *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSMZ 20271'e benzerliklerinden dolayı *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* olarak tanımlanmıştır.

DO1, DO3, DO4, DO6, SP6, SP7, SP8, BDP5, BDP6, BDP7, BDP11 ve ITP2 suşları %75-90 oranında *P. jensenii* DSMZ 20235 referans kültürüne benzerliklerinden dolayı *P. jensenii* olarak belirlenmiştir.

SMP1 ve AKP1 suşları %65 oranında *P. thoenii* DSMZ 20276'ya benzerliklerinden dolayı *P. thoenii* olarak tanımlanmıştır.

SMP 1 ve AKP1'in dublikesi olan DOO1 ve DOO2 %90 oranında *P. thoenii* DSMZ 20276'ya, DO4'ün dublikesi DOO3 %95 oranında *P. jensenii* DSMZ 20235'e, BDP7'nin dublikesi DOO4 %100 oranında *P. jensenii* DSMZ 20235'ye ve SP1'in dublikesi DOO5 % 92 oranında *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSMZ 20271'e benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. SMP1, AKP1, DO4, SP1 ve BDP7'nin tanımlanması dublikelerle doğrulanmıştır.

Çizelge 4.3. Propiyonibakteri suşlarının biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçları

	Suşlar														
	DO1	DO2	DO3	DO4	DO5	DO6	DO7	DO8	DO9	SP1	SP2	SP3	SP4	SP5	
Amigdalın	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d+	d+	d+	d+	d+	
Arabinoz	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d+	d-	
Sellobiyoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Eskulin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d+	+	+	
Fruktoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Galaktoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Gliserol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Inulin	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	
Laktoz	+	-	+	+	-	+	-	-	-	d+	+	+	+	+	
Malltoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Melezitoz	+	+	+	d-	d-	+	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	
Melibiyoz	+	+	+	d+	d+	d+	d+	d+	d-	d+	d+	+	d+	d+	
Rafinoz	-	d+	d+	-	-	d+	+	d-	+	d-	-	+	+	-	
Ramnoz	d+	d+	d+	d+	d+	d+	d+	d+	d+	+	d+	d+	d+	d+	
Riboz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Salisin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Sorbitol	+	+	+	d+	d+	+	d+	d+	d+	d+	d+	d+	d+	d+	
Sorboz	d-	+	+	d-	d-	d-	d-	d-	d-	+	+	+	+	+	
Nişasta	-	d+	d+	-	d-	d-	-	-	-	-	d-	-	d+	d+	
Sukroz	+	+	+	d+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	d+	
Threhaloz	+	+	+	+	+	+	+	+	d+	d+	d+	+	+	+	
Ksiloz	d+	+	+	d+	d+	+	+	d+	d+	d+	d+	+	+	d+	
İndol	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	
Jelâtin	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	
Nitrat İndirgeme	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	+	d-	d-	d-	d-	
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Gaz	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	
Hareketlilik	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	
Asetoin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d-	d-	d-	+	
Pigmentasyon	T	T	T	KR	T	T	T	KR	T	T	T	T	T	KR	
H <sub>2</sub> S	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	
Sitrat	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	
Arjinin hidroliz	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	
Eskulin hidroliz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
oksidaz	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	
Lizindekarboksila	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d+	d+	d+	d+	d+	

Biyokimyasal ve Fizyolojik Testler

Çizelge 4.3. (Devam) Propiyonibakteri suşlarının biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçları

	Suşlar										
	SP6	SP7	SP8	SP9	BDP2	BDP4	BDP5	BDP6	BDP7	BDP11	
Amigdalın	d+	d+	d+	d+	+	+	+	+	d+	+	
Arabinoz	d-	d-	d-	d-	d+	d+	d+	d+	+	d-	
Sellobiyoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Eskulin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Fruktoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Galaktoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Gliserol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Inulin	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	
Laktoz	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	
Malltoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Melezitoz	d-	+	d-	+	+	+	+	+	+	d-	
Melibiyoz	d+	d+	d+	d-	+	+	d+	d+	d+	d-	
Rafinoz	+	-	+	d+	+	+	+	+	+	+	
Ramnoz	d+	d+	d+	d+	d+	d+	d+	d+	-	d+	
Riboz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Salisin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Sorbitol	d+	d+	d+	d+	+	+	+	+	+	+	
Sorboz	+	+	+	d+	d-	+	d-	d-	d-	+	
Nişasta	-	-	-	d-	-	-	-	-	d-	d-	
Sukroz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Threhaloz	+	d+	d+	d+	+	+	+	+	+	+	
Ksiloz	+	d+	d+	-	+	d+	d+	-	+	d+	
İndol	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	
Jelatin	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	+	d-	d-	
Nitrat İndirgeme	d-	+	d-	d-	d-	d-	+	+	d-	d-	
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Gaz	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	
Hareketlilik	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	
Asetoin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Pigmentasyon	KR	T	T	T	T	T	KR	KR	KR	KR	
H <sub>2</sub> S	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	
Sitrat	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	
Arjinin hidroliz	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	
Eskulin hidroliz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
oksidaz	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	
Lizin											
Dekarboksilaz	d+	+	d+	+	+	+	+	+	+	d+	

Biyokimyasal ve Fizyolojik Testler



Çizelge 4.3. (Devam) Propiyonibakteri suşlarının biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçları

	Suşlar									
	SMP1	AKP1	ITP1	ITP2	ITP3	DOO1*	DOO2*	DOO3*	DOO4*	DOO5*
Amigdalın	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinoz	+	d+	+	d-	d+	d+	d-	d-	d-	d-
Sellobiyoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eskulin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fruktoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galaktoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gliserol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-
Laktoz	+	+	-	+	-	+	+	+	+	d+
Malltoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitoz	d-	d+	+	+	+	d-	+	+	+	+
Melibiyoz	+	d+	d+	+	d+	+	d+	+	+	d+
Rafinoz	+	+	+	+	d-	+	+	-	+	d-
Ramnoz	d+	d+	+	+	+	d+	d+	d+	d+	d+
Riboz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salisin	+	+	+	+	+	d+	+	+	+	+
Sorbitol	d+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorboz	+	+	d-	+	+	+	d+	d-	d-	+
Nişasta	d+	d+	-	-	-	-	d+	d-	d-	-
Sukroz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Threhaloz	d+	+	+	+	+	d+	+	+	+	+
Ksiloz	d+	+	+	+	d+	d+	-	-	-	d+
İndol	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-
Jelatin	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-
Nitrat İndirgeme	d-	d-	d-	+	d-	d-	d-	d-	d-	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gaz	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-
Hareketlilik	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-
Asetoin	+	+	+	+	+	+	d-	d-	+	+
Pigmentasyon	K	2	KR	KR	KR	K	K	KR	T	KR
H <sub>2</sub> S	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-
Sitrat	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-
Arjinin hidroliz	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-
Eskulin hidroliz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
oksidaz	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-	d-
Lizindekarboksilaz	+	d+	+	+	+	+	+	+	+	+

Biyokimyasal ve Fizyolojik Testler

Çizelge 4.3. (Devam) Propiyonibakteri suşlarının biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçları

	Referanslar**				
	20270	20271	20272	20276	20235
Amigdalın	-	d-	-	d-	d-
Arabinoz	d-	d-	d-	-	d-
Sellobiyoz	-	-	d-	d-	d+
Eskulin	-	d-	-	d-	+
Fruktoz	+	+	d+	+	+
Galaktoz	+	+	+	+	+
Glukoz	+	+	+	+	+
Gliserol	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	d-	-	d-
Laktöz	d+	-	-	+	-
Malaltoz	d+	d+	d+	+	d+
Mannitol	d-	d-	d-	+	+
Melezitöz	d-	-	-	-	-
Melibiyöz	+	-	+	-	-
Rafinoz	-	-	-	-	-
Ramnoz	-	d-	d-	d+	d+
Riboz	d-	d+	d+	+	+
Salisin	-	d-	d-	+	+
Sorbitol	d-	-	-	+	+
Sorboz	-	-	d-	d-	d-
Nişasta	-	-	-	d-	d-
Sukroz	+	+	+	+	d+
Threhaloz	-	d-	d-	+	+
Ksiloz	d-	-	-	d-	d-
İndol	-	-	-	-	-
Jelatin	-	-	-	-	-
Nitrat İndirgeme	-	-	-	-	-
Katalaz	+	+	+	+	+
Gaz	-	-	-	-	-
Hareketlilik	-	-	-	-	-
Asetoin	d+	-	d+	+	+
Pigmentasyon	T	T	T	K	KR
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-
Sitrat	-	-	-	-	-
Arjinin hidroliz	-	-	-	-	-
Eskulin hidroliz	-	+	-	+	-
oksidaz	-	-	-	-	-
Lizin Dekarboksilaz	+	+	+	+	+

K: Kırmızı, KR: Kahverengi, T: Turuncu +: pozitif, d+: zayıf pozitif, -: negatif, d-: zayıf negatif

\*: Dublike suşlar: SMP1 Dublikesi DOO1, AKP1 Dublikesi DOO2, DO4 Dublikesi DOO3, BDP7 Dublikesi DOO4, SP1 Dublikesi DOO5

\*\* : Refrans kültürler DSMZ: 20270: *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*, 20271: *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii*, 20272: *P. acidopropionici*, 20276: *P. thoenii*, 20535: *P. jensenii*

#### 4.3.2. API (50 CHL, 20 E ve 20 A) tanımlama sonuçlarının değerlendirilmesi

API 50 CHL, API 20 E ve API 20 A peynirlerden izole edilen 29 suş ile 5'i referans ve 2'si dublike kültürler (SP6'nın dublikesi DOO1, SP9'un dublikesi DOO2) olmak üzere toplam 36 suşa Bölüm 3.2.5'de anlatıldığı gibi uygulanmıştır. API 50 CHL, 20 E ve 20 A kitleri birlikte uygulandığında propiyonibakteri suşlarının tanımlanması için toplam 74 testin uygulanması gerçekleştirilmiştir. Ancak bu üç kit birlikte uygulandığında gliserol, arabinoz, ksiloz, glukoz, mannoz, ramnoz, inositol, mannitol, sorbitol, amigdalin, eskulin, salisin, sellobiyoz, maltoz, laktoz, melibiyoz, sukroz, trehaloz, melezitoz, rafinoz, indol ve jelâtin hidroliz testleri bu üç kit içinde de mevcut olduğu için değerlendirmede ortalama sonuçları dikkat alınmıştır. API 50 CHL, API 20 E ve API 20 A kitleri ortalama sonuçlar ile pigment, katalaz ve oksidaz testleri birleştirildiğinde 65 testin 29 suş ile 5'i referans ve 2'si dublike kültürler üzerinde uygulanmasından elde edilen sonuçlar değerlendirilerek SNEATH'ın benzerlik formülüne göre referans türlerle karşılaştırılmasından elde edilen yüzde benzerlikleri Çizelge 4.4'de verilmiştir.

*P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* olarak tanımlanan DO2, DO5, DO7, DO8, DO9, SP1, SP2, SP3, SP4, SP5, SP9, BDP2, BDP4, ITP1 ve ITP3 suşlarının yüzde benzerlik oranı %82-95 olarak belirlenmiştir.

*P. jensenii* olarak tanımlanan DO1, DO3, DO4, DO6, SP6, SP7, SP8, BDP5, BDP6, BDP7, BDP11 ve ITP2 suşlarının API tanımlamasından elde edilen yüzde benzerlik oranı ise %71 ile 88 arasında tespit edilmiştir.

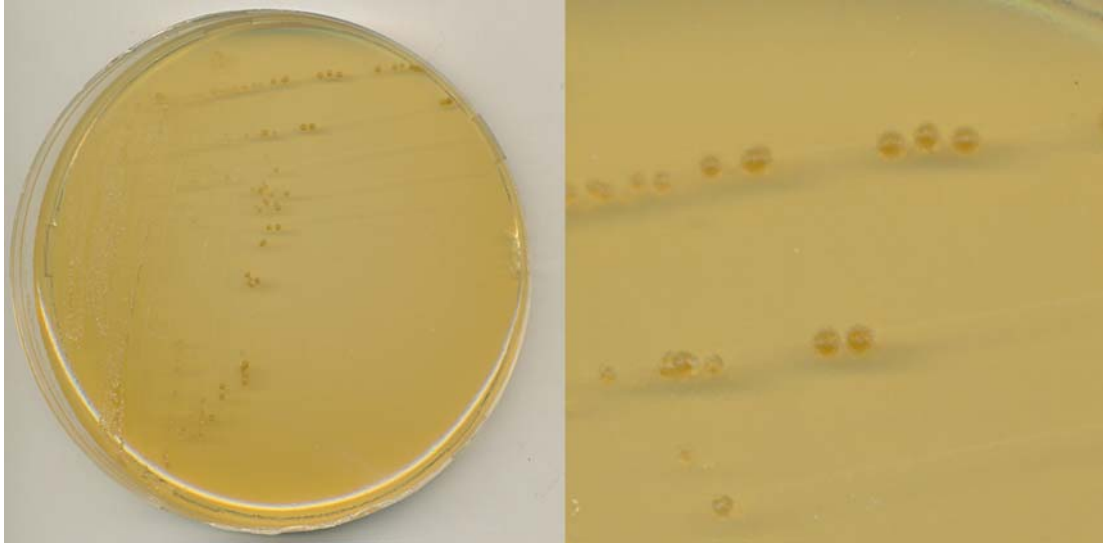
*P. thoenii* olarak tanımlanan SMP1 ve AKP1 suşlarının API tanımlamasındaki yüzde benzerlik oranı ise sırayla %71 ve 80 olarak bulunmuştur.

*P. jensenii* SP6 suşunun dublikesi olan DOO1 suşu %85 oranında *P. jensenii*'ye, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP9 suşunun dublikesi olan DOO2 ise %91 oranında *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii*'ye benzerlik gösterdikleri

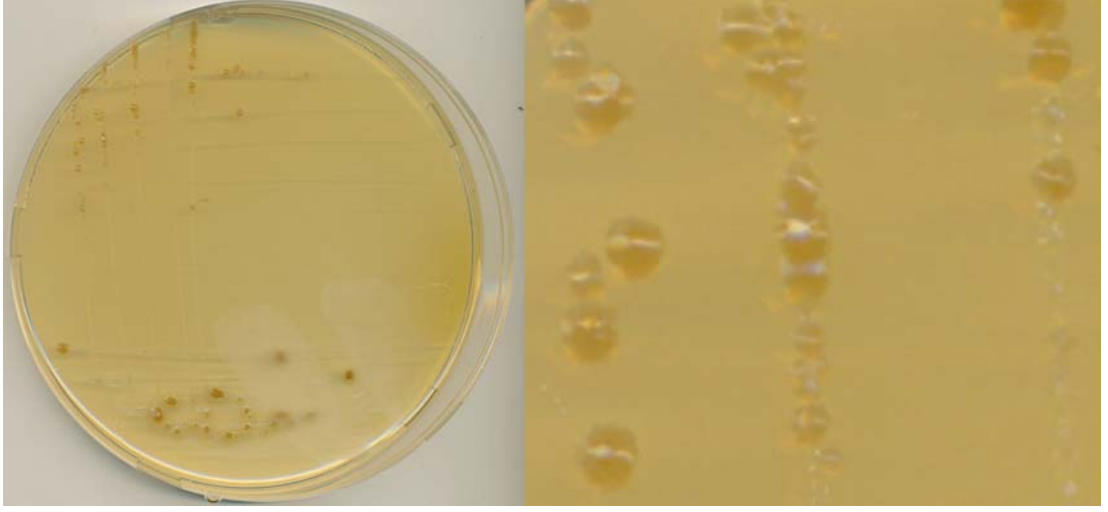
belirlenmiştir. API tanımlama sonuçları dublikantların %85-91 oranında benzerlik göstermesiyle doğrulanmıştır.

Balıkesir Dil Peynirinden izole edilen *P. jensenii* BDP6 ve Balıkesir Sepet Peynirinden izole edilen *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP4 suşlarının YEL katı besiyerinde koloni morfolojisi ve pigmentasyonu Resim 4.2 ve 4.3’ de verilmiştir. Çalışmalarda referans kültür olarak kullanılan *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSMZ 20271 ve *P. jensenii* DSMZ 20235 türlerinin YEL katı besiyerindeki koloni morfolojisi ve pigmentasyonu ise Resim 4.4’de gösterilmiştir.

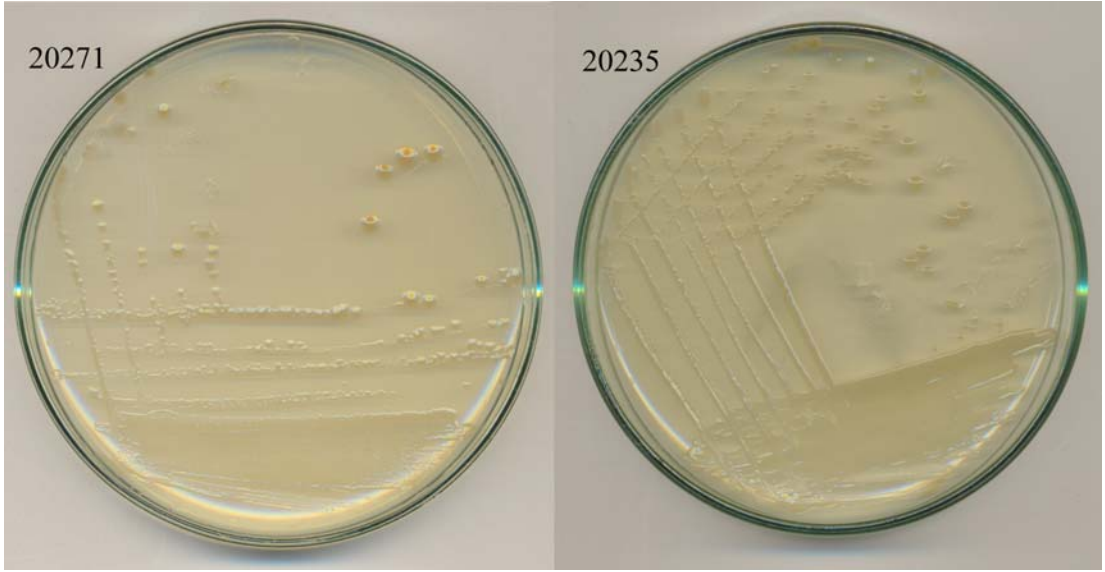
Afyon Dinar Yöresi Köy Peynirinden izole edilen *P. thoenii* AKP1, Mihaliç Kelle Peynirinden izole edilen *P. thoenii* SMP1 (Resim 4.5), Kars Gravyerinden izole edilen *P. jensenii* DO3 ve DO4 suşları (Resim 4.6) ile Balıkesir Sepet peynirinden izole edilen *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP2 ve SP5 suşlarına ait mikroskopik görüntüler Resim 4.7’de gösterilmiştir.



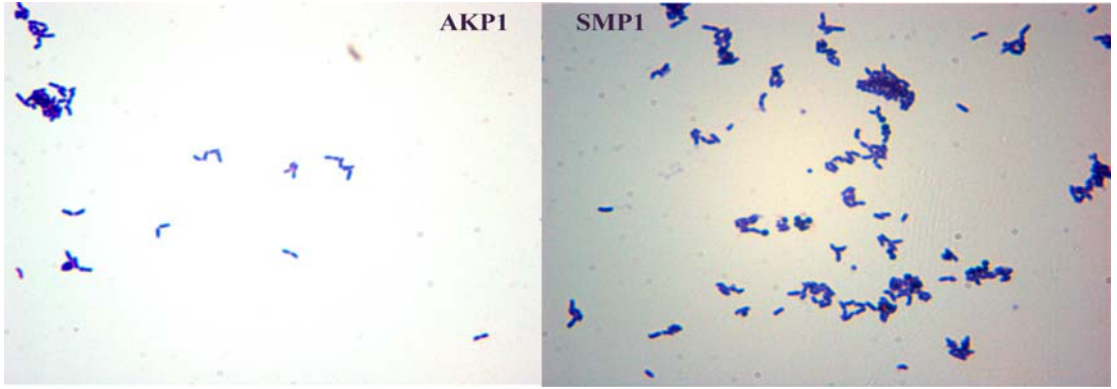
Resim 4.2. *P. jensenii* BDP6 suşunun YEL katı besiyerindeki koloni morfolojisi (solda) ve pigmentasyonu (sağda)



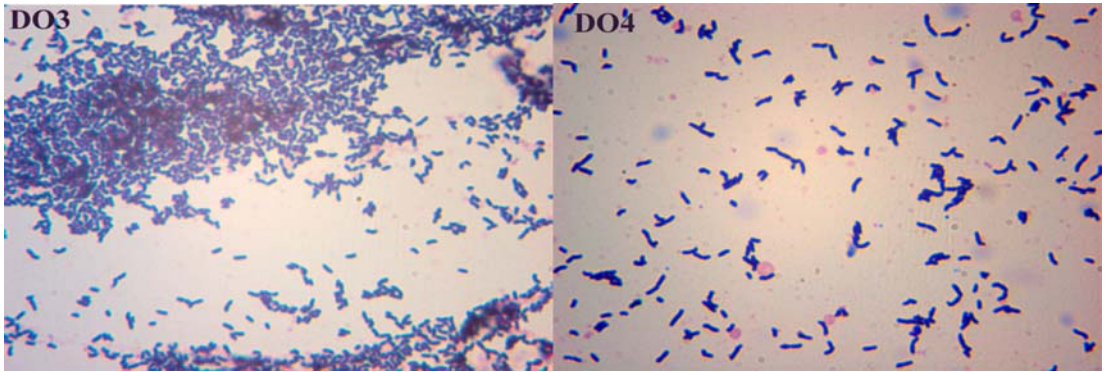
Resim 4.3. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP4 suşunun YEL katı besiyerindeki koloni morfolojisi (solda) ve pigmentasyonu (sağda)



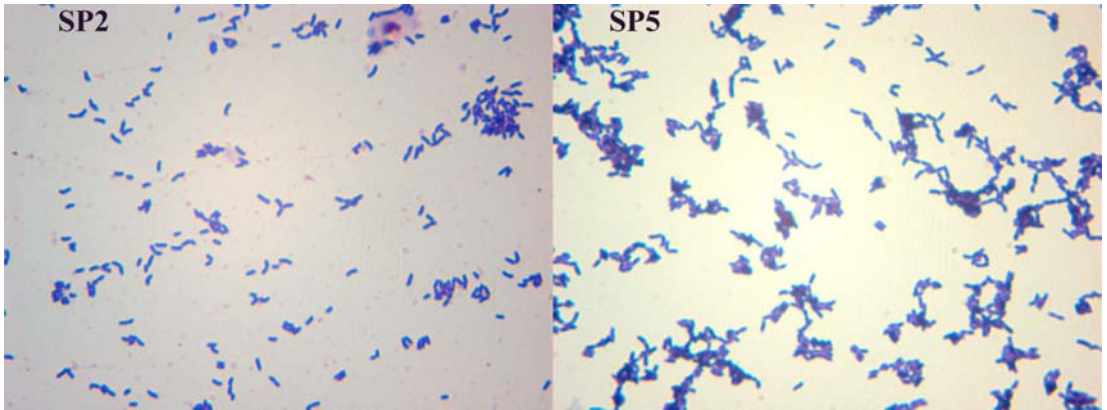
Resim 4.4. Referans kültür olarak kullanılan *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSMZ 20271 ve *P. jensenii* DSMZ 20235 türlerinin YEL katı besiyerindeki koloni morfolojisi ve pigmentasyonu



Resim 4.5. *P. thoenii* AKP1 ve SMP1 suşlarının mikroskopik morfolojileri



Resim 4.6. *P. jensenii* DO3 ve DO4 suşlarının mikroskopik morfolojileri



Resim 4.7. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP2 ve SP5 suşlarının mikroskopik morfolojileri

Çizelge 4.4. API tanımlanması sonucunda izole edilen propiyonibakterilerin adlandırılması ve % benzerlik oranları

No	Suşlar	API Yüzde Benzerlik Oranları	Klasik Yüzde Benzerlik Oranları
1	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DO2	%88	%85
2	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DO5	%86	%75
3	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DO7	%88	%75
4	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DO8	%85	%75
5	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DO9	%86	%72
6	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP1	%89	%67
7	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP2	%85	%67
8	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP3	%85	%69
9	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP4	%85	%69
10	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP5	%88	%69
11	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP9	%91	%77
12	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> BDP2	%86	%80
13	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> BDP4	%86	%80
14	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> ITP1	%82	%75
15	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> ITP3	%86	%77
16	<i>P. jensenii</i> DO1	%80	%90
17	<i>P. jensenii</i> DO3	%80	%85
18	<i>P. jensenii</i> DO4	%70	%82
19	<i>P. jensenii</i> DO6	%79	%85
20	<i>P. jensenii</i> SP6	%88	%77
21	<i>P. jensenii</i> SP7	%82	%75
22	<i>P. jensenii</i> SP8	%83	%75
23	<i>P. jensenii</i> BDP5	%80	%87
24	<i>P. jensenii</i> BDP6	%80	%90
25	<i>P. jensenii</i> BDP7	%79	%82
26	<i>P. jensenii</i> BDP11	%77	%82
27	<i>P. jensenii</i> ITP2	%75	%87
28	<i>P. thoenii</i> SMP1	%71	%65
29	<i>P. thoenii</i> AKP1	%80	%65
30	<i>P. jensenii</i> DOO1 (SP6)	%85	%80
31	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DOO2 (SP9)	%91	%90

#### 4.4. Tanımlama Testlerinin Nümerik Taksonomi Programında Değerlendirilmesi

##### 4.4.1. Klasik tanımlama sonuçlarının değerlendirilmesi

Peynirlerden izole edilen 29 adet propiyonibakteri izolatu, 5'i referans ve 5'i dublike kültürler olmak üzere toplam 39 suş üzerinde klasik tanımlama testleri 3 kez uygulanmıştır. Klasik tanımlama ile yapılan karbohidrat ve fizyolojik test sonuçları nümerik taksonomi programında değerlendirilmiş (NTSYSpc, Numerical Taxonomy System, version 2.10q) ve elde edilen dendrogram Şekil 4.2'de verilmiştir.

Klasik tanımlamadan elde edilen dendrogram değerlendirildiğinde; SMP1 suşunun dublikantı DOO1 ve AKP1 suşunun dublikantı DOO2 dendrogramda birbirlerine yakın mesafede buldukları tespit edilmiştir. Dublikantların *P. thoenii* DSMZ 20276 referans kültürüne %90 oranında benzerlik gösteren SMP1 ve AKP1 suşları dendrogramda referans kültüre benzerlik oranın düşük olduğu gözlenmiştir. DO4 suşunun dublikantı olan DOO3, BDP7 suşunun dublikantı DOO4 ve SP1 suşunun dublikantı DOO5 suşları birbirlerine %90'nın üzerinde benzerlik göstermesine rağmen dendrogramda birbirlerine olan benzerlik oranın düşük olduğu tespit edilmiştir.

*P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* türü olarak tanımlanan DO2, DO5, DO7, DO8, DO9, BDP2, BDP4, ITP1 ve ITP3 suşlarının dendrogramda *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSMZ 20271 referans kültürüne yakın mesafede yer aldığı, SP1, SP2, SP3, SP4, SP5 ve SP9 suşlarının ise dendrogramda *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSMZ 20271 referans kültüründen uzak mesafede yer aldığı tespit edilmiştir.

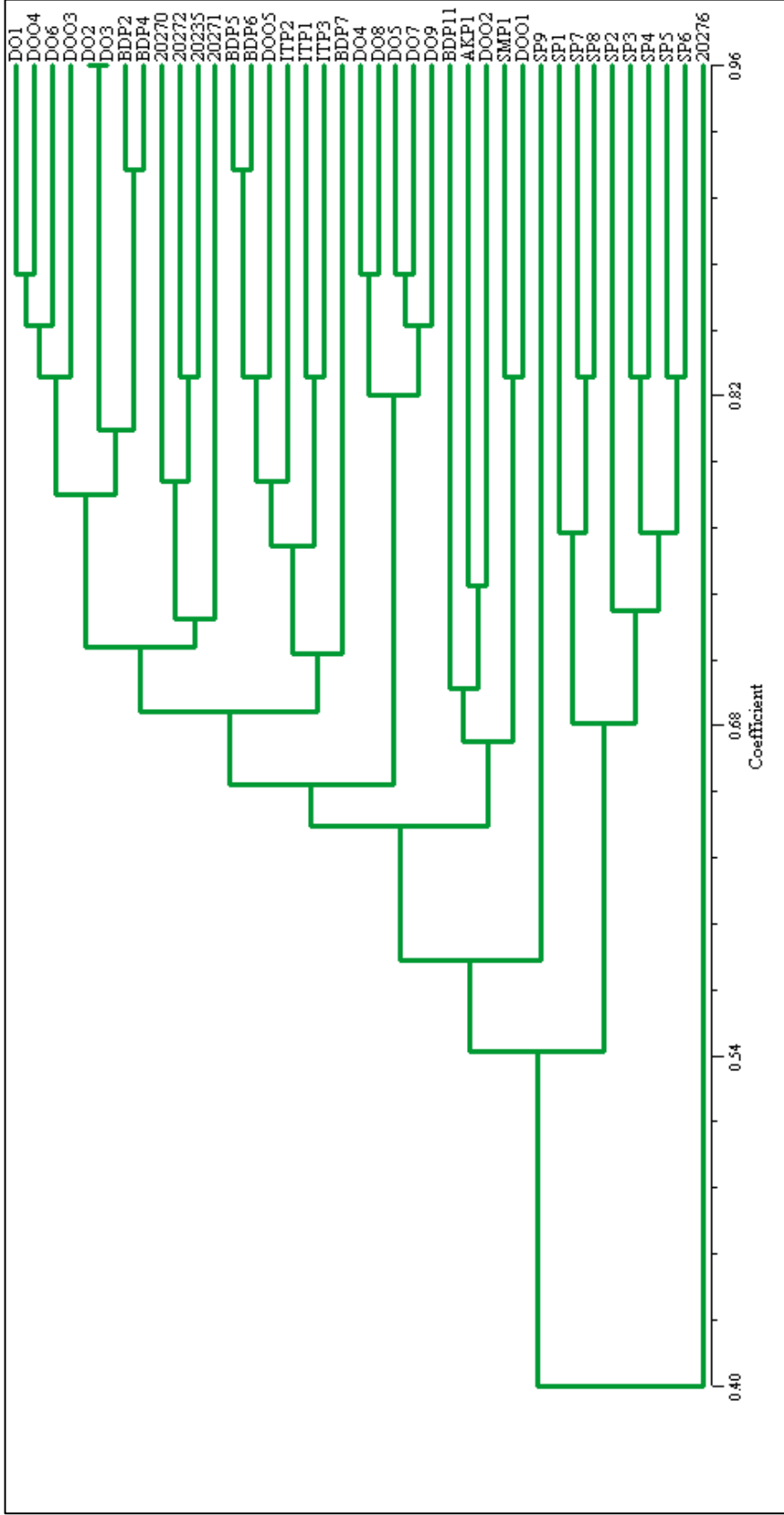
*P. jensenii* türü olarak tanımlanan DO1, DO3, DO4, DO6, BDP5, BDP6, BDP7, BDP11 ve ITP2 suşları dendrogramda *P. jensenii* DSMZ 20235 referans kültürüne yakın mesafede yer alırken, SP6, SP7 ve SP8 suşları dendrogramda *P. jensenii* DSMZ 20235 referans kültüründen uzak mesafede yer almıştır.



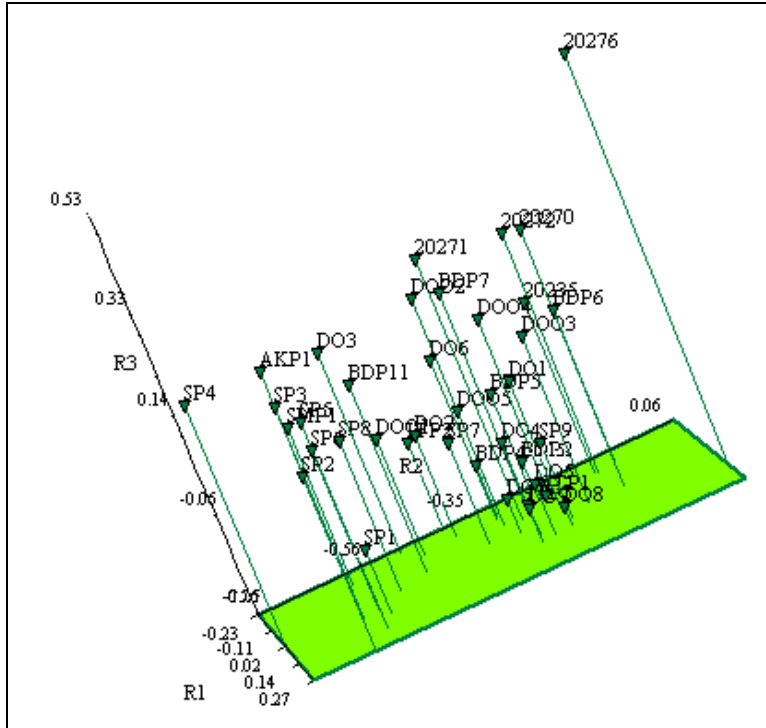
Klasik tanımlama test sonuçlarına göre oluşturulan dendrogramda *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii*'ye ait olan suşların %57-90 oranları arasında benzerlik gösterdiği ve *P. jensenii*'ye ait suşların ise %76-90 oranları arasında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. *P. thoenii* olarak tanımlanan suşların ise %74-83 oranında benzerlik gösterdikleri görülmüştür.

Klasik tanımlamadan elde edilen sonuçlar nümerik taksonomi programının (NTSYSpc) Principal Coordinates Analysis (PCA) özelliği kullanılarak değerlendirilmesi sonucu hazırlanan üç boyutlu grafik Şekil 4.3'de verilmiştir. Klasik tanımlamadan elde edilen koordinat analiz grafiği (Şekil 4.3) incelendiğinde, izole edilen suşların birbirinden ayrıldığı ve herhangi bir kümeleşmenin olmadığı gözlenmiştir. *P. thoenii* DSMZ 20276 referans kültürü koordinat analiz grafiğinde *P. thoenii* olarak tanımlanan SMP1 ve AKP1 suşlarından uzakta yer almıştır. Klasik tanımlama için yapılan koordinat analizi ile dendrogram analiz sonuçları paralellik göstermiştir.

Elde edilen bu sonuçlar değerlendirildiğinde klasik tanımlama testlerinin propiyonibakterilerin tanımlanmasına tek başına etkili ve yeterli bir sistem olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. Peynirlerden izole edilen propiyonibakterilerin klasik yöntemlerle tanımlama dendrogramı



Şekil 4.3. Klasik tanımlama sonuçlarının PCA ile değerlendirilmesi

#### 4.4.2. API tanımlama sonuçlarının değerlendirilmesi

API 50 CHL, API 20 E ve API 20 A, peynirlerden izole edilen 29 suş ile 5'i referans ve 2'si dublike kültürler (SP6'nın dublikesi DOO1, SP9'un dublikesi DOO2) olmak üzere toplam 36 suşa uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar nümerik taksonomi programında değerlendirilmiş ve elde edilen dendrogram Şekil 4.4'de verilmiştir.

SP6 ve SP9 suşlarının dublike kültürleri olan DOO1 ve DOO2'ye dendrogramda %91 oranında benzerlik göstererek birbirlerine yakın mesafede yer almışlardır.

