

**KEFİR DEN İZOLE EDİLEN BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
METABOLİK, ANTİMİKROBİYAL VE PLASMİD DNA 'LARININ
İNCELENMESİ**

Zehra Nur MUMCU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Aralık 1997
ANKARA**

Zehra Nur MUMCU tarafından hazırlanan KEFİRDEN İZOLE EDİLEN BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN METABOLİK, ANTİMİKROBİYAL VE PLASMİD DNA 'LARININ İNCELENMESİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.



Doç. Dr. Yavuz BEYATLI

Tez Yöneticisi

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

Başkan : Doç.Dr.Yavuz BEYATLI

Üye : Doç.Dr.Figen ERKOÇ

Üye : Doç.Dr.Cumhur ÇÖKMÜŞ

Üye :

Üye :



Dr. Erkoç

Doç. Dr. Çökmüş

Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.

B. Atasoy

**KEFİRDEN İZOLE EDİLEN BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
METABOLİK, ANTİMİKROBİYAL VE PLASMİD DNA 'LARININ
İNCELENMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

Zehra Nur MUMCU

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Aralık 1997**

ÖZET

Araştırmada, kefir örneklerinden toplam 42 adet laktik asit bakterisi (LAB) izole edilmiştir. İzolatların 21 adedi *Lactobacillus* ve 21 adedi de *Streptococcus* olarak tanımlanmıştır. Bakterilerin identifikasyon sonuçları; 1 adet *Lactobacillus acidophilus*, 2 adet *L. helveticus*, 4 adet *L. casei*, 3 adet *L. bulgaricus*, 6 adet *L. lactis*, 3 adet *L. plantarum*, 2 adet *L. brevis*, 4 adet *S. lactis*, 3 adet *S. thermophilus*, 3 adet *S. durans* ve 11 adet *S. cremoris* olduğunu göstermiştir.

Lactobacillus ve *Streptococcus* bakterilerinin laktik asit, hidrojen peroksit, hidrojen sülfür, proteolitik aktivite, asetaldehit üretimleri belirlenmiştir. Ayrıca *Streptococcus* bakterilerinin diasetil üretimleri de saptanmıştır.

Lactobacillus ve *Streptococcus* suşlarının *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* koagülaz (+), mutant *Staphylococcus aureus* koagülaz (-), *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerindeki inhibisyon etkileri agar diffüzyon yöntemiyle belirlenmiştir.

Bu bakterilerin bakteriosin üretimleri, aynı test bakterileri üzerinde uygulanmıştır.

Ayrıca, bu bakterilerin PHB üretimleri de tespit edilmiştir. PHB verimi (kuru hücre ağırlığına göre) *Lactobacillus* suşlarında %0,52-25,55 arasında, *Streptococcus* suşlarında %0,61-13,69 arasında saptanmıştır.

Yüksek inhibisyon gösteren 5 *Lactobacillus* ve 6 *Streptococcus* suşunun plasmid DNA profilleri de çıkarılmıştır. *L. acidophilus* Z1L suşunda 13,42, 7,02 ve 3,58 kb ağırlığında 3 plasmid, *L. casei* Z3L suşunda 25,42, 21,34 ve 11,47 kb ağırlığında 3 plasmid, *L. brevis* Z13L suşunda 34,23, 25,42, 20,42, 9,13 ve 2,59 kb ağırlığında beş plasmid, *S. lactis* Z1S suşunda 23,70, 20,61, 17,15 ve 8,67 kb ağırlığında dört plasmid, *S. lactis* Z3S suşunda 23,49, 16,41 kb ağırlığında iki plasmid, *S. durans* Z15S suşunda 21,89, 18,39, 17,29, 8,89 ve 4,42 kb ağırlığında beş plasmid bulunduğu, *L. casei* Z4L, *L. bulgaricus* Z8L, *S. thermophilus* Z5S, *S. cremoris* Z6S ve Z10S suşlarının ise plasmid DNA içermediği tespit edilmiştir.

Bilim Kodu : 401.02.00

Anahtar Kelimeler : Kefir, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, metabolik ve antimikrobiyal aktivite, plasmid, biyoplastik (Poly- β -hydroxybutyrate) üretimi

Sayfa Adedi : 129

Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Yavuz BEYATLI

**STUDIES ON METABOLIC, ANTIMICROBIAL AND PLASMID-DNA
PROFILES OF SOME LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM
KEFIR**

(M. Sc. Thesis)

Zehra Nur MUMCU

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

December 1997

ABSTRACT

In this research, a total of 42 lactic acid bacteria (LAB) were isolated. The isolated bacteria were 21 isolates of *Lactobacillus* spp. and 21 isolates were *Streptococcus* spp.

Identification results of the bacteria were; 1 species of *Lactobacillus acidophilus*, 2 species of *L. helveticus*, 4 species of *L. casei*, 3 species of *L. bulgaricus*, 6 species of *L. lactis*, 3 species of *L. plantarum*, 2 species of *L. brevis*, 4 species of *S. lactis*, 3 species of *S. thermophilus*, 3 species of *S. durans* and 11 species of *S. cremoris*.

Amount of lactic acid, hydrogen peroxide, hydrogen sulfide, acetaldehyde and proteolytic activities of *Lactobacillus* and *Streptococcus* species was estimated. Amount of diacetyl produced by *Streptococcus* species was also determined.

Inhibitory effect of *Lactobacillus* and *Streptococcus* strains on *Escherichia coli*, coag.(+) *Staphylococcus aureus*, mutant coag.(-) *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* was tested. Also, bacteriosin produced by the strains and inhibitory activities of these material were tested on tested bacteria.

Amount of PHB produced by the bacteria was estimated. Amount of PHB produced by *Lactobacillus* and *Streptococcus* species according to dry cell wt. was 0,52-25,55 and 0,61-13,69%, respectively.

Five *Lactobacillus* spp. and 6 *Streptococcus* spp. with high inhibition activities were used for studying their plasmid DNA profiles. *L. acidophilus* Z1L contains 3 plasmids (13,42, 7,02 and 3,58 kb), *L. casei* Z3L contains 3 plasmids (25,42, 21,34 and 11,47 kb), *L. brevis* Z13L contains 5 plasmids (34,23, 25,42, 20,42, 9,13 and 2,59 kb), *S. lactis* Z1S contains 4 plasmids (23,70, 20,61, 17,15 and 8,67 kb), *S. lactis* Z3S contains 2 plasmids (23,49, 16,41 kb), *S. durans* Z15S contains 5 plasmids (21,89, 18,39, 17,29, 8,89 and 4,42 kb).

L. casei Z4L, *L. bulgaricus* Z8L, *S. thermophilus* Z5S, *S. cremoris* Z6S and Z10S strains did not have any plasmid.

Science Code : 401.02.00

Key Words : Kefir, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, metabolic and antimicrobial activities, plasmid, bioplastic (Poly- β -hydroxybutyrate)

Page Number : 129

Adviser : Assoc. Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım boyunca değerli ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, tecrübe ve bilgilerinden yararlandığım sayın hocam Doç. Dr. Yavuz BEYATLI 'ya sonsuz teşekkür ederim. Laboratuvar çalıőmalarım sırasında destek ve yardımlarını esirgemeyen Uzman Dr. Belma ASLIM 'a ve tez yazımı sırasında yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Hüseyin ÖZDİKMEN 'e teőekkürlerimi sunarım.



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Çeşitli kefirlerin özellikleri	9
Çizelge 3.1. İndikatör bakteri suşları ve temin edildiği kaynaklar	15
Çizelge 4.1. İdentifiye edilen <i>Lactobacillus</i> suşlarının izolasyon kaynağı	53
Çizelge 4.2. İdentifiye edilen <i>Streptococcus</i> suşlarının izolasyon kaynağı	53
Çizelge 4.3. İzole edilen <i>Lactobacillus</i> suşlarının fizyolojik ve bazı özellikleri	54
Çizelge 4.4. İzole edilen <i>Lactobacillus</i> suşlarının identifikasyon testleri	55
Çizelge 4.5. İzole edilen <i>Streptococcus</i> suşlarının fizyolojik testleri	56
Çizelge 4.6. İzole edilen <i>Streptococcus</i> suşlarının identifikasyon testleri	57
Çizelge 4.7. İzole edilen <i>Lactobacillus</i> suşlarının oluşturduğu bazı metabolik ürünlerin miktarları	59
Çizelge 4.8. <i>Lactobacillus</i> suşlarının test bakterileri üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun çap değerleri	66
Çizelge 4.9. <i>Lactobacillus</i> suşlarının PHB üretimleri	71
Çizelge 4.10. İzole edilen <i>Streptococcus</i> suşlarının oluşturduğu bazı metabolik ürünlerin miktarları	75
Çizelge 4.11. <i>Streptococcus</i> suşlarının test bakterileri üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun çap değerleri	81
Çizelge 4.12. <i>Streptococcus</i> suşlarının test bakterileri üzerinde oluşturduğu bakteriosin zon çap değerleri	89
Çizelge 4.13. <i>Streptococcus</i> suşlarının PHB üretimleri	91
Çizelge 4.14. Bazı <i>Lactobacillus</i> ve <i>Streptococcus</i> suşlarının plasmid DNA profil ve moleküler ağırlıkları	93

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. MRS agar besiyerinde <i>L. brevis</i> Z13L suşunun üreme durumu	52
Şekil 4.2. Elliker agar besiyerinde <i>S. durans</i> Z7S suşunun üreme durumu	52
Şekil 4.3. <i>Lactobacillus</i> suşlarının oluşturduğu % laktik asit üretim miktarlarının histogramı	60
Şekil 4.4. <i>Lactobacillus</i> suşlarının oluşturduğu hidrojen peroksit üretim miktarlarının histogramı	61
Şekil 4.5. <i>L. acidophilus</i> Z1L suşunun TSI besiyerinde üreme durumu	62
Şekil 4.6. <i>Lactobacillus</i> suşlarının oluşturduğu proteolitik aktivite üretim miktarlarının histogramı	63
Şekil 4.7. <i>Lactobacillus</i> suşlarının oluşturduğu asetaldehit üretim miktarlarının histogramı	64
Şekil 4.8. İnhibiyon gösteren <i>Lactobacillus</i> suşlarının <i>E. coli</i> üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun histogramı	67
Şekil 4.9. İnhibiyon gösteren <i>Lactobacillus</i> suşlarının <i>S. aureus</i> koag.(+) üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun histogramı	67
Şekil 4.10. İnhibiyon gösteren <i>Lactobacillus</i> suşlarının <i>S. aureus</i> koag.(-) üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun histogramı	67
Şekil 4.11. İnhibiyon gösteren <i>Lactobacillus</i> suşlarının <i>B. subtilis</i> üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun histogramı	68
Şekil 4.12. İnhibiyon gösteren <i>Lactobacillus</i> suşlarının <i>P. aeruginosa</i> üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun histogramı	68
Şekil 4.13. <i>S. aureus</i> koag.(+) üzerine <i>L. casei</i> Z3L ve Z4L suşlarının oluşturduğu inhibisyon zonu	69
Şekil 4.14. <i>S. aureus</i> koag.(+) üzerine <i>L. casei</i> Z7L ve <i>L. bulgaricus</i> Z8L suşlarının oluşturduğu inhibisyon zonu	69
Şekil 4.15. <i>S. aureus</i> koag.(-) üzerine <i>L. acidophilus</i> Z1L ve <i>L. helveticus</i> Z2L suşlarının oluşturduğu inhibisyon zonu	70