*P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* türü olarak tanımlanan DO2, DO7, DO8, DO9, SP1, SP2, SP3, SP4, SP5, SP9 BDP2, BDP4 ve ITP1 suşları dendrogramda *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSMZ 20271 referans kültürüne %79-91 oranında benzerlikle yakın mesafede yer alırken, DO5 ve ITP3 suşları %84 oranında benzerlikle dendrogramda *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSMZ 20271 referans kültürden uzak mesafede yer almıştır.

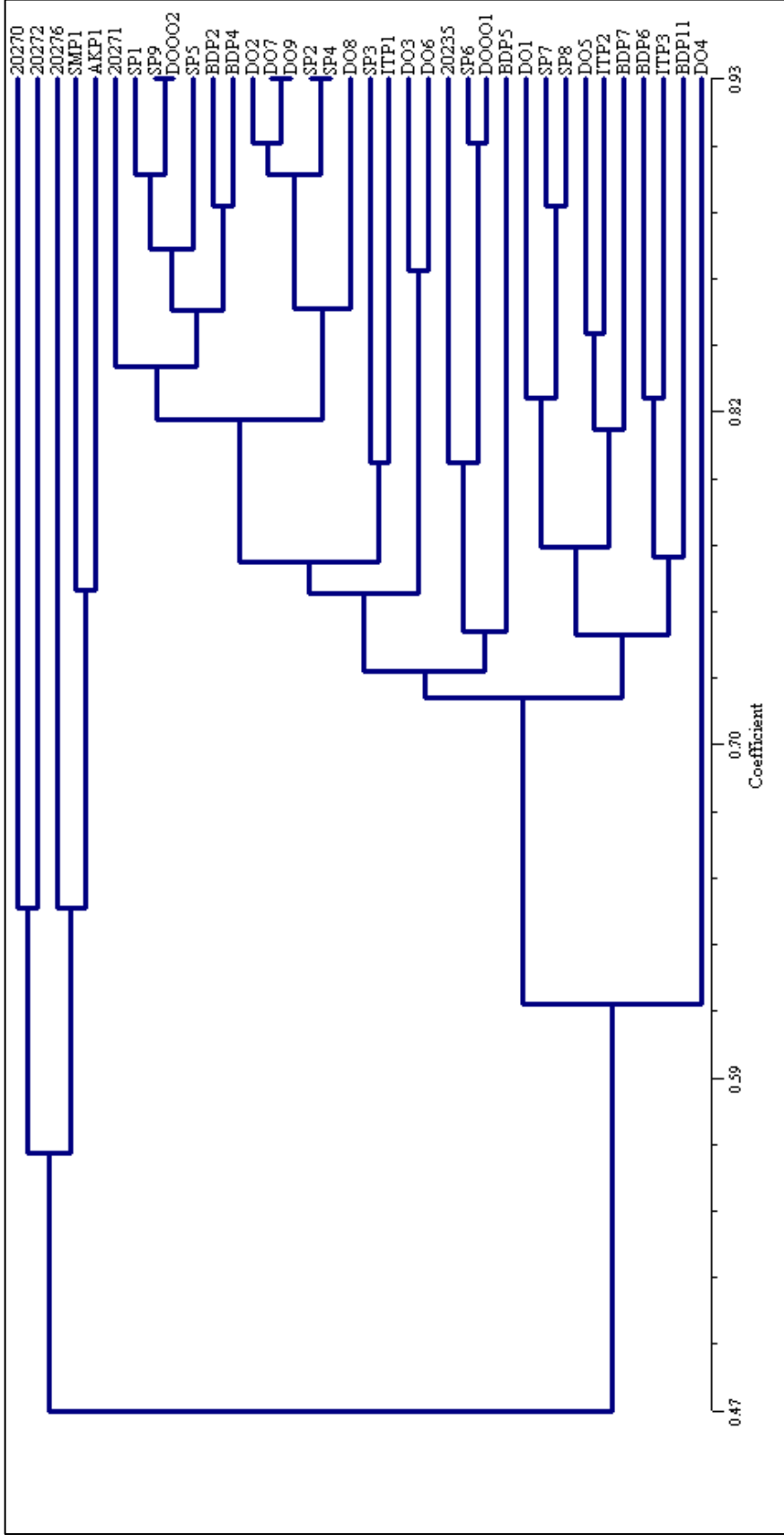
*P. jensenii* türü olarak belirlenen DO1, DO3, DO6, SP6, SP7, SP8, BDP5, BDP6, BDP7, BDP11 ve ITP2 suşları dendrogramda *P. jensenii* DSMZ 20235 referans kültürüne %74-91 oranında benzerlikle yakın mesafede yer alırken, DO4 suşu %61 oranında benzerlikle dendrogramda *P. jensenii* DSMZ 20235 referans kültüründen ayrı bir dalda yer almıştır.

*P. thoenii* türü olarak tanımlanan SMP1 ve AKP1 suşları dendrogramda *P. thoenii* DSMZ 20276 referans kültürüne %75 oranında benzerlikle yakın mesafede yer aldığı gözlenmiştir.

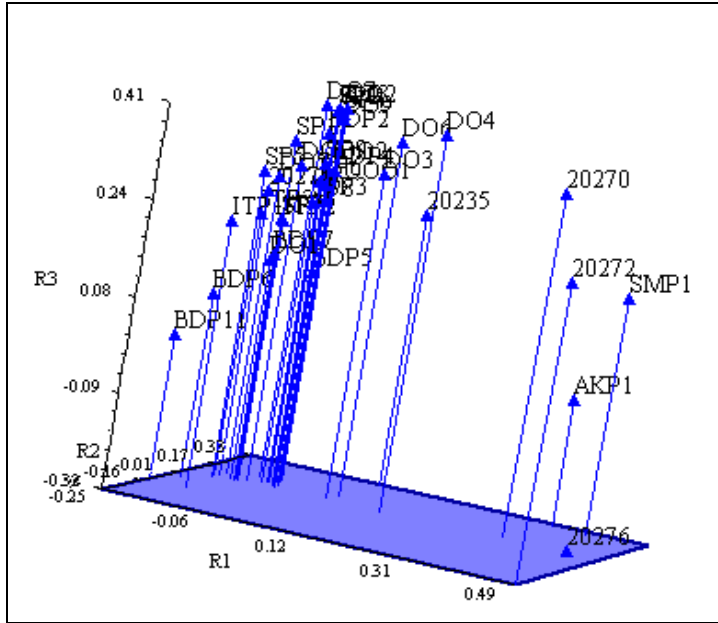
API tanımlamalarından elde edilen sonuçlar, nümerik taksonomi programının (NTSYSpc) Principal Coordinates Analysis (PCA) özelliği kullanılarak değerlendirilmiş ve elde edilen üç boyutlu grafik Şekil 4.5’de verilmiştir. API tanımlamasından elde edilen PCA grafiği incelendiğinde; *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* olarak tanımlanan DO2, DO5, DO7, DO8, DO9, SP1, SP2, SP3, SP4, SP5, SP9, BDP2, BDP4, ITP1 ve ITP3 suşlarının birbirine yakın bir küme etrafında ve *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSMZ 20271 çok yakın yer aldıkları belirlenmiştir. *P. jensenii* olarak tanımlanan DO1, DO3, DO4, DO6, SP6, SP7, SP8, BDP5, BDP6, BDP7, BDP11, ITP2 suşlarının PCA grafiği incelendiğinde de *P. jensenii* DSMZ 20235 referans kültürüne yakın bir küme etrafında yer aldıkları tespit edilmiştir.

API tanımlamalarında *P. thoenii* DSMZ 20276 referans kültüre benzerlik gösteren SMP1 ve AKP1 suşları koordinat analizinde birbirine çok yakın mesafede oldukları bulunmuştur. İzole edilen 29 suş arasında rastlanılmayan *P. acidopropionici* ve *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* türlerinin referans kültürlerinin koordinat analizi incelendiğinde izole edilen suşlardan uzakta ve grafiğin (Şekil 4.5) dışında yer aldıkları tespit edilmiştir.

API tanımlamasından elde edilen dendrogram (Şekil 4.4) ve koordinat analizinden elde edilen PCA grafiği (Şekil 4.5) karşılaştırıldığında sonuçların paralellik gösterdiği gözlenmiştir.



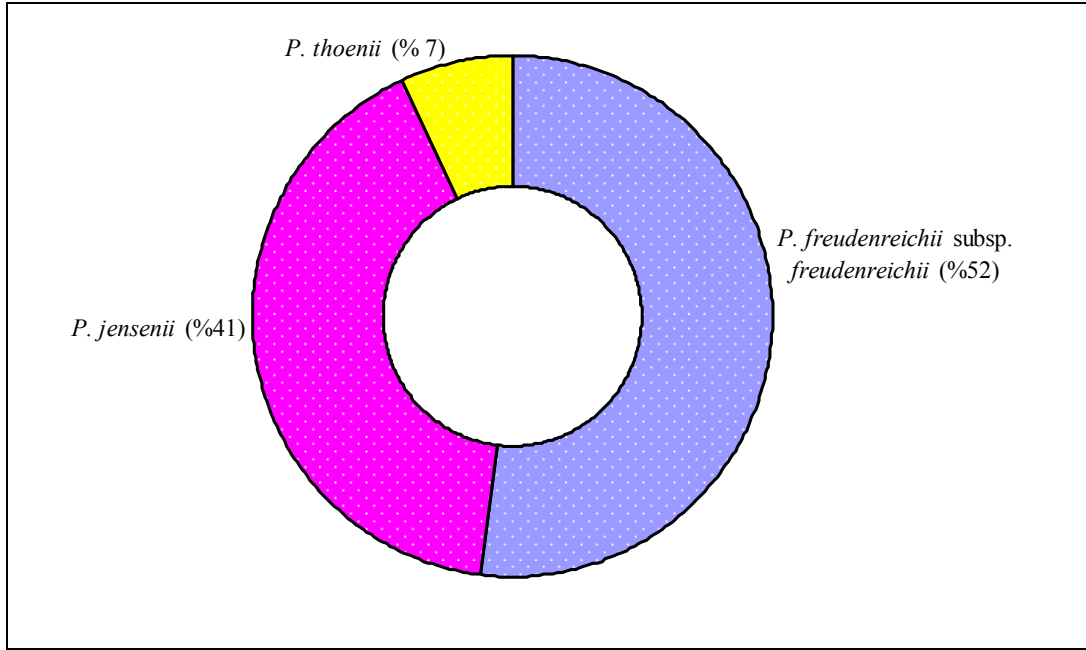
Şekil 4.4. Peynirlerden izole edilen propiyonibakterilerin API 50 CHL, 20E ve 20A kriteri ile tanımlama dendrogramı



Şekil 4.5. API 50 CHL, API 20 E ve API 20 A sonuçlarının PCA ile değerlendirilmesi

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde API ile yapılan tanımlama testlerinin klasik tanımlama testlerine göre daha etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca izole edilen bu suşların tanımlaması TÜBİTAK 107T486 kodlu proje kapsamında 16S ve 23S rRNA analizleri ile doğrulanmıştır.

Sekiz çeşit yöresel peynirden izole edilen 29 suşun tanımlama testleri sonucundaki tür dağılım grafikleri Şekil 4.6'da verilmiştir. Yapılan tanımlama testleri sonucunda %52 oranında dağılımla dominant tür *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* olarak tespit edilmiştir. %41 oranında dağılımla *P. jensenii* türünün ikinci yaygın tür olduğu gözlenmiştir. Her iki tanımlama testleri sonucunda %7 oranında dağılımla en az bulunan türün ise *P. thoenii* olduğu belirlenmiştir. *P. acidopropionici* ve *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* türlerine izole edilen 29 suş arasında rastlanılmamıştır.



Şekil 4.6. Peynirlerden izole edilen propiyonibakterilerin % tür dağılımları

#### 4.5 Propiyonibakterilerin Asit Üretimleri

##### 4.5.1. Nicel asit tayini

Peynirlerden izole edilen 29 izolat ve 5 referans kültürün YEL, skim milk, glukozlu ve laktozlu YEL sıvı besi ortamlarında ürettikleri % asit miktarları Bölüm 3.2.7 (Nicel asit tayini)'de anlatıldığı gibi belirlenmiş olup sonuçları Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Suşların YEL sıvı besi ortamındaki 8 günlük kültürlerinin titre edilebilir yüzde asit miktarları en düşük %0,08 (*P. jensenii* DO3 ve *P. jensenii* BDP6) ve en yüksek % 0,21 (*P. jensenii* ITP2) olarak belirlenmiştir. YEL sıvı besi ortamında, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO5 (%0,16), *P. jensenii* BDP11 (%0,16), *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO7 (%0,15), *P. jensenii* SP8 (%0,15), *P. thoenii* AKP1 (%0,19) ve SMP1 (%0,18) suşlarının yüksek asit ürettikleri gözlenmiştir. Referans kültürlerin titre edilebilir asit üretimleri ise *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSMZ 20271 kültüründe %0,19, *P. thoenii* DSMZ 20276 kültüründe %0,18 ve *P. jensenii* DSMZ 20235 kültüründe %0,14 olarak bulunmuştur

(Şekil 4.7). Suşların 8 günlük kültürlerin son kültür pH'ları da 6,1-6,8 arasında olduğu tespit edilmiştir. YEL sıvı besiortamının başlangıç pH'sı 7,0 olup, inkübasyon sonunda pH 0,2-0,9 arasında düşüş göstermiştir. pH'nın az düşüş göstermesi ile az üretilen yüzde asit miktarı arasında paralellik gözlenmiştir.

Skim milk besi ortamında 8 günlük inkübasyon sonunda en düşük titre edilebilir asit miktarı %0,07 ile *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP4 suşunda belirlenirken, %0,99 ile en yüksek asit üretimi *P. jensenii* BDP5 ve BDP11 suşlarında bulunmuştur. *P. thoenii* AKP1 (%0,42), *P. jensenii* BDP7 (%0,50), *P. jensenii* DO6 (%0,52), *P. jensenii* BDP6 (%0,54), *P. jensenii* DO1 (%0,59), *P. jensenii* DO3 (%0,67), *P. thoenii* SMP1 (%0,70), *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP9 (%0,71) ve *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP2 (%0,76) suşlarının bu besi ortamında asit üretimleri yüksek bulunmuştur (Şekil 4.8). Skim milk sıvı besi ortamının başlangıç pH'sı 6,8 olup, 8 günlük inkübasyon sonunda pH'nın 4,6 ile 6,5 arasında düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. Referans kültürlerin skim milk besi ortamında titre edilebilir asit üretimleri ise *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSMZ 20271'de %0,19, *P. thoenii* DSMZ 20276'da %0,62 ve *P. jensenii* DSMZ 20235'de %0,37 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5). Suşların skim milk besi ortamında ürettikleri asit miktarları YEL sıvı besi ortamı ile karşılaştırıldığında genel olarak daha yüksek bulunmuştur.

İzole edilen suşların tanımlama testlerinde laktoz ve glukozdan asit oluşturduğu tespit edilmiştir. Buna bağlı olarak da suşların asit üretiminin laktozdan mı ya da bunun parçalanması sonucu oluşan glukozdan mı arttığını belirlemek için YEL sıvı besi ortamının bileşiminde bulunan laktat elemine edilerek yerine aynı oranda laktoz ve glukoz ilave edilerek suşların yüzde asit üretimleri belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

Suşların glukozlu YEL sıvı besi ortamında ürettikleri titre edilebilir yüzde asit miktarları belirlendiğinde suşların genel olarak bu ortamda asit üretiminin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Propiyonibakterilerin glukozlu YEL sıvı besi ortamında asit üretiminin % 0,50-0,75 arasında olduğu belirlenmiştir. Glukozlu YEL sıvı besi ortamının pH'sının 8 günlük inkübasyon sonunda 4,5'a kadar düşüş gösterdiği



belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Suşların YEL, skim milk, glukoz ve laktozlu YEL besiyerleride ürettikleri asitin karşılaştırılmalı grafiği Şekil 4.9'da verilmiştir.

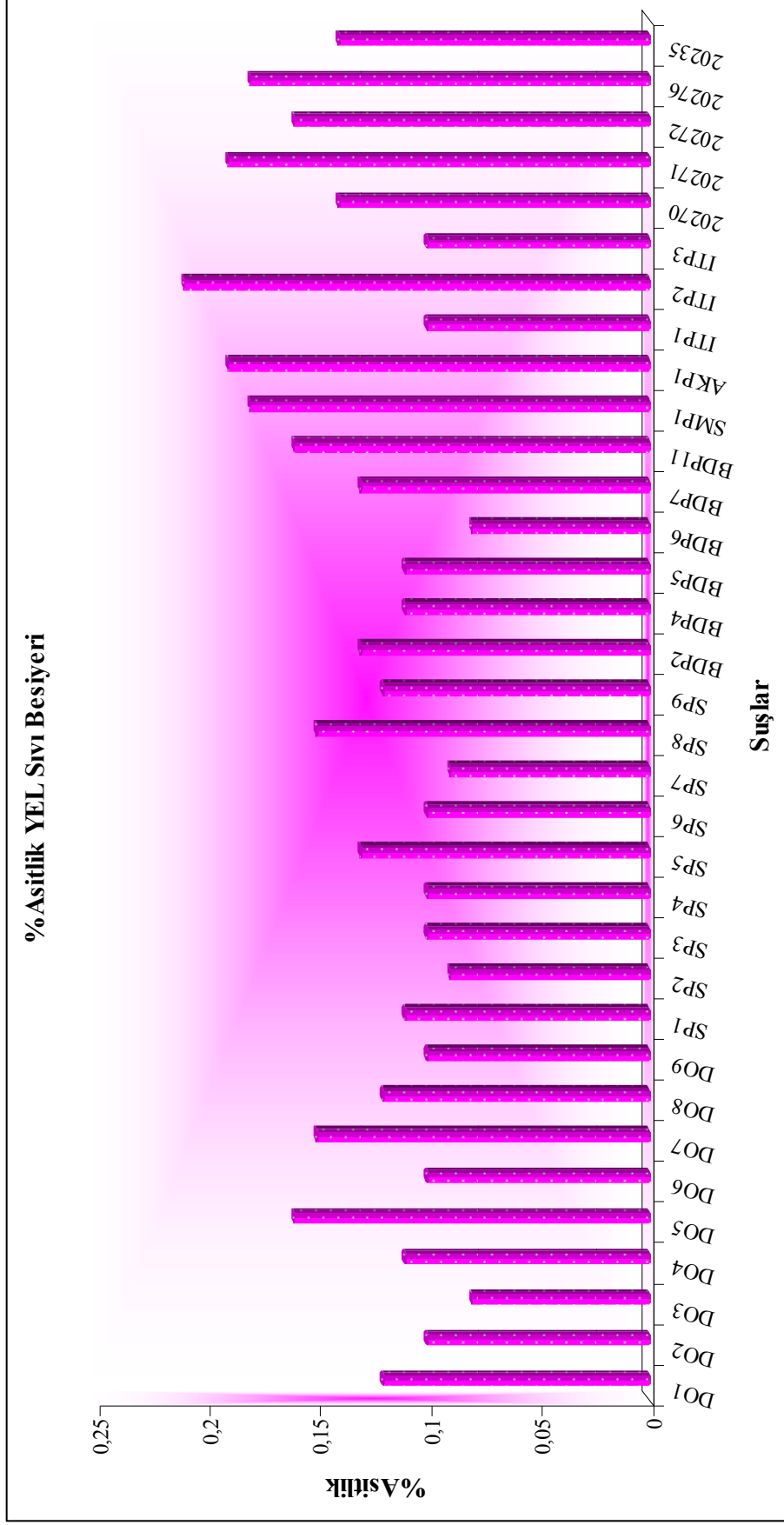
İzole edilen propiyonibakterilerin laktozlu YEL sıvı besi ortamında asit üretiminin ise % 0,10-0,77 arasında olduğu belirlenmiştir. Laktozlu YEL sıvı besi ortamının pH'sının 8 günlük inkübasyon sonunda 4,6'ya kadar düşüş gösterdiği belirlenmiştir. Laktozlu ortamda üretilen asit miktarı glukozlu ortamla karşılaştırıldığında düşük olduğu tespit edilmiştir. Laktozlu ortamda asit üretimi düşük olan suşların (DO2, DO5, DO7, DO8, DO9, SP1, SP2, SP3, SP4, SPP5, SP9, BDP2, BDP4, ITP1, ITP3) laktoz fermentasyonu yapamayan *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* türüne ait oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.9). Tüm suşların glukozlu YEL ortamında YEL, skim milk ve laktozlu YEL ortamlarına göre daha yüksek asit ürettiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.5. Propiyonibakterilerin YEL, Skim Milk, Glukozlu ve Laktozlu YEL sıvı besiyortamlarında ürettikleri % asit miktarları ve son kültür pH'ları

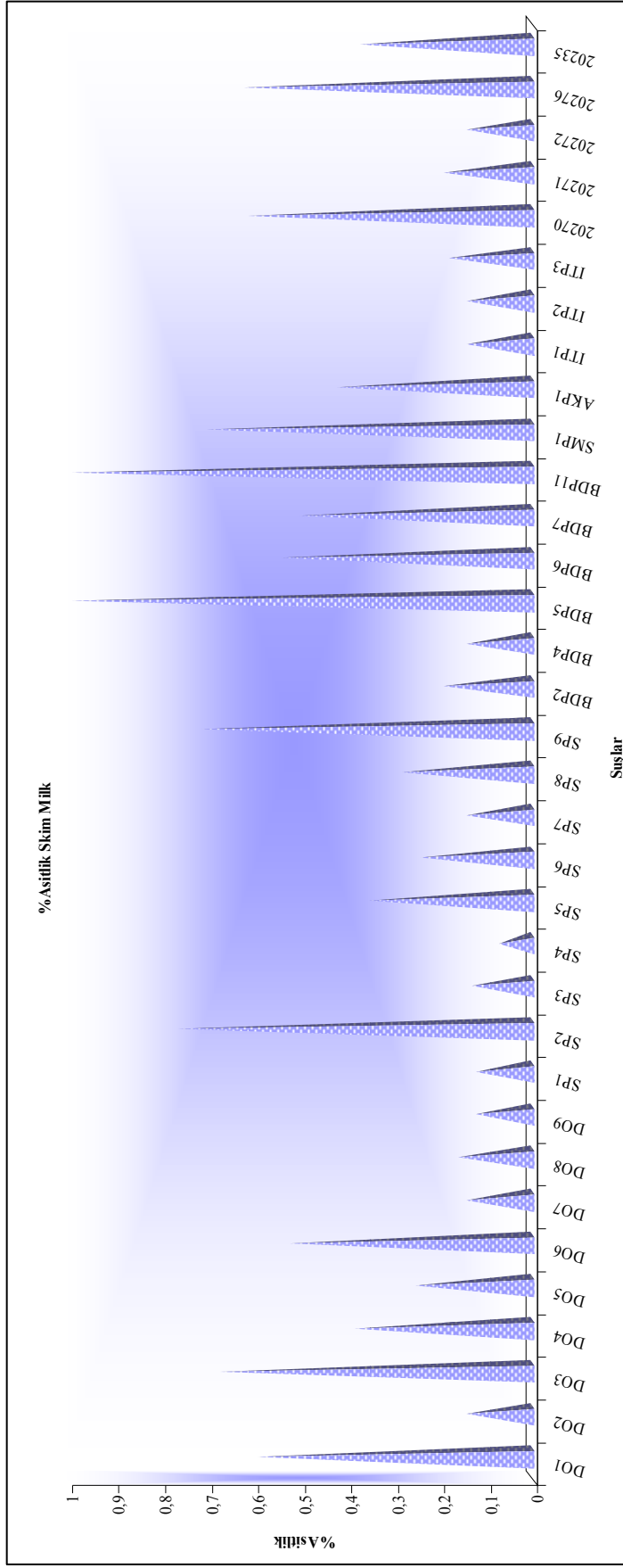
No	Suş Kodu	YEL			Skim Milk		Glukozlu YEL		Laktozlu YEL	
		pH	%Asit		pH	%Asit	pH	% Asit	pH	% Asit
1	DO1	6,4±0,1	0,12±0,0		4,9±0,0	0,59±0,0	4,8±0,1	0,62±0,0	4,7±0,0	0,77±0,0
2	DO2	6,4±0,0	0,10±0,0		6,0±0,3	0,14±0,0	4,9±0,1	0,72±0,1	6,1±0,2	0,25±0,0
3	DO3	6,5±0,1	0,08±0,0		5,0±0,2	0,67±0,0	4,8±0,0	0,74±0,0	4,7±0,0	0,77±0,0
4	DO4	6,1±0,1	0,11±0,0		5,1±0,0	0,38±0,1	4,8±0,0	0,73±0,0	4,8±0,0	0,76±0,1
5	DO5	6,2±0,1	0,16±0,0		6,1±0,1	0,25±0,0	4,9±0,0	0,50±0,0	6,8±0,0	0,20±0,0
6	DO6	6,3±0,7	0,10±0,0		5,1±0,1	0,52±0,0	4,8±0,0	0,65±0,0	4,7±0,0	0,74±0,0
7	DO7	6,2±0,1	0,15±0,0		5,9±0,0	0,14±0,1	4,9±0,1	0,65±0,0	6,8±0,0	0,20±0,0
8	DO8	6,3±0,2	0,12±0,0		6,0±0,0	0,16±0,0	4,9±0,1	0,60±0,0	6,8±0,0	0,14±0,0
9	DO9	6,8±0,1	0,10±0,0		6,4±0,1	0,12±0,0	5,0±0,0	0,62±0,0	6,8±0,0	0,14±0,0
10	SP1	6,6±0,0	0,11±0,0		6,5±0,1	0,12±0,0	4,8±0,0	0,71±0,0	6,2±0,0	0,26±0,0
11	SP2	6,7±0,1	0,09±0,0		5,9±0,5	0,76±0,0	5,0±0,0	0,62±0,0	6,1±0,1	0,23±0,0
12	SP3	6,6±0,0	0,10±0,0		6,5±0,0	0,13±0,0	4,9±0,0	0,67±0,1	5,9±0,0	0,20±0,2
13	SP4	6,7±0,2	0,10±0,0		6,5±0,1	0,07±0,0	5,0±0,0	0,68±0,0	5,9±0,0	0,30±0,0
14	SP5	6,1±0,0	0,13±0,1		5,8±0,1	0,35±0,0	5,8±0,6	0,56±0,1	4,9±0,1	0,16±0,0
15	SP6	6,6±0,0	0,10±0,0		5,8±0,0	0,24±0,0	5,2±0,0	0,57±0,1	4,9±0,1	0,55±0,0
16	SP7	6,7±0,0	0,09±0,0		5,7±0,0	0,14±0,0	4,5±0,0	0,72±0,0	4,7±0,0	0,45±0,0
17	SP8	6,1±0,1	0,15±0,0		5,5±0,2	0,28±0,1	4,9±0,1	0,61±0,0	5,1±0,3	0,55±0,0
18	SP9	6,4±0,1	0,12±0,0		5,0±0,0	0,71±0,1	5,1±0,0	0,64±0,0	6,4±0,2	0,14±0,0
19	BDP2	6,1±0,0	0,13±0,0		5,9±0,1	0,19±0,0	5,0±0,0	0,69±0,0	6,8±0,0	0,19±0,0
20	BDP4	6,4±0,0	0,11±0,0		6,0±0,0	0,14±0,0	4,9±0,0	0,70±0,0	6,8±0,0	0,10±0,0
21	BDP5	6,5±0,1	0,11±0,0		4,7±0,1	0,99±0,0	5,0±0,0	0,65±0,0	4,9±0,0	0,57±0,0
22	BDP6	6,6±0,0	0,08±0,0		5,5±0,1	0,54±0,1	5,0±0,1	0,64±0,0	4,9±0,1	0,53±0,0
23	BDP7	6,3±0,3	0,13±0,1		5,1±0,0	0,50±0,0	4,9±0,0	0,63±0,0	4,9±0,0	0,55±0,0

Çizelge 4.5 (Devam) Propiyonibakterilerin YEL, Skim Milk, Glukozlu ve Laktozlu YEL sıvı besiyortamlarında ürettikleri % asit miktarları ve son kültür pH'ları

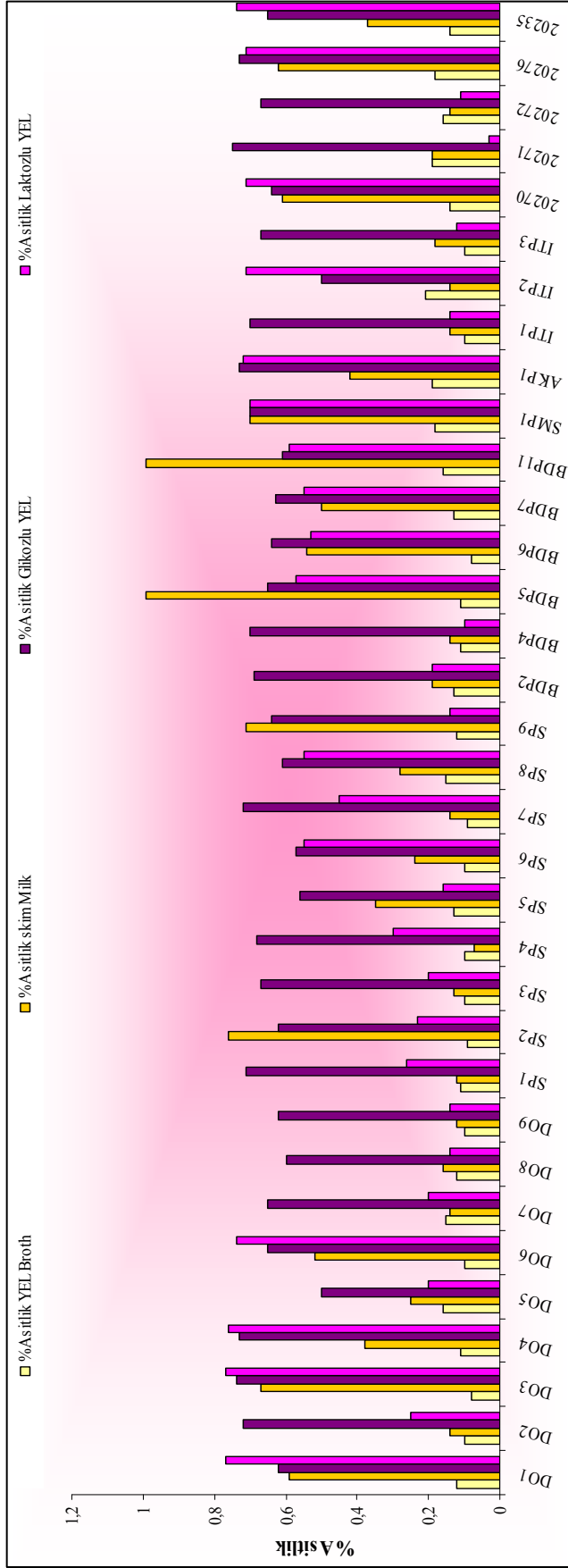
No	Suş Kodu	YEL		Skim Milk		Glukozlu YEL		Laktozlu YEL	
		pH	%Asit	pH	%Asit	pH	% Asit	pH	% Asit
24	BDP11	6,2±0,2	0,16±0,0	4,6±0,0	0,99±0,0	4,9±0,0	0,61±0,0	4,6±0,0	0,59±0,0
25	SMP1	6,1±0,0	0,18±0,0	5,1±0,3	0,70±0,4	4,6±0,0	0,70±0,0	4,6±0,1	0,70±0,0
26	AKP1	6,1±0,1	0,19±0,0	5,2±0,0	0,42±0,0	4,6±0,0	0,73±0,0	4,6±0,1	0,72±0,0
27	ITP1	6,5±0,1	0,10±0,0	6,0±0,0	0,14±0,0	4,9±0,0	0,70±0,0	6,8±0,1	0,14±0,0
28	ITP2	6,5±0,2	0,21±0,0	6,0±0,2	0,14±0,0	4,7±0,0	0,50±0,0	6,6±0,1	0,71±0,0
29	ITP3	6,6±0,1	0,10±0,0	5,8±0,0	0,18±0,0	4,5±0,0	0,67±0,0	6,5±0,0	0,12±0,0
30	20270	6,3±0,9	0,14±0,0	5,3±0,1	0,61±0,1	4,9±0,0	0,64±0,0	6,4±0,0	0,71±0,0
31	20271	6,4±0,0	0,19±0,0	6,0±0,0	0,19±0,0	4,8±0,0	0,75±0,0	6,8±0,0	0,03±0,0
32	20272	6,1±0,1	0,16±0,0	5,9±0,1	0,14±0,0	4,9±0,0	0,67±0,0	6,8±0,0	0,11±0,0
33	20276	6,2±0,1	0,18±0,0	4,9±0,0	0,62±0,0	4,6±0,0	0,73±0,0	4,6±0,1	0,71±0,0
34	20235	6,4±0,1	0,14±0,0	5,3±0,0	0,37±0,0	4,5±0,0	0,65±0,1	4,7±0,0	0,74±0,0



Şekil 4.7. Propiyonibakterilerin YEL sıvı besiyerinde % asit üretimleri



Şekil 4.8. Propiyonibakterilerin skim milk besiyerinde % asit üretimleri



Şekil 4.9. Propiyonibakterilerin YEL, Skım Milk, Glukozlu ve Laktozlu YEL sıvı besiortamlarında % asit üretimleri

#### 4.5.2. Nitel asit üretimi

Türkiye'nin geleneksel peynirlerinden izole edilen propiyonibakteri, suşlarının ürettikleri titre edilebilir asit miktarları YEL, skim milk, glukozlu ve laktozlu YEL sıvı besiortamlarında Bölüm 3.2.7 (Nitel asit tayini)'de anlatıldığı gibi belirlenmiştir. Suşların nitel asit üretimleri Çizelge 4.6 ve Şekil 4.10'da verilmiştir.

*P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP1 suşu, glukozlu YEL katı besi ortamında 83,8 mm zon çapı ile en yüksek asit üretimi göstermiştir. Bu suşun YEL (%0,11) ve glukozlu YEL (%0,71) sıvı besi ortamlarında da titre edilebilir asit miktarının yüksek olduğu görülmüştür. Skim milk besiyerinde titre edilebilir asit miktarı (% 0,99) yüksek olan *P. jensenii* BDP11, laktozlu YEL katı besi ortamında 83,0 mm zon çapı ile asit üretiminin yüksek olduğu görülmüştür.

YEL, skim milk, glukozlu ve laktozlu YEL sıvı besiyeri ortamlarının hepsinde titre edilebilir asit miktarı yüksek olan *P. jensenii* DO1, DO3, DO4, DO6, SP6, BDP5, BDP7, BDP11 ve *P. thoenii* SMP1, AKP1 suşlarının glukozlu ve laktozlu YEL katı ortamlarında da asit üretimlerinin yüksek olduğu görülmüştür. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO8 ve *P. thoenii* SMP1 suşlarının glukozlu ve laktozlu YEL katı besiortamlarında asit üretimleri Resim 4.8 ve 4.9'da gösterilmiştir. Suşların sodyum laktat ve bromkresol purple içeren kontrol YEL katı besiortamında pH değişimine bağlı olarak sarı renkli zonların hiçbir suşda oluşmadığı gözlenmiştir (Resim 4.10). Suşların bu besiyerinin sıvı ortamında da asit üretimlerinin düşük ve son kültür pH'larının yüksek olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Suşların petride nitel asit üretim değerleri değerlendirildiğinde *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* türü olarak tanımlanan ve laktozu fermente edemeyen DO2 (12,2 mm), DO5 (19,9 mm), DO7 (9,2 mm), DO8 (26,9), DO9 (15,3 mm), SP1 (16,5 mm), SP4 (19,0 mm), ITP1 (19,7 mm) suşlarının spot ekimlerinin etrafında inkübasyondan sonra sarı renkli zonlar olduğu gözlenmiştir. Ancak bu zon çaplarının laktozu fermente edebilen *P. jensenii* ile *P. thoenii* türlerinin zon çapları ile kıyaslandığında düşük olduğu tespit edilmiştir. *P. freudenreichii* subsp.