Şekil	Sayfa
Şekil 4.16. <i>Lactobacillus</i> suşlarının kuru hücre ağırlığı ve PHB üretimleri	72
Şekil 4.17. <i>Streptococcus</i> suşlarının oluşturduğu % laktik asit üretim miktarlarının histogramı	76
Şekil 4.18. Hidrojen peroksit üreten <i>Streptococcus</i> suşlarının histogramı	77
Şekil 4.19. Proteolitik aktivite gösteren <i>Streptococcus</i> suşlarının histogramı	78
Şekil 4.20. Asetaldehit üreten <i>Streptococcus</i> suşlarının histogramı	79
Şekil 4.21. İnhibisyon gösteren <i>Streptococcus</i> suşlarının <i>E. coli</i> üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun histogramı	82
Şekil 4.22. İnhibisyon gösteren <i>Streptococcus</i> suşlarının <i>P.areroginosa</i> üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun histogramı	82
Şekil 4.23. <i>Streptococcus</i> suşlarının <i>S. aureus</i> koag.(+) üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun histogramı	83
Şekil 4.24. <i>Streptococcus</i> suşlarının <i>S. aureus</i> koag.(-) üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun histogramı	84
Şekil 4.25. İnhibisyon gösteren <i>Streptococcus</i> suşlarının <i>B. subtilis</i> üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun histogramı	85
Şekil 4.26. <i>S. aureus</i> koag.(+) ve <i>S. aureus</i> koag.(-) üzerine <i>S. cremoris</i> Z9S ve Z10S suşlarının oluşturduğu inhibisyon zonu	86
Şekil 4.27. <i>S. aureus</i> koag.(+) ve <i>S. aureus</i> koag.(-) üzerine <i>S. durans</i> Z15S ve <i>S. cremoris</i> Z16S suşlarının oluşturduğu inhibisyon zonu	86
Şekil 4.28. <i>B. subtilis</i> üzerine <i>S. lactis</i> Z13S ve <i>S. cremoris</i> Z14S suşlarının oluşturduğu inhibisyon zonu	87
Şekil 4.29. <i>B. subtilis</i> üzerine <i>S. durans</i> Z15S ve <i>B. cremoris</i> Z16S suşlarının oluşturduğu inhibisyon zonu	87
Şekil 4.30. <i>Streptococcus</i> suşlarının <i>S. aureus</i> koag.(-) ve <i>B.subtilis</i> üzerinde oluşturduğu bakteriosin inhibisyon zonunun histogramı	90
Şekil 4.31. <i>Streptococcus</i> suşlarının kuru hücre ağırlığı ve PHB üretimleri	92
Şekil 4.32. Bazı <i>Lactobacillus</i> ve <i>Streptococcus</i> suşlarının plasmid DNA profilleri ..	94

KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılan kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

KISALTMALAR

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
A.O.Ç.	Atatürk Orman Çiftliği
ark. (et.al.)	Arkadaşları
A.Ü.Z.F.	Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi
bak.	Bakteri
°C	Santigrad derece
cm	Santimetre
dk	Dakika
D.S.A.	Dairy Science Abstract
g	Gram
kb	Kilobaz
lt	Litre
ml	Mililire
mg	Miligram
mm	Milimetre
μ	Mikron
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
nm	Nanometre
N	Normalite
O.D	Optikal Dansite
SEK	Süt Endüstrisi Kurumu

Kısaltma

uv

vd.

vs.

%

Açıklama

Ultraviyole

Ve diğerleri

Ve saire

Yüzde



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	vi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	vii
KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Kefir'in Tanımı ve Tarihçesi	4
2.2. Kefir Tanesinin Yapısı ve Kefirin Mikroflorası	5
2.3. Kefirin Kimyasal Özellikleri	8
2.4. Kefirin Beslenme Değeri ve Sağlık Üzerine Etkileri	9
2.5. Kefirden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	11
2.6. Laktik Asit Bakterileri	13
2.7. Laktik Asit Bakterilerinin Oluşturduğu Metabolik Ürünler	15
2.7.1. Laktik asit	15
2.7.2. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	16
2.7.3. Hidrojen sülfür (H ₂ S)	18
2.7.4. Proteolitik aktivite	19
2.7.5. Diasetil ve asetaldehit	20
2.8. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Özellikleri	22
2.9. Bakteriosin ve/veya Bakteriosin Benzeri Maddelerin Etkisi	24
2.10. PHB Üretimi	26
2.10.1. PHB 'nin özellikleri	26
2.10.2. Biyoplastiklerin mikrobiyal yıkımları	27
2.10.3. Termobiyoplastiklerin potansiyel kullanım alanları	28
2.10.4. PHB üretiminde kullanılan substratlar	28
2.10.5. PHB 'nin tespiti	29

	Sayfa
2.10.6. Biyoplastik üretiminde kullanılan bakteriler	29
2.10.6.1. <i>Alcaligenes</i> bakterileri	29
2.10.6.2. Toprak bakterileri	30
2.11. Laktik Asit Bakterilerinde Yapılan Plasmid DNA Çalışmaları	30
3. MATERYAL METOD	33
3.1. Materyal	33
3.1.1. Materyal örnekleri	33
3.1.2. Araştırmada kullanılan besiyerleri	33
3.1.3. Test bakterilerinin aktifleştirilmesi	35
3.2. Metod	36
3.2.1. Bakterilerin izolasyonu	36
3.2.2. İzole edilen suşların muhafazası	36
3.2.3. İdentifikasyon testleri	36
3.2.4. Metabolik ürünlerin tespiti	38
3.2.4.1. Laktik asit üretiminin tespiti	38
3.2.4.2. Hidrojen peroksit üretiminin tespiti	38
3.2.4.3. Hidrojen sülfür üretiminin tespiti	39
3.2.4.4. Proteolitik aktivitenin tespiti	40
3.2.4.5. Diasetil miktarının tespiti	42
3.2.4.6. Asetaldehit miktarının tespiti	43
3.2.5. İnhibisyon zonunun tespiti	44
3.2.6. Bakteriosin ve/veya bakteriosin-benzeri maddelerin etkisi	45
3.2.7. PHB üretiminin tespiti	46
3.2.8. Plasmid DNA izolasyonu	48
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	51
4.1. <i>Lactobacillus</i> ve <i>Streptococcus</i> Suşlarının İzolasyonu ve İdentifikasyonu	51
4.2. <i>Lactobacillus</i> 'ların Metabolik Aktivitelerin Sonuçları	58
4.2.1. <i>Lactobacillus</i> 'ların laktik asit üretimleri	58
4.2.2. <i>Lactobacillus</i> 'ların hidrojen peroksit üretimleri	58

	Sayfa
4.2.3. <i>Lactobacillus</i> 'ların hidrojen sülfür üretimleri	58
4.2.4. <i>Lactobacillus</i> 'ların proteolitik aktivite üretimleri	62
4.2.5. <i>Lactobacillus</i> 'ların asetaldehit üretimi	62
4.3. <i>Lactobacillus</i> 'ların İnhibisyon Etkisi	65
4.4. <i>Lactobacillus</i> 'ların Bakteriosin ve/veya Bakteriosin Benzeri Madde Üretimleri	70
4.5. <i>Lactobacillus</i> 'ların PHB Üretimi	70
4.6. <i>Streptococcus</i> 'ların Metabolik Aktivitelerin Sonuçları	73
4.6.1. <i>Streptococcus</i> 'ların laktik asit üretimleri	73
4.6.2. <i>Streptococcus</i> 'ların hidrojen peroksit üretimleri	73
4.6.3. <i>Streptococcus</i> 'ların hidrojen sülfür üretimleri	73
4.6.4. <i>Streptococcus</i> 'ların proteolitik aktivite üretimleri	74
4.6.5. <i>Streptococcus</i> 'ların diasetil üretimi	74
4.6.6. <i>Streptococcus</i> 'ların asetaldehit üretimi	74
4.7. <i>Streptococcus</i> 'ların İnhibisyon Etkisi	80
4.8. <i>Streptococcus</i> 'ların Bakteriosin ve/veya Bakteriosin Benzeri Madde Üretimleri	88
4.9. <i>Streptococcus</i> 'ların PHB Üretimi	88
4.10. Plasmid DNA	93
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	95
KAYNAKLAR	109
ÖZGEÇMİŞ	129

1. GİRİŞ

Kefir, Kafkasya orjinli fermente süt ürünüdür. İnek, koyun ve keçi sütünden yapılan bu ürünün tarihçesi hakkında çok fazla bilgi yoktur. Uzun yıllar Kafkasya'da üretilen kefir buradan dünyaya yayılmıştır. Sindirim rahatlığı, ferahlatıcı ve iştah açıcı özelliği yanısıra, bazı hastalıklar üzerine iyileştirici etkisi, tüketimi arttırdığı gibi, birçok araştırıcının da ilgisini çekmiştir.

Kefir retiminde, diğer fermente süt ürünlerinden farklı olarak, fermentasyonu sağlamak için kefir tanelerinden veya bunlardan üretilen starter kültürlerden faydalanılmaktadır. Kefir taneleri, kefire işlenecek sütte süt asidi ve alkol fermentasyonu yapacak mikroorganizmaları içeren, beyazımsı renkte, karnıbahara benzer yapıda, bezelye veya fındık büyüklüğündedir. Ne zaman ve nasıl olduğu kesin olarak bilinmemekle beraber, ilk kez Kafkasya'daki "Gaucase" köyünde olduğu ve burada yaşayan köylülerin sütleri deri tulumlar içerisinde fermentasyona bırakmaları ile "airan" adı verilen bir süt mamlnn elde edildiği ileri sürülmektedir (Koçak ve Grsel, 1981; Ergüllü ve nc, 1983; Kneifel and Mayer, 1991).

Kefir taneleri esas olarak, "Kefiran" adı verilen polisakkarit içermektedir. Polisakkarit yapı içinde bir miktar yağ ve kazein mevcuttur. Mikroorganizmalar tane içinde simbiyoz halde yaşarlar (Toba et al.,1986; Yokoi et al., 1990; Yokoi and Watanabe, 1992).

Kefir tanelerinde genel olarak, laktik asit bakterileri, asetik asit bakterileri, laktozu fermente eden ve edemeyen mayalar bulunmaktadır. Laktozu fermente edemeyen mayalar tanenin daha dip katmanlarında, laktozu fermente eden mayalar büyük oranda dış yüzeylerde yer alırlar. Tanedeki mikroorganizma türü ve bunların birbirine oranı, kalitatif ve kantitatif analizler sonucu, tanelerin orjinine göre değiştiği bildirilmiştir (Yaygın, 1995; Duitschaever et al., 1987).

Kefir tanesindeki mikroorganizmaları aşağıdaki şekilde bildirilmiştir;

Laktobasil'ler: *Lactobacillus brevis*, *L. kefir*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. kefiranofaciens*, *L. cellobiosus*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus* ssp. *jugurti* ve *L. lactis* ssp. *lactis*. Streptokok'lar: *Streptococcus lactis* ssp. *cremoris*, *S. thermophilus*, *S. durans*. Lökonostok'lar: *Leuconostoc dextranicum*, *L. mesenteroides*, *L. kefir*. Asetik asit bakterileri: *Acetobacter aceti*, *A. rasens*. Maya'lar: *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, *K. fragilis*, *Torula kefir*, *Saccharomyces kefir*, *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *Candida kefir* (Kwak et al. 1996; Yaygın, 1995; Babina, 1971).

Kefirin bileşiminde etil alkol, CO₂ ve süt asiti bulunmakta ve kullanılan süte bağlı olarak da yağ oranı değişmektedir. Hafif acımsı-mayamsı bir tada sahiptir. Keskin asitli ve mayalı tat, batma hissi ile beraber, maya florası tarafından üretilen CO₂'in dağılmasından kaynaklanmaktadır. Bu da tipik bir kefir lezzetidir (Duitschaever et al., 1987).

Ülkemizde kefirin endüstriyel düzeyde üretimi bulunmamasına karşın, halk arasında kefire duyulan ilginin özellikle konu ile ilgili haberler ve yayınlarla gün geçtikçe arttığı belirlenmiştir. Kefirin sağlık açısından yararlı olduğu duyuldukça, isteğin daha da arttığı gözlenmiştir. Ülkemizde kefirin ticari üretimi ve satışının çok az bulunması nedeniyle tüketicinin kefir bizzat yapma yoluna gittiği saptanmıştır. Halk arasında kefir taneleri elden ele geçirilerek geleneksel yöntemlerle kefir yapılmakta ve tüketilmektedir (Konar ve Şahan, 1989; Anon, 1989).