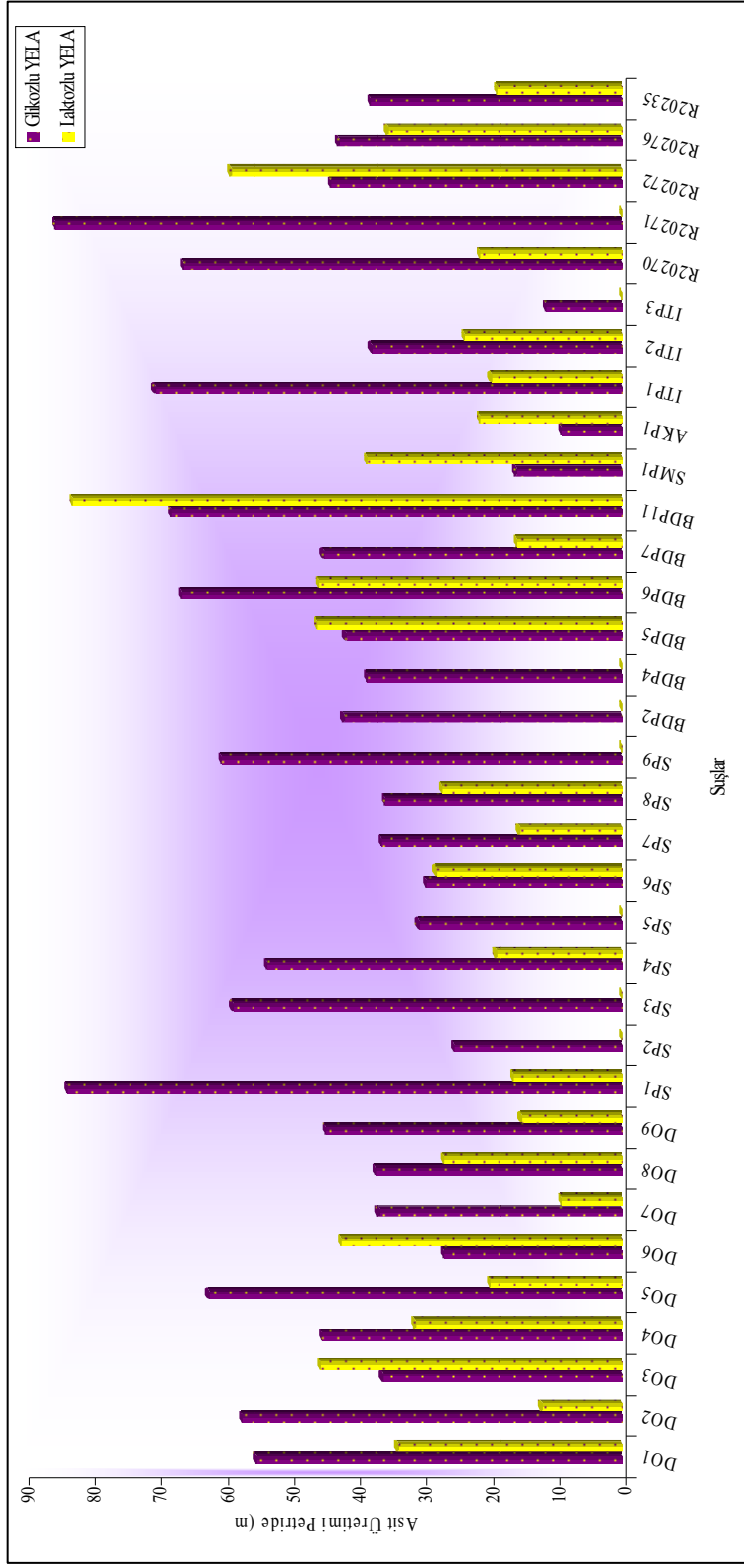
*freudenreichii* DO2, DO5, DO7, DO8, DO9, SP1, SP4 ve ITP1 suşlarının laktozlu YEL sıvı besi ortamında az miktarda da olsa (%0,14-0,30) asit üretebildiği belirlenmiştir. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSMZ 20271 referans kültürü glukozlu YEL katı besiyerinde spot ekimlerin etrafında 85,6 mm'lik zon gösterirken, laktozlu YEL katı besiyerinde zon göstermemiştir. Peynirlerden izole edilen *P. jensenii* izolatlarının glukozlu ve laktozlu YEL katı ortamlarında spot ekimler etrafında gösterdiği sarı renkli zon çaplarının bu türün referans kültürü olan *P. jensenii* DSMZ 20235'den yüksek olduğu tespit edilmiştir.



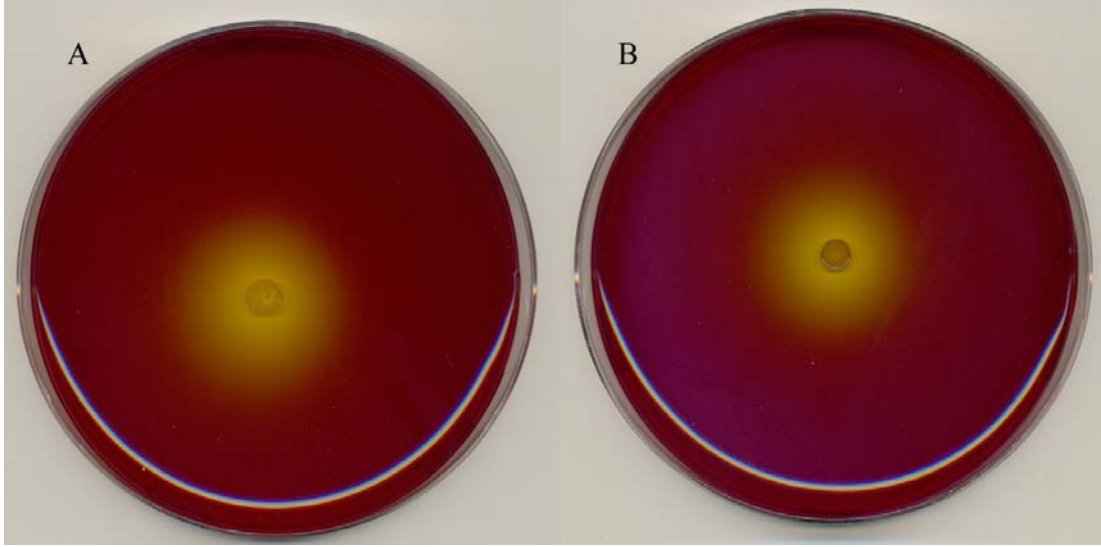
Çizelge 4.6. Propiyonibakteri suşlarının bromcresolpurble agarda nitel asit üretimleri (mm)

No	Suşlar	YEL Agar	Glukozlu YEL Agar	Laktozlu YEL Agar
1	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DO2	-	57,3	12,2
2	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DO5	-	62,4	19,9
3	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DO7	-	36,8	09,2
4	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DO8	-	37,1	26,9
5	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DO9	-	44,8	15,3
6	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP1	-	83,8	16,5
7	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP2	-	25,4	-
8	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP3	-	58,7	-
9	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP4	-	53,6	19,0
10	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP5	-	30,7	-
11	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP9	-	60,4	-
12	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> BDP2	-	42,0	-
13	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> BDP4	-	38,4	-
14	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> ITP1	-	70,5	19,7
15	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> ITP3	-	11,5	-
16	<i>P. jensenii</i> DO1	-	55,2	33,9
17	<i>P. jensenii</i> DO3	-	36,2	45,6
18	<i>P. jensenii</i> DO4	-	45,3	31,3
19	<i>P. jensenii</i> DO6	-	27,0	42,4
20	<i>P. jensenii</i> SP6	-	29,6	28,1
21	<i>P. jensenii</i> SP7	-	36,3	15,6
22	<i>P. jensenii</i> SP8	-	35,9	27,2
23	<i>P. jensenii</i> BDP5	-	41,7	46,1
24	<i>P. jensenii</i> BDP6	-	66,4	45,8
25	<i>P. jensenii</i> BDP7	-	45,1	16,0
26	<i>P. jensenii</i> BDP11	-	68,0	83,0
27	<i>P. thoenii</i> SMP1	-	16,1	38,5
28	<i>P. thoenii</i> AKP1	-	09,2	21,5
29	<i>P. jensenii</i> ITP2	-	37,8	23,8
30	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> DSMZ 20270*	-	66,2	21,5
31	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DSMZ 20271*	-	85,6	-
32	<i>P. acidopropionici</i> DSMZ 20272*	-	44,0	59,0
33	<i>P. thoenii</i> DSMZ 20276*	-	42,8	35,5
34	<i>P. jensenii</i> DSMZ 20235*	-	38,0	18,9

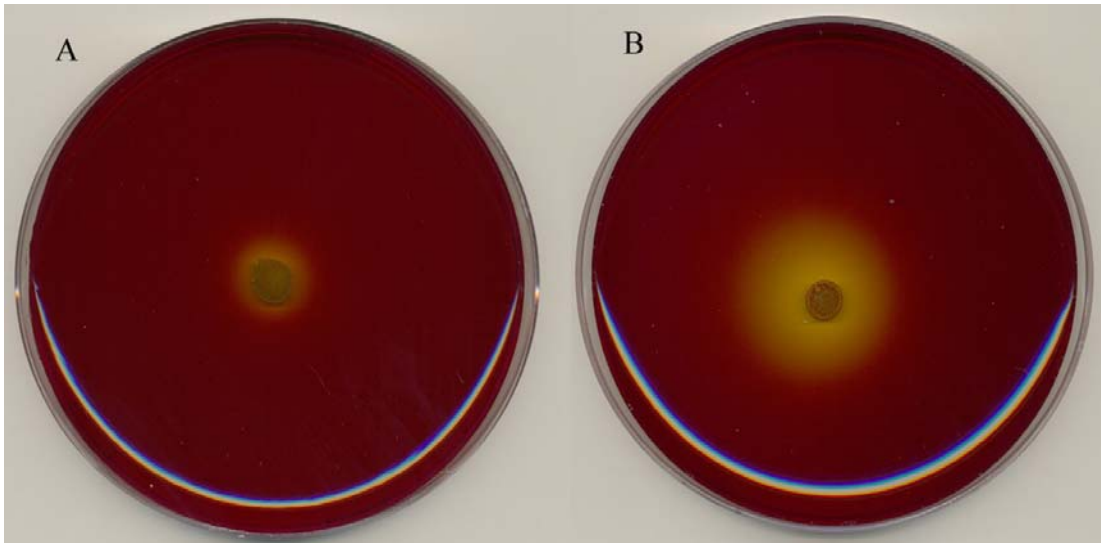
\* : Referans kültürler. -: asit üretimi yok



Şekil 4.10. Propiyonibakterilerin bromkresolpurple agarda nitel asit üretimleri (mm)



Resim 4.8. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO8 suşunun glukozlu (A) ve (B) laktozlu YEL agar ortamlarında asit üretimleri.



Resim 4.9. *P. thoenii* SMP1 suşunun glukozlu (A) ve laktozlu (B) YEL agar ortamlarında asit üretimleri



Resim 4.10. Sodyum laktatlı YEL katı besi ortamında zon oluşturmayan *P. jensenii* SP8 suşu

#### 4.5.3. Propiyonibakterilerin HPLC analizi ile propiyonik, asetik ve laktik asit üretimleri

Çalışmada YEL ve skim milk sıvı besi ortamlarında titre edilebilir asit miktarı yüksek olan *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO8, SP2, SP9, ITP1, *P. jensenii* DO1, DO3, DO4, DO6, BDP5, BDP7, BDP11, *P. thoenii* AKP1 suşları ile referans kültür olarak kullanılan *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* DSMZ 20270, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSMZ 20271, *P. freudenreichii* subsp. *acidopropionici* DSMZ 20272, *P. thoenii* DSMZ 20276 ve *P. jensenii* DSMZ 20235 kültürlerinin ürettikleri asitin türü ve miktarı HPLC analizi ile Bölüm 3.2.7 (Propiyonibakterilerin HPLC analizi ile propiyonik, asetik ve laktik asit tayini)'de anlatıldığı gibi belirlenmiştir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.11).

Skim milk de geliştirilen *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSMZ 20271 dışında, YEL ve skim milk sıvı besi ortamlarında geliştirilen suşlarda laktik asit

üretimi tespit edilmemiştir. YEL sıvı besiyerinde, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO8 suşunda yüksek miktarda propiyonik ve asetik asit (6,4 ve 9,2 mg/ml) tespit edilirken, *P. jensenii* DO6 suşunda düşük propiyonik asit (1,2 mg/ml), *P. thoenii* AKP1 suşunda ise düşük asetik asit (2,3 mg/ml) belirlenmiştir. Laktozu fermente edemeyen *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO8 suşunun skim milk sıvı besi ortamında propiyonik ve asetik asit üretiminin düşük olduğu (0,9 ve 1,0 mg/ml sırasıyla), laktozu fermente eden *P. jensenii* DO6 suşunun ise skim milk besi ortamında propiyonik asit (3,8 mg/ml) üretimin yüksek olduğu tespit edilmiştir. YEL sıvı besi ortamında *P. jensenii* BDP11 suşunda yüksek propiyonik asit (4,8 mg/ml) ve asetik asit (6,7 mg/ml) ürettiği gözlenmiştir.

Skim milk besiyerinde ise yüksek asetik asit miktarı *P. jensenii* DO6 suşunda (3,3 mg/ml) (Şekil 4.12), yüksek propiyonik asit miktarı ise *P. jensenii* DO4 suşunda (4,8 mg/ml) tespit edilmiştir (Şekil 4.13). Skim milk besi yerinde en düşük asetik asit üretimi *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP2 suşunda (0,7 mg/ml) (Şekil 4.14), propiyonik asit üretimi ise *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP9 suşunda 0,1 mg/ml olarak belirlenmiştir. Laktozu fermente edebilen *P. jensenii* DO4 suşunun skim milk besi ortamında propiyonik asit üretiminin yüksek olduğu gözlemlenirken bu suşun YEL sıvı besi ortamında propiyonik asit üretiminin düştüğü tespit edilmiştir. Laktoz fermentasyonu yapamayan *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP9 suşunun YEL sıvı besi ortamındaki propiyonik asit üretiminin ve *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP2 suşunun ise asetik asit üretiminin laktoz ihtiva eden skim milk besi ortamına göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Laktozu fermente edemeyen *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO8, SP2, SP9 ve ITP1 suşlarının, hem asetik asit hem de propiyonik asit üretim miktarları YEL sıvı besiyerinde skim milk besiyerine göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Peynirlerinden izole edilen *P. jensenii* DO1, DO3, DO4, DO6, BDP5, BDP7 ve BDP11 izolatlarının propiyonik ve asetik asit üretimlerinin bu türün referans kültürü olan *P. jensenii* DSMZ 20235'den daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. *P. thoenii* AKP1 suşunun HPLC analizi ile tespit edilen propiyonik ve asetik asit üretimlerinin bu türün referans kültürü olan *P. thoenii* DSMZ 20276'dan düşük olduğu

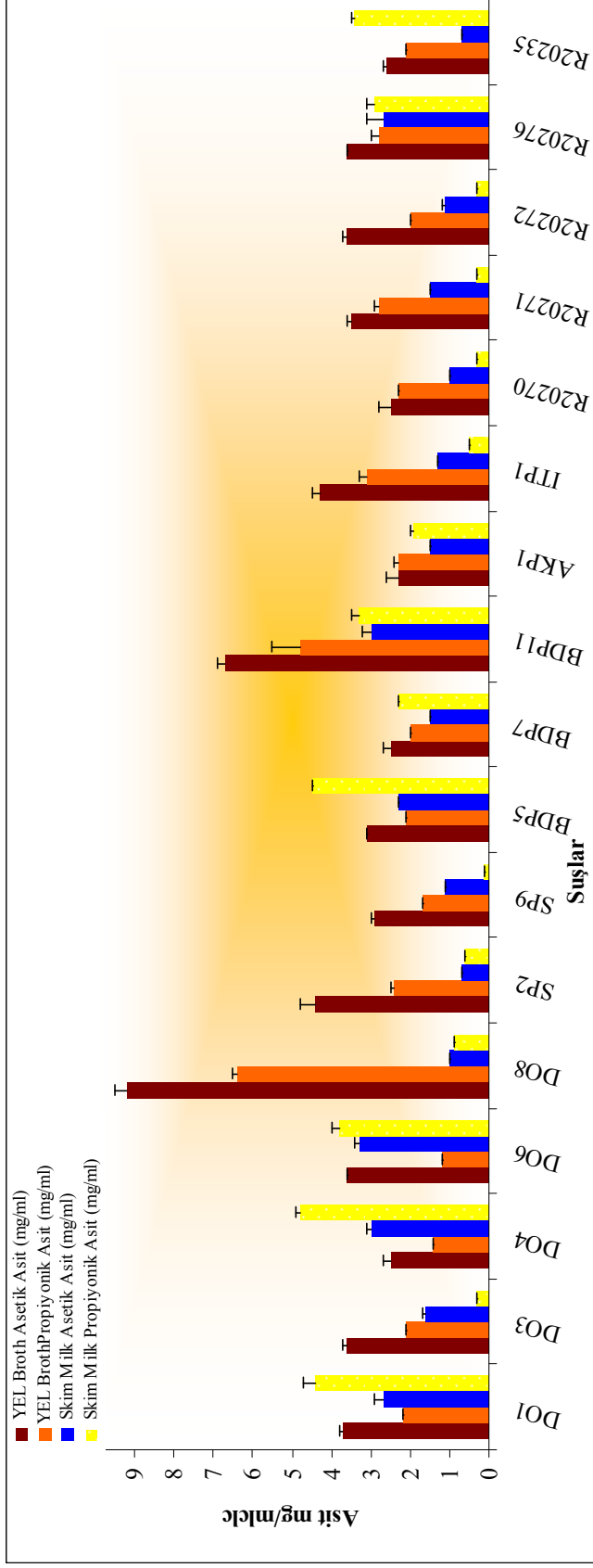
belirlenmiştir. HPLC analizi ile belirlenen bu asit üretim sonuçlarının nitel ve nicel asit analizinden elde edilen sonuçlara paralellik göstermiştir.

Çizelge 4.7. Propiyonibakterilerin asit üretimlerinin HPLC analiz sonuçları

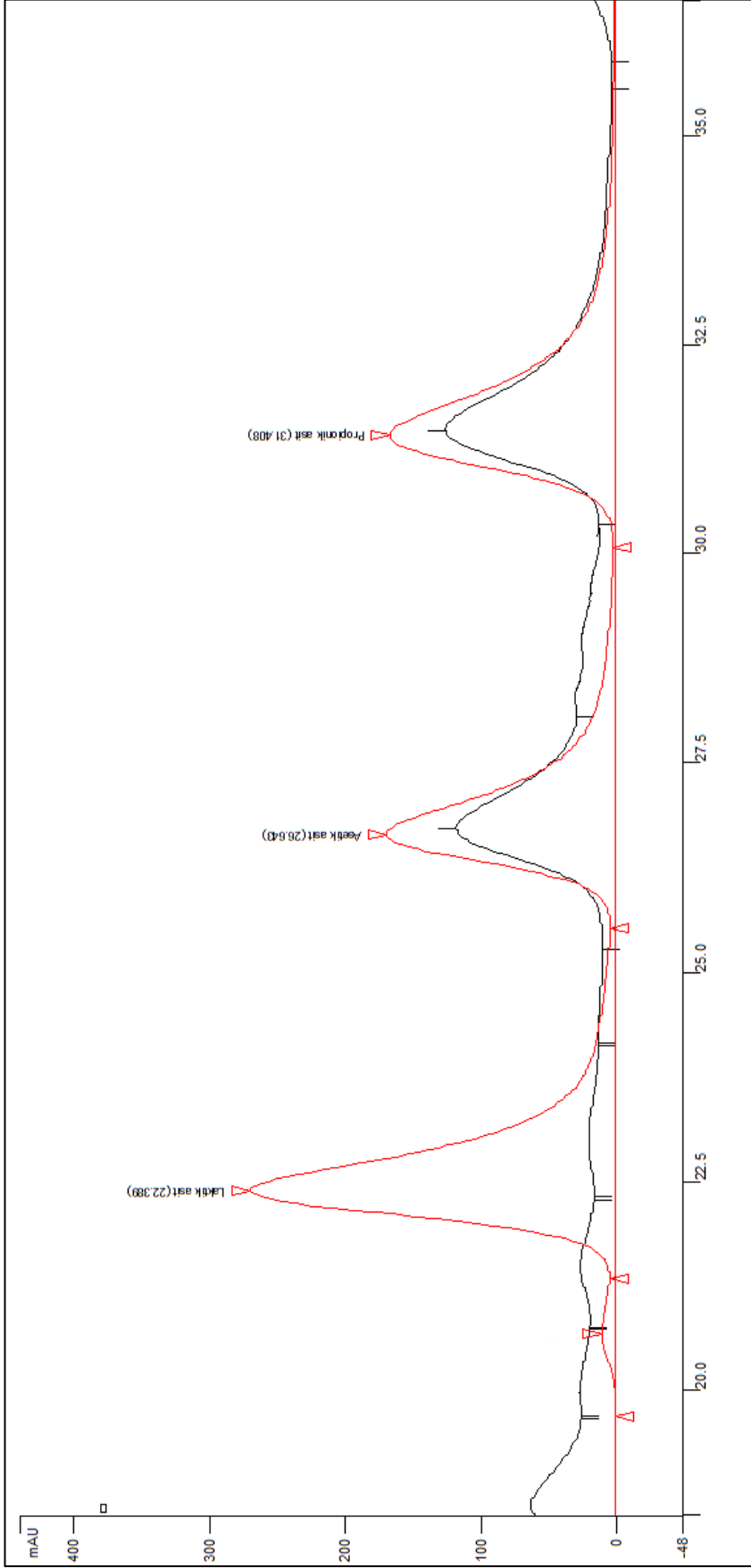
Suş Kodu	YEL			Skim Milk		
	Laktik Asit (mg/ml)	Asetik Asit (mg/ml)	Propiyonik Asit (mg/ml)	Laktik Asit (mg/ml)	Asetik Asit (mg/ml)	Propiyonik Asit (mg/ml)
DO1	t.e	3,7±0,1	2,2±0,0	t.e	2,7±0,2	4,4±0,3
DO3	t.e	3,6±0,1	2,1±0,0	t.e	1,6±0,1	0,3±0,0
DO4	t.e	2,5±0,2	1,4±0,0	t.e	3,0±0,1	4,8±0,1
DO6	t.e	3,6±0,0	1,2±0,0	t.e	3,3±0,1	3,8±0,2
DO8	t.e	9,2±0,3	6,4±0,1	t.e	1,0±0,0	0,9±0,0
SP2	t.e	4,4±0,4	2,4±0,1	t.e	0,7±0,0	0,6±0,0
SP9	t.e	2,9±0,1	1,7±0,0	t.e	1,1±0,0	0,1±0,0
BDP5	t.e	3,1±0,0	2,1±0,0	t.e	2,3±0,0	4,5±0,0
BDP7	t.e	2,5±0,2	2,0±0,0	t.e	1,5±0,0	2,3±0,0
BDP11	t.e	6,7±0,2	4,8±0,7	t.e	3,0±0,2	3,3±0,2
AKP1	t.e	2,3±0,3	2,3±0,1	t.e	1,5±0,0	1,9±0,1
ITP1	t.e	4,3±0,2	3,1±0,2	t.e	1,3±0,0	0,5±0,0
20270*	t.e	2,5±0,3	2,3±0,0	t.e	1,0±0,0	0,3±0,0
20271*	t.e	3,5±0,1	2,8±0,1	0,36±0,0	1,5±0,0	0,28±0,0
20272*	t.e	3,6±0,1	2,0±0,0	t.e	1,1±0,1	0,3±0,0
20276*	t.e	3,6±0,0	2,8±0,2	t.e	2,7±0,4	2,9±0,2
20235*	t.e	2,6±0,1	2,1±0,0	t.e	0,7±0,0	3,4±0,1

t.e: tespit edilemedi

\*: Refrans kültürler.

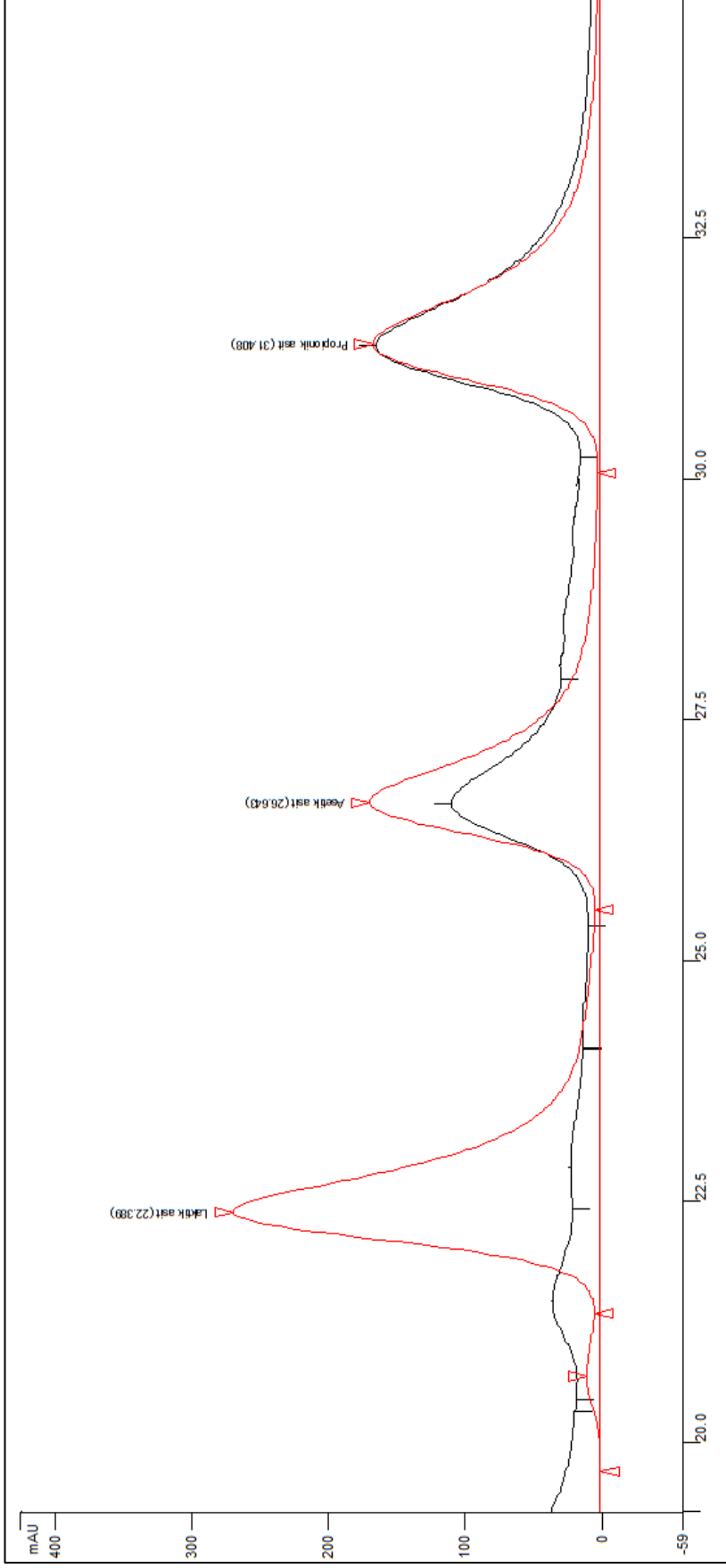


Şekil 4.11. Propiyonibakterilerin YEL ve skim milk sıvı besi ortamlarında propiyonik ve asetik asit üretimleri

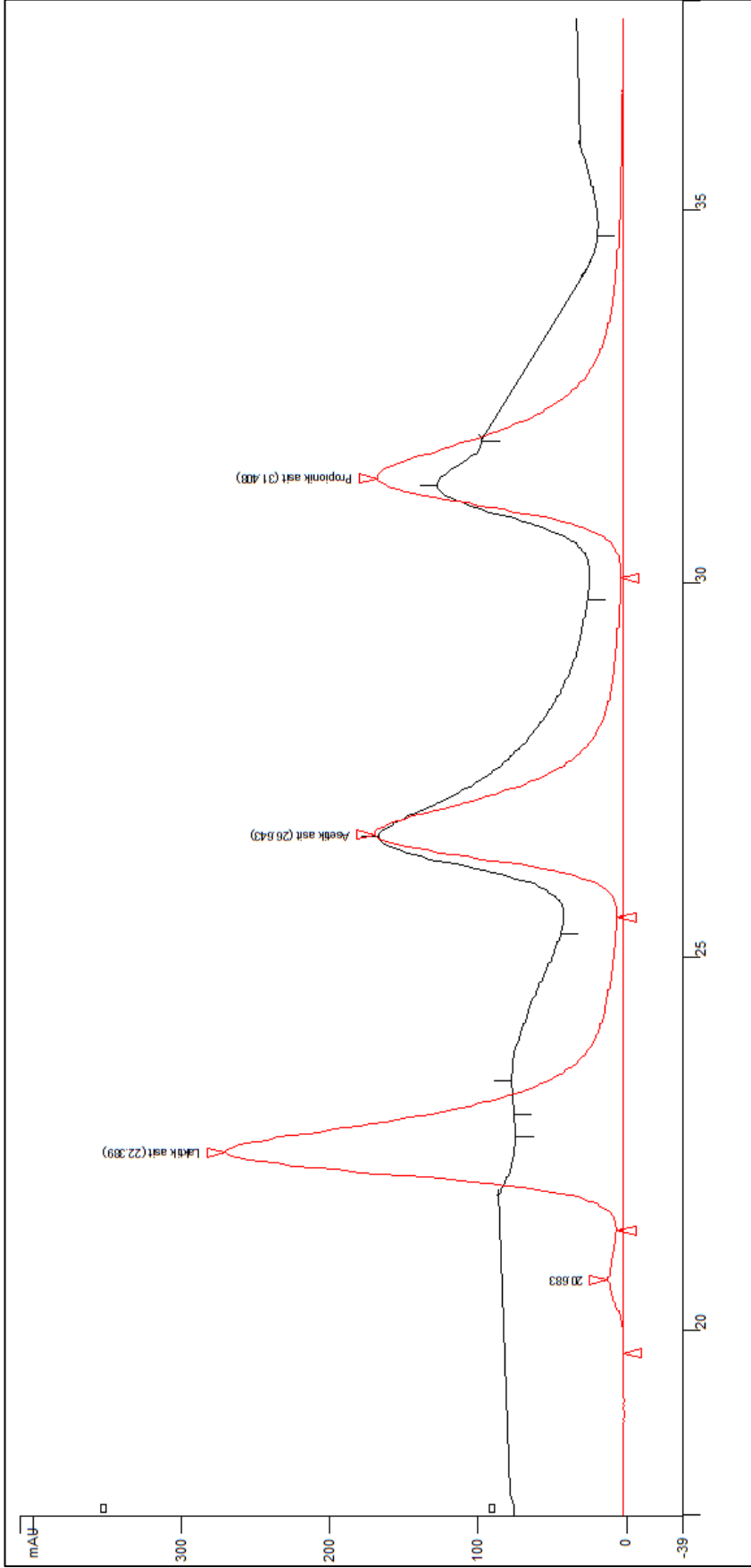


Şekil 4.12. *P. jensenii* DO6 suşunun skim milk besiyerindeki laktik, asetik ve propiyonik asit üretim kromatogramı (Kırmızı pik: Standart, Siyah pik: DO6)





Şekil 4.13. *P. jensenii* DO4 suşunun skim milk besiyerindeki laktik, asetik ve propiyonik asit üretim kromatogramı (Kırmızı pik: Standart, Siyah pik: DO4)



Şekil 4.14. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP2 suşunun YEL sıvı besiyerindeki laktik, asetik ve propiyonik asit üretim kromatogramı (Kırmızı pik: Standart, Siyah pik: SP2)

#### 4.6. Propiyonibakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri

Probiyotik olarak kullanımı araştırılan mikroorganizmaların sahip olması gereken en önemli özelliklerden biri de patojen mikroorganizmaları inhibe etme özelliğidir. Bu nedenle çalışmada Türkiye'nin geleneksel peynirlerinden izole edilen 29 adet propiyonibakteri suşları ile 5 referans kültürün gıda veya bağırsakta patojen olan bazı mikroorganizmalar (*Escherichia coli* ATCC 11229, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Bacillus cereus* RSKK 863, *Shigella sonnei* Mu:57, *Micrococcus luteus* NRLL B-4375 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) üzerine inhibisyon etkileri Bölüm 3.2.8'de anlatıldığı gibi belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Propiyonik asit bakterilerinin YEL sıvı besi ortamında geliştirilen kültür supernatantları antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanıldığında test bakterilerine karşı herhangi bir antimikrobiyal aktivite tespit edilememiştir. Modifiye Skim milk besi ortamında ise suşların antimikrobiyal aktivite gösterdikleri görülmüştür. Skim milk besi ortamında suşların son kültür pH'larının 4,0 ile 5,5 arasında olduğu belirlenmiştir.

Genel olarak sonuçlar değerlendirildiğinde;

*P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP1, SP2 ve SP3 suşları dışında izole edilen tüm suşların (%91) *E. coli* ATCC 11229 test bakterisine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. *P. jensenii* DO1 suşunun *E. coli* ATCC 11229 suşu üzerine gösterdiği inhibisyon etkisi Resim 4.11 (A) 'da gösterilmiştir.

Suşların % 56'sının *E. coli* ATCC 35218 suşuna karşı inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenirken, bu etki en yüksek, 8,5 mm inhibisyon zon çapı ile *P. thoenii* SMP1 suşunda belirlenmiştir.

Propiyonibakteri suşlarının % 56'sı *E. coli* O157:H7 suşuna karşı inhibisyon etkisi gösterirken, en yüksek inhibisyon etkisi 9,0 mm inhibisyon zon çapı ile *P. jensenii* BDP6 suşunda tespit edilmiştir. *P. thoenii* DSMZ 20276 (10,1 mm) referans kültüründe *E. coli* O157:H7 test bakterisine yüksek inhibisyon göstermiştir. *P. jensenii* DO6 suşunun *E. coli* O157:H7 suşu üzerine gösterdiği inhibisyon etkisi Resim 4.11 (B) 'de gösterilmiştir.

Suşların % 50'si *S. aureus* ATCC 25923 üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenirken, en yüksek inhibisyon etkisi 8,6 mm zon çapı oluşturan *P. jensenii* DO4 suşunda gözlenmiştir.

*L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu üzerine, propiyonibakteri suşlarının % 29'nun inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. İzolatlardan maksimum inhibisyon etkisini *P. jensenii* BDP6 suşu (5,6 mm), referans kültürlerden ise *P. thoenii* DSMZ 20276 (10,1 mm) göstermiştir.