Araştırmamızın amacı;

1. Farklı kefir örneklerinden laktik asit bakterilerini izole etmek ve bakterilerin oluşturdukları metabolik ürünlerini ve antimikrobial aktivitelerini tespit etmektir. Ayrıca bakterilerin bazı kontaminant ve patojen bakteriler üzerinde inhibisyon etkilerini araştırmaktır. Ayrıca izole edilen suşların PHB üretimlerini araştırmak ve bazı suşların plasmid DNA'larını incelemektir.

2. Ülkemizde kefir üretimini daha iyi bir şekilde geliştirerek, endüstriyel olarak kefir starterlerini kullanarak, özellikle Türk damak tadına uygun bir kefir mamulünün üretilmesi ve sağlık açısından yararlı bir ürünün yaygınlaştırılmasını sağlayabilmek amacıyla bu çalışma yapılmıştır.
3. Kefir üretimi yapılan ülkelerde olduğu gibi Türkiye'de de kefirle ilgili bir standardın çıkarılmasında çalışmalarımızdan faydalanılabilmesi amaçlanmıştır.



2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kefir'in Tanımı ve Tarihçesi

Kefir tanelerinin süte ilave edilmesiyle elde edilen kefir, asidik ve alkolik fermentasyonların bir arada oluştuğu, tarihi ve geçmişi olan kültüre edilmiş bir süt ürünüdür (Merin and Rosenthal, 1986; Karagözlü, 1990; Kneifel and Mayer, 1991).

Araştırmacılar, kefirin anavatanının Kafkas Dağları olduğunu bildirmişlerdir (Vedamuthu, 1977; Ergüllü ve Üçüncü, 1983; Klupsch, 1984; Marshall et al., 1984; Duitschaeffer et al., 1987; Kneifel and Mayer, 1991; Kwak et al., 1996). Kefirin Kafkasya'da Elburus Dağları eteklerinde yapıldığı ve yapımının gizli tutulduğu; Rusya'da yayınlanan "Kefyr" kitabının 1984 yılında Moritz Schulz tarafından Almanca'ya çevrilmesi ile Avrupa'da tanındığı açıklanmıştır (Klupsch, 1984).

Wiese (1986), kefir kelimesinin Türkçe "keyif veren, sarhoş eden, coşturan, mest eden", "kef" sözcüğünden türediğini bildirmiştir. Klupsch (1984) ise, bu kelimenin Kafkasya orijini "en iyi yapıldı" anlamına gelen "keyf" sözcüğünden türediğini bildirmiştir.

Kefirin önceleri Güneybatı Asya'da Türkler tarafından yapıldığı, alkol ve asit fermentasyonlarıyla meydana gelen hafif alkollü, ekşi ve köpüklü bir süt içkisi olduğu belirtilmektedir. Ayrıca Kafkasya'da "Kyppe" adı verilen, yağlı veya yağsız sütlerden (inek, koyun, keçi, kısırak), peynir altı sularından yapıldığından söz edilmektedir (Adam, 1971).

Kefirin bileşiminde %0,5-1,5 etil alkol, yaklaşık %0,7 kadar süt asiti ve %3,2 yağ olduğu tespit edilmiştir (Ergüllü ve Üçüncü, 1983; Krukowski and Rusiecki, 1963; Niketic and Vukenovic, 1975).

Tipik bir kefirin duyuşsal özellikleri, acılığa kaçmayan ve hoşça giden ekşimsi bir tat, hafif maya tat ve aroması, yumuşak bir yapı ve içerdiği CO₂'den dolayı hafif köpüklü,

ferahlatıcı ve serinletici niteliklerden oluştuğu belirtilmiştir (Koçak ve Gürsel, 1981; Yokoi et. al., 1990; Kwak et. al., 1996).

2.2. Kefir Tanesinin Yapısı ve Kefirin Mikroflorası

Kefir taneleri beyaz-sarımtırak renkte, çapı 1-2 mm'den 3-6 mm'ye kadar değişen, karnabahara benzer yapıda, bezelye veya fındık büyüklüğündedir. Şekilleri düzgün olmayan kefir taneleri, suda erimez. Süte katıldıkları zaman ise şişerler ve renkleri beyazlaşır (Koçak ve Gürsel, 1981; Tekinşen ve Atasever, 1994; Yaygın, 1995).

Tanelerin, sütü fermente edici rol oynadığı, kazein ve birbirleriyle ortaklaşa yaşayan mikroorganizmaların meydana getirdiği jelatinimsi kolonilerden oluştuğu ve tanenin en önemli özelliğinin fermentasyon sonunda süzülerek geri kullanılması olduğu bildirilmiştir (Koçak ve Gürsel, 1981; Lee and Kim, 1986).

Geleneksel olarak, Kafkas halkı hayvan postlarından yapılan tulumların içerisinde sütü fermente ederek kendi kefirlerini hazırlamışlardır. Fermente olmuş sütün bir kısmı bu tulumlar içerisinde alınarak taze sütü yeniden eklemiş ve böylece devamlı ve doğal fermentasyon sağlamışlardır. Fermentasyondan haftalar sonra, tabaka şeklinde biriken protein pıhtılarını içeren karnabahar-benzeri yapılar oluşmuştur. Tulumun iç yüzeyindeki süngerimsi yapılar alınıp bölünerek kurutulmuş ve kuruma sonucunda oluşan küçük parçalar kefir taneleri olarak isimlendirilmiştir (Kheraskov, 1964; Duitschaeffer et. al., 1987).

Kefir yapmak için kullanılan kefir taneleri, "Kefiran" adı verilen suda-çözülmeyen bir polisakkaritten oluşan karakteristik bir fibrillar maddeden oluşmuştur. Kefiran'ın glukoz ve galaktozdan eşit miktarlarda içerdiği ve antitümör aktivitesine sahip olduğu belirtilmiştir (Vedamuthu, 1977; Mukai et. al., 1990; Yokoi et. al., 1990; Yokoi et. al., 1991; Yokoi and Watanabe, 1992).

Duitschaever ve arkadaşları, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile kefir tanesinde yer alan mikroorganizmaları incelediklerinde, mikroorganizmalarda en zengin koloniyi oluşturan kısmın, dışa yakın kısmı olduğunu bildirmişlerdir. Bu kısımda başlıca bakteriler ve çok az sayıda mayalar bulunurken, tanenin merkezine yakın kısımlarda ise mayalar miktarca artarken bakterilerin azaldığını tespit etmişlerdir. Görünüm olarak kefir tanesinin ağ gibi ince-levhamsı bir yapı ile süngerimsi ve lifsi bir yapıya sahip olduğu, özellikle tanenin merkezindeki lif kütesinin dallanma ve uzun bağlar gösterdiği belirtilmiştir. Tanenin merkezinde, mayalar ve bakterileri birlikte tutan ağın, mayalar tarafından üretildiği, tanenin kenar yapısının daha düz olmasının da mikroorganizmaların taneden süte geçişini kolaylaştırdığı ileri sürülmüştür (Konar ve Şahan, 1989).

Koçak ve Gürsel'e (1981) göre, iyi bir kefir akıcı kıvamda, homojen ve parlak bir görünümde olmalıdır. İyi bir kefir %0,6-0,9 laktik asit, %0,6-0,8 alkol ve %50 CO₂ (hacim olarak) içermelidir.

Kefirleri asit, alkol ve CO₂ içeriklerine göre; zayıf kefir (asit, alkol ve CO₂'ce fakir), orta kefir, kuvvetli kefir (asit ve alkolce zengin, CO₂ miktarı fazla, dolayısıyla çok köpüklü) diye sınıflandırmıştır (Koçak ve Gürsel, 1981; Kaptan, 1982).

Kefir tanelerinin laktozu fermente eden ve etmeyen mayalar ile homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterileri ve asetik asit bakterilerinin farklı türlerini içeren kompleks bir mikrofloraya sahip olduğu tespit edilmiştir (Marshall et al., 1984; Toba et al., 1987; Pidoux et al., 1988; Clementi et al., 1989; Pidoux et al., 1990). Kefir tanesi içerisinde mikroorganizmaların simbiyoz halde yaşadığı belirtilmiştir (Leroi and Pidoux, 1993; Yaygın, 1995).

Yaygın'a (1995) göre, tanedeki mikroorganizma türü ve bunların birbirine oranı, tanelerin orjinine göre değişmektedir. Bu nedenle tanelerdeki mikroorganizma türü konusunda farklı bildirişler vardır.

Koroleva (1988), kefir tanesindeki mikroorganizma gruplarını aşağıdaki gibi bildirmiştir:

Mesofil homofermentatif streptokoklar: *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris*, *S. durans*.

Laktobasiller: *Lactobacillus brevis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. kefir*, *L. casei*.

Lökonostoklar: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*.

Mayalar: *Kluyveromyces marxianus* subsp. *marxianus*, *Torulasporea delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefir* (Yaygın, 1995).

Kwak ve arkadaşlarına (1996) göre, kefir taneleri laktobasil, laktokok ve lökonostok türlerini içerir. Laktobasil türlerini *Lactobacillus caucasicus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. kefiranoferiens*, *L. cellobiosus*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus* ssp. *Jugurti* ve *L. lactis*, laktokok türlerini *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *L. filant* ve *Streptococcus durans* ve yaygın lökonostokları *Leuconostoc dextranicum*, *L. mesenteroides* ve *L. kefir* olarak belirtmişlerdir. Kefir tanelerindeki mayalar ise *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, *K. fragilis*, *Torula kefir* ve *Saccharomyces kefir* gibi laktozu fermente eden mayalar ve *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsbergensis* gibi laktozu fermente edemeyen mayalar olarak bildirmişlerdir.

Angula ve arkadaşları (1993), kefir tanelerinde laktozu fermente edemeyen mayaların laktozu fermente eden mayalara göre daha fazla olduğunu ve laktik asit bakterilerinden de *Lactobacillus* cinsi bakterilerin daha baskın olduğunu tespit etmişlerdir.

Karagözlü (1990), kefir tanelerinde genel olarak laktik asit bakterileri, laktozu fermente eden veya edemeyen mayalar bulunduğunu ve bunların taneden taneye değişiklik gösterdiğini, bazı kefir örneklerinde enterokokların ve koliform grubu

bakterilerin de bulunabileceğini belirtmiştir. Son iki gruptaki mikroorganizmaların normal kefir mikroflorasında bulunmadığı fakat çeşitli kaynaklardan kefire bulaşmış olabileceğini bildirmiştir.

2.3. Kefirin Kimyasal Özellikleri

Karagözlü (1990), kefirin bileşimine ve duyusal özelliklerine etki eden faktörlerin, öncelikle kullanılan kefir tanesinin veya kültürünün mikroflorası ve uygulanan üretim yöntemleri olduğunu belirtmiştir. Bu nedenle kefirin kimyasal özelliklerinin (asitlik, laktoz, yağ, protein oranları, serbest yağ asitleri miktarı, alkol gelişimi, uçucu bileşikler) kefirin duyusal özelliklerine direkt etki ettiğini ifade etmektedir.

Yaygın'a (1995) göre, kefirin bileşimi ve kimyasal özellikleri, kefir yapımında kullanılan sütün niteliklerine, inkübasyon süresine ve soğuk odada muhafaza süresine bağlı olarak değişmektedir.

Konar ve Şahan (1989), tüm kefirlerde fermentasyon sırasında oluşan olayların aynı ve aşağıda belirtildiği şekilde özetlenebileceği belirtilmektedir.

1. Laktozdan laktik asit oluşumu (Laktik asit fermentasyonu)
2. Laktozdan etil alkol ve CO₂ oluşumu (Alkol fermentasyonu)
3. Kefire özgü tipik mayayı andırır kefir aroması oluşumu
4. Sınırlı ölçüde proteinin, pepton ve amino asitlere parçalanması

Yaygın (1995) ve Kaptan (1982), kefir tanelerinin muhafazası sırasında kefirde asitlik, CO₂ ve alkol miktarı artışına bağlı olarak kefirli tatlı kefir, orta sert kefir, sert kefir ve çok sert kefir olarak sınıflandırmışlardır.

Yöney (1967), çeşitli kefirlerin özelliklerini Çizelge 2.1'deki gibi bildirmiştir.

Çizelge 2.1. Çeşitli kefirlerin özellikleri

	Tatlı Sert Kefir %	Orta Sert Kefir %	Sert Kefir %	Çok Sert Kefir %
Su	88,2	88,9	89,4	89,0
Süt Asidi	0,8	0,6	0,7	0,9
Etil Alkol	0,6	0,7	0,8	1,1
Süt Şekeri	2,7	2,9	2,3	1,7
Kazein	2,9	2,7	2,9	2,5
Albumin	0,3	0,2	0,1	0,1
Yağ	3,3	3,1	2,8	3,3
Kül	0,8	0,6	0,7	0,6

Kaptan (1982), kefiri ayrıca ekşi süt kefiri, kefir sodası, glukozlu kefir ve peynir suyu kefiri olarakta sınıflandırmaktadır.

Konar ve Şahan (1989), kefiri yağ oranlarına göre, yağsız süt kefiri (en az %0,3 yağ), yağca fakir kefir (%1,5-1,8 yağ), kefir (en az %3,5 yağ) ve krema kefiri (en az %10 yağ) olarak sınıflandırmışlardır.

2.4. Kefirin Beslenme Değeri ve Sağlık Üzerine Etkileri

Sütteki tüm besin maddelerini içerdiği için kefirin beslenme değeri yüksektir. Kefirin bileşimi, yapıldığı süt ve yağ oranına bağlıdır. Kefirin oluşumu sırasında mikroorganizmalar, sütteki proteinleri pepton, peptit hatta amino asitlere, süt şekerini de süt asiti ve alkole kadar parçaladıklarından sindirimi kolaylaştırır. Ayrıca ortaya çıkan bu maddeler serinletici, iştah açıcı, sevilen tat ve aromaya sahip olan bu süt ürününün karakteristik özelliklerini oluşturur (Sezginer, 1980).

Cerna ve Hrabova (1977) ve Yaygın (1995), kefirdeki CO₂'in sindirimi kolaylaştırdığını, başta B₁₂ olmak üzere bazı B grubu vitaminleri sentezlediklerini ve

kefirde oluşan süt asidinin %90'dan fazlasının L(+) süt asiti olduğunu bildirmişlerdir. L(+) süt asitinin kolayca hazmedilebilme özelliğinin bulunduğunu belirtmektedirler.

Yaygın (1995), kefirde oluşan asetik asit, H₂O₂ (Hidrojen Peroksit) gibi antibakteriyal maddeler ile antibiyotiklerin *E. coli* ve *Salmonella* gibi patojen bakterilere antibakteriyal etki yaptığını, ayrıca asetik asit bakterilerinin bağırsaktaki bakterilere karşı antibakteriyal etki gösterdiğini ve bu nedenlerle kefirin bazı rahatsızlıkları iyileştirdiğini bildirmiştir.

Renner ve Saldamlı (1983), Rusya'daki pediatri uzmanlarının fermente sütü bilhassa kefiri, yalnızca besleyici özelliğinden değil aynı zamanda diyareye karşı yararlı olmasından dolayı hem sağlıklı hem de hastalıklı çocuklarda tercih edildiğini bildirmişlerdir.

Kefirin iştahsızlık, uykusuzluk, verem ve böbrek hastalıklarında, safra bozukluklarında, sarılık, çeşitli enfeksiyon ve ekzemada iyi sonuçlar verdiği belirtilmektedir (Kaptan, 1982).

Sezginer (1980), sindirim sistemi üzerinde bulunan ve kimyasal sindirim için gerekli salgıları yapan mide, karaciğer, safra kesesi, bağırsakların dinlenebilmesi dolayısıyla onlarda ve onların neden olduğu hastalıkların tedavisi için en iyi ilacın kefir olduğunu bildirmektedir.

Kefirin gençlik içkisi olarak tanındığı ve su yerine içildiği Kafkasya'da tüberküloz, kanser ve hazım bozukluğu gibi hastalıklara rastlanmaması ve ortalama insan ömrünün 110-130 seneye ulaşması dikkatleri çekmiştir. Yapılan araştırmalarda kefirin bu konuda önemli rol oynadığı saptanmış ve bazı hastalıkların tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılabileceği görülmüştür. Mide iltihapları, enfeksiyon, sarılık, iç ve dış ularlar, kronik bağırsak iltihapları, ekzama, kalbin atardamar ile ilgili hastalıkları, yüksek tansiyon, ishal, kabızlık bu hastalıklar arasında belirtilmektedir (Koçak ve Gürsel, 1981; Sezginer, 1980).

Hayvanlarda ve insanlarda yapılan araştırmalarda *Lactobacillus acidophilus* ve *L. bulgaricus* içeren fermente süt ürünlerinin tüketilmesi ile, mide'deki koliform grubu organizmaların sayısında düşme, laktobasillerde de artma görüldüğü rapor edilmektedir. Bu raporlar fermente süt ürünleri tüketimiyle, bağırsak florasının yenilediğini ve bağırsak Őikayetlerinin kaybolduğunu vurgulamaktadır (Renner and Saldamlı, 1983).

Karagzlı (1990), kefir mikroflorasındaki mayalar ve asetik asit bakterilerinin yoğurt ve diğer fermente süt mamüllerinde bağırsak mikroorganizmalarına karşı yüksek oranda antibiyotik aktivitesine sahip olduğunu bildirmiştir. Kefirde sindirimi kolaylaŐtıran diğer bir olayın da CO₂ oluşumu olduğunu, kalsiyum tuzları ve CO₂'in varlığı ile ürün salgısının sıvılaŐması ile idrarı arttırdığını, kefirdeki süt asitinin tadı ve karakteristik mikroflorası nedeniyle mide ve pankreas salgılarını arttırdığını belirtmektedir.

2.5. Kefirden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Ege Üniversitesi Tarım rnleri Teknolojisi Bölümü'nde kefir tanelerinden *Streptococcus lactis*, *S. cremoris*, *S. faecalis*, *Lactobacillus casei*, *L. brevis* bakterileri ve *Kluyveromyces lactis* mayası izole edilmiştir (Karagzlı, 1990).

Danimarka kefir tanelerinden izole edilen mikroorganizmaların yaklaşık %70'inin streptokoklar, %20'sinin laktobasiller ve %5'inin de mayalardan oluştuğu bildirilmiştir (Gajdusek, 1962).

Ticari olarak üretilmiŐ Yunan kefirlerinden *Saccharomyces italicus*, *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* mayaları ve yaklaşık $3,4 \times 10^8$ adet/ml laktobasiller, az sayıda *Streptococcus lactis* ve *S. thermophilus* izole edilmiştir (Georgantas, 1970).

Tane kefirde izole edilen, katalaz pozitif ve gram negatif özellik gösteren 84 adet aerobik asetik asit bakterileri, *Acetobacter acetii* türü olarak tanımlanmıştır (Rosi, 1978).

Lee ve Kim (1986), tanelerden izole ettikleri 90 bakteriyal suşun karakterizasyonunu çalışmışlar ve suşların %40-60 üzerindekiilerinin *Lactobacillus brevis* ve *L. buchneri* olduğunu bildirmişlerdir. Laktik streptokok izole edememişler ve izole edilen 50 mayanın %4-96'sının *Saccharomyces* spp. ve *Candida pseudotropicalis* olarak belirlemişlerdir.

Babina (1971), olgunlaşmamış kefir örneklerinden *Streptococcus lactis*, *S. paracitrovorus*, *Leuconostoc dextranicum* izole etmiştir.

Kojima ve arkadaşları (1993), homofermentatif laktobasillerin kefiran üreten bir suşunun, seçici bir besiyeri (Rogasa-CW agar) kullanılarak kefir tanelerinden izole edilebileceğini göstermişler ve bu mikroorganizmanın *Lactobacillus kefiranofaciens* olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca, kefir tanelerinden *Lactobacillus kefir* olarak tanımladıkları heterofermentatif laktobasiller izole etmişlerdir.

Angula ve arkadaşları (1993), kefir tanelerinden 46 laktik asit bakterisi izole etmişler ve bunlardan homofermentatif laktobasiller içinde, *Lactobacillus casei* subsp. *tolerans*, *L. casei* subsp. *pseudoplantarum*, *L. casei* subsp. *rhamnosus*, *L. acidophilus* ve *L. gasseri*, heterofermentatif grup içinde *L. brevis*, *L. viridescens*, *L. kefir* ve *L. fermentum* olduğu bildirmişler ve homofermentatif suşların heterofermentatif suşlardan daha fazla izole edildiği tespit etmişlerdir.

Ergülü ve Üçüncü (1983), kefir mikroflorası üzerine yaptıkları araştırmada, *Lactobacillus* ve *Leuconostoc* cinslerinin sayıları örneklerde çok yüksek değerler göstermiş ve kefir mikroflorasının ana kaynağını oluşturduğu belirtilmiştir. İncelenen kefir örneklerinde *Staphylococ*, *Micrococ* ve *Pseudomonas* bakterileri ile *Clostridium* ve *Bacillus* gibi spor yapan bakterilere rastlanılmadığı bildirilmiştir. İncelenen kefir

örneklerinden *Streptococcus lactis*, *S. faecalis*, *S. cremoris*, *Leuconostoc cremoris*, *Leu. mesenteroides*, *Leu. kefir*, *Lactobacillus casei*, *L. brevis*, *L. caucasicum* bakteri türleri izole edilmiştir.

2.6. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri, metabolizmaları sırasında laktozu parçalayarak başlıca laktik asit oluşturan mikroorganizmaları kapsar (Tekinşen ve Atasever, 1994). Laktik asit bakterileri laktozu, çoğunlukla %0,5-1,5'lük laktik asit konsantrasyonuna kadar parçalarlar, ancak %3 konsantrasyona kadar fermentasyon yapan türleri de vardır (Yetişmeyen, 1995).

Laktik asit bakterileri gram pozitif reaksiyon verirler. *Sporolactobacillus imilimus* hariç hiçbiri spor oluşturmaz. Bir iki ayrıcalık gösteren üye dışında hepsi hareketsizdir. Fizyolojik karakterleri bakımından birbirine yakın veya benzer bulunan, ancak morfolojileri oldukça farklı olan cinsleri içerirler. Morfolojileri kok veya çubuklardan oluşan farklı uzunlukta zincir şeklindedir (Tunail ve Köşker, 1989; Halkman, 1991; Yetişmeyen, 1995).

Laktik asit bakterileri iki ayrı familya da toplanmıştır. *Streptococcaceae* familyasına ait *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* türleri yer alırken, *Lactobacillaceae* familyasına ait *Lactobacillus* türleri bulunur (Daeschel, 1989; Tunail ve Köşker, 1989; Tekinşen ve Atasever, 1994).

Laktik asit bakterilerinin "hem" grupları (sitokrom ve katalaz) yoktur. "Hem" gruplarının eksikliğine karşın havanın oksijeninde gelişip üreyebilirler. Bir diğer deyişle katalaz enzimleri olmaksızın aerob koşullarda gelişebilen nadir bakteriler arasında laktik asit bakterileri de bulunur. Bütün üyeleri anaerob veya mikroaerofiliktir (Halkman, 1991).

Laktik asit bakterileri fermentasyonda oluşan ürünlerin cins ve miktarına göre de sınıflandırılırlar. Homofermentatif laktik asit bakterileri glukozu, Fruktoz Di Fosfat (FDP) yolu ile parçalayarak fermentasyon sonucu %95-100 oranında laktik asit üretirler. Bunun yanında az miktarda besi yerinin özelliğine göre formik asit, asetik asit ve etanol oluştururlar. Heterofermentatif laktik asit bakterileri ise, glukozu Hegzos Mono Fosfat (HMF) yolu ile parçalayarak fermentasyon sonucu %50 laktik asit üretirken, bunun yanısıra yüksek oranda etanol, asetik asit, gliserol, mannitol ve fruktoz oluştururlar (Drinan et al., 1976; Prescott and Dunn, 1987; Halkman, 1991; Yetişmeyen, 1995).