Suşların % 59'u *S. enteritidis* ATCC 13076 suşuna karşı inhibisyon etkisi gösterirken, en yüksek inhibisyon etkisi 10,3 mm inhibisyon zon çapı ile *P. thoenii* AKP1 suşunda tespit edilmiştir. *P. jensenii* DO1 suşunun *S. enteritidis* ATCC 13076 suşu üzerine gösterdiği inhibisyon etkisi Resim 4.11 (C) 'de verilmiştir.

İzole edilen propiyonibakteri suşlarının % 53'ü *B. cereus* RSKK 863 suşu üzerine inhibisyon etki göstermişlerdir. En yüksek inhibisyon etkisi gösteren *P. jensenii* BDP11 suşunun oluşturduğu inhibisyon zonunun çapı 6,3 mm olarak gözlenmiştir.

*S. sonnei* Mu:57 suşu üzerine izole edilen propiyonibakterilerin % 91'i inhibisyon etkisi göstermiştir. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP1, SP2 ve *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* DSMZ 20270 dışında tüm suşların *S. sonnei* Mu:57 test bakterisine inhibisyon gösterdikleri tespit edilmiştir. En yüksek inhibisyon zon çapı (11,9 mm) *P. jensenii* DO3 suşunda belirlenmiştir.

*Micrococcus luteus* NRLL B-4375 test bakterisine propiyonibakteri suşlarının % 35'i inhibisyon etkisi gösterirken, en yüksek inhibisyon zon çapı (16,3 mm) *P. jensenii* BDP11 suşunda belirlenmiştir. Bu suşun aynı zamanda denenen tüm test bakterileri içerisinde en yüksek inhibisyon zonuna sahip olduğu gözlenmiştir. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO7 suşu ise *Micrococcus luteus* NRLL B-4375 dışında tüm test bakterilerine inhibisyon etkisi göstermiştir.

Propiyonibakteri suşlarının % 76'sı *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 karşı inhibisyon etkisi gösterirken, en yüksek inhibisyon etkisi 10,4 mm inhibisyon zon çapı ile *P. jensenii* BDP11 suşunda tespit edilmiştir. *P. jensenii* DO3 suşunun *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu üzerine gösterdiği inhibisyon etkisi (7,6 mm) Resim 4.11 (D) 'de gösterilmiştir.

Yüksek asit üreten suşlar olarak belirlenen *P. jensenii* DO1, DO4, DO6, BDP6 suşları ile yalnız glikozlu YEL sıvı besi ortamında yüksek asit üretimi gösteren *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* ITP1 suşu çalışmada kullanılan tüm test bakterilerine karşı inhibisyon etkisi gösterdikleri belirlenmiştir. Referans kültürlerden *P. thoenii* DSMZ 20276'da çalışmada kullanılan tüm test bakterilerine inhibisyon gösterirken, bu türün izolatu olan *P. thoenii* SMP1 suşunda *L. monocytogenes* ATCC 7644 dışında tüm test bakterilerine antimikrobiyal aktivite göstermiştir. *P. jensenii* BDP11 ve SP6 suşlarının *L. monocytogenes* ATCC 7644 dışında diğer test bakterilerine antimikrobiyal etki gösterdikleri tespit edilmiştir.

Çizelge 4.8. Peynirlerden izole edilen propiyonibakteri suşlarının bağırsak patojenleri ve gıda kontaminantları üzerine antimikrobiyal aktivite sonuçları (zon çapı, mm)

Suşlar	Bağırsak patojenleri ve gıda kontaminantlarının kodları										
	pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DO1	4,6±0,0	7,9±1,9	6,3±2,3	5,8±0,4	3,0±0,3	6,2±2,3	7,7±1,8	4,9±0,3	6,0±1,0	7,5±1,8	6,7±0,3
DO2	5,4±0,0	11,0±0,6	-	-	-	-	-	-	4,5±0,4	-	-
DO3	4,5±0,0	7,6±0,6	7,7±0,7	4,7±0,7	-	7,6±0,3	5,5±0,1	-	11,9±1,3	6,9±0,9	7,6±0,3
DO4	4,5±0,1	7,9±1,1	7,3±1,4	8,6±0,3	4,0±1,4	6,1±1,7	6,5±0,7	6,0±1,7	8,7±1,9	7,9±0,1	8,6±1,2
DO5	5,2±0,0	8,1±0,9	-	-	-	-	-	4,4±0,0	7,0±0,3	-	4,4±0,8
DO6	4,4±0,0	8,4±0,0	5,6±0,3	7,2±0,9	4,0±0,6	8,7±0,1	7,8±0,6	5,2±0,0	9,8±0,3	5,3±0,7	7,5±0,1
DO7	4,8±0,0	9,2±1,1	6,5±0,4	6,2±0,6	4,2±0,3	5,4±1,4	6,1±0,1	7,1±0,4	9,4±0,6	-	6,2±1,4
DO8	5,5±0,3	6,1±1,6	-	-	-	-	4,7±0,4	-	5,0±0,8	-	-
DO9	5,1±0,2	5,7±0,7	-	-	-	-	-	-	3,8±0,4	-	-
SP1	5,3±0,0	-	-	-	-	-	-	-	4,0±1,4	-	-
SP2	5,3±0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,7±0,1
SP3	5,4±0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,4±0,0
SP4	5,3±0,0	5,5±1,6	-	-	-	-	4,4±0,0	-	4,7±0,1	-	-
SP5	5,3±0,1	10,1±0,3	-	-	-	-	-	-	4,9±0,1	-	-
SP6	4,8±0,1	7,8±0,6	5,4±0,6	7,2±1,4	-	4,6±0,3	7,3±0,1	4,4±0,0	8,0±0,8	7,9±3,5	8,4±0,6
SP7	4,8±0,0	7,2±0,3	3,3±0,1	-	-	-	8,1±0,9	5,5±0,4	8,4±0,0	-	4,4±0,0
SP8	4,8±0,1	9,0±0,8	4,6±0,7	-	4,7±0,1	5,8±0,0	-	3,8±0,0	4,5±0,4	9,4±3,3	8,1±0,2
SP9	5,3±0,0	7,0±1,9	-	-	-	4,8±0,0	-	-	3,8±0,3	-	3,7±0,1
BDF2	5,3±0,1	5,6±0,3	-	-	-	-	-	-	5,3±0,4	-	4,6±0,3
BDF4	5,3±0,0	5,5±0,7	-	-	-	-	-	-	6,0±0,8	-	-
BDF5	4,5±0,4	9,5±0,7	5,7±0,4	7,4±0,3	-	6,4±0,3	9,8±0,3	4,8±0,6	10,3±1,3	-	5,9±0,9
BDF6	4,9±0,3	8,2±0,6	7,9±0,4	7,4±0,3	5,6±0,0	4,8±0,8	7,3±0,9	5,7±0,4	6,3±0,4	8,2±0,0	8,3±0,7

Çizelge 4.8. (Devam) Peynirlerden izole edilen propiyonibakteri suşlarının bağırsak patojenleri ve gıda kontaminantları üzerine antimikrobiyal aktivite sonuçları (zon çapı, mm)

Suşlar	pH	Bağırsak patojenleri ve gıda kontaminantlarının kodları									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>BDP7</b>	4,5±0,0	7,6±0,0	4,7±0,1	5,6±0,8	-	9,0±1,6	7,4±0,8	3,5±0,7	8,9±0,1	-	7,1±0,7
<b>BDP11</b>	4,4±0,0	9,1±0,7	8,4±1,1	5,0±1,4	-	5,9±0,4	7,9±0,4	6,3±0,7	8,7±0,1	16,3±1,5	10,4±0,8
<b>SMPI</b>	4,6±0,0	8,5±0,4	8,5±0,7	6,3±0,1	-	4,7±0,7	8,2±0,6	4,6±0,8	7,1±0,9	10,7±0,1	9,3±0,1
<b>AKPI</b>	4,9±0,1	6,9±0,7	4,8±0,3	5,0±0,6	-	7,8±0,3	10,3±0,7	-	7,7±0,7	9,1±1,3	8,5±0,1
<b>İTP1</b>	5,2±0,3	8,1±0,9	5,0±0,0	5,6±0,0	4,0±0,0	5,4±0,0	5,6±0,0	4,8±0,0	7,0±0,6	12,2±0,0	6,3±2,6
<b>İTP2</b>	4,0±0,0	5,4±0,6	-	-	-	-	-	-	5,2±0,0	-	4,0±0,0
<b>İTP3</b>	5,4±0,1	6,7±0,7	-	-	-	-	-	-	5,2±0,3	-	3,6±0,6
<b>SMPI</b>	4,6±0,0	8,5±0,4	8,5±0,7	6,3±0,1	-	4,7±0,7	8,2±0,6	4,6±0,8	7,1±0,9	10,7±0,1	9,3±0,1
<b>20271*</b>	4,7±0,0	8,0±0,0	5,7±0,1	6,2±0,0	6,3±0,4	5,4±0,6	8,8±2,5	4,5±0,1	7,9±1,5	-	7,2±0,6
<b>20272*</b>	5,3±0,1	5,0±0,3	4,5±0,7	7,0±0,0	5,0±0,0	4,2±0,0	3,3±0,1	5,0±0,0	6,6±0,0	-	4,1±0,0
<b>20276*</b>	4,4±0,0	11,9±0,1	8,4±0,8	0,5±0,1	10,1±0,9	9,9±2,2	8,6±2,2	6,1±0,9	12,4±1,6	12,3±2,3	8,7±0,9
<b>20235*</b>	4,7±0,0	9,8±0,6	6,1±0,4	5,3±0,1	-	4,9±0,1	8,8±0,3	4,5±0,4	4,7±0,0	-	9,9±0,7

-: inhibisyon yok

\*: Referans kültürler

1: *E. coli* ATCC 11229, 2: *E. coli* ATCC 35218, 3: *S. aureus* ATCC 25923, 4: *L. monocytogenes* ATCC 7644, 5: *E. coli* O157:H7, 6: *S. enteritidis* ATCC 13076, 7: *B. cereus* RSKK 863, 8: *S. sonnei* Mu:57, 9: *M. luteus* NRRL-B 4375, 10: *P. aeruginosa* ATCC 27853



Resim 4.11. Propiyonibakteri suşlarının antimikrobiyal aktiviteleri  
(a): *P. jensenii* DO1 suşunun *E. coli* ATCC 11229 suşu üzerine gösterdiği inhibisyon zonu  
(b): *P. jensenii* DO6 suşunun *E. coli* O157:H7 suşu üzerine gösterdiği inhibisyon zonu  
(c): *P. jensenii* DO1 suşunun *S. enteritidis* ATCC 13076 suşu üzerine gösterdiği inhibisyon zonu  
(d): *P. jensenii* DO3 suşunun *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu üzerine gösterdiği inhibisyon zonu



#### 4.7. Propiyonibakterilerin Antibiyotik Duyarlılıkları

İzole edilen propiyonibakteri suşlarının antibiyotik duyarlılıkları bu bakterilerin ileride probiyotik olarak kullanılabilmesinde belirleyici olduğu için araştırılmıştır. Türkiyenin geleneksel peynirlerinden izole edilen 29 adet propiyonibakteri suşları ile 5 referans kültürün hücre duvar sentezini inhibe eden penisilin (10 unit) ve ampisilin (10 µg); protein sentezini inhibe eden streptomisin (10 µg), gentamisin (10 µg), kloramfenikol (30 µg) ve kanamisin (30 µg); nükleik asit sentezini inhibe eden nalidiksik asit (30 µg), ofloksasin (5 µg) ve rifampisin (5 µg), sitoplazmik zar sentezini inhibe eden polimiksin (300 U) antibiyotikleri ile furan türevlerinden nitrofurantoin (300 µg) antibiyotiklerine duyarlılıkları disk difüzyon yöntemine göre Bölüm 3.2.9'da anlatıldığı gibi belirlenmiş sonuçlar CLSI standardına (Çizelge 4.9) göre değerlendirilmiştir (Çizelge 4.10). Propiyonibakteri suşlarının antibiyotiklere göstermiş oldukları yüzde duyarlılık oranları Çizelge 4.11 ve Şekil 4.15'de verilmiştir.

Propiyonibakteri suşlarının hepsi nalidiksik asit dışında tüm antibiyotiklere %56 ile %94 oranında yüksek duyarlılık gösterdikleri tespit edilmiştir. Ampisilin (%91) ve nitrofurantoin (%94) antibiyotikleri en yüksek duyarlılık gösterilen antibiyotikler olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11). Protein sentezini inhibe eden kloramfenikol (%88), hücre duvar sentezini inhibe eden penisilin (%82) ve nükleik asit sentezini inhibe eden rifampisin (%74) antibiyotikleri propiyonibakteri suşlarının yüksek duyarlılık gösterdikleri antibiyotikler olarak tespit edilmiştir.

*P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO5, DO9 ve *P. jensenii* DO6, BDP7 suşlarının kullanılan antibiyotiklere genel olarak dirençli olduğu görülmüştür (Çizelge 4.10). Antibiyotiklere duyarlılık oranı yüksek olan *P. thoenii* AKP1 suşunun antibiyotiklere duyarlılık test sonucu Resim 4.12'de verilmiştir.

Araştırmalar sonucunda propiyonibakteri suşlarının protein sentezini inhibe eden streptomisin (%29), gentamisin (%24), kanamisin (%20) ve nükleik asit sentezini

inhibe eden rifampisin (%26) ile sitoplazmik zar sentezini inhibe eden polimiksin (%24) antibiyotiklerine düşük seviyede dirençli oldukları bulunmuştur. En yüksek dirençlilik nükleik asit sentezini inhibe eden nalidiksik asit (%100) antibiyotiğine karşı tespit edilmiştir. En düşük dirençlilik %3 oranında furan türevlerinden nitrofurantoin antibiyotiğinde görülürken, propiyonibakteri suşlarının hücre duvar sentezini inhibe eden penisilin (%6) ve ampisilin (%9) antibiyotiklerine de dirençlilik oranlarının düşük olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.9. CLSI kriterlerine göre antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi

No	Etki Mekanizması	Antibiyotik	Dirençli	Orta derece duyarlı	Duyarlı
1	Hücre duvarı sentezi inhibitörü	Penisilin (P) 10U	≤11	12-21	≥22
2	Hücre duvarı sentezi inhibitörü	Ampisilin (AMP) 10µg	≤11	12-13	≥14
3	Protein sentezi inhibitörü	Streptomisin (S) 10µg	≤11	12-14	≥15
4	Protein sentezi inhibitörü	Gentamisin (CN) 10µg	≤12	13-14	≥15
5	Nükleik asit sentezi inhibitörü	Nalidiksik asit (NA) 30µg	≤13	14-18	≥19
6	Nükleik asit sentezi inhibitörü	Rifampisin (RD) 5µg	≤15	-	≥16
7	Antimikrobiyal	Nitrofurantoin (F) 300 µg	≤14	15-16	≥17
8	Nükleik asit sentezi inhibitörü	Ofloksasin (OFX) 5 µg	≤14	15-21	≥22
9	Protein sentezi inhibitörü	Kloramfenikol (C) 30µg	≤12	13-17	≥18
10	Sitoplazmik zar sentezi inhibitörü	Polimiksin (PB) 300 U	≤8	9-11	≥12
11	Protein sentezi inhibitörü	Kanamisin (K) 30 µg	≤13	14-17	≥18

Çizelge 4.10. Peynirlerden izole edilen propiyonibakteri suşlarının antibiyotiklere gösterdiği duyarlılık test sonuçları

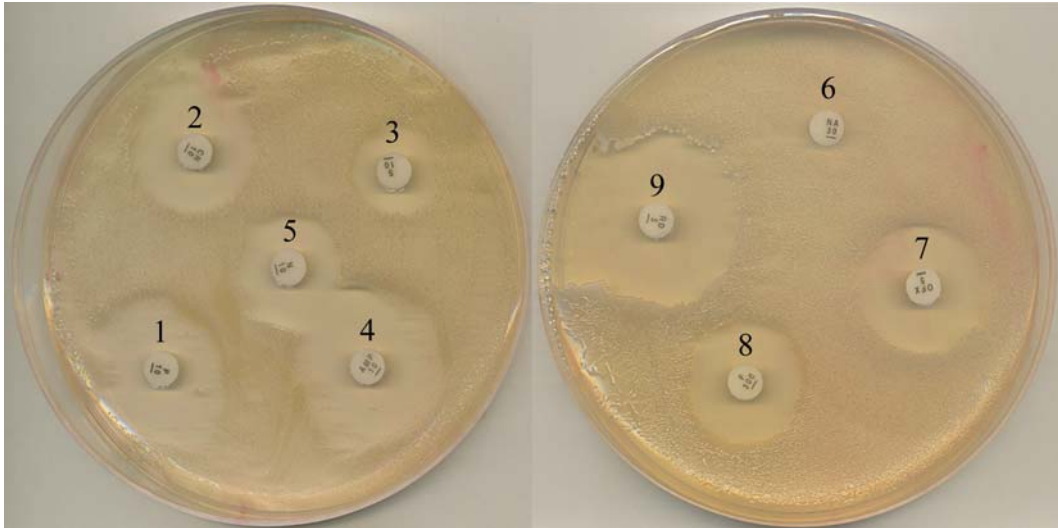
	P 10U	AMP 10µg	S 10 µg	CN10 µg	NA 30µg	RD 5µg	F 300 g	OFX 5 µg	C 30 µg	PB 300U	K 30 µg
DO1	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++
DO2	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++
DO3	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++
DO4	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++
DO5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
DO6	+	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-
DO7	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++
DO8	+	++	-	-	-	-	++	-	++	-	++
DO9	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-
SP1	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++
SP2	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++
SP3	++	++	+	++	-	++	++	++	++	++	++
SP4	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++
SP5	++	++	++	++	-	-	++	-	++	++	++
SP6	++	++	+	++	-	++	++	++	++	++	++
SP7	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++
SP8	+	++	+	++	-	++	++	++	++	++	++
SP9	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++
BDP2	++	++	+	++	-	++	++	++	++	++	++
BDP4	++	++	-	-	-	-	++	+	++	-	-
BDP5	++	++	-	++	-	-	++	+	++	++	+
BDP6	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++
BDP7	++	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-
BDP11	++	++	+	-	-	++	+	-	++	-	-
SMP1	+	++	++	++	-	++	++	++	++	++	+
AKP1	++	++	++	++	-	++	++	+	++	++	++
ITP1	++	++	-	+	-	++	++	++	++	++	++
ITP2	++	++	-	+	-	-	++	+	++	-	+
ITP3	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++
20270	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++
20271	++	++	-	-	-	++	++	++	++	-	-
20272	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++
20276	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++
20235	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++

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

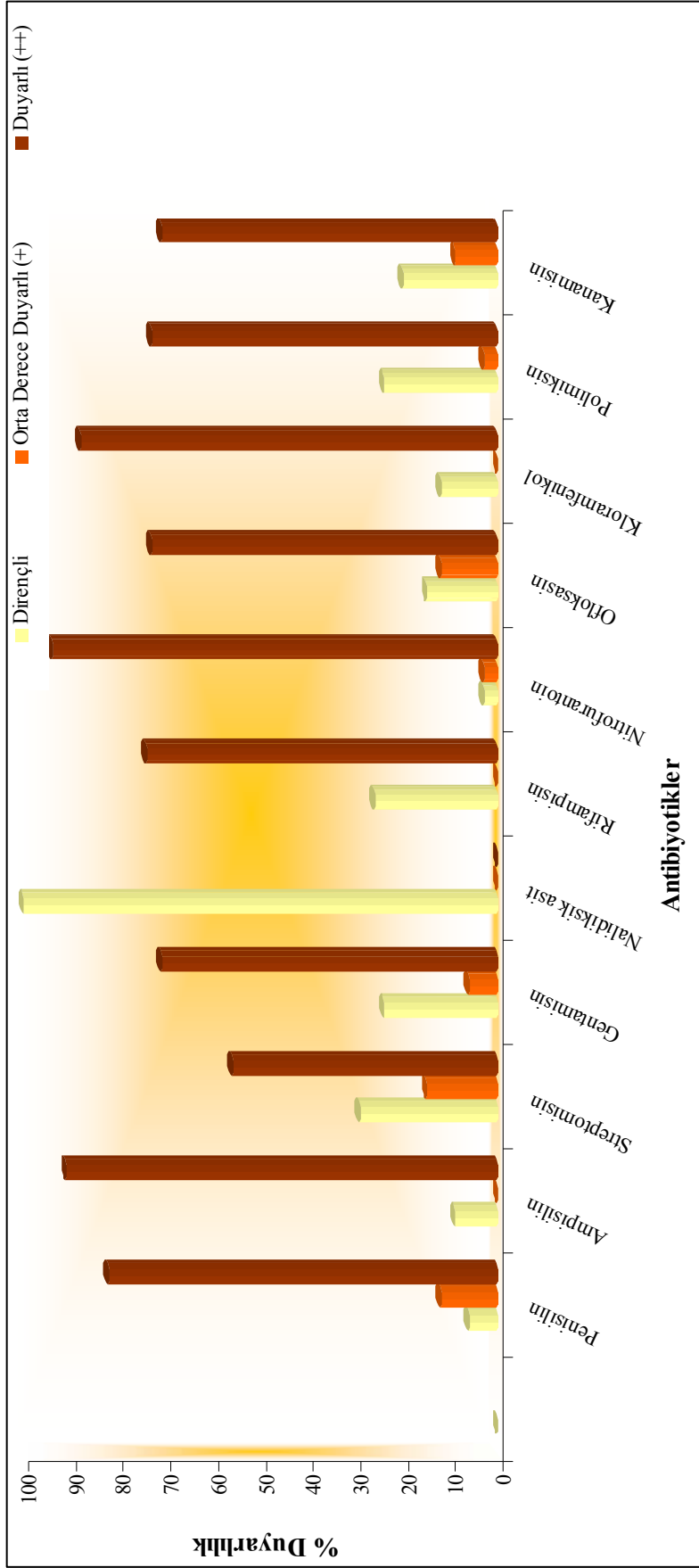
\*: Referans kültürler

Çizelge 4.11. Propiyonibakteri suşlarının antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları

Antibiyotik	Dirençli (-)	Orta Derece Duyarlı (+)	Duyarlı (++)
Penisilin (P) 10U	6	12	82
Ampisilin (AMP) 10µg	9	0	91
Streptomisin (S) 10µg	29	15	56
Gentamisin (CN) 10µg	24	6	71
Nalidiksik asit (NA) 30µg	100	0	0
Rifampisin (RD) 5µg	26	0	74
Nitrofurantoin (F) 300 µg	3	3	94
Ofloksasin (OFX) 5 µg	15	12	73
Kloramfenikol (C) 30µg	12	0	88
Polimiksin (PB) 300 U	24	3	73
Kanamisin (K) 30 µg	20	9	71



Resim 4.12. *P. thoenii* AKP1 suşunun antibiyotiklere göstermiş oldukları disk difüzyon sonuçları 1(P): Penisilin, 2(CN): Gentamisin, 3(S): Streptomisin; 4(AMP): Ampisilin, 5(K): Kanamisin, 6(NA): Nalidiksik Asit; 7(OFX): Ofloksasin, 8(F): Nitrofurantoin, 9(RD):Rifampisin



Şekil 4.15. Propionibakteri suşlarının antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları

#### 4.8. Propiyonibakterilerin Eksopolisakkarit (EPS) Üretimleri

İzole edilen 29 adet propiyonibakteri suşlarının ve 5 adet referans kültürlerin YEL ve skim milk sıvı besi ortamlarında geliştirilen 8 günlük kültürlerin eksopolisakkarit (EPS) üretimleri Bölüm 3.2.10'da anlatıldığı gibi araştırılmış ve sonuçlar Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Suşların son kültür pH'ları YEL besiyerinde 6,1-6,9 arasında, skim milk besiyerinde 4,6-6,5 arasında belirlenmiştir. Skim milk'te geliştirilen suşların son kültür pH'larının YEL besiyerinde geliştirilenlere göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. EPS üretiminden önce belirlenen OD değerlerinin 0,9 ile 2,2 arasında olduğu, suşların ortalama OD değerlerinin ise 1,5 olduğu tespit edilmiştir. Yüksek EPS üretimi gösteren suşların son kültür OD değerlerinin de yüksek olduğu görülmüştür.

8 günlük inkübasyondan sonra suşların YEL sıvı besi ortamında EPS üretimleri 25,0-163,7 mg/l (Şekil 4.16), skim milk ortamında ise 110,4-393,6 mg/l (Şekil 4.17) olarak belirlenmiştir. YEL sıvı besi ortamında geliştirilen suşlar arasında en yüksek EPS üretimi *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO9 (163,7 mg/l) suşunda görülürken, en düşük EPS üretimi *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP4 (25,0 mg/l) suşunda tespit edilmiştir. Skim milk besiyerinde geliştirilen *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO8 suşunda yüksek EPS üretimi (393,6 mg/l) belirlenirken, *P. jensenii* BDP7 suşda en düşük EPS üretimi (110,4 mg/l) görülmüştür.

*P. jensenii* DO1 (101,5 mg/l), DO3 (113,5 mg/l), BDP6 (109,4 mg/l) suşları ile *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO5, DO7, DO9 ve BDP2 suşları YEL sıvı besi ortamında yüksek EPS üreten suşlar olarak belirlenmiştir. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO8 (393,6 mg/ml), *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP9 (342,5 mg/ml), *P. jensenii* DO6 (347,2 mg/ml), *P. jensenii* SP6 (353,8 mg/ml) ve *P. jensenii* BDP11 (342 mg/ml) suşlarının skim milk besi ortamında yüksek EPS ürettikleri tespit edilmiştir. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP3 suşunun YEL (25,8 mg/ml) ve skim milk (180,2 mg/ml) besi ortamlarında düşük EPS üretimi

göstermiştir. *P. thoenii* AKP1 suşu ise YEL besi ortamında yüksek EPS üretimi (93,8 mg/ml) gösterirken, skim milk ortamında EPS üretiminin orta seviyede (192,5 mg/ml) olduğu belirlenmiştir. Referans kültürlerin hepsi her iki besi ortamında yüksek EPS üretimi göstermiştir. İzole edilen suşların bazılarının EPS üretimlerinin referans kültürlerden yüksek olduğu görülmüştür (Çizelge 4.12).

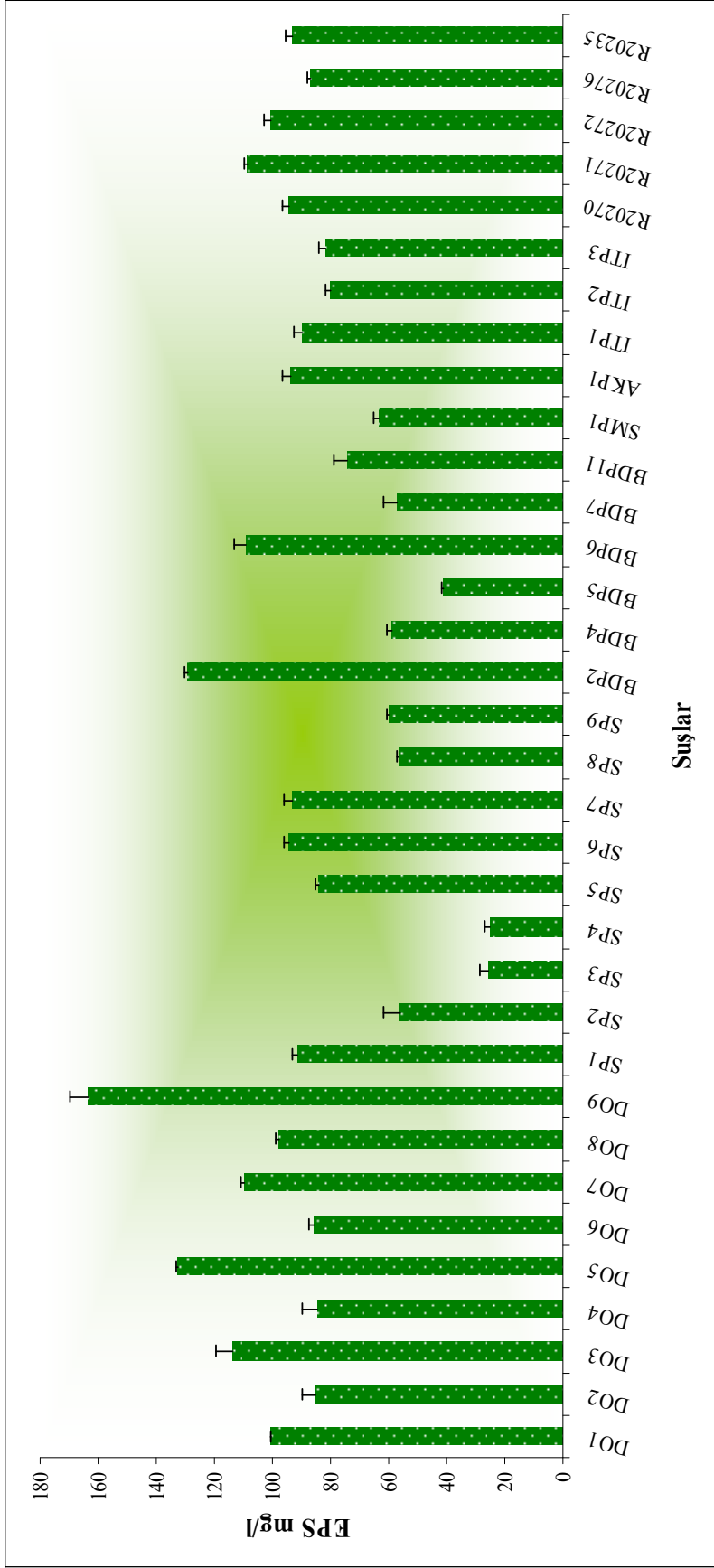
*P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* türüne ait suşların ortalama EPS üretimlerinin hem YEL (87,4 mg/ml) hem de skim milk besi ortamında (278,3 mg/ml), *P. jensenii* türüne ait suşlardan yüksek olduğu belirlenmiştir (sırayla; 83,7 ve 253,8 mg/ml). Propiyonibakteri suşlarının skim milk besi ortamında ürettikleri EPS miktarları YEL besi ortamı ile kıyaslandığında daha yüksek olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.12. Propiyonibakteri suşlarının EPS üretimleri

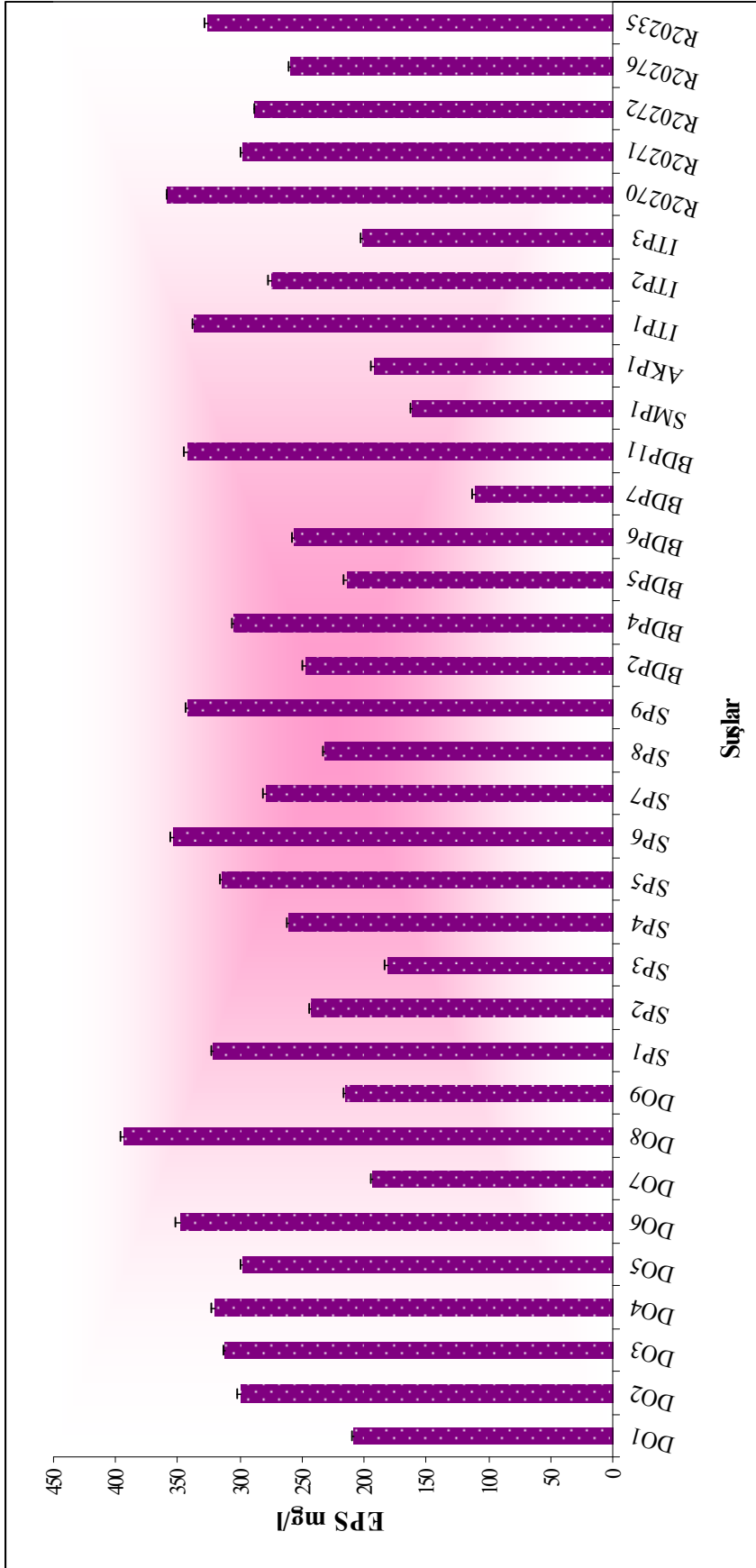
Suş kodu	YEL			Skim Milk	
	OD	Son pH	EPS mg/l <sup>a</sup>	Son pH	EPS mg/l <sup>a</sup>
DO1	1,4±0,0	6,4±0,1	100,5±0,3	4,9±0,0	208,3±2,0
DO2	1,7±0,0	6,4±0,0	85,1±4,8	6,0±0,3	299,7±2,0
DO3	1,0±0,0	6,9±0,0	113,5±5,7	5,0±0,2	311,6±2,4
DO4	1,2±0,0	6,7±0,0	84,6±5,4	5,1±0,0	320,6±2,9
DO5	1,8±0,0	6,4±0,1	132,3±0,7	6,1±0,1	297,8±1,3
DO6	1,8±0,3	6,3±0,7	85,9±1,4	5,1±0,1	347,2±4,4
DO7	1,6±0,4	6,9±0,0	109,5±1,1	5,9±0,0	193,2±1,7
DO8	1,4±0,0	6,7±0,0	97,7±1,2	6,0±0,0	393,6±2,7
DO9	1,0±0,0	6,7±0,0	163,7±6,0	6,4±0,1	215,9±1,1
SP1	1,3±0,0	6,9±0,1	91,7±1,2	6,5±0,1	321,9±1,6
SP2	1,3±0,1	6,7±0,1	56,2±5,5	5,9±0,5	243,5±1,3
SP3	1,1±0,1	6,9±0,0	25,8±2,8	6,5±0,0	180,2±2,8
SP4	1,7±0,1	6,4±0,1	25,0±1,8	6,5±0,1	261,1±1,8
SP5	1,8±0,3	6,1±0,0	84,2±0,8	5,8±0,1	314,3±1,7
SP6	1,1±0,1	6,8±0,1	94,3±1,7	5,8±0,0	353,8±2,1
SP7	1,0±0,0	6,8±0,1	93,3±2,6	5,7±0,0	279,2±2,2
SP8	1,4±0,1	6,3±0,1	56,8±0,3	5,5±0,2	231,5±1,9
SP9	2,0±0,1	6,4±0,1	60,2±0,6	5,0±0,0	342,5±1,3
BDP2	2,2±0,0	6,1±0,0	128,9±1,6	5,9±0,1	246,8±2,9
BDP4	2,1±0,0	6,8±0,0	58,6±2,1	6,0±0,0	304,8±1,3
BDP5	1,6±0,0	6,7±0,0	41,4±0,4	4,7±0,1	213,3±3,7
BDP6	1,2±0,1	6,8±0,0	109,4±3,5	5,5±0,1	256,7±1,8
BDP7	0,8±0,2	6,7±0,2	57,4±4,1	5,1±0,0	110,4±2,6
BDP11	1,7±0,0	6,3±0,0	74,1±4,5	4,6±0,0	342,0±2,9
SMP1	2,1±0,3	6,2±0,0	63,7±1,6	5,1±0,3	162,0±1,5
AKP1	1,6±0,6	6,1±0,1	93,8±2,6	5,2±0,0	192,5±1,7
ITP1	1,6±0,2	6,7±0,1	89,5±3,3	6,0±0,0	336,8±1,9
ITP2	1,6±0,0	6,5±0,2	80,1±1,9	6,0±0,2	275,3±2,1
ITP3	1,9±0,0	6,6±0,1	81,9±2,1	5,8±0,0	201,7±1,8
20270*	0,9±0,0	6,9±0,0	94,5±2,3	5,3±0,1	358,5±0,0
20271*	1,4±0,1	6,5±0,0	108,4±1,1	6,0±0,0	298,7±1,2
20235*	1,3±0,3	6,4±0,1	93,4±1,9	5,3±0,0	325,3±2,6
20276*	1,4±0,1	6,6±0,1	86,6±1,3	4,9±0,0	260,1±1,3
20272*	2,1±0,1	6,6±0,1	100,8±1,8	5,9±0,1	288,5±0,4

a: Sonuçlar üç farklı paralelin ortalamasıdır , \*: Refrans kültürler.





Şekil 4.16. Propiyonibakterilerin YEL besiyerinde EPS üretimleri



Şekil 4.17. Propiyonibakterilerin skim milk besiyerinde EPS üretimleri

#### 4.9. Propiyonibakterilerin Farklı pH Değerlerine Toleransı

Propiyonibakteri suşlarının farklı pH değerlerine dirençliliği 3.2.11. kısmında anlatıldığı gibi yapılmıştır. Spektrofotometrik metoda göre 600 nm de hücre yoğunlukları ölçülmüş ve kontrol grubunun (pH 7) hücre yoğunluğuna göre farklı pH'ların yüzde inhibisyonları Çizelge 4.13'de verilmiştir. Tüm izolatlardan elde edilen verilere göre propiyonibakterilerin farklı pH değerlerine direnci oldukça zayıf bulunmuştur. Ortamdaki asitlik oranı arttıkça, bakterilerin yoğunluğunda düşme meydana gelmiştir.

Suşların genelinde pH 2'de yoğunluğunun düştüğü ve yüzde inhibisyonun ise arttığı gözlenmiştir. pH 2'de suşların asit dirençliliği değerlendirildiğinde en düşük bakteri yoğunluğu *P. jensenii* SP7 (0,022 OD) suşunda en yüksek bakteri yoğunluğu ise *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO7 (0,055 OD)'de tespit edilmiştir. pH 2'de *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* (0,039 OD) suşlarının ortalama hücre yoğunluğunun *P. jensenii* (0,036 OD) suşlarından yüksek olduğu görülmüştür.

pH 3'de yüzde inhibisyon %92 ile 98 arasında tespit edilirken, hücre yoğunluğunda en düşük (0,036 OD) *P. jensenii* SP7 suşunda, en yüksek ise *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO7 (0,066 OD) ve BDP4 (0,069 OD) suşlarında belirlenmiştir.

pH 4'de ortalama hücre yoğunluğu pH 2 ve 3'e göre biraz daha artış göstermiştir. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* suşlarının ortalama hücre yoğunluğu 0,084 OD, *P. jensenii* suşlarının ise 0,081 OD olarak bulunmuştur.

pH 2, pH 3 ve 4 ile karşılaştırdığımızda ortalama en yüksek hücre yoğunluğunun ve en düşük yüzde inhibisyonun pH 5'de olduğu gözlenmiştir. pH 5'de *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* suşlarının ortalama hücre yoğunluğu 0,98 OD, *P. jensenii* suşlarının ise 0,53 OD olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.13).

Genel olarak tüm izolatlara baktığımızda *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii*'ye ait olanların diğerlerine oranla daha dirençli olduğu, *P. jensenii*'ye ait olanların ise

biraz daha duyarlı olduğu gör÷lmektedir. *P. thoenii* olarak tanımlanan AKP1 suşunun hücre yoğunluğunda pH değeri nin artışına paralel olarak artış göstermiştir.

Yüksek EPS üretimi gösteren *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO5, DO7, DO8, *P. jensenii* BDP11 ve *P. thoenii* AKP1 suşlarının farklı pH değerlerine direncinin de yüksek olduğu gör÷lmüştür. Yapılan analizlerde, suşların EPS üretimleri (YEL ve skim milk) ile farklı pH'lara direnci arasında anlamlı ve pozitif bir ilişki bulunmuştur ( $P < 0.05$ ).

Çizelge 4.13. Propiyonibakteri suşlarının farklı pH değerlerine toleransı

Suşlar	pH 2		pH 3		pH 4		pH 5		pH 7	
	OD <sup>a</sup>	% İnhibisyon <sup>b</sup>	OD <sup>a</sup>	% İnhibisyon <sup>b</sup>	OD <sup>a</sup>	% İnhibisyon <sup>b</sup>	OD <sup>a</sup>	% İnhibisyon <sup>b</sup>	OD <sup>c</sup>	
<b>DO1</b>	0,035±0,0	98	0,038±0,0	98	0,047±0,0	97	0,35±0,0	78	1,61±0,0	
<b>DO2</b>	0,045±0,0	98	0,056±0,0	98	0,078±0,0	97	0,23±0,0	90	2,34±0,0	
<b>DO3</b>	0,037±0,0	97	0,051±0,0	96	0,091±0,0	93	0,17±0,0	87	1,28±0,0	
<b>DO4</b>	0,038±0,0	98	0,039±0,0	98	0,102±0,0	95	1,76±0,1	13	2,03±0,0	
<b>DO5</b>	0,047±0,0	98	0,051±0,0	98	0,052±0,0	98	1,55±0,0	27	2,13±0,0	
<b>DO6</b>	0,040±0,0	97	0,048±0,0	97	0,096±0,0	93	0,31±0,1	79	1,47±0,0	
<b>DO7</b>	0,055±0,0	97	0,066±0,1	97	0,083±0,0	96	1,27±0,1	38	2,05±0,0	
<b>DO8</b>	0,043±0,0	98	0,047±0,0	98	0,095±0,0	95	1,33±0,1	34	2,00±0,0	
<b>DO9</b>	0,034±0,0	97	0,050±0,0	96	0,119±0,1	90	0,14±0,0	88	1,18±0,0	
<b>SP1</b>	0,049±0,0	95	0,060±0,0	94	0,105±0,0	90	0,52±0,0	50	1,03±0,0	
<b>SP2</b>	0,040±0,0	98	0,056±0,0	97	0,130±0,0	93	1,26±0,1	32	1,86±0,0	
<b>SP3</b>	0,035±0,0	98	0,039±0,0	98	0,049±0,0	97	1,15±0,0	32	1,70±0,3	
<b>SP4</b>	0,031±0,0	97	0,048±0,0	96	0,091±0,0	92	0,77±0,0	29	1,09±0,3	
<b>SP5</b>	0,032±0,0	98	0,055±0,0	97	0,110±0,0	94	0,14±0,0	92	1,84±0,1	
<b>SP6</b>	0,038±0,0	97	0,058±0,0	96	0,104±0,0	93	0,17±0,0	88	1,40±0,0	
<b>SP7</b>	0,022±0,0	99	0,036±0,0	98	0,096±0,0	94	0,12±0,0	93	1,68±0,0	
<b>SP8</b>	0,036±0,0	96	0,037±0,0	96	0,093±0,0	90	0,10±0,0	90	0,97±0,2	
<b>SP9</b>	0,026±0,0	99	0,045±0,0	98	0,074±0,0	97	0,45±0,0	79	2,19±0,0	
<b>BDP2</b>	0,045±0,0	98	0,056±0,0	97	0,059±0,0	97	1,85±0,1	9	2,03±0,3	
<b>BDP4</b>	0,039±0,0	98	0,069±0,0	97	0,084±0,0	96	1,81±0,0	19	2,23±0,1	
<b>BDP5</b>	0,036±0,0	98	0,041±0,0	98	0,060±0,0	97	0,12±0,0	94	2,11±0,0	
<b>BDP6</b>	0,039±0,0	98	0,046±0,0	98	0,083±0,0	60	0,11±0,0	95	2,08±0,0	

Çizelge 4.13. (Devam) Propiyonibakteri suşlarının farklı pH değerlerine toleransı

Suşlar	pH 2		pH 3		pH 4		pH 5		pH 7	
	OD <sup>a</sup>	% İnhibisyon <sup>b</sup>	OD <sup>a</sup>	% İnhibisyon <sup>b</sup>	OD <sup>a</sup>	% İnhibisyon <sup>b</sup>	OD <sup>a</sup>	% İnhibisyon <sup>b</sup>	OD <sup>a</sup>	% İnhibisyon <sup>b</sup>
<b>BDP7</b>	0,044±0,0	97	0,056±0,0	96	0,079±0,0	94	0,15±0,1	89	1,34±0,0	
<b>BDP11</b>	0,043±0,0	97	0,047±0,0	97	0,055±0,0	96	1,48±0,0	5	1,56±0,1	
<b>SMP1</b>	0,035±0,0	98	0,043±0,0	98	0,047±0,0	98	1,30±0,1	35	1,99±0,0	
<b>AKP1</b>	0,050±0,0	98	0,056±0,0	97	0,066±0,0	97	1,35±0,1	33	2,03±0,0	
<b>ITP1</b>	0,038±0,0	98	0,054±0,0	97	0,058±0,0	97	1,31±0,1	37	2,08±0,0	
<b>ITP2</b>	0,034±0,0	98	0,047±0,1	98	0,061±0,0	97	1,55±0,0	21	1,97±0,4	
<b>ITP3</b>	0,035±0,0	97	0,049±0,0	96	0,081±0,0	94	1,18±0,1	7	1,27±0,0	
<b>20270*</b>	0,042±0,0	98	0,161±0,1	92	0,396±0,0	79	0,48±0,1	74	1,91±0,0	
<b>20271*</b>	0,036±0,0	98	0,044±0,0	98	0,050±0,0	97	1,19±0,0	38	1,91±0,2	
<b>20272*</b>	0,032±0,0	98	0,041±0,0	98	0,049±0,0	97	1,63±0,0	11	1,84±0,0	
<b>20276*</b>	0,044±0,0	97	0,049±0,0	97	0,054±0,0	97	0,69±0,1	56	1,57±0,0	
<b>20235*</b>	0,040±0,0	98	0,060±0,0	96	0,220±0,0	87	0,39±0,0	76	1,63±0,1	

\*Referans kültürler

a: Spektrofotometrede 600 nm de okunan optik yoğunluklar

b: %İnhibisyon=OD1-OD2/OD2X100; OD1: Kontrol, OD2: Farklı pH'lardaki optikal yoğunluklar

c: Çalışmalarda kullanılan besiyerinin pH'ıdır.

#### 4.10. Propiyonibakterilerin Farklı Safra Konsantrasyonlarına Toleransı

İzole edilen propiyonibakteri suşlarının safra toleransı 3.2.12’de anlatıldığı gibi belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.14’de verilmiştir. Tüm suşlardan elde edilen verilere göre *Propionibacterium* cinsi bakterilerin bağırsaklarda bulunan safraya olan toleransı, safra oranına göre değişmekte olup, safranın % 0,06; % 0,15 ve % 0,30 artan konsantrasyona bağlı olarak tüm suşların gelişiminde düşme gözlenmiştir. Propiyonibakteri suşları ortamda bulunan safrayı belirli bir seviyeye kadar tolere edebilmektedir. Ancak safra konsantrasyonu yükseldikçe ve özellikle % 0,30 oranındaki safranın varlığında tüm suşların yoğunluğunda azalma tespit edilmiştir.

% 0,06, % 0,15 ve % 0,30 safra konsantrasyonlarında en düşük hücre yoğunluğu *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO5, SP3 ve SP4 suşlarında belirlenmiştir. Farklı safra konsantrasyonlarındaki yüzde inhibisyonları değerlendirdiğimizde %0,06 safra konsantrasyonunda %2-61, %0,15 safra konsantrasyonunda %15-84 ve %0,30 konsantrasyonunda %31 ile 88 oranlarında olduğu tespit edilmiştir. En yüksek yüzde inhibisyon %0,30 safra konsantrasyonunda gözlenmiştir.

Tüm safra konsantrasyonlarındaki ortalama hücre yoğunluklarını değerlendirdiğimizde ise *P. jensenii*’ye ait olan suşların diğerlerine oranla daha dirençli olduğu *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii*’ye ait olanların ise biraz daha duyarlı olduğu görülmektedir. Denenen tüm safra konsantrasyonlarına *P. jensenii* suşlarının ortalama hücre yoğunlukları sırayla 1,17 OD, 0,93 OD ve 0,74 OD olarak tespit edilirken, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* suşlarınınki 1,04 OD, 0,83 OD ve 0,63 OD olarak tespit edilmiştir. *P. thoenii* olarak tanımlanan SMP1 ve AKP1 suşları ise tüm safra konsantrasyonlarında yüksek gelişim göstermiştir.

Yüksek EPS üretimi gösteren *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO7, DO8, *P. jensenii* DO6, BDP6, BDP11 ve *P. thoenii* AKP1 suşları kontrolle (Safrasız) karşılaştırıldığında tüm safra konsantrasyonlarında yüksek gelişim ve düşük inhibisyon göstermiştir. Düşük EPS üretimi gösteren *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP3 suşu ise tüm safra konsantrasyonlarında düşük hücre yoğunluğu

ve kontrolle karşılaştırıldığında yüksek inhibisyona sahip olduğu gözlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde, suşların EPS üretimleri (YEL ve skim milk) ile farklı safra konsantrasyonlarına direncin arasında anlamlı ve pozitif bir ilişki bulunmuştur ( $P<0.05$ ).



Çizelge 4.14. Propiyonibakteri suşlarının farklı safra konsantrasyonlarına toleransı

Suşlar	Kontrol OD <sup>a</sup>	%0,06 safra		%0,15 safra		%0,30 safra	
		OD <sup>b</sup>	% inhibisyon <sup>c</sup>	OD <sup>b</sup>	% inhibisyon <sup>c</sup>	OD <sup>b</sup>	% inhibisyon <sup>c</sup>
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DO2	2,07±0,1	1,18±0,2	43	0,68±0,1	67	0,60±0,1	71
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DO5	0,70±0,1	0,36±0,0	49	0,34±0,0	51	0,18±0,0	74
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DO7	1,51±0,0	1,14±0,0	25	0,91±0,5	40	0,74±0,0	51
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DO8	0,89±0,1	0,84±0,2	6	0,50±0,0	44	0,33±0,0	63
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DO9	1,26±0,0	0,49±0,1	61	0,38±0,0	70	0,34±0,0	73
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP1	1,15±0,0	0,84±0,0	27	0,73±0,1	36	0,43±0,1	63
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP2	1,67±0,1	1,44±0,0	14	1,14±0,0	31	1,12±0,0	31
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP3	0,57±0,3	0,37±0,0	35	0,36±0,0	37	0,31±0,0	46
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP4	1,06±0,4	0,45±0,0	58	0,33±0,0	69	0,32±0,0	70
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP5	1,92±0,1	1,63±0,3	15	1,62±0,3	15	1,10±0,1	43
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP9	1,84±0,0	1,50±0,0	18	1,14±0,0	38	0,82±0,1	55
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> BDP2	2,14±0,2	1,60±0,2	25	1,13±0,0	47	0,81±0,0	62
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> BDP4	1,88±0,0	1,39±0,0	26	0,98±0,1	48	0,54±0,1	71
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> ITPI	1,70±0,0	1,28±0,1	25	1,25±0,0	26	0,97±0,0	43
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> ITP3	1,17±0,1	1,11±0,1	5	0,92±0,1	21	0,85±0,0	27
<i>P. jensenii</i> DO1	1,79±0,2	1,06±0,1	41	0,96±0,0	46	0,81±0,0	55
<i>P. jensenii</i> DO3	1,42±0,1	0,85±0,0	40	0,79±0,0	44	0,56±0,0	61
<i>P. jensenii</i> DO4	1,65±0,1	1,56±0,0	5	1,03±0,0	38	0,73±0,5	56
<i>P. jensenii</i> DO6	1,17±0,0	0,92±0,1	21	0,87±0,0	26	0,71±0,0	39

Çizelge 4.14 (Devam) Propiyonibakteri suşlarının farklı safra konsantrasyonlarına toleransı

Suşlar	Kontrol OD <sup>a</sup>	%0,06 safra		%0,15 safra		%0,30 safra	
		OD <sup>b</sup>	% inhibisyon <sup>c</sup>	OD <sup>b</sup>	% inhibisyon <sup>c</sup>	OD <sup>b</sup>	% inhibisyon <sup>c</sup>
<i>P. jensenii</i> SP6	1,4±0,0	1,36±0,1	3	0,89±0,1	36	0,60±0,0	57
<i>P. jensenii</i> SP7	0,99±0,0	0,86±0,1	13	0,57±0,0	42	0,45±0,0	55
<i>P. jensenii</i> SP8	1,40±0,1	0,90±0,0	36	0,81±0,0	42	0,54±0,0	61
<i>P. jensenii</i> BDP5	2,12±0,1	1,56±0,1	26	1,13±0,0	47	0,89±0,0	58
<i>P. jensenii</i> BDP6	2,09±0,0	1,52±0,2	27	1,28±0,4	39	1,00±0,0	52
<i>P. jensenii</i> BDP7	1,34±0,0	1,1±0,2	18	0,98±0,0	27	0,93±0,1	31
<i>P. jensenii</i> BDP11	1,46±0,0	1,35±0,0	8	0,99±0,0	32	0,89±0,1	39
<i>P. jensenii</i> ITP2	1,09±0,2	1,06±0,0	3	0,84±0,1	23	0,79±0,0	28
<i>P. thoenii</i> SMP1	2,22±0,0	1,86±0,0	16	1,66±0,0	25	0,96±0,3	57
<i>P. thoenii</i> AKP1	2,04±0,0	1,88±0,2	8	1,57±0,5	23	1,03±0,1	50
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> DSMZ 20270*	1,95±0,0	1,36±0,0	30	1,19±0,1	39	0,88±0,1	55
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DSMZ 20271*	1,68±0,0	1,01±0,0	40	0,27±0,0	84	0,21±0,0	88
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>acidopropionici</i> DSMZ 20272*	2,09±0,0	1,62±0,0	22	1,15±0,1	45	1,01±0,3	52
<i>P. thoenii</i> DSMZ 20276*	1,72±0,0	1,68±0,1	2	1,13±0,0	34	0,99±0,0	42
<i>P. jensenii</i> DSMZ 20235*	1,77±0,0	0,96±0,1	46	0,91±0,1	49	0,53±0,0	70

\*Referans kültürler

a: Çalışmalarda kullanılan besiyerinde gelişme durumu (Safra içermemektedir)

b: %Inhibisyon=OD<sub>1-OD<sub>2</sub></sub>/OD<sub>2</sub>X100; OD<sub>1</sub>: Kontrol, OD<sub>2</sub>: Farklı safra konsantrasyonlardaki optikal yoğunluklar

c: Spektrofotometrede 600 nm de okunan optik yoğunluklar

## 4.11. Propiyonibakterilerin Agregasyonu

### 4.11.1. Otoagregasyon

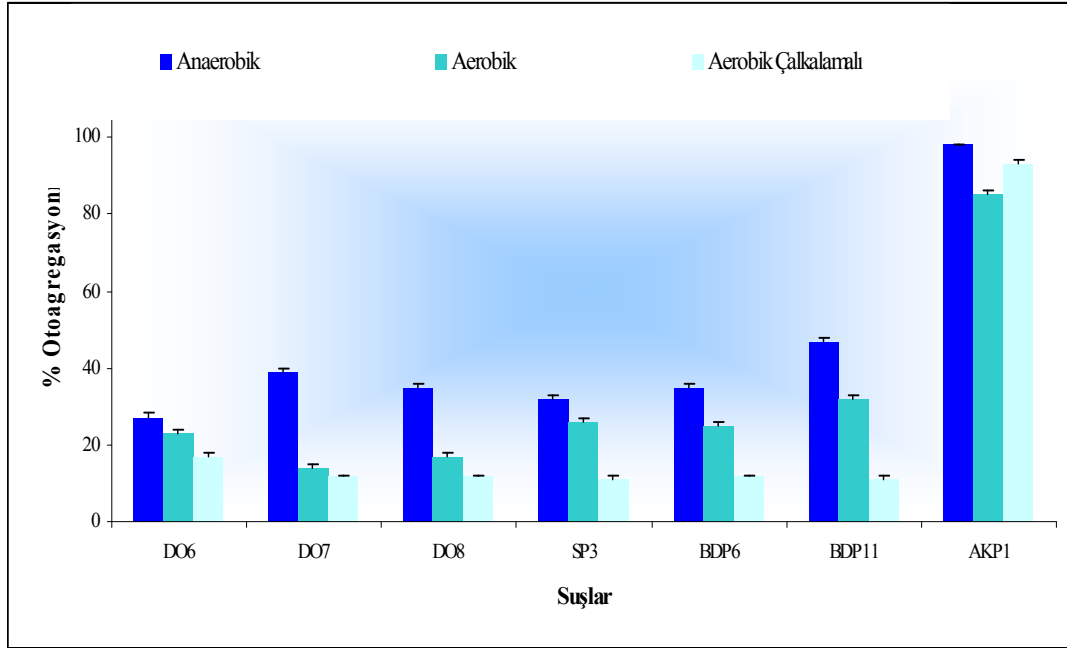
Bu çalışmada, yapılan tüm çalışmaların sonuçları incelendiğinde asit direnci, safra toleransı ve EPS üretim kapasitesi en yüksek olan *P. thoenii* AKP1, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO7, DO8, *P. jensenii* DO6, BDP6, BDP11 suşları ile en düşük olarak belirlenen *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP3 suşlarının otoagregasyon denemeleri Bölüm 3.2.13 (Otoagregasyon)'de anlatıldığı şekilde yapılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.15 ile Şekil 4.18'de gösterilmiştir. Ayrıca, suşların otoagregasyon görünümleri ışık mikroskopunda da gözlenmiştir. Buna göre iyi bir şekilde otoagregasyon gösteren ve olmayan propiyonibakteri suşlarının ayırımları gerçekleştirilmiştir.

*P. thoenii* AKP1 suşu anaerobik (%98), aerobik (%85) çalkalamasız ve aerobik çalkalamalı (%93) koşulların hepsinde yüksek otoagregasyon göstermiştir (Resim 4.13). *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO7 (Resim 4.14) ve *P. jensenii* BDP11 suşları anaerobik koşullarda orta dereceli otoagregasyon göstermiştir. Anaerobik koşullarda suşların çoğu yüksek ve orta dereceli otoagregasyon göstermiştir. Aerobik koşullarda otoagregasyonun azaldığı aerobik çalkalamalı ortamda ise en düşük otoagregasyonun gerçekleştiği tespit edilmiştir. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP3 suşunda düşük otoagregasyon mikroskobik olarak Resim 4.14.'de ve makroskobik olarak Resim 4.15'de gösterilmiştir. Suşların yüzde otoagregasyon ve ışık mikroskopundaki otoagregasyon sonuçları paralellik göstermiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde, suşların EPS üretimleri (YEL ve skim milk) ile otoagregasyonları arasında anlamlı ve pozitif bir ilişki bulunmuştur ( $P < 0.05$ ).

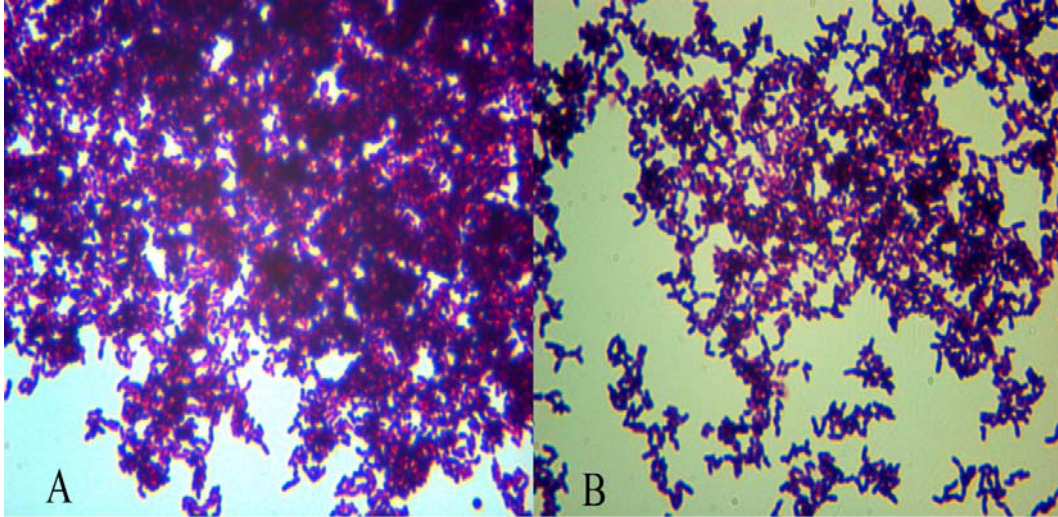
Çizelge 4.15. Propiyonibakteri suşlarının anaerobik, aerobik (çalkalamasız) ve aerobik çalkalamalı ortamlarda agregasyonu

	Anaerobik		Aerobik		Aerobik ve Çalkalamalı	
	Otoagregasyon %	Koagregasyon %	Otoagregasyon %	Koagregasyon %	Otoagregasyon %	Koagregasyon %
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DO7	39±1,0 (++)	33±1,0 (++)	14±1,0 (+)	11±1,0 (+)	12±0,0 (+)	9±1,0 (+)
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DO8	35±1,0 (++)	22±1,0 (+)	17±1,0 (+)	12±0,0 (+)	12±0,0 (+)	8±1,0 (+)
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP3	32±0,9 (+)	18±0,1 (+)	26±1,0 (+)	15±0,0 (+)	11±1,0 (+)	9±0,0 (+)
<i>P. jensenii</i> DO6	27±1,5 (+)	29±1,0 (+)	23±1,0 (+)	19±1,0 (+)	17±1,0 (+)	12±1,0 (+)
<i>P. jensenii</i> BDP6	35±1,0 (++)	37±1,0 (++)	25±1,0 (+)	10±1,0 (+)	12±0,0 (+)	9±0,0 (+)
<i>P. jensenii</i> BDP11	47±1,0 (++)	42±1,0 (++)	32±1,0 (++)	11±1,0 (+)	11±1,0 (+)	10±1,0 (+)
<i>P. thoenii</i> AKP1	98±0,0 (+++)	61±1,0 (++)	85±1,0 (+++)	55±1,0 (++)	93±1,0 (+++)	50±1,0 (++)

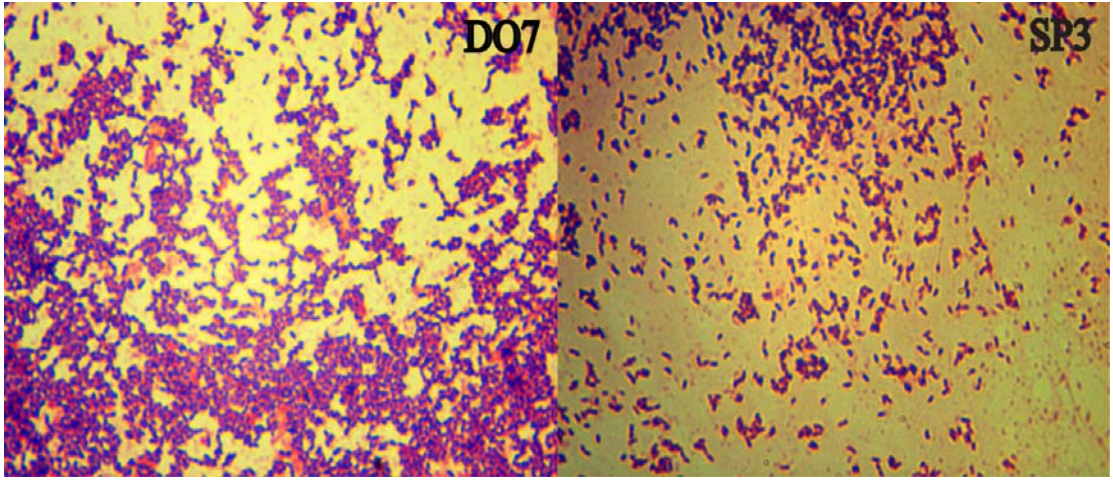
+++ : Yüksek otoagregasyon ve koagregasyon; ++ : Orta dereceli otoagregasyon ve koagregasyon; + : Düşük otoagregasyon ve koagregasyon



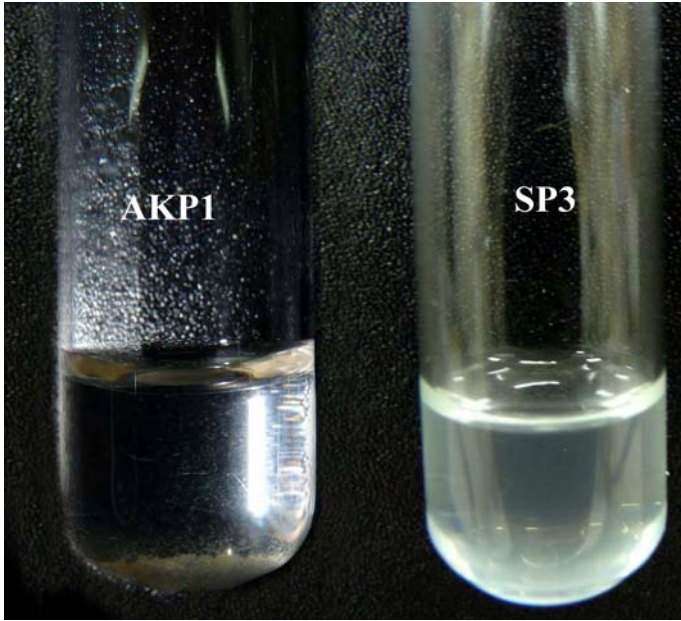
Şekil 4.18. Propiyonibakteri suşlarının anaerobik, aerobik (çalkalamasız) ve aerobik çalkalamalı ortmalarda otoagregasyon



Resim 4.13. *P. thoenii* AKP1 suşunun otoagregasyonun ışık mikroskobu görüntüsü  
 A: Anaerobik koşullarda yüksek otoagregasyon  
 B: Aerobik koşullarda yüksek otoagregasyon (100X)



Resim 4.14. Anaerobik koşullarda orta düzey otoagregasyon gösteren *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO7 suşu ve aerobik koşullarda düşük otoagregasyon gösteren *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP3 suşunun ışık mikroskobu görüntüsü (100X)



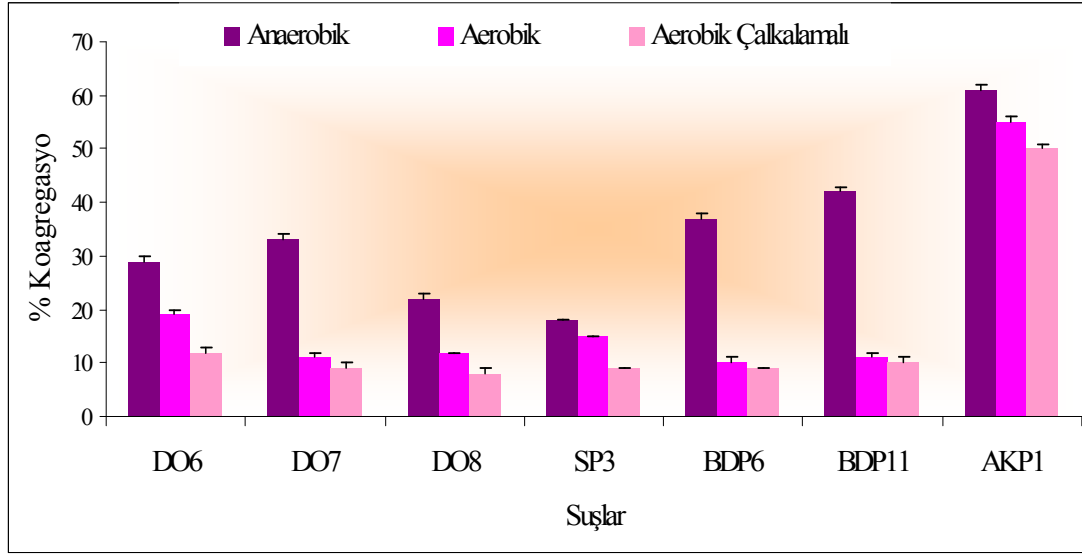
Resim 4.15. Otoagregasyon olmuş *P. thoenii* AKP1 ve otoagregasyon olmamış *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP3

#### 4.11.2. Koagregasyon

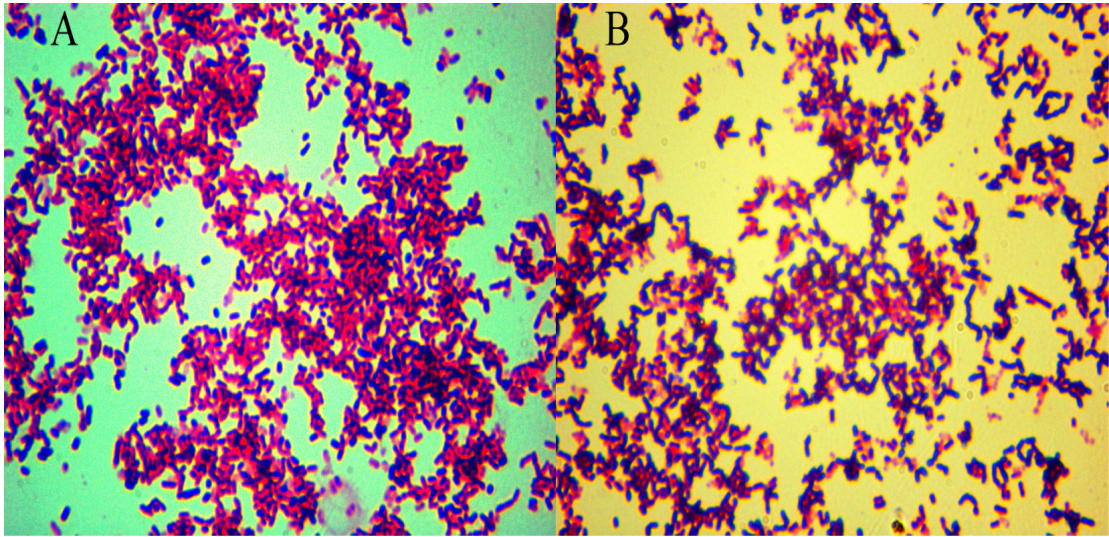
Bu çalışmada, yapılan tüm çalışmaların sonuçları incelendiğinde asit direnci, safra toleransı ve EPS üretim kapasitesi en yüksek olan *P. thoenii* AKP1, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO7, DO8, *P. jensenii* DO6, BDP6, BDP11 suşları ile en düşük olarak belirlenen *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP3 suşları seçilerek koagregasyon deneyleri Bölüm 3.2.13 (Koagregasyon)'de anlatıldığı şekilde yapılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.15 ile Şekil 4.19'da gösterilmiştir. Ayrıca, suşların koagregasyon görünümleri ışık mikroskobunda da gözlenmiştir. Buna göre iyi bir şekilde koagregasyon gösteren ve olmayan propiyonibakteri suşlarının ayırımları gerçekleştirilmiştir.