Homofermentatif yol:



Heterofermentatif yol:



Laktik asit bakterileri çok hassas mikroorganizmalardır. Bu bakteriler sütte bulunan laktoz şekerini parçalayarak, galaktoz ve glukoz şekeri oluştururlar (Tekinşen ve Atasever, 1994).

Su ve toprakta hemen hemen hiç rastlanılmayan bu bakterilere, cins ve türe göre değişmek üzere süt ve süt ürünleri çalışma yerlerinde, bitki ve bitki atıklarında, insan, hayvan ve diğer canlıların bağırsak sistemlerinde rastlanır (Tunail ve Köşker, 1989; Tekinşen ve Atasever, 1994).

Laktik asit bakterilerinin bir başka karakteristik özelliği de karmaşık büyüme ve gelişme sistemleridir. Grubun hiçbir üyesi, içinde yalnız glukoz ve amonyum bulunan

bir mineral besi ortamında gelişmez. Pekçoğu vitaminlerden bir yada birden fazlasına gerek duyarlar. Ayrıca amino asit istemleri de çok fazladır. Laktik asit bakterileri genellikle, vitamince zengin, maya ekstraktı, domates suyu, peynir altı suyu, süt serumu veya kan içeren karmaşık besi yerlerinde iyi gelişirler (Tunail ve Köşker, 1989; Halkman, 1991).

Laktik asit bakterileri, laktik asitin yanında hidrojen peroksit, hidrojen sülfür, bakteriosin gibi antimikrobiyal maddeler oluştururlar (Reit and Harnuly, 1984; Carminati et. al., 1988; Daeschel, 1989; Spelhaug and Harlader, 1989; Fitzsimmons and Berry, 1994).

Laktik asit bakterilerinin metabolizmaları sonucu oluşan çeşitli antimikrobiyal maddeler, diğer kontaminant mikroorganizmaların üremelerini engeller (Attaie et. al., 1987; Lindren and Dobrogosz, 1990).

2.7. Laktik Asit Bakterilerinin Oluşturduğu Metabolik Ürünler

Laktik asit bakterileri, karbonhidrat kaynaklarından laktik asit ve asetik asit gibi organik asitler üretebilmektedir. Çoğu mikroorganizmalar bu asitlere ve pH düşüşüne hassastır. Laktik asit bakterileri tarafından aerobik gelişme sırasında üretilen hidrojen peroksit de bir çok mikroorganizma üzerine inhibitör etki göstermektedir. Ayrıca oluşturdukları diasetil gibi metabolitlerin birikimi ve mikrobiyal gelişme sırasında azalan besin elementleri açısından rekabetin de etkili olabileceği belirtilmektedir (Okereke and Montville, 1991).

2.7.1. Laktik asit

Laktik asit, laktik asit bakterilerinin fermentasyon yolu ile ürettikleri bir üründür ve mikroorganizmalar üzerinde olumsuz etki yapmaktadır.

Laktik asit, organik bir asittir. Ekşi tatta, kokusuz bir maddedir. Su, alkol ve eterle kolaylıkla karışabilir. Kloroformda çözülmez. İyi bir çözücü, zayıf bir asittir. Kolaylıkla polimerleşir. Bu özellikleri nedeniyle geniş kullanım alanları vardır. Besin maddelerinin korunmasında asidite sağlar (Çetin, 1983).

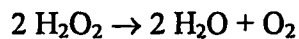
Laktik streptokoklar oluşturdukları laktik asit'le pH'yı 4,5-4,3'e kadar, laktobasiller de pH'yı 3,5-3,2'ye kadar düşürmektedirler. Laktobasiller daha fazla asit oluşturduklarından asitliğe karşı daha dayanıklıdırlar (Rasic and Kurmann, 1987).

Yapılan çalışmalar sonucu laktik asit bakterilerinde, laktik asit üretiminin plasmid DNA ile kontrol edildiği sonucuna varılmıştır (Kempner and McKay, 1979; Prestini et. al., 1983; Herman and McKay, 1985; Kok and Venema, 1988).

Savay-de- Giori ve arkadaşları (1985), *L. plantarum* suşlarının asit üretim yeteneklerinin inkübasyon ısısına bağlı olduğunu ve *L. plantarum* CRL 60 ve *L. plantarum* CRL83 suşlarının 30-37 °C 'de asit üretirken, 15 °C 'de asit üretmediğini bildirmişlerdir.

2.7.2. Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Laktik asit bakterileri üremeleri sonucu hidrojen peroksit oluştururlar. Oluşturulan hidrojen peroksit miktarı, laktik asit bakterilerinin cins, tür ve hatta suşlarına göre farklılık gösterir. Hidrojen peroksit termodinamik bakımdan kararsız bir bileşiktir, su ve oksijene ayrışır (Daeschel, 1989; Juven et. al., 1992).



Bu reaksiyon ısı, ışık ve katalizör olmadıkça yavaş ceryan ettiğinden hidrojen peroksit uzun süre saklanabilir.

Fernandes ve arkadaşları (1987), bazı bakterilerin patojen mikroorganizmaların üremesini kontrol eden çeşitli antimikrobiyal maddeler oluşturduğunu saptamışlardır. Örneğin, *Lactobacillus lactis*'in hidrojen peroksit üretilen *E. coli*'nin *in vivo* olarak üremesini durdurduğunu gözlemişlerdir. Ayrıca laktik asit bakterileri tarafından üretilen antimikrobiyal maddelerin, intestinal infeksiyonunu ve üriner infeksiyonunu koruduğunu tespit etmişlerdir.

Hidrojen peroksit, ortamda yüksek konsantrasyona vardığı zaman, gerçek antibiyotik olmadığı halde *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Clostridium* gibi bir çok bakterilerin gelişimini engelleyebilmektedir (Eralp, 1974).

Nötr pH'da ve beş karbonlu dekstroz içeren besiyerinde *Lactobacillus*'ların maksimum hidrojen peroksit oluşturmaktadır (Dahiya and Speck, 1967). Nötr pH'da düşme veya yükselmeler hidrojen peroksit miktarında azalmaya sebep olmaktadır (Collins and Aramaki, 1980).

Reinheimer ve arkadaşları (1990), laktik streptokok ve laktobasillerin hidrojen peroksit oluşturma yeteneklerinin aerobik koşullarda, anaerobik koşullara göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

L. plantarum, glukozlu substratta ve oksijenli ortamda üretildiği zaman, bakterinin NADH oksidaz, piruvat oksidaz ve NADH peroksidaz aktivitelerinde artış olduğu bildirilmiştir. Enzimlerin aktivitesi sonucu ortamda belirli miktarda hidrojen peroksit oluştuğu gösterilmiştir. NADH oksidaz, piruvat oksidaz enzimlerinin *in vivo* koşullarda, NADH peroksidaz enziminin *in vitro* koşullarda hidrojen peroksit ürettikleri açıklanmıştır (Murphy and Condon, 1984).

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

Reiter ve Harnulv (1984), bir çok laktobasil ve streptokok'un aerobik şartlar da yeterli miktarlarda H₂O₂ ürettiğini bildirmişlerdir.

Kot ve arkadaşları (1996), *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842 'nin glukoz varlığında, pH 6,5-5,0 'de ve aerobik koşullarda hidrojen peroksit ürettiğini bildirmişlerdir.

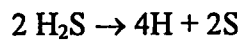
Daeschel (1989), büyüme ortamında laktobasiller tarafından üretilen hidrojen peroksitin birikmesi sonucu *S. aureus* ve *Pseudomonas* türleri üzerinde inhibitör etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Hidrojen peroksit, mikroorganizmaların enzim aktivitelerinin bozulmasına, enzimlerin kimyasal yapısının, biyokimyasal karakterinin ve aktivitelerinin değişikliğe uğramasına ve böylece enzimlerin inaktive olmasına sebep olur.

2.7.3. Hidrojen sülfür (H₂S)

Hidrojen sülfür çok etkili toksik bir maddedir. Hidrojen sülfüre KÜKÜRTLÜ HİDROJEN de denir. Kükürtün hidrojenle oluşturduğu renksiz, çok zehirli gaz halindeki bir bileşiktir.

Hidrojen sülfür, karakteristik çürük yumurta kokusunda bir gazdır. Termodinamik bakımdan kararlı olmasına rağmen çok yüksek sıcaklıklarda ayrışması mümkündür (İlyaslı, 1997).



Sülfatların bakteriler tarafından redüksiyonu ve proteinlerin parçalanması sonucunda hidrojen sülfür oluşur. Laktik asit bakterileri aracılığı ile besi yerindeki kükürtlü amino asitleri kullanarak hidrojen sülfür oluştururlar. Bu amino asitler sistein, sistin ve metiyonindir (Toksoy, 1993).

Bazı laktik asit bakterilerinin değişik miktarlarda hidrojen sülfür ürettikleri belirlenmiştir (Akbari, 1994; Tulumoğlu, 1994; Toksoy, 1996; İlyaslı, 1997).

Lactobacillus plantarum, *L. viridescens* ve *L. coryneformis* türlerinin peptonlu demir agarda hidrojen sülfür oluşturduğu bildirilmiştir (Hanna et. al., 1983).

Sharpe ve Franklin (1962), bir çok laktobasil suşunun anaerobik şartlar altında ve düşük sıcaklık derecelerinde hidrojen sülfür oluşturduklarını açıklamışlardır. Ayrıca, besi yerinde karbon kaynağı az olduğunda da hidrojen sülfürün meydana geldiğini belirtmişlerdir.

2.7.4. Proteolitik aktivite

Proteolitik aktivite, mikroorganizmalarca salgılanan proteolitik enzimler ile proteinlerin hidrolize edilmesidir. Proteolitik aktivite, hem starter kültürlerin asit oluşturma fonksiyonu hem de ürünün duyuşal nitelikleri açısından önemlidir. Bu özelliğın belirlenmesinde Hull yönteminden yararlanılır ve kazeinin paçalanması sonucu serbest kalan tiroşin ve triptofan belirlenir. Sonuçlar ise tiroşin ekivalenti olarak verilir.

Laktik asit bakterileri, gelişebilme için ortamda bazı serbest amino asitlerin bulunmasına gerek duyarlar. *Streptococcus* türleri, ekstrasellüler proteinaz enzimiyle özellikle hücre zarına bitişik olan kazeini peptitlere paçalar. Bu peptitler, bakteri hücresi tarafından alınır ve intrasellüler olarak hidrolize edilirler (Law and Kolstad, 1983).

de Giori ve arkadaşları (1985), laktik asit bakterilerinde bulunan proteolitik enzimlerin peynir aromasının ve belli ürünlerin kokusunun oluşmasında etkili olduğunu belirtmişler ve proteolitik aktivite de pH ve ısının etkili olduğunu ispatlamışlardır.

Rasic ve Kurmann (1978), proteolitik aktivitenin bakterilerin logaritmik gelişme fazında meydana geldiğini, *S. thermophilus* 'un yalnızca endosellüler enzim ürettiğini, *L. bulgaricus* 'un ise endosellüler ve az miktardada ekzosellüler enzim oluşturduğunu bildirmişlerdir. Ekzosellüler enzimlerle proteinlerin, küçük parçalara ayrılarak hücre içine daha fazla girmesinin sağlandığını ileri sürmüşlerdir.

Streptokokların spesifik proteolitik aktivitelerinin 0,1'in (μg kristal tripsin eşdeğeri / ml hücresel DNA) altında, laktobasillerin aktivitesinin 0,2-3,2 arasında değiştiği bildirilmiştir. Ayrıca, *L. bulgaricus* hücrelerinin yüksek proteolitik aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Renner and Saldamlı, 1983; Tekinşen ve Atasever, 1994).

Yapılan araştırmalarda, laktik asit bakterilerinde, laktik asit üretimi ve proteolitik aktivitenin cins, tür ve suşlar arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir (de Giori et. al., 1985; Rajagopal and Sandine, 1990; Aslım, 1994).