Propiyonibakteri suşlarının *E. coli* ATCC 11229 ile koagregasyon sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek koagregasyon anaerobik (çalkalamasız) koşullarda *P. thoenii* AKP1 suşunda (%61) belirlenmiştir. *P. thoenii* AKP1 suşu aerobik (%55) ve aerobik çalkalamalı (%50) koşullarda orta dereceli koagregasyon gösterdiği tespit edilmiştir. *P. thoenii* AKP1 suşunun koagregasyonun mikroskobik görüntüsü Resim 4.16'da verilmiştir. Aerobik koşullarda koagregasyonun azaldığı aerobik çalkalamalı ortamda ise en düşük koagregasyonun gerçekleştiği tespit edilmiştir. Propiyonibakteriler anaerobik olduğu için anaerobik koşullarda koagregasyonun yüksek olduğu, sindirim sistemindeki peristaltik hareketi taklit etmek amacıyla kullanılan aerobik çalkalamalı ortamın ise koagregasyonu düşürdüğü tespit edilmiştir. Otoagregasyonu yüksek olan suşların koagregasyonunda yüksek olduğu tespit edilmiştir. Düşük (*P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP3) ve yüksek (*P. thoenii* AKP1) koagregasyonun makroskobik görünümü Resim 4.17'de verilmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde, suşların EPS üretimleri (YEL ve skim milk) ile koagregasyonları arasında anlamlı ve pozitif bir ilişki bulunmuştur ( $P < 0.05$ ).





Şekil 4.19. Propiyonibakteri suşlarının anaerobik, aerobik, aerobik ve çalkalamalı ortamlarda koagregasyon



Resim 4.16. *E. coli* ATCC 11229 ile *P. thoenii* AKP1 suşunun anaerobik (A) ve aerobik (B) koagregasyonu (100X)





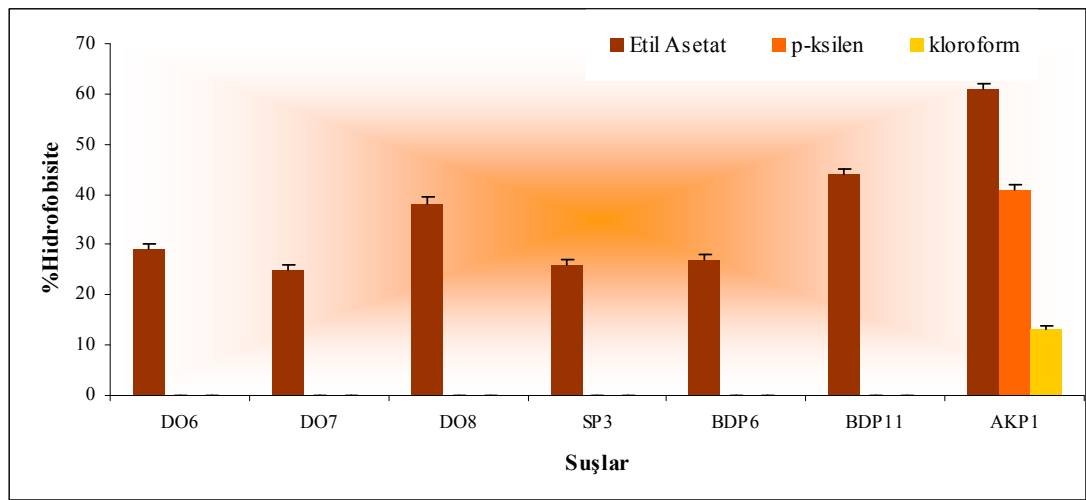
Resim 4.17. *E. coli* ATCC 11229 ile koagrege olmuş *P. thoenii* AKP1 ve koagrege olmamış *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP3

#### 4.12. Propiyonibakterilerin Hücre Yüzeyinin Hidrofobik Yapısı

Otoagregasyon ve koagregasyon özellikleri ile asit direnci, safra toleransı ve EPS üretim kapasitesi en yüksek olan *P. thoenii* AKP1, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO7, DO8, *P. jensenii* DO6, BDP6, BDP11 suşları ile en düşük olarak belirlenen *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP3 suşlarının hidrofobisiteyi Bölüm 3.2.14'de anlatıldığı gibi belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.16 ve Şekil 4.20'de verilmiştir. Suşların hidrofobisite sonuçları değerlendirildiğinde bazik çözücü olan etil asetata ilgisinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Etil asetata ilgisinin yüksek olması propiyonibakterilerin yüzey yapılarının asidik karakterde olduğunu göstermektedir. *P. thoenii* AKP1 suşu dışında diğer suşların asidik çözücü olan kloroform ve nötral çözücü olan p-ksilene ilgisinin olmadığı tespit edilmiştir. *P. thoenii* AKP1 suşu ise etil asetat, ksilen ve kloroforma sırasıyla %61, 41 ve 13 oranlarında hidrofobisite gösterdiği belirlenmiştir. AKP1 suşunun her üç çözücüde hidrofobisite göstermesi bu suşun yüzey yapısının kompleks olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.16. Propiyonibakteri suşlarının % hidrofobisite

	Etil Asetat	p-Ksilen	Kloroform
<i>P. jensenii</i> DO6	29±1,0	0	0
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DO7	25±1,0	0	0
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> DO8	38±1,5	0	0
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> SP3	26±1,0	0	0
<i>P. jensenii</i> BDP6	27±1,0	0	0
<i>P. jensenii</i> BDP11	44±1,0	0	0
<i>P. thoenii</i> AKP1	61±1,0	41±1,0	13±1,0



Şekil 4.20. Propiyonibakteri suşlarının % hidrofobisite

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Süt, peynir ve yoğurt gibi belirli süt ürünleri yararlı bakterilerin bağırsağa ulaştırılmasında uygun ortam sağlayan, gelişimlerini ve canlılıklarını destekleyen ideal gıda sistemleridir [149]. Bu çalışma ile Türkiye'ye özgü peynir çeşitlerinde bulunan propiyonibakteri türleri belirlenerek propiyonik asit bakterilerinin Türkiye'deki florası ortaya çıkarılacaktır. Peynirlerin mayalanmasında çevreden kontaminasyon ile geçen doğal propiyonibakteri türlerinin belirlenerek probiyotik özelliklerinin belirlenmesi için bu çalışmada geleneksel yöntemlerle yapılmış ülkemize ait peynirler kullanılmıştır.

Propiyonibakterilerin izolasyon ve genel sayımlarını belirlemede kullanılan YEL besi ortamının seçici besiyeri olarak uygun olmadığı belirtilmiştir [129]. Bu besiyerinde gelişebilen mesofilik laktobasiller, ürettikleri bakteriosin ile *Propionibacterium* spp.'lerin gelişimlerini inhibe etmelerinden dolayı peynir örneklerinde propiyonibakterilerin sayımı YELN katı besiyeri kullanılarak belirlenmiştir. Drinan ve Cogan (1992), *Propionibacterium* spp.'lerin YEL ve MRS ortamlarında yeterince iyi gelişmemelerini; yeast ekstrakt içerisinde bulunan şeker kalıntılarının laktik asit bakterileri tarafından kullanılması sonucu ortam pH'sının düşürmesine (*Propionibacterium* spp.'lerin gelişimini engelleyecek pH) ve ortamdaki besinlerin diğer starter bakteriler tarafından tüketilmesi ile açıklamışlardır. YEL besi ortamında seçicilik laktat tarafından sağlanmasına rağmen, genellikle yeast ekstrakt ve pepton diğer bakterilerin gelişmesine izin verecek yeterli gelişme faktörlerini içermektedir. Yeast ekstrakt eklenmeden besi ortamının seçiciliğini artırma çalışmaları başarısız olmuştur, çünkü propiyonik asit bakterileri yeast ekstrakt bulunmayan ortamlarda gelişmemektedirler [129]. YEL besi ortamına; sodyum azid [150], kloksasillin [129] ve naladiksik asit [13] gibi maddelerin eklenmesinin besi ortamının seçiciliğini artırdığı bildirilmiştir. Bu seçiciliğin, çok sayıda gram negatif bakterinin ve diğer starter bakterilerinin gelişimini kısmen engellenmesi ile olduğu tespit edilmiştir [13].

Çanakkale Ezine Koyun Peyniri, Erzurum Sünme Peyniri ve Kayseri Tomarza Yöresi Köy peynirlerinde propiyonibakterilere rastlanılmamıştır. Türkiye'nin çeşitli yörelerinden temin edilen bu peynirlerin üreticilerinden elde edilen bilgilere göre; peynir yapımında kullanılan süt, peynir yapımından önce kaynatılmaktadır. Cummunis ve Johnson (1986)'a göre propiyonik asit bakterilerinin optimum gelişme sıcaklık aralığı 30-37 °C olarak belirlenirken, bazı türlerin ise 25 °C ve 45 °C'de gelişebildikleri bildirilmiştir [12]. Optimum gelişme sıcaklıkları 30 °C olan ve süte doğal kontaminasyon yolu ile bulaşan bu bakterilerin peynir yapımında kullanılan süütün kaynatılması sürecinde ortamdan elimine olduğunu düşünmekteyiz. Carcano ve ark., (1995) İtalya'ya özgü peynir olan Parmigiano Reggiano ile Grana Pardo peynirlerinden bu peynirlerde geç olgunlaşmaya neden olan altı adet (*P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. acidopropionici* ve *P. thoenii*) propiyonik asit bakterisi izole ederek tanımlamışlardır. Parmigiano Reggiano ve Grana Pardo peynirlerinin olgunlaşma sürecinde ortamdan propiyonik asit bakterilerinin elimine edilebilmesi için bu bakterilerin 15, 22 ve 30 °C'deki sıcaklık toleranslarını belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar izole ettikleri propiyonik asit bakterileri için optimum gelişme sıcaklıklarının 30 °C olduğunu ve 22 °C'ye kadar da gelişme gösterebildiklerini belirlemişlerdir [12, 19].

Britz ve Riedel (1994), Güney Afrika'daki Ulusal Kooperatif Mandırasından temin edilen 6 adet Leerdammer peynirlerinde LAB bakteri sayısını MRS katı besiyerinde 8,8 log kob/g olarak belirlerken, YELN katı besiyerinde *Propionibacterium* spp.'lerin sayısının 6,5 log kob/g olduğunu bildirmişlerdir [13]. Çalışmada izolasyon yapılan peynirler arasında en yüksek propiyonibakteri sayısının Kars Gravyer peynirinde YELN katı besiyerinde 7,2 log kob/g ve bu peynirde diğer starter bakteri sayısı MRS katı besiyerinde 7,4 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Geniş (2–4 mm), kabartılı ve turuncu, kırmızı ve kahve renkli koloniler şeklinde YELN besiyerinde üreyen propiyonibakterilerin kolonileri diğer starter bakterilerden kolaylıkla ayırt edilebilmiştir. Leverrier ve ark., (2005) İsviçre tipi peynirlerden Emmental'de toplam klasik propiyonibakterilerin sayısının olgunlaşma süresi sonunda 10<sup>10</sup> kob/g olduğunu bildirmişlerdir [147]. İsviçre'ye özgü Appenzell peynirinden 43 suş, Emmental

peynirinden 10 suş, Raclette peynirinden 10 suş ve Sbrinz peynirinden 72 adet propiyonibakteri suşu izole edilmiştir [20].

Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden temin edilen 8 çeşit yöresel peynir numunesinden toplam 29 propiyonibakteri suşu izole edilmiştir. İzole edilen 29 suşun tanımlamasında klasik tanımlama metotları ve API 50 CHL, API 20 E, API 20 A kitleri kullanılmıştır. Klasik tanımlamada karbohidrat ve fizyolojik testler olmak üzere toplam 39 test kullanılırken, API kitleri ile tanımlamada ise karbohidrat ve fizyolojik testler olmak üzere 74 adet fenotipik karakterden yararlanılmıştır. Her iki tanımlamadan elde edilen sonuçlar nümerik taksonomi programında değerlendirilmiş suşların referans kültürlerine benzerlikleri yüzde olarak SNEATH'ın benzerlik formülüne göre hesaplanmıştır. API tanımlamasından elde edilen dendrogramda 29 izolatın benzerlik oranının %74 ve %91 arasında değiştiği belirlenmiştir (Şekil 4.2 ve 4.4). Geleneksel peynirlerden izole edilen 29 adet propiyonik asit bakterilerinden 15 adedi *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii*, 12 adedi *P. jensenii* ve 2 adedi *P. thoenii* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.4).

Britz ve Riedel (1995), 147 *Propionibacterium* izolatını API 50 CHL, 20 E ve 20 A kitlerine göre tanımlama sonuçlarını nümerik taksonomi programında değerlendirdiklerinde bakterilerin benzerlik oranlarını %43 ile %71 arasında olduğunu tespit etmişlerdir [7]. Britz ve Riedel (1991) yaptıkları bir diğer çalışmada 22 adedi referans kültür olmak üzere toplam 73 adet propiyonik asit bakterisinin tanımlamasında biyokimyasal testler ile API 50 CHL, API 20 A ve API 20 E kitleri kullanmışlar ve sonuçları nümerik taksonomi programında değerlendirmişlerdir. API sisteminin veritabanında propiyonik asit bakterileri yer almadığından, API kitlerinin propiyonik asit bakterilerinin karbohidrat kullanım profillerinin çıkarılmasında etkili ve yeterli bir sistem olduğu açıklanmıştır [25].

Britz ve Riedel (1991, 1994) duplike kültürler ile yaptıkları çalışmalarda taksonomik hata oranlarının %2,4 ve %2,9 oranında olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar, taksonomik çalışmalarında hata olasılığını en aza indirilmesinde iyi standardize edilmiş testlerin uygulanması ile gerçekleşebildiğini bildirmişlerdir [13, 25].

Çalışmada API tanımlamasında rastgele seçilen dublike SP6 ve SP9 suşları sırayla *P. jensenii* DSMZ 20235'e ve *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSMZ 20271'e %85 ve %91 oranlarında benzerlik göstermiş, dendrogram ve PCA analizlerinde bu türlere yakın mesafede yer almışlardır. Bu nedenle suşların taksonomik tanımlanmalarında herhangi bir sapmanın olmadığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmada gıda kökenli 'Klasik' propiyonibakterilerin dört temsilcisinden üçü (*P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii*, *P. jensenii*, ve *P. thoenii*) Afyon Dinar Yöresi Köy Peyniri, Balıkesir Manyas Dil Peyniri, Balıkesir Mihaliç Peyniri, Balıkesir Sepet Mihaliç Peyniri, İzmir Tulum Peyniri, Kars Gravyeri, Kars Kaşarı, Mihaliç Kelle Peyniri örneklerinden izole edilmiştir. *P. acidopropionici* ve *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* türlerine ise çalışılan peynir örneklerinde rastlanılmamıştır. Sekiz adet geleneksel peynirden izole edilen ve tanımlanan 29 adet suşun API tanımlamalarından elde edilen sonuçlar doğrultusunda %52 oranında dağılımla dominant türün *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* olduğu, *P. jensenii* türünün ikinci en yaygın (%41) tür olduğu tespit edilmiştir. %7 dağılımla en az bulunan tür ise *P. thoenii* olarak belirlenmiştir.

Baer ve Ryba (1992), *P. freudenreichii*'nin İsviçre tipi peynirlerin temel türü olduğunu bildirmişlerdir [10]. Britz ve Riedel (1994) ise Güney Afrika'daki Ulusal Kooperatif Mandırasında üretilen 6 adet Leerdammer peynirinde *P. acidopropionici* ve *P. jensenii* türlerinin dominant türler olduğunu açıklamışlardır [13]. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* ve *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* arasındaki en ayırt edici özelliğin laktoz fermentasyonu olduğu bildirilmiştir. Bu iki alt türden yalnızca *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* laktozu fermente edebilmektedir [12]. Her iki kültürün ayrımı protein profili veya 23S rRNA analizi ile belirlenemez iken, riboz tiplendirmesi ile belirlenebilmiştir [30]. Çalışmada izole edilen *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* türlerinin tanımlamasında hem API 50 CH hem de API 20 E kitlerinde bulunan laktoz testinin sonuçları dikkate alınmıştır.

Propiyonik asit, pek çok küf, bakteri ve mayanın gelişmesini inhibe eder. Propiyonik asit sıvı ortamlarda bakteriyostatik ve yüksek konsantrasyonlarda bakteriyosidal etki

gösterirler [88]. Propiyonik asitin tuz formu çeşitli endüstrilerde ham materyal olarak kullanılırken, propiyonik esterleri parfüm endüstrisinde ve selüloz propiyonatında plastik edüstrisinde kullanıldığı bildirilmiştir. Propiyonik asitin sodyum, kalsiyum ve potasyum tuzlarının gıda koruyucusu olarak “genel olarak güvenli” (Generally Recognized As Safe, GRAS) şeklinde tanımlanan gıdalara eklenebileceği belirlenmiştir [151]. Klasik propiyonibakterilerin enerji eldesi için çok farklı subsratları kullanabildikleri bildirilmiştir. Ancak bu bakteriler peynirlerdeki propiyonik asit fermentasyonu için temel enerji kaynağı olarak laktatı kullanmaktadırlar. Laktatın yanı sıra şekerleri, gliserol ve selüloz gibi organik bileşiklerle gluten, peynir altı suyu gibi çeşitli endüstriyel atıkları da propiyonik asit fermentasyonunda kullanabilmektedirler. Propiyonik asit bakterileri ortamda bulunan üç molekül laktatı fermente ederek iki molekül propiyonat, bir molekül asetat, CO<sub>2</sub> ve suya fermente eder. Bir peynirin iyi kalitede olabilmesi için, peynirde gerçekleşen propiyonik asit fermentasyonu sonucu oluşan propiyonat, asetat ve CO<sub>2</sub>'in yeterli miktarda oluşması gerekmektedir [152].

Çalışmada suşların YEL ve skim milk sıvı besiyerlerinde ürettikleri titre edilebilir asit miktarları araştırılmıştır. Suşların YEL sıvı besiyerindeki 8 günlük kültürlerinin titre edilebilir yüzde asit miktarları en düşük %0,08 (*P. jensenii* DO3 ve *P. jensenii* BDP6) ve en yüksek %0,21 (*P. jensenii* ITP2) olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.7). Suşların skim milk besiyerinde daha fazla asit ürettikleri gözlenmiştir. En düşük titre edilebilir asit miktarı %0,07 ile *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP4 kültüründe belirlenirken, %0,99 ile en yüksek asit üretimi *P. jensenii* BDP5 ve BDP11 suşlarında bulunmuştur. (Çizelge 4.5, Şekil 4.8). Suşların 8 günlük kültürlerinin son kültür pH'ları da YEL besiyerinde 6,1-6,8 arasında belirlenirken, başlangıç pH'sı 6,8 olan skim milk sıvı besiyerinin, 8 günlük inkübasyon sonunda pH'sının 4,6'ya kadar düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. Suşların skim milk besiyerinde ürettikleri asit miktarları YEL sıvı besiyerine ile karşılaştırıldığında genel olarak daha yüksek bulunmuştur. Suşların skim milk besiyerinde yüksek asit üretimlerinin nedenin bu besiyerinin bileşiminde bulunan laktozdan kaynaklandığı düşünülmektedir.

İzole edilen suşların tanımlama testlerinde laktoz ve glukozdan asit oluşturduğu tespit edilmiştir. Buna bağlı olarak da suşların asit üretiminin laktozdan mı ya da bunun parçalanması sonucu oluşan glukozdan mı arttığını belirlemek için YEL sıvı besi ortamının bileşiminde bulunan laktat elemine edilerek yerine aynı oranda laktoz ve glukoz ilave edilerek suşların yüzde asit üretimleri araştırılmıştır (Çizelge 4.5). Suşların glukozlu YEL sıvı besi ortamında ürettikleri titre edilebilir yüzde asit miktarları belirlendiğinde suşların genel olarak bu ortamda asit üretiminin yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9). İzole edilen propiyonibakterilerin glukozlu YEL sıvı besi ortamında asit üretiminin %0,50-0,75 arasında olduğu belirlenirken, laktozlu YEL sıvı besi ortamında asit üretiminin %0,10-0,77 arasında olduğu tespit edilmiştir. Laktozlu ortamda asit üretimi düşük olan suşların ise laktoz fermentasyonu yapamayan *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* türüne ait oldukları belirlenmiştir. Glukozlu YEL sıvı besi ortamının pH'sının 8 günlük inkübasyon sonunda 4,5'a, laktozlu YEL besiyerinde ise 4,6'ya kadar düşüş gösterdiği gözlenmiştir. Hsu ve Yang (1991), *P. acidopropionici*'nin laktozun fermentasyonu sonucu üretilen propiyonik asite pH'nın etkisini araştırdıklarında üretilen propiyonik asit miktarının pH'nın düşmesiyle arttığını tespit etmişlerdir. pH 6,1-7,1'de üretilen propiyonik asit % 33 iken, pH 4,5-5,0'e düştüğünde propiyonik asit miktarının %63'e yükseldiğini belirlemişlerdir [153]. Goswami ve Srivastava (2000), fermentörle propiyonik asit üretimini araştırdıklarında başlangıçta 47,7 g/l konsantrasyonunda olan laktozun 85 saat sonra hepsinin tüketildiğini ve 20,75 g/l propiyonik asit üretildiğini ve propiyonik asit ile birlikte asetik asit, süksinik asitinde üretildiğini tespit etmişlerdir [151].

İzole edilen suşların asit üretimlerini doğrulamak amacıyla nitel asit üretimleri araştırılmıştır. Bu amaçla YEL katı besi ortamının bileşiminde bulunan sodyum laktat çıkarılarak, yerine aynı oranda, %1 oranında laktoz ve %1 oranında glikoz ile bromkresol purple indikatörü ilave edilerek besiyerleri hazırlanmıştır. Suşlar bu besi yerlerine spot yöntemi ile ekimleri yapılarak anaerobik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde ortamın pH değişimine bağlı olarak spot ekimlerin etrafında oluşan sarı renkli zonların çapları kumpas ile ölçülerek asit üretimi nitel olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6, Şekil 4.10). Suşlar Glikozlu ve



Laktozlu YEL katı besi ortamlarında farklı zon çapları ile asit ürettikleri gözlenmiştir. Genellikle skim milk besi yerinde titre edilebilir asit miktarları yüksek olan suşların bu besiyerlerinde oluşturdukları zon çapları da yüksek bulunmuştur (Resim 4.8 ve 4.9). YEL, skim milk, glukozlu ve laktozlu YEL sıvı besiyeri ortamlarının hepsinde titre edilebilir asit miktarı yüksek olan *P. jensenii* DO1, DO3, DO4, DO6, SP6, BDP5, BDP7, BDP11 ve *P. thoenii* SMP1, AKP1 suşlarının glukozlu ve laktozlu YEL katı besiyerlerinde de asit üretimlerinin yüksek olduğu gözlenmiştir.

Rehberger ve Glatz (1998) propiyonik asit bakterilerinin asit üretilip üretilmediğini öncelikle glukoz, maltoz, fruktoz içeren bromkresol purple YEL katı besiyerinde araştırmışlar ve asit üreten suşların ürettikleri asit miktarlarını araştırdıklarında en yüksek asit üretiminin glikozlu YEL katı besiyerinde olduğunu tespit etmişlerdir [88]. Suşların Sodyum Laktat kontrol YEL katı besiyerinde pH değişimine bağlı olarak sarı renkli zonların hiçbir suşta oluşmadığı gözlenmiştir. Suşların bu besiyerinin sıvı ortamında da asit üretimlerinin düşük ve son kültür pH'larının yüksek olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.5). Suşların YEL sıvı ortamında asit üretimlerinin düşük olması nitel asit üretimleri ile de doğrulanmıştır (Resim 4.10).

Propiyonik asit bakterileri ortamda bulunan laktoz, glikoz ve laktatı kullanarak son ürün olarak propiyonik, asetik ve süksinik asit üretirler [151]. Bu doğrultuda, hem YEL ve hemde skim milk sıvı besi ortamlarında yüksek asit üretimi gösteren suşların (DO8, SP2, SP9, ITP1, DO1, DO3, DO4, DO6, BDP5, BDP7, BDP11, AKP1) ve referans kültürlerin, asit üretimleri HPLC analizi ile tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Suşların YEL sıvı besi ortamında asetik asit üretimi 2,3-9,2 mg/ml, propiyonik asit üretimi 1,2 ile 6,4 mg/ml arasında bulunmuştur. Suşların skim milk besi ortamında asetik asit üretimleri 0,7-3,3 mg/ml, propiyonik üretimleri ise 0,1 ile 4,8 mg/ml arasında tespit edilmiştir. YEL sıvı besiyerinde, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO8 suşunun hem yüksek miktarda propiyonik asit ürettiği tespit edilirken (6,4 mg/ml), hemde 9,2 mg/ml'lik yüksek miktarda asetik asit ürettiği belirlenmiştir. Skim milk besiyerinde ise yüksek asetik asit miktarı *P. jensenii* DO6

suşunda (3,3 mg/ml) (Şekil 4.12), yüksek propiyonik asit miktarı ise *P. jensenii* DO4 suşunda (4,8 mg/ml) tespit edilmiştir (Şekil 4.13).

*P. shermanii* B-123 suşunun %1 oranında yeast ekstrat ve %2 oranında kalsiyum karbonat ilave edilen sıvı kültürlerinin 161 saatlik inkübasyon süresi sonunda 2,92 g/l asetik asit ve 2,21 g/l oranında propiyonik asit ürettiği HPLC analizi ile belirlenmiştir [87]. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii*, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, *P. acidopropionici*, *P. thoenii* ve *P. jensenii* türlerinin MRS, asetatsız MRS ve YEL besiyerlerinde propiyonik asit ve asetik asit üretimlerini araştırıldığında en yüksek propiyonik ve asetik asit üretimlerinin YEL besiyerinde olduğu tespit edilmiştir. YEL besiyerinde HPLC ile belirlenen en yüksek propiyonik asit ve asetik asit üretiminin *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* ve *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* türleri tarafından yapıldığı bildirilmiştir [89].

*P. jensenii* DO1, DO4, BDP5 ve BDP11 suşlarının hem YEL hemde skim milk sıvı besi ortamlarındaki asetik ve propiyonik asit üretim miktarlarının yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7). Rehberger ve Glatz (1998), *P. acidopropionici*, *P. thoenii* ve *P. jensenii* türlerinin YEL sıvı besi ortamındaki laktat oranını artırdıklarında kültürlerin inkübasyon sonunda pH'sının düştüğünü ve buna bağlı olarak da üretilen propiyonik ve asetik asit miktarının arttığını belirlemişlerdir [88].

Probiyotik mikroorganizmaların en önemli özelliklerinden biri de, ortamda bulunan gıda kaynaklı patojenlerin ve kontaminant mikroorganizmaların gelişimini engellemeleri ve ölümlerine sebep olmalarıdır. İzole edilen propiyonibakterilerin YEL sıvı besi ortamında geliştirilen kültür supernatantları antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanıldığında test bakterilerine karşı herhangi bir antimikrobiyal aktivite belirlenememiştir. Warminska-Radyo ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada YEL sıvı besi ortamında geliştirilen kültürlerin supernatantlarının antimikrobiyal aktivite çalışmalarında etkili olmadığını bildirmişler ve çalışmalarında glikoz ve yeast ekstrat ile zenginleştirilen skim milk besi ortamının kültür supernatantlarının antimikrobiyal aktivite de test bakterilerine karşı etkili olduğunu göstermişlerdir [67]. Bu çalışmada zenginleştirilmiş skim milk besi ortamı kullanıldığında

izolatlarımızın birçoğunun test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edildi.

Yüksek asit üreten suşlar olarak belirlenen *P. jensenii* DO1, DO4, DO6, BDP6 suşları ile yalnız glikozlu YEL sıvı besi ortamında yüksek asit üretimi gösteren *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* ITP1 suşu çalışmada kullanılan tüm test bakterilerine karşı inhibisyon etkisi göstermişlerdir. *P. thoenii* SMP1, *P. jensenii* BDP11 ve SP6 suşlarının *L. monocytogenes* ATCC 7644 dışında diğer test bakterilerine antimikrobiyal etki gösterdikleri tespit edilmiştir. Lyon ve Glatz (1991), *P. thoenii* P127 suşundan izole ettikleri ve Propionicin PLG-1 olarak tanımladıkları bakteriyosinin, *E. coli* JM109 ve *E. coli* V517 ( $\leq 10$  mm)'ye, *P. aeruginosa* ( $\geq 18$  mm)'ya antimikrobiyal etki gösterdiğini belirlemişlerdir [90]. Van der Merwe ve ark., (2004) *P. thoenii* 447'den izole ettikleri thoeniicin 447 bakteriyosininin *Bacillus cereus*, *Clostridium tyrobutyricum*, *C. sporongenes*, *Lactobacillus* spp.'lere, *Enterococcus faecalis*, *Listeria innocua*, *Pediococcus pentosaceus*, *P. jensenii*, *P. acidopropionici*, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* ve *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* bakterilerine antimikrobiyal etki göstermediğini bu bakteriyosinin yalnızca *L. bulgaricus* (6 mm) ve *P. acnes* (4 mm) bakterilerine etkili olduğunu bildirmişlerdir [154].

En yüksek antimikrobiyal aktivite %91 oranında *E. coli* ATCC 11229, *S. sonnei* Mu:57'ye ve %76 oranında *P. aeruginosa* ATCC 27853 test bakterilerine karşı belirlenirken, en düşük antimikrobiyal aktivite ise %29 oranında *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve %35 oranında *M. luteus* NRLL B-4375 test bakterilerine olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). Warminska-Radyo ve ark., (2002) *P. acidopropioici* ve *P. thoenii* türlerinin *E. coli* O157:H7 ile *E. coli* 205 test bakterilerine %66 ile %74 oranında antimikrobiyal aktivite gösterdiklerini belirlemişlerdir [67]. Grinstead ve Barefoot (1992) *P. jensenii* P126 suşundan izole ettikleri Jensenii G bakteriyosinin çeşitli patojen bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkisini değerlendirdiklerinde, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O:24 B:17, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *S. aureus* ATCC 25923 bakterilerine karşı herhangi bir antimikrobiyal etki göstermediğini bildirmişlerdir [91]. Çalışmada antimikrobiyal etki gösteren suşların

bu etkiyi bakteriyosin ya da ürettikleri propiyonik asit ile gösterdikleri düşünülmektedir. Propiyonik asit bakterileri tarafından üretilen bu antimikrobiyal maddelerin doğal gıda koruyucusu olarak kullanımı ve aynı zamanda probiyotik özellik gösteren suşların ise bu antimikrobiyal özellikleri ile bağırsak florasının düzenlenmesine katkı sağlayacakları düşünülmektedir.

İzole edilen propiyonibakterilerin hepsi nalidiksik asit dışında tüm antibiyotiklere %56 ile %94 oranında yüksek duyarlılık gösterdikleri tespit edilmiştir. Warminska-Radyo ve ark., (2002) *P. acidopropioici* ve *P. thoenii* türlerinin çok farklı antibiyotiklere duyarlılıklarını araştırdıklarında nalidiksik asit dışında kullanılan antibiyotiklere yüksek oranda duyarlılık gösterdiklerini bildirmişlerdir [67]. *Propionibacterium* spp. suşlarının peynirlerden izolasyonunda YEL katı besiyerinde %0,02 oranında nalidiksik asit ilave edilmiştir [13]. Ortama ilave edilen nalidiksik asit gram negatif bakterilerin ve diğer starter bakterilerinin ortamdan elimine edilerek propiyonibakterilerin YELN katı besiyerinden izolasyonunu sağlamıştır. Antibiyotik duyarlılık testlerinde de tüm suşların nalidiksik asit antibiyotiğine (%100 dirençli) direnç göstermesi bu bakterilerin tanımlarını bir kez daha doğrulamıştır.

Araştırmada ampisilin (%91), nitrofurantoin (%94), kloramfenikol (%88), hücre duvar sentezini inhibe eden penisilin (%82) ve nükleik asit sentezini inhibe eden rifampisin (%74) antibiyotikleri izole edilen propiyonibakterilerin yüksek duyarlılık gösterdikleri antibiyotikler olarak belirlenmiştir. Roberts ve ark., (2006) hücre duvar sentezini inhibe eden; penisilin, amoksisilin, piperasillin-tazobaktam, sefoksitin, seftriakson, protein sentezini inhibe eden; klindamisin ve nükleik asit sentezini inhibe eden metronidazole antibiyotiklerine *Propionibacterium* spp.'lerin %100 oranında duyarlı olduklarını tespit etmişlerdir [155]. *P. freudenreichii*'nin ampisilin, kloramfenikol, rifampisin, kanamisin ve streptomisin antibiyotiklerine duyarlı olduğu, nalidiksik asitin ise herhangi bir inhibitörük etkisinin olmadığı bildirilmiştir [156].

Antibiyotiklere karşı belirlenen bu yüksek duyarlılık oranları propiyonik asit bakterilerinin gıda üretiminde kullanım olasılıklarını sağlamamaktadır.

Kemoteropatik ajanların bulunduğu ortamlardan bu bakteriler kolaylıkla elimine olabilirler. Ancak bu bakterilerin gram negatif bakteriler üzerinde göstermiş oldukları antimikrobiyal aktivitenin yüksek olması ve bağırsak için yararlı bir bakteri olan *Bifidobacterilerin* gelişimini stimüle etmesi bu bakterilerin probiyotik olarak kullanımlarını desteklemektedir.

Bakterilerin mideden geçip bağırsağa ulaştıklarında probiyotik özelliklerini gösterebilmelerindeki en büyük avantajlardan biri de ekzopolisakkarit (EPS) üretim kapasitelerine sahip olmalarıdır [157]. Bakteriler tarafından üretilen polisakkaritler reolojik özellikleri ve kıvam artırması 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 bildirilirken propiyonik asit bakterileri tarafından üretilen EPS çalışmalarına gereken önemin verilmesi gerektiği gösterilmiştir [103]. Bu sebeple, yapılan bu çalışma probiyotik kullanıma yönelik kapsamlı bir çalışma olması ve bu çalışmayla yüksek EPS üretimine sahip propiyonibakterilerin avantajlarının vurgulanması açısından bir ilk olmuştur.