2.7.5. Diasetil ve asetaldehit

Süt ürünlerinin (peynir, yoğurt, tereyağı, kefir, kıymız) kendine özgü lezzet ve aroması vardır. Starter kültürlerinin önemli işlevlerinden biriside kullandıkları süt ürünlerinde lezzet ve aromayı oluşturmalarıdır. Lezzet ve aromayı oluşturan bileşikler, genellikle ürünün yapımında kullanılan starter kültürlerinin faaliyetleri sonucu meydana gelmektedir. Süt ürünlerinde tat ve kokuyu oluşturan diasetil ve asetaldehit, karakteristik aroma bileşikleridir (Tzanetaki and Mastrojionnaki, 1988; Tekinşen ve Atasever, 1994).

Sütte bulunan sitrik asit veya ara ürün olan piruvat fazlasından yararlanılarak diasetil oluşturulmaktadır (Daeschel, 1989; Tunail ve Köşker, 1989; Tekinşen ve Atasever, 1994). Sitrata kullanabilen laktik asit bakterileri ile kullanamayanlar arasındaki ayrıcılık, sitrat metabolizmasında önemli rol oynayan sitrataz (sitrataz-lyaz) enziminin varlığına bağlanmaktadır (Tunail ve Köşker, 1989).

Sitratin, laktik asit bakterileri için enerji kaynağı olmadığı ve diasetilin de bakteri metabolizmasında önemli rolü olmadığı, starter kültürlerinin bu bileşiği ortamdaki fazla piruvatın toksik etkisini gidermek amacıyla, tesadüfen oluşturdukları sanılmaktadır (Harvey and Collins, 1963; Tunail ve Köşker, 1989).

Tunail ve Köşker 'e (1989) göre, kullanılan sütün çeşiti, sütteki sitrat miktarı, bakterinin inoküle edildiği sıcaklık ve pH dereceleri de diasetil oluşumunu etkileyen faktörler arasındadır.

Asetaldehit üretiminde *Lactobacillus* 'ların önemli rolü olduğu bilinmektedir. Fakat tür ve suşlar arasında asetaldehit üretimi bakımından farklılık olduğu gözlenmiştir. *Streptococ* 'ların ise daha az miktarda asetaldehit ürettiği tespit edilmiştir (Shimazu et. al., 1985).

Tzanetaki ve Mastrojannaki (1988), *S. thermophilus* ve *L. casei* kullanılarak üretilen S1 peyniri ile *S. thermophilus*, *S. diacetylactis*, *S. durans* kullanılarak S2 peynirinin her ikisinde de asit üretimi ile diasetil üretimi arasında bir bağlantı olduğunu tespit etmişler ve asit üretimi arttıkça diasetil üretiminin de arttığını gözlemişlerdir.

Bills ve arkadaşları (1972), yoğurtlarda uçucu tat komponentler içinde en önemlisinin asetaldehit olduğunu belirtmişlerdir. %0, %4, %8, %12 oranında sakkaroz ihtiva eden, %2 'lik yağlı süte *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* aşılandığı zaman, %4 ve daha fazla sakkaroz bulunan besi yerinde hücre sayısında ve asit üretiminde azalma, %8 ve üzerinde sakkaroz ihtiva eden besi yerinde de asetaldehit üretiminde düşme olduğunu tespit etmişlerdir.

Raya ve arkadaşları (1986), *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* 'un 4 suşunda fosfoketolaz, alkol dehidrogenaz ve aldehit dehidrogenaz enzimlerini tespit edememişlerdir. Az miktarda piruvat karboksilaz enzimi bulmalarına rağmen, asetaldehitin piruvattan oluşmadığını belirtmişlerdir. Tüm suşlarda asetat kinaz ve

fosfat asetil transferaz enzimlerinin bulunduğunu gözlemişlerdir. Threonine aldolaz enziminin *S. thermophilus* 'da az, *L. bulgaricus* 'da yüksek miktarda bulunduğunu ve theaninin asetaldehit oluşumunda etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Araştırmacılar tarafından, *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* ve *Leuconoctoc cremoris* tarafından oluşturulan diasetil ve asetoinin piruvattan kaynaklandığı belirtilmektedir. Ayrıca, *L. cremoris* 'in diasetil üretiminde özellikle *S. lactis* subsp. *diacetylactis* ve/veya *S. cremoris* ile etkili olduğu bildirilmiştir (Kaneko et. al., 1987; Petit et. al., 1989a; Petit et. al., 1989a,b).

Jay (1982), 200 µg/ml seviyesinde diasetilin, mayalar ve gram negatif bakteriler için inhibitör etkiye, 300 µg/ml seviyesinde gram pozitif bakteriler için inhibitör etkiye sahip olduğunu ve 350 µg/ml veya daha fazla konsantrasyonlara kadar laktik asit bakterilerini etkilemediğini göstermiştir (Daeschel, 1989).

Tunail ve Köşker'e (1989) göre, homofermentatif laktik asit bakterilerinin heterofermentatif olanlara oranla daha fazla ve hızlı diasetil oluşturmaktadır. Laktik asit bakterilerinin 18-22 °C 'de, 30 °C ve üzerindeki sıcaklık derecelerine oranla daha fazla diasetil üretmektedirler. Ortamın pH 'sına bağlı olarak düşük pH 'larda yüksek pH derecelerine oranla diasetil fazla oluşmaktadır.

Bottazi ve Dellaglio (1967), yapmış oldukları çalışmada *S. thermophilus* 'un bütün suşlarının diğer homofermentatif laktik streptokoklardan daha fazla asetaldehit ve diasetil ürettiğini tespit etmişlerdir.

2.8. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Özellikleri

Süt ürünlerinin yapımında kullanılan laktik asit bakterilerinin önemli bir özelliği de, ortamda bulunan gıda kaynaklı patojen ve kontaminant mikroorganizmaların (*E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus* gibi) gelişimini engellemeleri ve ölümlerine sebep olmalarıdır.

Starter seçiminde ürünün saklama süresini uzatma ve kalite bakımından, bu özelliğe dikkat edilmektedir. *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* 'un antibakteriyal aktivitesi insan sağlığı açısından da önem taşımaktadır (Frank and Marth, 1977; Kılıç, 1990).

Laktik asit bakterilerinin en önemli inhibitör etkisi özellikle asidik ortamlarda oluşmaktadır. Ayrıca inoküle edilen starter kültür miktarı ve aktivitesi de, özellikle fermentasyonun ilk aşamasında, patojen mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmektedir (Tekinşen ve Atasever, 1994).

Laktik asit bakterilerinin oluşturduğu laktik asitin ve küçük konsantrasyonlarda üretilen formik asit, propiyonik asit, asetik asit gibi organik asitlerin patojen mikroorganizmalar üzerinde, antibakteriyal etkisi olmaktadır. Yapılan çalışmalarda *Lactobacillus* 'ların inhibisyonik etkisinin, *Streptococcus* 'lara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Attaie et.al., 1987; Kılıç, 1990).

Laktik asit bakterileri tarafından aerobik gelişme sırasında üretilen hidrojen peroksidin de bir çok mikroorganizma üzerine inhibitör etki gösterebildiği bildirilmiştir (Spelhaug and Harlander, 1989; Juven et. al., 1991; Lewus et. al., 1991; Mortvedt et. al., 1991; Muriana and Klaenhammer, 1991; Barefoot and Nettles, 1993; Fitzsimmons and Berry, 1994).

Dahiya ve Speck (1967), *Lactobacillus lactis* ve *L. bulgaricus* 'un kültür filtratlarında *S. aureus* 'a karşı oluşan inhibitör faktörü, hidrojen peroksit olarak tespit etmişlerdir. *Lactobacillus* 'ların nötr pH'da 5 °C 'de, dekstrozu ortamda saklandıklarında, maksimum hidrojen peroksit oluşturduğu sonucuna varmışlardır.

Abdel-Bar ve arkadaşları (1987), *L. bulgaricus* 'un laktik asitten farklı bir antimikrobiyal madde ürettiğini ve bu maddenin gram pozitif bakterilerden *S. aureus* 'a, gram negatif bakterilerden de *Pseudomonas fragilis* 'e etkili olduğunu tespit etmişlerdir.

Yapılan bir çok araştırma sonucunda organik asitler (laktik asit, asetik asit, formik asit), diasetil ve hidrojen peroksitin tek başına veya birlikte gerek gram pozitif gerekse gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Harris et al., 1989; Juven et al., 1992).

Laktik asit bakterilerinin, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Enterococcus*, *Listeria* ve *Pseudomonas* cinsi mikroorganizmalara karşı da antagonistik etki gösterdikleri saptanmıştır (Frank and Marth, 1977; Attaie et al., 1987; Harris et.al., 1989; Kepler et al., 1994).

2.9. Bakteriosin ve/veya Bakteriosin Benzeri Maddelerin Etkisi

Bakteriosinler, protein veya protein kompleksleri olup, bakteriyal türlerin oldukça büyük bir kısmı tarafından üretilen potansiyel antimikrobiyal maddelerdir (Geis et.al., 1983; Klaenhammer, 1988; Daeschel, 1989; Barefoot and Nettles, 1993).

Tagg ve arkadaşları, bakteriosin için 6 karakteristik özellik belirlemişlerdir. Bakteriosinler, biyolojik olarak aktif proteinlerdir, plasmid orjinlidir, bakterilerde bulunan spesifik bağlanma kısımlarıyla reaksiyona girerler, bakteriosidalırlar, letal biyosentezle üretilirler (Lewus and Montville, 1991).

Protein veya peptitlerden oluşan bakteriosinin antagonistik etkisi olduğu ve bakteriosinin proteolitik enzimlerle inhibe olabileceği açıklanmıştır (Carminati et al., 1988).

Bir çok gram pozitif ve gram negatif bakterilerin geniş bir oranda bakteriosin ürettiği bildirilmiştir (Tagg et al., 1976; Lewus and Montville, 1991; Toba et al., 1991a).

Klaenhammer'e (1988) göre, şimdiye kadar karakterize edilmiş olan *Lactobacillus* bakteriosinleri protein yapısında, bakteriosidal etki mekanizması sergileyen ve kendisine çok yakın cinsleri etkileyen bir etki mekanizmasına sahiptir.

Laktik asit bakterileri içinde bakteriosin üreten *Lactobacil*, *Leuconostoc*, *Micrococ*, *Pediococ* ve *Lactococ* cinsleri gıda maddelerinin korunmasında doğal koruyucu olarak rol oynamaktadır (Lewus and Montville, 1991).

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriosinler, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria* türleri ve *Staphylococcus aureus* gibi gıda maddelerinin bozulmasına neden olan patojen mikroorganizmalar üzerinde bakteriosidal etki gösterirler (Lewus and Montville, 1991; Biswas et. al., 1991; Lewus et. al., 1991).

Streptococcus lactis tarafından üretilen Nisin, gıda koruyucusu, besin üretimi ve süt mayalama da kullanılmaktadır. Nisin, laktik asit bakterisi tarafından üretilen antimikrobiyal proteinler içinde en fazla karakterize olanıdır. Dehydroalanine, Lanthionine ve β -methylothionine amino asitlerini içerir (Klaenhammer, 1988; Kaletta and Entian, 1989).

Geis ve arkadaşları (1983), laktik streptokokların bakteriosin üretme potensiyellerini tespit etmişlerdir. İncelenen 280 suşun, yaklaşık %5 'inin bakteriosin ürettiğini bildirmişlerdir.

Gonzales ve Kunka (1987), *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0 suşunda bakteriosin üretiminin plasmid kodlu olduğunu bildirmişler ve bu bakteriosini Pediocin PA-1 olarak tanımlamışlardır.

Lactisin F olarak tanımlanan, *L. acidophilus* 88 tarafından üretilen bir bakteriosinin, *L. acidophilus* 6032, *L. lactis* 970, *L. helveticus* 87, *L. bulgaricus* 1489, *L. leichmanii* 4797, *L. fermentum* 1750 ve *S. faecalis* 19433 'e karşı inhibitör aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Muriana and Klaenhammer, 1987).