*P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* türüne ait suşların ortalama EPS üretimlerinin hem YEL (87,4 mg/ml) hem de skim milk besi ortamında (278,3 mg/ml), *P. jensenii* türüne ait suşlardan yüksek olduğu belirlenmiştir (sırayla; 83,7 ve 253,8 mg/ml). İzole edilen propiyonibakterilerin skim milk besi ortamında ürettikleri EPS miktarları YEL besi ortamı ile kıyaslandığında daha yüksek olarak bulunmuştur. Suşlar arasında *P. jensenii* SP6, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO8, DO9 suşları hem skim milk besi ortamında ve hem de YEL besi ortamlarında yüksek EPS üretimine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, son kültür pH'sı ve hücre yoğunluğu ile ekzopolisakkarit üretimi arasında bir ilişkinin olmadığı belirlenmiştir. Ölçülen değerler bir birine yakın olmakla birlikte, bazı suşlarda (DO3, DO9, SP6) hücre

yoğunluğunun düşük olmasına rağmen, EPS üretimlerinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Frengova ve ark. (2000), yoğurt starter kültürü olarak kullanılan *S. thermophilus*'un on suşunun 57-270 mg/l arasında EPS ürettiğini, Cerning ve ark. (1992), *L. bulgaricus* suşlarının 55-150 mg/l aralığında EPS ürettiklerini bildirmişlerdir [105, 158]. Çalışmada skim milk ortamında geliştirilen *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO8 suşu 393,6 mg/l'ye kadar yüksek EPS üretmesi arzu edilen sonuçlardandır. Tüm suşların EPS üretiminin, daha önce *Lactobacillus* cinsine ait farklı türlerle ve *S. thermophilus* türü ile yapılan çalışmalarda elde edilen değerlere göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. 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 [159, 160].

Bir mikroorganizmanın probiyotik özelliklerini gösterebilmesi için bağırsak sisteminde canlı kalması gerekmektedir. Ağız yolu ile alınan probiyotikler bağırsak bölgesine ulaşmadan önce midenin asitli ortamı ile karşı karşıya kalmaktadırlar. Bu sebeple, propiyonibakteri suşlarının aside direncinin yüksek olmasının, asidik bir ortam olan midede canlılığını kaybetmeden bağırsak sistemine geçerek, burada kolonizasyonu için avantaj olabileceği düşünülmektedir. Her gün mideden pH'sı yaklaşık 2,0 civarında olan 3 litre kadar mide suyu salgılanmaktadır. Bu nedenle, probiyotik mikroorganizmaların kolona ulaşip, orada kolonize olması için gerekli olan ilk koşul mide asidinden en az oranda zarar görmesidir. Ancak yapılan çalışmalarda propiyonibakterilerin birçoğunun ancak pH 3,0, 4,0 ve 5,0'a direnç gösterip, daha altındaki pH'larda canlılık kaybı yaşadığı bildirilmiştir. Budan dolayı, probiyotik amaçlı kullanılmak istenen propiyonibakteri türlerinin direncinin maksimum düzeyde olması istenmektedir [161].

Asit stresi gıda teknolojisinde kullanılan bakteriler için özel bir öneme sahiptir. Laktik asit bakterilerinin fermentasyonu ile üretilen süt ürünleri asitli olabilmektedir. Fermente edilmiş süt ürünlerinde bulunan probiyotik bakteriler laktik asit stresi ile karşılaşmaktadırlar. *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* gibi probiyotik türler fermente ürünlerin işlenmesi ve depolanması sırasında ürünün asitliğinden dolayı canlılığını

kaybedebilmektedir. Peynirin az asitli, yüksek yağlı olması gibi yapısal özellikleri probiyotik bakterilerin depolanma, olgunlaşma ve sindirim sistemine taşınmasında koruyucu olabilmektedir. Probiyotik mikroorganizmaların mide boşluğuna geldiğinde mide de bulunan hidroklorik asit engelini aşarak yararlı etkiler gösterebilmek için bağırsağa ulaşması gerekmektedir [162]. Mikroorganizmaların sindirim sisteminde karşılaştıkları ilk engel midenin düşük pH'sıdır. Midenin düşük pH'sı proteinleri denatüre ederek bakterilerin canlılığını etkilemektedir. Bakterilerin miden sonra ince bağırsakta canlı kalabilmeleri safra ve pankreatik enzimlere dirençliliğine bağlıdır. Probiyotik bakterinin mide-bağırsak sistemini geçerek konak için yararlı etkiler oluşturabilmesi için bağırsakta günlük  $10^6$  ile  $10^9$  oranında canlı bakterinin bulunması gerekmektedir. Bu nedenle mide-bağırsak sistemi koşullarını tolere edebilen türlerin belirlenmesi bir mikroorganizmanın probiyotik olarak seçilmesinde en önemli kriter olarak belirlenmiştir. Ancak propiyonibakterilerin probiyotik kullanımları ve bağırsakta canlı kalmaları üzerine yapılan çalışmalar son yıllarda başlamıştır. Yararlı propiyonibakterileri içeren probiyotik peynirlerin geliştirilmesinin, tadı ve viskoz yapısından dolayı tercih edilmeyen geleneksel fermente süt ürünlerine alternatif olabileceği düşünülmüştür [68].

Bazı araştırmacılar aside ve safraya toleranslı türlerin seçiminde HCl ile asitlendirilmiş besiyeri, tampon, distile su ve safra tuzlarının kullanımı ile taramanın yapılabileceğini bildirmişlerdir [137, 164, 167]. Bu çalışmada HCl ile asitlendirilmiş besiyeri ve farklı konsantrasyonlarda safra içeren besiyerlerini kullanarak 29 izolat ile 5 referans kültürün asit ve safra toleransını belirlenmiştir (Çizelge 4.13 ve 4.14). Propiyonibakterilerin asit duyarlılığının yüksek oranda suş ve türe bağlı olduğu bildirilmiştir [42, 88]. Jan ve ark., (2000) yaptıkları çalışmada pH'sı 5 olan YEL sıvı besiyerinde kulture ettikleri *P. freudenreichii* TL 162 suşundan eksponensiyel fazda alarak pH 2-6 olan besiyerlerine ekim yaptıklarında, pH'sı 7 olan kontrol grubundan yapılan ekimlere göre %32 daha fazla canlı kaldığını kontrol grubunun canlılık oranının ise %0,01 oranında olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmada pH'sı 7 olan YEL besiyerinde geliştirilerek eksponensiyel fazda alınan kültürlerden pH 2, 3, 4 ve 5 olan YEL besiyerlerine ekim yapılarak 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda pH 7 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında suşların genelinde pH 2'de

yoğunluğun düştüğü ve yüzde inhibisyonun ise arttığı gözlenmiştir. Yüzde inhibisyonun artmasının inkübasyon süresinin uzun olmasından ve aşılana kültürün düşük pH değerlerinde geliştirilmemiş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Warminska-Radyo ve ark., (2002) çalıştıkları 12 adet PAB'den 9'unun pH'2 de 1 saat canlı kalabildiklerini tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar yalnızca *P. thoenii* T124 suşunun aynı koşullarda 2 saat canlı kalabildiğini ancak canlılık oranının 3 log değeri kadar düştüğünü belirlemişlerdir. pH 2,5 ve 3,0'de ise 12 PAB'nin hepsinin 1 saat canlı kalabildiğini yalnızca 5 PAB'in pH 2,5'da 2 saat canlı kalabildiğini gözlemlemişlerdir. *P. thoenii* 124 suşu pH 2,0 ve 2,5'da 2 saat canlı kalarak HCl'in etkisine en dirençli bakteri olarak belirlenmiş, *P. jensenii* 123, 128, P2/5 ve *P. freudenreichii* 83 suşları da pH 2,5 'da 2 saat canlı kalabilmişlerdir. Bu araştırmacılar yaptıkları bu çalışma ile PAB'lerin midenin asidik koşullarında canlı kalma süresinin 1-2 saat olduğunu belirlemişlerdir [67].

Çalışmada, pH 3'de yüzde inhibisyon %92 ile 98 arasında tespit edilirken, hücre yoğunluğunda en düşük (0,036 OD) *P. jensenii* SP7 suşunda, en yüksek ise (0,066 OD ve 0,069 OD) *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO7, BDP4 suşlarında belirlenmiştir. pH 4'de ortalama hücre yoğunluğu pH 2 ve 3' e göre biraz daha artış göstermiştir. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* suşlarının ortalama hücre yoğunluğu 0,084 OD, *P. jensenii* suşlarının ise 0,081 OD olarak bulunmuştur. pH 2, 3 ve 4 ile karşılaştırdığımızda ortalama en yüksek hücre yoğunluğunun ve en düşük yüzde inhibisyonun pH 5,0'de olduğu gözlenmiştir. pH 5'de *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* suşlarının ortalama hücre yoğunluğu 0,98 OD, *P. jensenii* suşlarının ise 0,53 OD olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.13). Zárate ve ark., (2000) pH'sı 2 olan mide sıvısına 3 saat maruz bırakılan *P. acidopropionici* CRL 1198, Q4 ve *P. freudenreichii* CRL 757, F3 'ün canlılığının 5 log kadar düştüğünü bildirilmişlerdir. Bu araştırmacılar test ettikleri dört türden üçünün canlılığının pH 3 ve 4'den anlamlı bir şekilde etkilenmediğini yalnızca *P. acidopropionici* Q4 suşunun pH 3'den çok az etkilendiğini bildirmişlerdir [68]. Leverrier ve ark., (2005) *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ve *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* türlerinde pH 3 ve 4 ile karşılaştırdıklarında canlılık kaybının pH 2'de daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir



[147]. Genel olarak çalışmada kullanılan tüm izolatlara bakıldığında *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii*'ye ait olanların diğerlerine oranla daha dirençli olduğu, *P. jensenii*'ye ait olanların ise biraz daha duyarlı olduğu görülmektedir. Yüksek EPS üretimi gösteren *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO5, DO7, DO8, *P. jensenii* BDP11 ve *P. thoenii* AKP1 suşlarının farklı pH değerlerine direncinin diğer suşlara göre yüksek olduğu görülmüştür.

Probiyotik mikroorganizma seçiminde bakterilerin ince bağırsak sistemi koşullarında canlı kalması, midedeki canlılığa göre daha önemli bulunmuştur. Asite duyarlı bir bakteri tamponlanarak uygun gıda içerisinde mide de canlı kalabilmektedir. Ancak probiyotik bakterinin konak için yararlı etkiler gösterebilmesi için ince bağırsakta canlı kalabilmesi ve kolonize olması gerekmektedir [112]. Ayrıca safraya toleranslı türlerin seçimi laktoz intoleransı olan insanlarda laktozu sindirimini düzenlemesi açısından önemli olduğu bildirilmiştir [68]. Bu nedenlerle safraya tolerans aslında probiyotik seçiminde temel kriterlerden birini oluşturmaktadır. Yağları parçalayarak bunların bağırsaklardan emilimlerine yardımcı olmak üzere karaciğerden ince bağırsağa salgılanan safra, bakterilerin büyük oranda lipit ve yağ asidi içeren hücre membranlarına zarar vermek suretiyle inhibitör etkisi yapmaktadır [163]. Bu sebeple probiyotik olarak kullanılacak bakterilerin bağırsaklarda fonksiyon gösterebilmeleri için safraya karşı dirençli olmaları gerekmektedir [164, 165]. Bununla beraber, insan kullanımı için probiyotiklerin seçimindeki safra toleransı çalışmalarında % 0,15 ve % 0,30 konsantrasyonlarında safranın kullanılması önerilmektedir [112]. Yapılan çalışmalarda, insandaki safra konsantrasyonuna yakın bir değer olmasından dolayı safraya dirençli olan suşları belirlemek için özellikle % 0,30'lük safra konsantrasyonunun kritik bir değer olduğu bildirilmiştir [166].

Çalışmada izole edilen propiyonibakteriler ortamda bulunan safrayı belirli bir seviyeye kadar tolere edebilmektedir. Ancak safra konsantrasyonu yükseldikçe ve özellikle % 0,30 oranındaki safranın varlığında tüm suşların yoğunluğunda azalma tespit edilmiştir. Çalışmada, tüm safra konsantrasyonlarındaki ortalama hücre yoğunlukları değerlendirdiğinde *P. jensenii*'ye ait olan suşların diğerlerine oranla daha dirençli olduğu *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii*'ye, ait olanların ise biraz

daha duyarlı olduğu görülmektedir. %0,06, %0,15 ve %0,30 safra konsantrasyonlarına *P. jensenii* suşlarının ortalama hücre yoğunlukları sırayla 1,17 OD, 0,93 OD ve 0,74 OD olarak tespit edilirken, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* suşlarının 1,04 OD, 0,83 OD ve 0,63 OD olarak belirlenmiştir. *P. thoenii* olarak tanımlanan SMP1 ve AKP1 suşları ise tüm safra konsantrasyonlarında yüksek gelişim göstermiştir. Zárate ve ark., (2000) *P. freudenreichii* türlerinin bağırsak koşullarına *P. acidopropionici* türlerinden daha fazla dirençli olduğunu ve 180 dk maruz bırakıldıkları pankreatik sindirimin *P. freudenreichii*'lerin canlılığını çok az etkilediklerini tespit etmişlerdir [68]. Huang ve Adams (2004), çalışmada kullandıkları 13 PAB'dan çoğunun safraya toleranslı olduklarını, 240 dk'lık safralı inkübasyondan sonra canlılığın kaybolmadığını belirlemişlerdir. Yalnızca *P. freudenreichii* CSCC2207 ve *P. acidopropionici* 341 suşlarının safralı ortamda canlılıklarında çok az kayıp olduğunu tespit etmişlerdir [112].

Çalışmada yüksek EPS üretimi gösteren *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO7, DO8, *P. jensenii* BDP11 ve *P. thoenii* AKP1 suşları hem asitli hemde safralı ortamlarda diğer suşlara oranla daha fazla gelişim göstermişlerdir. Warminska-Radyo ve ark., (2002) yaptıkları çalışmada 12 PAB'dan yalnızca *P. jensenii* P2/5, *P. thoenii* 124 ve *P. acidopropionici* 122 suşlarının %4 safra konsantrasyonunda 2 saat canlı kalabildiklerini, bu üç türden yalnızca *P. thoenii* 124 suşunun aynı zamanda pH 2,0 ve 2,5'e dirençli olduklarını tespit etmişlerdir [67]. Böke (2005) tarafından yapılan çalışmada ise *Lactobacillus* suşlarının mide asitliğine yakın farklı pH'lara (1–3) dayanıklılıkları ölçülmüş pH 3'e tüm suşların yüksek oranda (% 72,5-96,3) dirençlilik gösterdiği fakat pH 1'de canlılık gözlenemediği belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada, laktobasil suşlarının % 0,15 konsantrasyonundaki safrayı % 30–39 ve % 0,30 konsantrasyonundaki safrayı % 24–36 arasında değişen oranlarda tolere ettikleri belirlenmiştir [157].

Yapılan çalışmada elde edilen verilere göre, suşların aside olan dirençliliğinin literatür taramalarında belirlenen laktobasillere göre düşük olduğu, buna karşın safraya karşı toleransının çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada, EPS üretimi yüksek olan suşların düşük asitliğe daha dirençli ve safraya daha

toleranslı olması dikkat çekicidir. Elde edilen sonuçlara göre, EPS üretimi ile asit direnci ve safra toleransı özellikleri arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Bu ilişki istatistiksel olarak da değerlendirilmeye alındığında, suşların asit direnci ve safra toleransı ile EPS üretim kapasiteleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu saptanmıştır ( $P < 0.05$ ). Elde edilen bu sonuçlar, özellikle EPS'nin asit ve safraya karşı koruyucu etkisinin varlığını göstermektedir ve bu düzeyde yapılmış ilk çalışma olması çalışmanın önemini ortaya çıkarmaktadır.

Araştırmada peynirden izole edilen propiyonibakterilerin probiyotik özellikleri araştırılmıştır. Amaç bu bakterilerin bağırsak epiteline kolonize olarak bağırsak florasını düzenlenmesidir. Bakterilerin bağırsakta epitele kolonize olabilmesi için agregasyon yeteneğine sahip olması gerekmektedir. Pèrez ve ark., (1998) da *Bifidobacterim* türleri ile yaptığı bir çalışma da otoagregolamayan suşların yüksek hidrofobisitelere rağmen Caco-2 hücrelerine tutunamadıklarını tespit etmişlerdir [168].

*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Propionibacterium*'lerin bazı seçilmiş türleri probiyotik ürünlerle alındıklarında insan sağlığı üzerinde olumlu etkiler göstermektedirler. Patojen olmamak, mide-bağırsak sistemi koşullarına toleranslı olmak, bağırsak mukozasına adezyon ve rekabetle patojenlerin bağırsaktan uzaklaştırılması probiyotik seçiminde en önemli kriterler olarak dikkate alınmıştır. Probiyotiklerin konak için yararlı etkiler gösterebilmesi için agregasyon ile yeterli yoğunlukta olmaları gerekmektedir. Bu nedenle probiyotiklerin agregasyon yetenekleri probiyotik seçiminde istenilen bir özellik olduğu bildirilmiştir. Probiyotiklerin patojen bakterilerle koagregasyonu bu bakterilere, bağırsakta tutunamayan ve koagregolamayan türlere göre avantaj sağlamaktadır. Bağırsakta epitel hücrelere adezyon, spesifik olmayan (hidrofobisite) ve spesifik ligand-reseptör gibi kompleks işlemler gerektirmektedir [169, 170]. Bakteri hücrelerinin adezyonu genellikle hücre yüzey yapısı ile ilişkilendirilmiştir. Bazı araştırmacılar *Lactobacillus* türlerinin koagregasyon yeteneklerinin patojenlerin kolonizasyonunu engelleyen bir bariyer olabileceğini bildirmişlerdir [171, 172].

Çalışmada probiyotik bakterilerin adezyon özelliklerinin araştırılmasında ön belirleyici olan hidrofobisite ve agregasyon özellikleri de araştırılmıştır. Bu amaçla hidrofobisite, otoagregasyon, bağırsakta sıklıkla bulunan ve diyareye neden olan *E. coli* ile koagregasyonları ölçülerek bakterilerin hücre yüzey özellikleri hakkında bilgi edinilmesi hedeflenmiştir. Hidrofobisite ve agregasyon çalışmalarında asit direnci, safra toleransı ve EPS üretim kapasitesi en yüksek olan *P. thoenii* AKP1, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO7, DO8, *P. jensenii* DO6, BDP6, BDP11 suşları ile en düşük olarak belirlenen *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP3 suşları kullanılmıştır. Ruas-Madiedo ve ark., (2006) yaptıkları çalışmada probiyotik mikroorganizmalar tarafından üretilen EPS'nin, bağırsakta mukusu maskeleyerek başka bakterilerin adezyonunu engellediğini bununda üretilen EPS'nin miktarına ve tipine bağlı olduğunu bildirmişlerdir [104].

Propiyonik asit bakterilerin agregasyon ve hidrofobisite özellikleri üzerine yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır [73, 169, 170]. Collado ve ark., (2008), *P. freudenreichii* ssp *shermanii* JS suşunun 20 ve 37 °C'de 2 saatlik inkübasyon süresi sonunda otoagregasyonunu sırayla %7,7 ve % 17,4 olarak belirlemişlerdir. Yine bu araştırmacılar çalıştıkları 12 adet probiyotik türden, *L. rhamnosus* GG, LC-705 ve *L. fermentum* ME-3 (<%25, 20 saatlik inübasyon 20 °C'de) türlerini yüksek otoagregasyon olan türler olarak belirlerken, *B. longum* 46 (%8,9) ve *B. lactis* 420 (%5) türlerini de en düşük otoagregasyon olan türler olarak tespit etmişlerdir. Çalıştıkları 12 adet türden 9'u 37 °C'de yüksek otoagregasyon (%28,8-63,2) göstermişlerdir [170]. Aslim ve ark., (2007) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarının otoagregasyonu %45- 93 arasında, Ekmekçi ve ark., (2009) vajinadan izole etikleri 28 adet *Lactobacillus* spp. suşlarının 37 °C'de ve aerobik koşullarda otoagregasyonunun %21 ile 97 arasında olduğunu tespit etmişlerdir [173, 174].

Çalışmada *P. thoenii* AKP1 suşu anaerobik (%98), aerobik (%85) çalkalamasız ve aerobik çalkalamalı (%93) koşulların hepsinde yüksek otoagregasyon göstermiştir. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO7 (%39) ve *P. jensenii* BDP11 (%47) suşları anaerobik koşullarda orta dereceli otoagregasyon göstermiştir. Propiyonibakteriler anaerobik olduğu için anaerobik koşullarda otoagregasyonun yüksek olduğu,

sindirim sistemindeki peristaltik hareketi taklit etmek amacıyla kullanılan aerobik çalkalamalı ortamın ise otoagregasyonu düşürdüğü tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında çalışmada kullanılan ve yüksek EPS üretimi gösteren propiyonibakterilerin otoagregasyonun laktobasillerden düşük ve *P. freudenreichii* ssp *shermanii* JS (%17,4) probiyotik suşundan ise yüksek olduğu belirlenmiştir. Otoagregasyonun bağırsak habitatındaki kısa yerleşim zamanlarında laktobasillerin kolonizasyon yeteneğini büyük ölçüde artırdığı düşünülmektedir. Son zamanlarda otoagregasyonun bifidobakterilerde hücre tutunmasının göstergisi olduğu bildirilmiştir [118, 144, 168]. Yüksek EPS üreten ve otoagregasyon gösteren suşların epitel yüzeylere daha yüksek oranda kolonize olabilecekleri düşünülmektedir.

Hücresel tutunmada, hücre membranı ve etkilediği hücreler arasında kompleks işlemlerin gerçekleştiği bildirilmiştir. Epitel ve mukozal yüzeylere tutunma probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalarda önerilen bir özelliktir. Bazı araştırmacılar bakterilerin epitel ve mukusa tutunmasına aracılık eden bileşim ve yapıları araştırdıklarında çoğu kez agregasyonun adezyon ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. Bakteriyel agregasyon aynı türden bakteriler arasında (otoagregasyon) yada farklı türden bakteriler arasında (koagregasyon) probiyotik bakterilerin aktif oldukları insan bağırsağı gibi bazı ekolojik habitatlarda gerçekleşmektedir [73].

Çalışmada yüksek ve düşük EPS üretimi gösteren suşların koagregasyon özellikleri araştırıldığında, *E. coli* ATCC 11229 ile en yüksek koagregasyon anaerobik koşullarda *P. thoenii* AKP1 suşunda (%61) belirlenmiştir. *P. thoenii* AKP1 suşu aerobik (%55) çalkalamasız ve aerobik çalkalamalı (%50) koşullarda orta dereceli koagregasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Propiyonibakterilerin koagregasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar laktobasil ve bifidobakterilerle karşılaştırıldığında daha az olduğu belirlenmiştir [169, 170]. Collado ve ark., (2008), *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* JS suşunun koagregasyonunu *Bacteriodes vulgatus* ile %5,6, *Clostridium histolyticum* ile %6,1, *S. aureus* ile %6,7 ve *Enterobacter sakazakii* ile %1,5 olarak belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar çalıştıkları 12 adet probiyotik bakterinin patojen bakteriler ile koagregasyon olduklarını ancak koagregasyon yüzdesinin suşa, inkübasyon

süresi ve koşullarına bağlı olduğunu tespit etmişlerdir. En yüksek koagregasyonu *B. vulgatus* ile *L. rhamnosus* LC-705 (%29,7) ve *L. fermentum* ME-3 (%25,9) suşları arasında belirlemişler. *C. histolyticum* ile yüksek koagregasyon *L. rhamnosus* LC-705 (%24,6), *L. fermentum* ME-3 (%22,7) ve *L. acidophilus* NCFC (%25,5) suşlarında belirlenmiştir. Collado ve ark., (2006) *P. freudenreichii* JS suşunun farklı probiyotik türlerle koagregasyonunu karşılaştırdıklarında en iyi koagregasyonun *L. rhamnosus* LC-705 ve GG suşları ile olduğunu ve koagregasyon yüzdesinin %10'dan fazla olduğunu gözlemlemişler [169]. Bu çalışmalar ile karşılaştırıldığında çalışmada kullanılan suşların koagregasyonlarının daha yüksek olduğu görülmektedir.

Drago ve arkadaşlarının (1997) yaptığı bir çalışmada otoagregasyonu en iyi olan *L. paracasei* B21070 suşunun *E. coli* ATCC 3540 ve *E. coli* ATCC 25922 ile iyi derecede koagregasyonu tespit edilmiş ve otoagregasyonu iyi olan suşların koagregasyonunda iyi olabileceği bildirilmiştir [121]. Bu sonuçlar, çalışma sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Çalışmada kullanılan *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO7, *P. jensenii* BDP11 ve *P. thoenii* AKP1 suşlarının hem *E. coli* ATCC 11229 ile koagregasyonu hem de iyi derecede otoagregasyonu bulunmuştur. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* SP3 suşunun ise otoagregasyonu ve koagregasyonu değerlerinin düşük olduğu tespit edilmiştir. EPS üretimi yüksek olan suşların oto ve koagregasyonunda yüksek bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, EPS üretimi agregasyonu özellikleri arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Bu ilişki istatistiksel olarak da değerlendirilmeye alındığında, suşların EPS üretimleri (YEL ve skim milk) ile oto ve koagregasyonları arasında anlamlı ve pozitif bir ilişki bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). Elde edilen bu sonuçlar, özellikle EPS'nin agregasyonu artırdığını göstermektedir ve bu düzeyde yapılmış ilk çalışma olması çalışmanın önemini ortaya koymaktadır.

Bakterilerin farklı maddelere tutunması öncelikle hücre yüzeyinin fizikokimyasal özellikleri, hücre tutunması ile pozitif ilişkisi olan hidrofobisite, otoagregasyonu, hemaglutinasyon gibi kesin karakterlerle belirlenmiştir. Streptokoklar, laktobasiller ve bifidobakterilerin hücre tutunması ile hücre yüzey hidrofobisitesi arasında pozitif bir ilişkinin olduğu bildirilmiştir. Zárate ve ark., (2002), test ettikleri

propiyonibakteri türlerinin hemen hepsinin apolar çözücü olan P-ksilene zayıf affinite (%1,1-67,6) ve güçlü bazik çözücü olan etil asetata (%11,7-52,0), asidik çözücü olan kloroformdan (%0-28,6) daha fazla affinite gösterdiğini tespit etmişler. Bu sonuçlarla da propiyonibakterilerin hidrofilik, güçlü elektron alıcısı ve zayıf elektron verici olduğunu göstermişlerdir. Buradaki türlerin hücre yüzeylerinin asidik ve hidrofilik yapısının, daha önceden mandıra propiyonibakterilerinin tutunması ile ilişkili olduğu bildirilen, teikoik asitin yapısında bulunmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir [73]. Ksilen hücre yüzeyinin hem hidrofobisite hemde hidrofilite özelliklerini gösterdiği için apolar solvent olarak hidrofobisite çalışmalarında kullanılmaktadır. Collado ve ark., (2008), çalıştıkları 12 adet probiyotik türden çoğunun yüksek hidrofobisite gösterdiğini ancak *L. salivarius* Ls-33 (%13,5), *B. breve* 99 (%17,4) ve *P. freudenreichii* ssp *shermanii* JS (%5,6) probiyotik türlerinin düşük hidrofobisite gösterdiğini bildirmişlerdir [170].

Çalışmada suşların hepsi bazik çözücü olan etil asetata affinite gösterirken, yalnızca *P. thoenii* AKP1 suşu ksilen ve kloroformda affinite göstermiştir. Bu da suşların yüzey yapısının genel olarak asidik karaktere sahip olduğunu, AKP1 suşunun ise yüzey yapısının kompleks olduğunu göstermektedir. Bağırsak pH'sının bazik olması ve suşların yüzey yapısının asidik olmasından dolayı bağırsak epiteline adezyonun yüksek olacağı düşünülmektedir.

Birçok araştırmacının ileri sürdüğü gibi mandıra orjinli propiyonibakteriler gösterdikleri yararlı özelliklerden dolayı probiyotik olarak kullanılabilirler [21, 70, 71, 77, 145, 146, 147, 148]. Bu nedenle yapılan çalışma, Türkiye'de farklı yörelerdeki evlerde yapılan çeşitli yöresel peynirlerden bulunan propiyonibakterilerin araştırıldığı ilk çalışmadır. Bu çalışma birçok geleneksel peynir örnekleri ile yapılmış ve genetiği değiştirilmemiş doğal izolatların arandığı kapsamlı bir çalışma olmakla birlikte, Türkiye'de bulunan farklı yöresel peynirlerden izole edilen propiyonibakterilerin probiyotik özellikleri bakımından bilgiler vermiştir. Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre suşlar tarafından üretilen EPS'nin probiyotik kullanım açısından önemli olduğu görülmüştür. EPS üretimi yüksek propiyonibakteri suşlarının asitliğe ve safraya daha dirençli olduğu, bununla birlikte epitel hücrelere

tutunmanın belirleyicisi olan oto ve koagregasyon kapasitesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Özellikle probiyotik kullanım açısından son zamanlarda çok önemli bir grup olduğu vurgulanan propiyonibakterilerin Türkiye'nin geleneksel peynirlerinde bulunan suşları ile bu düzeyde yapılmış kapsamlı bir çalışma olması nedeni ile bundan sonra bu alanda yapılacak olan araştırmalar için çok önemli bir kaynak oluşturacağı düşünülmektedir. Ayrıca, bu bakterilerin bağırsakta kolonize olmasına toplumun beslenme alışkanlıkları, coğrafi koşullar ve bakteri türlerinin farklılığı gibi birçok parametrenin de etkili olduğu düşünülürse, özellikle Türkiye'nin geleneksel peynirlerinden izole edilen doğal, probiyotik özellikleri araştırılmış üstün nitelikli suşların insanlarda uygulanması ile daha verimli sonuçların alınabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma sonucunda, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO7, *P. jensenii* BDP11 ve *P. thoenii* AKP1 suşlarının asit direnci, safra toleransı ve EPS üretim kapasitesinin yüksek olması nedeniyle canlılığını koruyarak, bağırsaklara ulaşacağı düşünülmektedir. Probiyotik seçim kriterlerinden olan hidrofobisite, otoagregasyon, koagregasyon, asit veya bakteriyosin gibi antimikrobiyal metabolik ürün üretimi ve antibiyotiklere dirençlilik kriterleri propiyonibakteriler için de değerlendirilmiştir. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO7, *P. jensenii* BDP11 ve *P. thoenii* AKP1 suşlarının otoagregasyon ve koagregasyon değerlerinin yüksek olduğu, hem yüksek asit üretimi hemde yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Ancak bu suşların bazı antibiyotiklere dirençli iken genel olarak antibiyotiklere duyarlı oldukları bulunmuştur. *P. thoenii* AKP1 suşunun denenen üç hidrokarbona affinite ile hücre yüzeyi kompleks bir yapı gösterirken, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO7 ve *P. jensenii* BDP11 suşlarının ise etil asetatla hidrofobisitesinin yüksek olması nedeniyle hücre yüzeyinin asidik yapıda olduğu bunun da epitele tutunma için avantaj olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, bu suşların ürettikleri EPS aracılığıyla epitel yüzeylere daha kolay kolonize olarak, patojenler üzerindeki inhibisyon etkileri sayesinde de epitel yüzeyde *E. coli* gibi patojen mikroorganizmalar için biyolojik bir bariyer oluşturabileceklerdir. *P. freudenreichii*



subsp. *freudenreichii* DO7, *P. jensenii* BDP11 ve *P. thoenii* AKP1 suşlarının taşıdığı bütün bu özelliklerinden dolayı sindirim sisteminde canlı kalarak konukçu için yararlı olabileceği düşünüldüğünden, probiyotik mikroorganizma olarak kullanımları önerilmektedir.

Gelecek çalışmalarda, propiyonibakterilerin asit direncinin az olması nedeniyle bu özelliği kapsülleme ve benzeri tekniklerle geliştirilerek probiyotik açıdan daha verimli kültürlerin oluşturulması önerilebilir. Aynı zamanda, üstün özelliğe sahip suşlar probiyotik uygulamalar için ticari preparatlar haline getirilebilir. Bağırsak epiteline kolonize olacağı düşünülen bu üstün özellikteki suşlardan birinin veya bir kaçının bir arada probiyotik olarak *E. coli*'nin neden olduğu enfeksiyonları önlemede klinik kullanımı önerilmektedir. Çalışmada elde edilen bu sonuçların daha sonraki probiyotik çalışmalara kaynak olacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Rossi, F., Torriani, S., Dellaglio, F., "Genus- and Species-Specific PCR-Based Detection of Dairy Propionibacteria in Environmental Samples by Using Primers Targeted to the Genes Encoding 16S rRNA" , *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (9): 4241-4244 (1999).
2. Turantaş, F., Ünlütürk, A., Gökten, D., "Microbiological and compositional status of Turkish white cheese" , *J. Food Microbiol.*, 8: 19-24 (1989).
3. Durlu-Özkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., "Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from beyaz cheese made from raw ewes' milk" , *J. Appl. Microbiol.*, 91: 861-870 (2001).
4. Kasimoglu, A., "Determination of *Brucella* spp. in raw milk and Turkish white cheese in Kirikkale" , *Dtsch. Tierarztl Wochenschor.*, 109 (7): 324-326 (2002).
5. Faye, T., Brede, D. A., Langsrud, T., Nes, I. F., Holo, H., "Prevalence of the genes encoding propionicin T1 and protease-activated antimicrobial peptide and their expression in classical propionibacteria" , *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 2240-2244 (2004).
6. Çetinkaya, A. "Yöresel Peynirler", *Ugurer Tarım Kitapları*, 8, 55, 60, 70, 81, 95, 167-171, 180, (2005).
7. Birtz, T. J., Riedel, K. H. J., "Numerical evaluation of the species groupings among the classical propionibacteria" , *Lait.*, 75: 309-314 (1995).
8. Gautier, M., Rouault, A., Sommer, P., Briandet, R., "Occurence of *Propionibacterium freudenreichii* bacteriophages in Swiss Cheese" , *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2572-2576 (1995).
9. Condon, S., Cogan, T. M., "Stimulation of Propionic Acid Bacteria by Lactic Acid Bacteria in Cheese Manufacture" , *Dairy Products Research Center, End of Project Report.*, DPRC No.32: 1-11 (2000).
10. Baer, A., Ryba, I., "Serological identification of propionibacteria in milk and cheese samples" , *Inter. Dairy J.*, 2: 299-310 (1992).
11. Stackebrandt, E., Cummins, C. S., Johnson, J. L., "Family Propionibacteriaceae: The Genus *Propionibacterium*" , *Prokaryotes.*, 3: 400-418 (2006).