Joerger ve Klaenhammer (1986), *L. helveticus* 481 tarafından üretilen bir bakteriosini saflaştırıp, karakterize etmişlerdir. Helveticin J olarak tanımlanan bakteriosinin, dar bir inhibitör spektruma ve bakteriosidal bir etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Daba ve arkadaşları (1991), *Leuconostoc mesenteroides* UL5 suşunun, Mesenterocin olarak tanımlanan ve *Listeria monocytogenes* suşlarına karşı etkili ama birkaç faydalı laktik asit bakterileri üzerine etkisi olmayan bir bakteriosin ürettiğini bildirmişlerdir.

Barefoot ve Klaenhammer (1983), *L. acidophilus*'un bir suşunda Lacticin B olarak tanımlanan bir bakteriosin tanımlamışlardır.

Bebek gaitasından izole edilen *L. acidophilus* LAPT 1060, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'un 6 suşuna ve *L. helveticus*'un 6 suşuna karşı antimikrobiyal bir madde ürettiği ve bununda Acidophilucin A olarak tanımlanan bir bakteriosin olduğu bildirilmiştir (Toba et al., 1991a).

2.10. PHB Üretimi

2.10.1. PHB'nin özellikleri

Endüstriyel üretilen termobiyoplastiklerin (PHB) sertlik durumlarının, polietilen'e oranla dört misli daha fazla olduğu (20 kg/mm) tespit edilmiştir. Üretilen biyoplastik maddelerin, çeşitli paketleme materyalleri olarak değerlendirilebileceği gösterilmiştir. Termobiyoplastiklerin genel özellikleri aşağıdaki şekilde açıklanmıştır (Annon, 1994).

1. Biyoplastiklerin yeniden oluşum devresi, "Sentez → Parçalanma → Sentez" olarak gösterilmiştir. Bu devir tabiatta olabileceğinden, çevre korunmasında da önemli görülmüştür.
2. Biyoplastik madde toprakta mikroorganizma yolu ile su ve CO₂'e parçalanmaktadır. Parçalanma süresi iki aya katkı maddesi ile ayarlanabilir. Parçalanma sırasında azot oksit oluşmadığından çevre korunmasında önemlidir.

3. Parçalanmış biyoplastik bitkilerin gelişmesini olumlu yönde etkilemektedir.
4. Biyoplastiklerin kaynama dereceleri yüksektir (185 °C).
5. Biyoplastik, petrolden elde edilen diğer plastikler gibi şekil kazandırılarak değişik amaçla kullanılabilir.

2.10.2. Biyoplastiklerin mikrobiyal yıkımları

Termobiyoplastik maddenin toprakta mikroorganizma ile su ve CO₂'e parçalandığı bildirilmiştir. Parçalanma süresinin iki aya veya iki yıla kadar bazı katkı maddeleri ile kontrol edilebilir (Annon, 1994).

PHB ve kopolimerler anaerobik şartlarda CO₂ ve metan gazına dönüştüğü ayrıca açıklanmıştır (Budwill et al., 1992).

Janssen ve Harfoot (1990), sedimen nehir ağzından izole ettikleri anaerobik, çomak ve spor oluşturmeyen çubuk şeklinde bir bakterinin PHB'yi parçalama yeteneğini araştırmışlardır. Bakterinin, PHB'yi hidrolize ederek 3-hidroksibütirat oluşturduğunu ve oluşan maddenin de asetat, bütirat ve hidrojene dönüştüğünü açıklamışlardır. Araştırmacılar, bakterinin ekstra PHB depolimeraz enzimi ile PHB'yi hidrolize ettiğini ve PHB'nin bakteri hücrelerine bağlanmadığını, anaerobik koşullarda hidrolize edebileceğini tespit etmişlerdir.

Doğal olan ve hiç bir tehlikeli yan ürün veya atığa yol açmadan tümüyle karbondioksit ile suya dönüşebilen bu biyopolimerler çok az polimerde görülebilen fizikokimyasal özelliklere sahiptirler. Bu özellikler Gürsel ve Hasırcı (1995) tarafından aşağıdaki şekilde belirtilmiştir:

- Biyolojik ortamda bozunurluk
- Toksik olmama
- Doğal kaynaklardan elde edilme

- Biyouyumluluk
- Stereospesifiklik
- Piezoelektriklik
- Optik aktiflik
- Termoplastiklik

2.10.3. Termobiyoplastiklerin potansiyel kullanım alanları

Tıbbi Uygulamalar

- Ameliyat ipliği ve kurutma bezleri
- Yara örtüsü
- Yapay damar
- Ortopedik plaka, çubuk ve vida
- Pizoelektriksellik nedeniyle kemik büyüme uyarıcısı
- Biyolojik ortamda parçalanan kontrollü ilaç salım sistemleri

Endüstriyel Uygulamalar

- Paketleme, şişe, poşet ve film gibi ambalaj malzemeleri
- Tek kullanımlık çocuk bezi ve hijyenik ped'ler
- Kontrollü ve uzun süreli zirai kimyasal (gübre, pestisit, insektisit, fungusit, vb.) salım ve taşıyıcı sistemleri (Gürsel ve Hasırcı, 1995).

2.10.4. PHB üretiminde kullanılan substratlar

King (1982), PHB üretiminde kullanılan glukozun maliyeti yükselttiğini, bunun için, ticari üretimde ucuz hammadde kullanımını önermiştir.

Teorik olarak PHB üretiminde kullanılan substrat, karbonhidrat (glukoz, sakkaroz), C1 bileşikleri (metanol, metan), C2 bileşikleri (asetik asit, etanol) ve C4 bileşikleri (bütirik asit, etanol) dir. En ekonomik üretimin sakkaroz'dan olduğu ve üretim maliyetinin de 25 Yen/kg olduğu bildirilmiştir (Yamane, 1993).

2.10.5. PHB 'nin tespiti

Mikroorganizma uygun substratlarda üretilir, santrifüj veya filtrasyonla biyomas elde edilir, kurutulur ve ekstraksiyon (aseton, kloroform, hegzan) işlemleri ile PHB elde edilir. Elde edilen PHB, sülfirik asitle krotonik asite dönüştürülür ve 235 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede absorbans okunur (Gerhardt, 1981). Üretilen PHB asidik yöntemle hidrolize edildikten sonra, HPLC'de fraksiyonlara ayrımları sağlanabilir (Yatazaw et. al., 1984). Ayrıca, gaz kromatografisi yöntemi de PHB analizlerinde kullanılabilir (Braunengry et. al., 1978).

2.10.6. Biyoplastik üretiminde kullanılan bakteriler

2.10.6.1. *Alcaligenes* bakterileri

Shimudzu Anonim Şirketi laktik asit bakterilerini kullanarak 1995 yılı içinde 100000 ton termobiyoplastik üretimini hedeflemiştir. Bu üretimde laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus* cinsi türlerin kullanımı düşünülmüştür. Bakteriler tarafından oluşturulan laktik asit, karbon kaynağı olarak başka diğer bakteriler yolu ile PHB'ye dönüştürülmektedir. Elde edilen biyoplastik maddenin sert ve şeffaf olduğu, petrolden elde edilen diğer plastik maddelere kıyasla, daha iyi olduğu bildirilmiştir. *Lactobacillus* 'ların fermentasyon yöntemi ile sürekli üretimde daha fazla biyoplastik elde edilebileceği, Üretilen biyoplastiğin fiyatının 800-2000 Yen olduğu açıklanmıştır (Annon, 1994).

Yapılan araştırmalarda, laktik asit bakterilerinden başka, bazı *Alcaligenes* türlerinin biyoplastik üretimi için uygunluk gösterdiği bildirilmiştir (Annon, 1990).

Alcaligenes euotrophus endüstriyel PHB üretiminde daha fazla kullanılmaktadır. Bakterinin basit substrat'ta iyi geliştiği ve hücre içinde yüksek miktarda PHB depoladığı (hücre kuru ağırlığının %80) tespit edilmiştir (Byrom, 1987).

2.10.6.2. Toprak bakterileri

Toprak bakterilerinin PHB üretimleri ile ilgili bazı araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Bir, araştırmada, toprak bakterileri, karbon kaynağı olarak glukoz içeren besiortamına inoküle edilmiş ve kontrol olarak da glukoz içermeyen substrat kullanılmıştır. Kontrol besi ortamında PHB üretimi 1,56-2,64 µg (karotonik asit)/ml örnek tespit edilmiştir. Sürekli olmayan fermenterlerde, %1 glukoz içeren besiortamında PHB üretiminin 20 misli arttığı, besiortamında glukozun azalması ile PHB miktarının düştüğu saptanmıştır (Hanzlikova et al., 1984).

Rhizobium bakterilerinin PHB üretimlerinin, suşa ve kültürel ortama bağlı olduğu bildirilmiştir. *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* ve *R. trifoli* suşlarının karbonhidratlı substratlarda üretilmesinde bakterilerin PHB ürettikleri, besiortamında karbonhidratların azalması ile üretilen PHB'nin metabolize olduğu açıklanmıştır (Tombolini and Nuti, 1989).

Bonartseva ve arkadaşları (1989), besi ortamına azot kompleksi ilavesiyle, PHB üretiminin 25 kat daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir.

2.11. Laktik Asit Bakterilerinde Yapılan Plasmid DNA alışmaları

Prestini ve arkadaşları (1983), *L. bulgaricus* ve *L. helveticus* suşlarından proteolitik aktivite ve laktozu kullanma yeteneklerinin plasmidle ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. *L. helveticus*'da 6 plasmid, *L. bulgaricus*'da da 4 plasmid gözlemişlerdir.

Kok ve Venema (1988), istenilen kalitede süt ürünlerinin elde edilebilmesi için, proteolitik aktivitesi yüksek, hızlı asit üreten laktik asit bakterilerine gerek duyulduğunu ve bu bakterilerle yapılan genetik çalışmaların artırılması, ayrıca klonlama sistemlerinin geliştirilmesinin gerektiğini savunmuşlardır.

Kempler ve McKay (1979), *L. lactis* subsp. *lactis* biyotip *diacetylactis* 'e akrinin oranı uygulayarak, cit⁻ mutantını tespit etmişler ve cit⁻ mutantın 5,5 Mdal. 'luk plasmidini kaybettiğini ve sitratı fermente etme yeteneği ile plasmid arasında bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir. Cit⁻ mutantın sitrataz aktivitesini sürdürmesine karşın, sitrat permeaz aktivitesini koruyamadığını ileri sürmüşlerdir.

Herman ve McKay (1985), yaptıkları çalışmada *S. thermophilus* 'un 23 suşunda 1,4-2,2 Mdal ağırlığında değişen 5 plasmidin varlığını gözlemişlerdir. Bu plasmidlerin küçük olması nedeni ile klonlamada vektör olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Girard ve arkadaşları (1987), çiğ süttten izole ettikleri *S. thermophilus* suşlarının 41 adedinde plasmid bulunmadığını, 6 adedinde 1, 3 adedinde ise 2 plasmid olduğunu tespit etmişlerdir. Plasmidlerin ağırlığının 2,9-7,6 kb arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Arzulanan niteliklerde ürün elde edebilmek için, fermente süt ürünlerinin yapımında laktik asit bakterilerinin, laktoz metabolizması, proteinaz aktivitesi, sitrat metabolizması, bakteriosin üretimi ve bakteriyofajlara karşı dirençliliğin bağlı olduğu plasmid DNA 'lara sahip olmaları gerektiği bildirilmiştir (Feng Xu et. al., 1990).

Leie ve arkadaşları (1990), laktoz, sakkaroz metabolizması ve proteinaz üretimi gibi özelliklerin plasmid DNA 'da kodlandığını, plasmidlerin konjugal olarak transfer edilebileceğini göstermişlerdir.

Bir çalışmada *Streptococcus* ve *Pediococcus* 'ların küçük plasmid içermelerine karşılık, *Lactobacillus* ve laktik streptokok suşlarının büyük plasmid bulundurduğu belirtilmiştir. Ayrıca, *S. lactis* 'in çeşitli suşlarında proteolitik aktivite ve laktoz kullanımı ile ilgili genlerin, 45-67,5 kb olarak sıralanan aynı plasmid üzerinde bulunduğu ileri sürülmüştür (Kok and Venema, 1988).