12. Cummunis, C. S., Johnson, J. L., "Genus I. *Propionibacterium* Orla-Jensen 1909", In: P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2., *The Williams and Wilkins Co.*, Baltimore, MD, 1346-1353 (1986).
13. Britz, T. J., Riedel, K. H. J., "Propionibacterium species diversity in Leerdammer cheese" , *Int. J. Food Microbiol.*, 22: 257-267 (1994).
14. Charfreitag, O., Stackebrandt, E., "Inter- and Intrageneric Relationship of the Genus *Propionibacterium* as Determined by 16S rRNA Sequences" , *J. Gen. Microbiol.*, 135: 2065-2070 (1989).
15. Meile, L., Le Blay, G., Thierry, A., "Safety assessment of dairy microorganisms: *Propionibacterium* and *Bifidobacterium*" , *Int. J. Food Microbiol.*, 126: 316-320 (2008).
16. Kılıç, S., "Süt endüstrisinde laktik asit bakterileri" , *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:542*, Bornova-İzmir, 61-64 (2001).
17. Carvalho, A. F., Guezenec, S., Gautier, M., Grimont, P. A. D., "Reclassification of "*Propionibacterium rubrum*" as *P. jensenii*" , *Institut Pasteur.*, 146: 51-58 (1995).
18. Fessler, D., Casey, M. G., Puhán, Z., "Propionibacteria flora in Swiss raw milk from lowlands and alps" , *Lait*, 79: 201-209 (1999).
19. Carcano, M., Todesco, R., Lidi, R., Brasca, M., "Propionibacteria in Italian hard cheeses" , *Lait*. 75: 415-426. (1995).
20. Fessler, D., Casey, M. G., Puhán, Z., "Identification of propionibacteria isolated from brown spots of Swiss hard and semi-hard cheeses" , *Lait*, 79: 211-216 (1999).
21. Mantere-Alhonen, S., "Propionibacteria used as probiotics - A review" , *Lait*, 75: 447-452 (1995).
22. Rossi, F., Dellaglio, F., Peluso, M., Torriani, S., "Dairy propionibacteria: occurrence, resistance to technological stresses and antagonistic properties. (Italian)" , *Industria Alimentari.*, 39: 553-557 (2000).
23. Salminen, S., Wright, A. V., Ouwehand, A. "Lactic acid bacteria: The probiotic potential of Propionibacteria Chapter (4) 3<sup>th</sup>" , *Marcel Dekker, INC*, New York, 159-174 (2004).
24. Madigan, T. M., Martinko, J. M., "Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi 11<sup>nd</sup> ed.", Çeviri Editörü, Cumhuriyet ÇÖKMÜŞ, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 388 (2010).

25. Britz, T. J., Riedel, K-H. J., “A numerical taxonomy study of *Propionibacterium* strains from dairy sources” , **J. Appl. Bacteriol.**, 71: 407-416 (1991).
26. Rossi, F., Torriani, S., Dellaglio, F., “Identification and clustering of dairy propionibacteria by RAPD-PCR and CGEREA methods” , **J. Appl. Microbiol.**, 85: 956–964 (1998).
27. Gautier, M., de Carvalho, A., Rouault, A., “DNA fingerprinting of dairy propionibacteria strains by pulsed-field gel electrophoresis” , **Curr. Microbiol.**, 32: 17–24 (1996).
28. Riedel, K. H. J., Britz, T. J., “Justification of the “classical” *Propionibacterium* species concept by ribotyping” , **Syst. Appl. Microbiol.**, 19: 370–380 (1996).
29. De Carvalho, A. F., Gautier, M., Grimont, F., “Identification of dairy *Propionibacterium* species by rRNA gene restriction patterns” , **Res. Microbiol.**, 145: 667–676 (1994).
30. Tilsala-Timisjärvia, A., Alatossava, T., “Characterization of the 16S-23S and 23S-5S rRNA intergenic spacer regions of dairy propionibacteria and their identification with species-specific primers by PCR” , **Inter. J. Food Microbiol.**, 68: 45-52 (2001).
31. Gorret, N., Maubois, J. L., Engasser, J. M., Ghoul, M., “Study of the effects of temperature, pH, and yeast extract on growth and exopolysaccharides production by *Propionibacterium acidopropionici* on milk microfiltrate using a response surface methodology” , **J. Appl. Microbiol.**, 90: 788-796 (2001).
32. Boyaval, P., Corre, C., Dupuis, C., Roussel, E., “Effects of free fatty acids on propionic acid bacteria” , **Lait**, 75: 17-29 (1995).
33. Gomes, A. M. P., Malcata, F. X., “*Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biochemical, technological and therapeutic properties relevant for use as probiotics” , **Trends. Food Sci. Techn.**, 10: 139 (1999).
34. Corthier, G., “The health benefits of probiotics” **Danone Nutritopics**, 29: 1-17 (2004).
35. Mercenier, A., Pavan, S., Pot, B., “Probiotics as Biotherapeutic Agents: Present Knowledge and Future Prospects” , **Curr. Pharm. Design.**, 8: 99-110 (2002).
36. Sullivan, A., Nord, C. E., “The place of probiotics in human intestinal infections” , **Int. J. Antimicrob. Ag.**, 20: 313 (2002).
37. Fuller, R., “Probiotics in man and animal” , **J. Appl. Bacteriol.**, 66: 365-378 (1998).

38. Salminen, S., Bouley, C., Boutron- Ruault, M. C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., Moreau, M. C., Roberfroid, M., Rowland, O., "Functional food science and gastrointestinal physiology and function" , *Brit. J. Nutr.*, 80 (1): 147 (1998).
39. Sanders, M. E., "Probiotics" , *Food Technol.*, 53: 67-77 (1999).
40. Salminen, S., Ouwehand, A. C., Isolauri, E., "Probiotics: an overview of beneficial effects" , *Anton Leeuw.*, 82: 279-289 (2002).
41. Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., Kim, H. Y., "Probiotics and their fermented food products are beneficial for health" , *J.Appl. Microbiol.*, 100: 1171-1185 (2006).
42. 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).
43. Garsse, J., Herreillers, M., Loveren, H. van., Vos, J., Opperhuizen, A., "Immunomodulation by probiotics: a literature survey" *RIVM report 340320001, Bilthoven*, 6-33 (2003).
44. 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).
45. Klaenhammer, R. T., Kullen, J. M., "Selection and design of properties" , *Int. J. Food Microbiol.*, 50: 45-57 (1999).
46. Donohue, D. C., Salminen, S. J., "Safety of probiotic bacteria" , *Asia., Pac., J.Clin. Nutr.*, 5: 25-28 (1996).
47. Karahan, Z. C., Güvener, E., "Probiotics", *J. Infect. Dis. Clin.Microbiol.*, 4: 156-162 (1999).
48. Çakır, İ., "*Lactobacillus* ve Bifidobacterler'de bazı probiyotik özelliklerin incelenmesi " , Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü*, Ankara, 4-7 (2003).
49. Marteau, P., Jian, R., "Probiotics and health: new facts and ideas" , *Curr. Opini. Biotech.*, 13: 486-489 (2002).
50. Kos, B., Šušković. S., Šimpraga, M., Frece, J., Matošić, S., "Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92" , *J.Appl. Microbiol.*, 94: 981-987 (2003).

51. Yücesan, S., “Probiyotikler ve sağlık üzerine etkileri” , *Türk Diyetisyenler Derneği Bülteni*, 2: 1-13 (2002).
52. Wendakoon, N., Ozimek, L., “Inhibition of *H. pylori* growth by *Lactobacillus casei* in fermented milk” , *Milchwissenschaft.*, 57: 506-508 (2002).
53. Salminen, E. I., Ouwehand A. C., “Probiotics. Best Practice & Research” , *Clin Gastroenterol.*, 18: 299-313 (2004).
54. Girsmondo, M. R., Dargo, L., Lombardi, A., “Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora” , *Int. J. Antimicro. Agents.*, 12: 287-292 (1999).
55. 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).
56. Yıldırım, Z., Yıldırım, M., “Probiyotik özellik gösteren Bifidobakteriler” , *VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu (Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri)*, Tekirdağ, 266-271 (2000).
57. Gamez, S., Cosson, C., Deschamps, A. M., “Evidence for a bacteriocin-like substances produced by a new strain of *Streptococcus* sp., inhibitory to gram-positive food-borne pathogens” , *Res. Microbiol.*, 148: 757-766 (1997).
58. Ocana, V. S., Pesce, A. A., Holgado, P. R., Nader-Macias, M. E., “Characterization of bacteriocin-like substances produced by a vaginal *Lactobacillus salivarius* strain” , *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 5631-5635 (1999).
59. Volin, M. J., Jerry, S., Miller, T. L., Zang, Y., Bank, S., “Change in production of ethanol , acids and H<sub>2</sub> from glucose by the fecal of a 16- to 158- -d-old breast-fed infant” , *J. Nutr.*, 130: 85-90 (1998).
60. Kabir, A., Aiba, M. A.Y., Takagi, A., Kamiya, S., Mirwa, T., Koga, Y., “Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model” , *Gut.*, 41: 49-55 (1997).
61. Peltö, L., Salminen, S. J., Isolauri, E., “*Lactobacillus* GG modulates milk induced immune inflammatory response in milk-hypersensitive adults” , *Nutr Doday Suppl.*, 31: 454-455 (1996).
62. Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Matto, J., Mattila-Salonen, T., “Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties” , *J. Biotechnol.*, 84: 197-215 (2000).

63. Vorobjeva, L., Leverrier, P., Zinchenko, A., Boyaval, P., Khodjaev, E., Varioukhina, S., Ponomareva, G., Gordeeva, E., Jan, G., “Anti-stress activity of *Propionibacterium freudenreichii*: identification of a reactivative protein” , *Anton Leeuw.*, 85: 53-62 (2004).
64. Macfarlane, G. T., Cummings, J. H., Allison, C., “Protein degradation by human intestinal bacteria” , *J. Gen. Bacteriol.*, 132: 1647-1656 (1986). ”
65. Moore, W. E. C., Holdeman, L. V., “Human faecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians” , *Appl. Microbiol.*, 27: 961-979 (1974).
66. McFarland, L. V., “Normal flora: diversity and functions” , *Microb. Ecol. Health Dis.*, 12: 193-207 (2000).
67. Warminska-Radyo, I., Laniewska-Moroz, L., Babuchowski, A., “ Possibilities for stimulation of *Bifidobacterium* growth by propionibacteria” , *Lait.*, 82: 113-121 (2002).
68. Zárate, G., Pèrez 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)
69. Jan, G., Rouault, A., Maubois, J. L., “Acid stress susceptibility and acid adaption of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*” , *Lait.*, 80: 325- 336 (2000).
70. Pèrez Chaia, A., Nader de Macias, M. E., Oliver G., “ Propionibacteria in the gut: effect on some metabolic activities of the host” , *Lait.*, 75: 435-445 (1995).
71. Ouwehand, A. C., Suomalainen, T., Tölkö, S., Salminen, S., “In vitro adhesion of propionic acid bacteria to human intestinal mucus” , *Lait.*, 82: 123-130 (2002).
72. Lehto, E. M., Salminen S., “Adhesion of two *Lactobacillus* strains, one *Lactococcus* and one *Propionibacterium* to cultured human intestinal Caco-2 cell line” , *Biosc. Microflora.*, 16: 13-17 (1997).
73. Zárate, G., Morata De Ambrosini, V. I., Chaia, A. P., González, N. S., “Adhesion of dairy Propionibacteria to intestinal epithelial tissue in vitro and in vivo” , *J. Food Protect.*, 65: 534-539 (2002).
74. Huang, Y., Kotula, L., Adams, M. C., “The in vivo assessment of safety and gastrointestinal survival of an orally administered novel probiotic, *Propionibacterium jensenii* 702, in a male Wistar rat model” , *Food Chem. Toxicol.*, 41: 1781-1787 (2003).

75. Adams, M. C., Lean, M. L., Hitchick, N. C., Beagley, K. W., “The efficacy of *Propionibacterium jensenii* 702 to stimulate a cell-mediated response to orally administered soluble *Mycobacterium tuberculosis* antigens using a mouse model” , *Lait.*, 85: 75-84 (2005).
76. Perez-Chaia, A., Zarate, G., “Dairy propionibacteria from milk or cheese diets remain viable and enhance propionic acid production in the mouse cecum” , *Lait.*, 85: 85-98 (2005).
77. Perez-Chaia, A., Zarate, G., Oliver, G., “The probiotic properties of propionibacteria” , *Lait.*, 79: 175-185 (1999).
78. Parker, J. A., Moon, N. J., “Interactions of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* in mixed culture” , *J. Food Prot.*, 45: 326-330 (1982).
79. Karasevich, E. K., Marjenko, V. G., Zelkova, N. T., “Effect of metabolites of propionic acid bacteria on *Lactobacillus acidophilus*” , *From Dairy Sci. Abstr.*, 42: 7474 (1978).
80. Kaneko, T., Mori, H., Iwata, M., Meguro, S., “Growth stimulator for bifidobacteria produced by *Propionibacterium freudenreichii* and several intestinal bacteria” , *J. Dairy Sci.*, 77: 393-404 (1994).
81. Krause, I., Bockhardt, A., Klostermeyer, H., “Characterization of cheese ripening by free amino acids and biogenic amines and influence of bactofugation and heat-treatment of milk” , *Lait.*, 77: 101–108 (1997).
82. Sumner, S. S., Roche, F., Taylor, S. L., “Factors controlling histamine production in Swiss cheese inoculated with *Lactobacillus buchneri*” , *J. Dairy Sci.*, 73: 3050–3058 (1990).
83. Brook, I., Frazier, E.H. “Infections caused by *Propionibacterium* species” , *Rev. Infect. Dis.*, 13: 819-822 (1991).
84. Demain, A. L., “Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms” , *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 455-463 (1999).
85. El-Adaway, T. A., “Optimum production, stability, partial purification and inhibitory spectrum of antimicrobial compounds produced by *Pediococcus pentosaceus* D1” , *Nahrung/Food.*, 45: 118-124 (2001).
86. Woskow, S. A., Glatz, B. A., “Propionic acid production by a propionic acid-tolerant strain of *Propionibacterium acidopropionici* in batch and semicontinuous fermentation” , *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(10): 2821-2828 (1991).



87. Jain, D. K., Tyagi, R. D., Kluepfel, D., Agbebavi, T. J., "Production of propionic acid from whey ultrafiltrate by immobilized cells of *Propionibacterium shermanii* in batch process" , ***Process Biochem.***, 26: 217-223 (1991).
88. Rehberger, J. L., Glatz, B. A., "Response of cultures of *Propionibacterium* to acid and low pH: tolerance and inhibition" , ***J. Food Protect.***, 61(2): 211-216 (1998).
89. Lind, H., Jonsson, H., Schnurer, J., "Antifungal effect of dairy propionibacteria – contribution of organic acids" , ***Int. J. Food Microbiol.***, 98: 157-165 (2005).
90. Lyon, W. J., Glatz, B. A., "Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii*" , ***Appl. Environ. Microbiol.***, 57: 701-706 (1991).
91. Grinstead, D. A., Barefoot, S. F., "Jensenin G, a heat-stable bacteriocin produced by *Propionibacterium jensenii* P126" , ***Appl. Environ. Microbiol.***, 58: 215-220 (1992).
92. Lyon, W. J., Glatz, B. A., "Isolation and purification of propionicin PLG-1, a bacteriocin produced by a strain of *Propionibacterium thoenii*" , ***Appl. Environ. Microbiol.***, 59: 83-88 (1993).
93. Ekinci, F. Y., Barefoot, S. F., "Fed-batch enhancement of jensenin G, a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii* (*jensenii*) P126" , ***Food Microbiol.***, 23: 325-330 (2006).
94. Faye, T., Brede, D. A., Langsrud, T., Nes, I. F., Holo, H., "An antimicrobial peptide is produced by extracellular processing of a protein from *Propionibacterium jensenii*" , ***J. Bacteriol.***, 184: 3649-3656 (2002).
95. Miescher, S., Stierli, M. P., Teuber, M., Meile, L., "Propionicin SM1, a bacteriocin from *Propionibacterium jensenii* DF1: Isolation and characterization of the protein and its gene" , ***Syst. Appl. Microbiol.***, 23:174-184 (2000).
96. Ratman, P., Barefoot, S. F., Prince, L. D., Bodine, A. B., Mccaskill, L. H., "Partial purification and characterization of the bacteriocin produced by *Propionibacterium jensenii* B1264" , ***Lait.***, 79: 125-136 (1999).
97. Brede, D. A., Faye, T., Johnsborg, O., Odegard, I., Nes, I. F., Holo, H., "Molecular and genetic characterization of propionicin F, a bacteriocin from *Propionibacterium freudenreichii*" , ***Appl. Environ. Microbiol.***, 70: 7303-7310 (2004).
98. Warminska-Radyko, I., Laniewska-Moroz, L., "Antibacterial activity of different fractions from the culture of *Propionibacterium acidipropionici*" , ***Pol. J. Food Nutr. Sci.***, 8: 23-29 (1999).

99. Leversee, J. A., Glatz, B. A., "Detection of bacteriocin propionicin PLG-1 with polyvalent anti-PLG-1 antiserum" , *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 2235-2239 (2001).
100. Holo, H., Faye, T., Brede, D. A., Nilsen, T., Ödegård, I., Langsrud, T., Brendehaug, J., Nes, I. F., "Bacteriosins of propionic acid bacteria" , *Lait.*, 82: 59-68 (2002).
101. De Vuyst, L., Degeest, B., "Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria" , *FEMS Microbiol. Rev.*, 23:153-177 (1999).
102. Leigh, J. A., Walker, C. G., "Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function1" , *Trends Genet.*, 10: 63–67 (1994).
103. Cerning, J., "Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria" , *Lait.*, 75: 463-472 (1995).
104. Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., Reyes-Gavilan, C. G., Salminen, S., "Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to Human intestinal Mucus" , *J Food. Protect.*, 69(8): 2011-2015 (2006).
105. Cerning, J., Bouillanne, C., London, M., Desmazeaud, M., "Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria" , *J. Dairy Sci.*, 75: 692-699 (1992).
106. Cerning J., Renard, C. M. G. C., Thibault, J. F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., Topisirovic, L., "Carbon Source Requirement for Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus casei* CG11 and Partial Structure Analysis of the Polymer" , *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (11): 3914-3919 (1994).
107. Bouzar, F., Cerning, J., Desmazeaud, M., "Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants" , *J. Dairy Sci.*, 79: 205-211 (1996).
108. 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).
109. Roginski, H., "Fermented milks: products from Northern Europe" , *Ency. Food Microbiol.*, 791-798 (1999.)
110. Duboc, P., Mollet, B., "Applications of exopolysaccharides in the dairy industry" , *Int. Dairy J.*, 11: 759-768 (2001).

111. Crow, L. W., "Polysaccharide production by propionibacteria during lactose fermentation" , *Appl. and Environ. Microbiol.*, 54 (7): 1892-1895 (1988).
112. 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).
113. Zavaglia, A. G., Kociubinski, G., Pérez, P., Disalvo, E., Antoni, G. D., "Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria" , *J. Appl. Microbiol.*, 93: 794-799 (2002).
114. Kocatürk, U., "Açıklamalı Tıp Terimleri Sözlüğü" , *Ankara Üniversitesi Basımevi*, Ankara, 5 (1991).
115. Boris, S., Suarez, J. E., Barbés, C., "Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, vaginal isolate" , *J. Appl. Microb.*, 83: 413-420 (1997).
116. Boris, S., Suárez, J. E., Vázquez, F., Barbés, C., "Adherence of human vaginal *Lactobacilli* to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens" , *Infect. Immun.*, 66 (5): 1985-1989 (1998).
117. Reid, G., McGroarty, J. A., Angotti, A., Cook, R. L., "*Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens" , *Can. J. Microbiol.*, 34: 344-351 (1988).
118. Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli M., Palenzona, D., "Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*" , *Let. Appl. Microbiol.*, 31: 438-442 (2000).
119. Roos, S., Lingren, S., Jonsson, H., "Autoaggregation of *Lactobacillus reuteri* is mediated by putative DEAD-box helicase" , *Mol. Microbiol.*, 32 (2): 427-436 (1999).
120. Tanaka, H., Hashiba, H., Kok, J., Mierau, I., "Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum*- biochemical and genetic characterization" , *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 2502-2512 (2000).
121. Drago, L., Gismondo, M. R., Lombardi, A., Haën, C., Gozzini, L., "Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin" , *FEMS Microbiol. Lett.*, 153: 455-463 (1997).
122. 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).

123. Del Re, B., Busetto, A., Vignola, G., Sgorbati, B., Palenzona, D. L., “Autoaggregation and adhesion ability in a *Bifidobacterium suis* strain” , ***Lett. Appl. Microbiol.***, 27: 307-310 (1998).
124. Zárate, G., Morata De Ambrosini, V. I., Chara, A. P., González, N. S., “Some factors affecting the adherence of *Propionibacterium acidipropionici* CRL 1198 to intestinal epithelial cells” , ***Can. J. Microbiol.***, 48: 449-457 (2002).
125. Malik, A. C., Reinbold, G. W., Vedamuthu, E. R., “Evaluation of the taxonomy of the *Propionibacterium*” , ***Can. J. Microbiol.***, 14: 1185-1195 (1968).
126. deMan, J. C., Rogosa, M., Sharpe, M. E., “A medium for the cultivation of lactobacilli” , ***J. Bacteriol.***, 23: 130 (1960).
127. Anonymous, “Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları” , Halkman, A.K., Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 243-244, 246, 247, 250, 289, 261, 320, (2005).
128. Thierry, A., Madec, M. N., “Enumeration of propionibacteria in raw milk using a selective medium” , ***Lait.***, 75: 315-323 (1995).
129. Drinan, F. D., Cogan, T. M., “Detection of propionic acid bacteria in cheese” , ***J. Dairy Res.***, 59: 65-69 (1992).
130. Halkman, A. K., Akçelik M., “Gıdaların Mikrobiyolojik Analizi 1 Temel İlkeler”, Gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları, ***Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü***, Ankara, 203-226 (2000).
131. Halkman, A. K., Ayhan H., “Gıdaların mikrobiyolojik analizi 2 mikroorganizma sayımı”, Gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları, ***Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü***, Ankara, 229-254 (2000).
132. Tunail, N., “Mikrobiyoloji” , ***Pelin Ofset Tipo Matbaacılık.***, Ankara, 186 (2009).
133. Krieg, N. R., Gerhardt, P., “Solid, liquid/solid, and semisolid culture” , ***Methods for General and Molecular Bacteriology***, Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., and Krieg, N. R., ***American Society for Microbiology***, Washington, DC., 222 (1994).
134. Arda, M., “Bazı Önemli Biyokimyasal Testler” , Temel Mikrobiyoloji, ***Medisan Yayın Serisi***, Ankara, 294-314 (2006).

135. Smibert, R. M., Krieg, N. R., “Phenotypic Characterization” , Methods for General and Molecular Bacteriology, Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., and Krieg, N. R., *American Society for Microbiology*, Washington, DC., 611-651 (1994).
136. Temiz, A., “Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri” , *Hatiboğlu Yayınevi*, Ankara, 127 (1996).
137. Chung, H. S., Kim, Y. B., Chun, S. L. and Ji, G. E., “Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria” , *Int. J. Food Microbiol.*, 47: 25-32 (1999).
138. Swart, R., Riedel, K. H., Britz, T., “Optimized Standard conditions for determination of nitrate reduction in propionibacteria” , *Lait.*, 78: 217-226 (1998).
139. Kapsar, H. F., “Denitrification, nitrate reduction to ammonium, and inorganic nitrogen pools in intertidal sediments” , *Marine Biology*, 74: 133-139 (1983).
140. Demirci, M. ve Gündüz, H., “Süt Teknolojisi El Kitabı” , *Hasad Yayıncılık*, Ankara, 184 (1994).
141. CLSI, “Clinical and Laboratory Standards Institute. Document M-100-S9. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 12 th” , *Informational Supplement. M100-S12 CLSI*, Wayne Pennsylvania (2005).
142. Marshall, V. M., Rawson, H. L., “Effects of Exopolysaccharide Producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on texture of stirred yoghurt”. *Int. J. Food Sci Technol.*, 34: 137-143 (1999).
143. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Pebers, P. A. and Smith, F., “Colorimetric method for determination of sugars and related substances” , *Anal. Chem.*, 28: 350–356 (1956).
144. Vandervoort, L., Chistiaens, H., Verstraete, W., “Prevalence of coaggregation reactions among chicken lactobacilli” , *J. Appl. Bacteriol.*, 72: 214-219 (1992).
145. Mori, H., Sato, Y., Taketomo, N., Kamiyama, T., Yoshiyama, Y., Meguro, S., Sato, H. and Kaneko, T., “Isolation and structural identification of bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii*” , *J. Dairy Sci.*, 80: 1959–1964 (1997).
146. Roland, N., Bougle, D., Lebourrier, F., Arhan, P., Maubois, J. L., “*Propionibacterium freudenreichii* stimulates the growth of *Bifidobacterium bifidum* in vitro and increases fecal bifidobacteria in healthy human volunteers” , *Int. Dairy J.*, 8: 587–588 (1998).

147. Leverrier, P., Fremont Y., Rouault, A., Boyaval, P., Jan, G., “In vitro tolerance to digestive stresses of propionibacteria: influence of food matrices” , ***Food Microbiol.***, 22: 11-18 (2005).
148. Zárata, G., Chaia, A. P., Oliver, G., “Some Characteristics of Practical Relevance of the  $\beta$ -Galactosidase from Potential Probiotic Strains of *Propionibacterium acidipropionici*” , ***Anaerobe.***, 8: 259-267 (2002).
149. Ross, R. P., Fitzgerald, G., Collins, K. and Stanton, C., “Cheese delivering biocultures-probiotic cheese” , ***Austr. J. Dairy Technol.***, 57: 71-78 (2002).
150. Britz, T. J. and Holzapfel, W. H., “The suitability of different media for the isolation and enumeration of propionibacteria from dairy products” , ***S. Afr. J. Dairy Technol.***, 5: 213-216 (1973).
151. Goswami, V., Srivastava, A. K., “Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*” , ***Biochem. Eng. J.***, 4: 121-128 (2000).
152. Boyaval, P. and Corre, C., “Production of propionic acid” , ***Lait.***, 75: 453-461 (1995).
153. Hsu, S. T., Yang, S.T., “Propionic acid fermentation of lactose by *Propionibacterium acidopropionici* effects of pH” , ***Biotechnol. Bioeng.***, 38: 571-578 (1991).
154. Van der Merwe, I. R., Bauer, R., Britz, T. J., Dicks, L. M. T., “Characterization of thoeniicin 447, a bacteriocin isolated from *Propionibacterium thoenii* strain 447” , ***Int. J. Food. Microbiol.***, 92: 153-160 (2004).
155. Roberts, S. A., Shore, K. P., Paviour, S. D., Holland, D., Morris, A. J., “Antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in New Zealand: 1999–2003” , ***Journal of Antimicrobial Chemotherapy.***, 57: 992-998 (2006).
156. Dey, A. B., “Isolation and sequence analysis of the propanediol dehydratase genes of *Propionibacterium freudenreichii*” , Master Science, ***Submitted to the Graduate Faculty of Texas Tech University***, Texas, 1-72 (2007).
157. 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).
158. Frengova, G. I., Simova, E. D., Beshkova, D. M., Simov, Z. I., “Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains” , ***Znaturforsch.***, 57: 805-810 (2002).

159. 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).
160. 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).
161. Vernazza, C. L., Gibson, G. R., Rastal, R. A., "In vitro fermentation of chitosan derivatives by mixed cultures of human fecal bacteria", *Carbohydr. Polym.*, 60: 539-545 (2005).
162. Jan G., Leverrier, P., Pichereau, V., Boyaval, P., "Changes in protein synthesis and morphology during acid adaptation of *Propionibacterium freudenreichii*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 2029-2036 (2001).
163. 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).
164. 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).
165. 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).
166. Erkkilä, S., Petäjä, E., "Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use", *Meat Sci.*, 55: 297-300 (2000).
167. Jiang, Z. L. Z., Zhou, K., Li, P., Liu, G., Zhang, B., "Screening of bifidobacteria with acquired tolerance to human gastrointestinal tract", *Anaerobe*, 13: 215-219 (2007).
168. Pérez, P., Minnaard, Y., Disalvo, E. A., Antoni, L. D., "Surface properties of bifidobacterial strains of human origin", *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (1): 21-26 (1998).
169. Collado, M. C., Meriluoto, J., Salminen, S., "Development of New Probiotics by Strain Combinations: Is It Possible to Improve the Adhesion to Intestinal Mucus?", *J. Dairy Sci.*, 90: 2710-2716 (2006).

170. Collado, M. C., Meriluoto, J., “Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains” , *Eur. Food Res Technol.*, 226: 1065-1073 (2008).
171. Boris, S., Suárez, J. E., Barbés, C., “Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, vaginal isolate” , *J. Appl. Microbiol.*, 83: 413-420 (1997.).
172. Schachtsiek, M., Hammes, W. P., Hertel, C., “Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001<sup>T</sup> surface protein Cpf Mediating coaggregation with and aggregation among pathogens” , *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 7078-7085 (2004).
173. Aslim, B., Onal, D., Beyatli, Y., “Factors influencing autoaggregation and aggregation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* isolated from hand-made yogurt” , *J. Food Protect.*, 70: 223-227 (2007).
174. Ekmekçi, H., Aslim, B., Darilmaz Önal, D., “Some factors affecting the autoaggregation ability of vaginal Lactobacilli isolated from Turkish women” , *Arch. Biol. Sci.*, 61: 407-412 (2009).



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : DARILMAZ ÖNAL, Derya  
 Uyuğu : T.C.  
 Doğum tarihi ve yeri : 16.06.1980 Hannover  
 Medeni hali : Evli  
 Telefon : 05052352543  
 e-mail : derya\_onal@yahoo.com

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi /Biyoloji Bölümü	2005
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2002
Lise	Melikgazi Süper Lisesi	1998

### İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2007-	Aksaray Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2008-2010	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

### Yabancı Dil

İngilizce

### Yayınlar

1. Ekmekçi, H., Aslim, B. and Darılmaz Önal, D. "Some factors affecting the autoaggregation ability of vaginal lactobacilli isolated from turkish women" Archives of Biological Science, 61(3): 407-412 (2009).

2. Ekmekçi, H., Aslım, B. and Darılmaz Onal, D. "Factors affecting the coaggregation ability of Turkish women vaginal lactobacilli with *Candida* spp." *Annals of Microbiology*, 59(1): 163-167 (2009).
3. Yüksekdağ, Z., Darılmaz Onal D., and Beyatlı, Y. "Production and monomer compositions of exopolysaccharides by *Propionibacterium* spp. isolated from Turkish Traditional cheese" *New Biotechnology*, 25(Supplement 1): 49-50 (2009).
4. Yüksekdağ, Z., Darılmaz Onal D., and Beyatlı, Y. "Acid productions and antimicrobial activities of *Propionibacterium* strains" *New Biotechnology*, 25 (Supplement 1): 50 (2009).
5. Beyatlı, Y., Aslım, B., Önal, D. and Bozkurt, H., "Determination of some characteristic properties of lactic acid bacteria isolated from traditional hand-made Turkish yogurts", *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 103: 517-522 (2007).
6. Şenyuva, H.Z., Gilbert, J., Özcan, S. and Önal, D. "Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A producing fungi and toxins in individual Turkish dried figs" *World Mycotoxin Journal*, 1: 55-62 (2008).
7. Aslım, B., Onal, D., Beyatlı, Y., "Factors Influencing Autoaggregation and Aggregation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Isolated from Handmade Yogurt", *Journal of Food Protection*, 70(1): 223-225 (2007).
8. Önal, D., Beyatlı, Y., Aslım, B. " Probiyotik bakterilerin epitel yüzeye tutunması ve önemi", *Orlab online Mikrobiyoloji Dergisi*, [www.mikrobiyoloji.org/pdf/702050901.pdf](http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702050901.pdf) , 3(9), 1-10, (2005).

### **Ulusal ve Uluslararası Sempozyum Bildirileri**

1. Önal Darılmaz, D., Beyatlı, Y. ve Yüksekdağ, Z. "Türkiye'nin Geleneksel Peynirlerinden İzole Edilen Bazı *Propionibacterium* spp. Türlerinin Kalitatif ve Kantitatif Asit Üretimlerinin Belirlenmesi", XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi. 13-16 Aralık 2009, Antalya syf: 58 (Poster Sunum).
2. Gümüştekin, Y., Beyatlı, Y. and Darılmaz, Önal, D., *Lactobacillus plantarum*' da sodyum benzoat (E211) dirençliliği, eksopolisakkarit (eps) ve toplam hücresel protein miktarının belirlenmesi, XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi. 13-16 Aralık 2009, Antalya syf: 57 (Poster Sunum).
3. Yüksekdağ, Z., Önal Darılmaz, D., ve Beyatlı, Y. "Productions and monomer compositions of exopolysaccharides by *Propionibacterium* spp. isolated from Turkish traditionally cheese" 14th European Congress on Biotechnology. 13-16 September, 2009, Barcelona Spain (Poster presentation).
4. Yüksekdağ, Z., Önal Darılmaz, D., ve Beyatlı, Y. "Acid productions and antimicrobial activities of *Propionibacterium* strains" 14th European Congress on Biotechnology. 13-16 September, 2009, Barcelona Spain (Poster presentation).
5. Aslım, B., Önal, D., Beyatlı, Y., "Factors Influencing Autoaggregation and Aggregation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Isolated from Handmade Yogurt", 2nd International Congress on Food and Nutrition. 24-26 October, 2007, Istanbul, Turkey (Poster Presentation).
6. Beyatlı, Y., Aslım, B., Önal, D. and Bozkurt, H., "Determination of some characteristic properties of lactic acid bacteria isolated from traditional hand-made Turkish yogurts", 2nd International Congress on Food and Nutrition. 24-26 October, 2007, Istanbul, Turkey (Poster Presentation).

7. Şenyuva, H.Z., Gilbert, J., Özcan, S. and Önal, D. "Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A producing fungi and toxins in individual Turkish dried figs". XIIth IUPAC International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. 21-25 May 2007, Istanbul, Turkey. Poster no: 1246 (Poster Presentation).
8. Gümüştekin, Y., Beyatlı, Y. and Darılmaz, Önal, D., Lactobacillus acidophilus' ta sodyum benzoat (E211) dirençliliği ve eksopolisakkarit (eps) miktarının belirlenmesi, 7. Uluslararası Katılımlı Türk Toksikoloji Derneği Kongresi, Ankara, 30 Mayıs-01 Haziran 2009 Syf:126 (Poster Sunum).
9. Önal, D., Aslım, B., Suludere, Z. and Beyatlı, Y., Muhtemel Probiyotik Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus Suşlarının Caco-2 Hücrelerine Tutunmalarına Eksopolisakkarit Üretimi ve Mide-Bağırsak Sistemi Koşullarının Etkisi.19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Trabzon, 23-27 Haziran 2008 SM035 syf: 112 (Sözlü Sunum).
10. Böke, H., Aslım, B., Önal, D., "Fermente Süt Ürünlerinden İzole Edilen Streptococcus thermophilus Suşlarının İmmobilize ve Serbest Hücrelerinin L-Laktat Üretimleri Ve L-Ldh Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi". Biyoteknoloji Derneği, 15. Biyoteknoloji Kongresi, Antalya, 28-31 Ekim 2007 P-GB1 syf:49 (Poster Sunum).
11. Önal, D., Beyatlı, Y., Aslım, B. "Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması", Adnan Menderes Üniversitesi, 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, Kuşadası/Aydın (Uluslar arası katılımlı), Syf:34, Haziran, 2006 (Sözlü Sunum).
12. Önal, D., Beyatlı, Y., Aslım, B. " Yoğurtlardan izole edilen muhtemel Probiyotik Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus ve Streptococcus thermophilus suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi ", Abant İzzet Baysal Üniversitesi, 9.Ulusal Gıda Kongresi, Bolu, Syf: 913, Mayıs, 2006 (Poster Sunum).