Beyatlı (1994), laktik asit bakterilerinden endüstriyel suş geliştirme programlarında, plasmidlerin önemli yer tuttuğunu belirtmiştir. Ayrıca Beyatlı, yapılan çalışmaların *S. cremoris* suşlarında laktozun katabolizmasında rol oynayan fosfotransferaz sistemi ve Fosfo- β -galaktozidaz enzimlerinin, plasmid genleri tarafından kontrol edildiğini bildirmiştir.



3. MATERYAL METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Materyal örnekleri

Araştırmada kullanılan kefir örnekleri Ankara piyasasından temin edilmiştir. Araştırma, 3 farklı satış merkezlerinden alınan 15 adet kefir örneğinden izole edilen mikroorganizmalarla yürütülmüştür.

Kefir örnekleri Atatürk Orman Çiftliği, Süt Endüstrisi Kurumu ve Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesinden temin edilmiştir.

3.1.2. Araştırmada kullanılan besiyerleri

Kefir *Lactobacillus*'ların izolasyon, identifikasyon, metabolik ürünlerin tespiti, antimikrobiyal etkilerinin, PHB üretim miktarlarının incelenmesinde ve plasmid DNA izolasyonlarında MRS besiyerinden yararlanılmıştır (de Man et. al., 1960).

MRS Broth

Maddeler	g/l
Peptone	10,0
Lab-lemco Powder	10,0
Yeast Extract	5,0
Dextrose	20,0
Tween 80	1 ml
Di Potassium Hydrogen Phosphate	2,0
Sodium Acetate 3 H ₂ O	5,0
Tri Ammonium Citrate	2,0
Magnesium Sulphate 7H ₂ O	0,2
Manganese Sulphate 4 H ₂ O	0,05

Maddeler 1 litre distile su içerisinde katılmıştır. Besiyerinin pH değeri 6.2 ± 0.2 'ye 0,01 N H_2SO_4 ve 0,01 N NaOH 'le ayarlanmıştır. Besiyeri 121 °C 'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Katı besiyerine % 1,5 g agar ilave edilmiştir.

Kefirden *Streptococcus* 'ların izolasyon, identifikasyon, metabolik ürünlerin tespiti, antimikrobiyal etkilerinin, PHB üretim miktarlarının incelenmesinde ve plasmid DNA izolasyonlarında ELLİKER Broth besiyerinden yararlanılmıştır (McLaughlin,1956).

ELLİKER Broth

Maddeler	g/lt
Tryptone	20
Yeast Extract	5
Glucose	5
Lactose	5
Saccharosse	5
Sodium Chloride	4
Sodium Acetate	1
Ascorbic Acid	0,5

Maddeler 1 litre distile su içerisinde katılmış, besiyerinin pH değeri 6.8 ± 0.2 'ye 0,01 N H_2SO_4 ve 0,01 N NaOH 'le ayarlanmıştır. Besiyeri 121 °C 'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.Katı besiyerine %1,5 g agar ilave edilmiştir.

Araştırmalarda kullanılan test bakterilerinin (*E. coli*, *S. aureus* 4-64 koagülaz (-), *S. aureus* 4-43 koagülaz (+), *P. aeruginosa* ve *B. subtilis*) aktifleştirilmesinde Nutrient Broth sıvı besiyeri kullanılmıştır (Cruikshank, 1972).

Araştırmada kullanılan indikatör bakteri suşları ve temin edildiği kaynaklar Çizelge 3.1 'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. İndikatör bakteri suşları ve temin edildiği kaynaklar

Bakteri Suşları	Temin Edildiği Kaynak
<i>Escherichia coli</i>	R.S.S.K.K
<i>Staphylococcus aureus</i> koag.(+) 4-43	M. Şabanoğlu*
<i>Staphylococcus aureus</i> koag.(-) 4-64	M. Şabanoğlu*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G.A.T.A
<i>Bacillus subtilis</i>	A.Ü.Z.F

R.S.S.K.K.: Refik Saydam Merkez Hıfzısshha Enstitüsü

*: Prof. Dr. Mehmet Şabanoğlu, Muğla Üniv. Fen Fak. Biyoloji Bölümü

G.A.T.A.: Gülhane Askeri Tıp Akademisi, 1994 yılı Mart ayında hastadan alınan örnek

A.Ü.Z.F.: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi

3.1.3. Test bakterilerinin aktifleştirilmesi

Denemede kullanılan test bakterileri *E. coli*, *S. aureus* koagülaz (+), *S.aureus* koagülaz (-), *P. aeruginosa*, *B. subtilis* bakterileri Nutrient Broth besiyerinde 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Bu bakteriler Nutrient Agar besiyerinde muhafazaya alınmıştır.

NUTRIENT Broth

Maddeler	g/lt
Lab-lemco Powder	1
Yeast Extract	2
Peptone	5
Sodium Chloride	5

Maddeler 1 litre distile suya ilave edilip pH'sı 6.8 ± 0.2 'ye ayarlanmıştır, 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir (Cruikshank, 1972). Katı besiyerinin hazırlanmasında, besiyerine %2 oranında agar ilave edilmiştir.

3.2. Metod

3.2.1. Bakterilerin izolasyonu

Ankara piyasasından temin edilen kefir örneklerinin, steril fizyolojik su ile 10^{-1} 'den 10^{-6} 'ya kadar seyreltme işlemi yapılmıştır. Seyreltilerden *Lactobacillus* 'ların izolasyonu için 0,1 ml alınarak MRS agara ve *Streptococcus* 'ların izolasyonu için de 0,1 ml Elliker agara inoküle edilip, steril şartlarda drigalski spatülü ile homojen bir şekilde yayılmıştır. Mikroorganizmaların gelişmesi için 30 ± 1 °C 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (de Man et. al., 1960 ; McLaughlin,1956).

İnkübasyon sonunda MRS agar ve Elliker agarda gelişen koloniler binokülerde incelenerek beyaz-krem renkli olanları seçilerek MRS ve Elliker sıvı besiyerine inoküle edilip aktiveleştirilmiştir.

3.2.2. İzole edilen suşların muhafazası

%10 'luk litmuslu süt hazırlanıp, 3 'er ml tüplere dağıtılarak 121 °C 'de 10 dakika sterilize edilmiştir. İzole edilen bakteriler uygun sıvı besi ortamında iki kez ard arda aktiveleştirilip, aktif kültürler 1 'er ml litmuslu süte inoküle edilmiştir. Kültürler 30 ± 1 °C 'de 2 saat inkübasyona bırakılmış ve 1,5 ml 'lik miktarlarda steril eppendrof tüplerine paralelli olarak alınmıştır. Eppendrof tüplerinin ağzı parafilmle kaplanıp, derin dondurucuda (-20 °C) depolanarak, muhafaza edilmiştir (Aslım, 1994).

3.2.3. İdentifikasyon testleri

İzole edilen izolatları ayırt etmek amacıyla çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal testlerden yararlanılmıştır. Bakterilerin morfolojileri (şekil ve formlanış), hareketlilikleri, spor oluşturma durumları, gram ve katalaz reaksiyonları incelendiği gibi sıvı besiyerindeki üreme durumları ile koloni şekil ve yapıları da incelenmiştir.

Lactobacillus'lar için önce gram reaksiyonuna bakılarak mikroskopik incelemeleri yapılmıştır. Litmuslu süte etki, homofermantatif veya heterofermantatif durumlarına, 15 °C, 45 °C, 50 °C'de gelişmelerine, %2 NaCl, %4 NaCl, %6,5 NaCl içeren besiyerinde üremelerine, katalaz reaksiyonlarına ve eskulin ve arjinin hidrolizlerine bakılmıştır.

Ayrıca riboz, laktoz, salisin, mellibiyoz, ksiloz, rafinoz, sellobiyoz, maltoz, mannitol, sorbitol, glukoz, galaktoz, sakkaroz, arabinoz, mannoz, trehaloz şekerlerinin testleri yapılmıştır.

Streptococcus'ların litmuslu süte etki, homofermantatif veya heterofermantatif durumları, gram reaksiyonları, 10 °C, 45 °C ve 60 °C'de 30 dakika da gelişmeleri, %2 NaCl, %4 NaCl ve %6,5 NaCl içeren besiyerinde üremeleri, pH 9,6 olan besi ortamında gelişmeleri ve %0,1'lik metilen mavisi bulunan sütte üreme durumları ve eskulin ve arjinin hidrolizleri tespit edilmiştir.

Ayrıca riboz, laktoz, salisin, mellibiyoz, ksiloz, rafinoz, sellobiyoz, maltoz, mannitol, sorbitol, glukoz, galaktoz, sakkaroz, arabinoz, mannoz, trehaloz şekerleri kullanılarak şeker testleri de yapılmıştır.

Şeker testlerinde MRS brotdan karbonhidrat kaynağı olarak lab-lemco powder ve dekstroz, Elliker brotdan da glukoz, laktoz, sakkaroz çıkarılmış ve 0,004 g klorofenol red indikatörü ilave edilerek stok besiyeri hazırlanmıştır. Hangi şekerin testi yapılacaksa o şekerden %2 oranında hazırlanmış ve 0,2 µm'lik filtre kağıdı kullanılarak, mikrofiltrasyon yolu ile sterilize edilmiştir. Stok besiyerine şekerlerden %1 oranında ilave edilmiştir. Daha sonra, steril besiyerine %1 aktif kültürlerden inoküle edilmiş ve 30±1 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda şekerini kullanarak üreyen suşlar, kırmızı renk olan besiyerini asit oluşturmasından dolayı, sarı renge dönüştürmüşlerdir (Buchanan and Gibbons, 1974; Beyatlı ve Tunail, 1982 ; Temiz, 1994).

3.2.4. Metabolik ürünlerin tespiti

Suşların metabolik ürünlerinden laktik asit, hidrojen peroksit, hidrojen sülfür, proteolitik aktivite, diasetil ve asetaldehit üretimi tespit edilmiştir.

3.2.4.1. Laktik asit üretiminin tespiti

Aktif suşlar, 25 ml 'lik steril yağsız süt (%10 'luk) besiortamına %2 oranında inoküle edilerek 30±1 °C 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örneklerden 10 ml alınıp, 90 ml distile su içeren cam erlenlere aktarılmıştır. Üzerine 2-3 damla fenol ftalein indikatörü damlatılarak, 0,1 N NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Bakterilerin ürettiği laktik asit yüzde olarak hesaplınmıştır (Demirci ve Gündüz, 1994).

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

3.2.4.2. Hidrojen peroksit üretiminin tespiti

%10 'luk yağsız süt besiyeri hazırlanarak 30 'ar ml koyu renkli şişelere dağıtılıp, 121 °C 'de 10 dakika sterilize edilmiştir. *Lactobacillus* suşları MRS besiyerinde, *Streptococcus* suşları ise Elliker Broth besiyerinde 30±1 °C 'de 24 saatte aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerden %2 oranında, yağsız süt besiyerine inoküle edilerek, 30±1 °C 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, örnekler 30 ml 'ye distile su ile tamamlanarak, 5000 dev/dak. da 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı kısım alınarak Whatman 42 filtre kağıdından karanlık bir ortamda süzölmüştür. Süzölen kısımdan 8 'er ml alınarak, üzerlerine sırası ile 1ml sülfirik asit, 1ml amonyum molibden ve 1ml potasyum iyodür çözeltileri ilave edilerek karıştırılmış ve 350 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar standart eğri ile karşılaştırılarak, hidrojen peroksit miktarları µg / ml olarak saptanmıştır (Patrick and Wagner, 1949).

Hidrojen Peroksit Standartının Hazırlanışı:

0,1 ml (%35) hidrojen peroksit alınıp, 29,9 ml 'ye saf suyla tamamlanmıştır. Çözeltiden de 1 ml alınıp, tekrar 30 ml 'ye distile su ile tamamlanmıştır. Metoddaki işlem aynen uygulanarak, hidrojen peroksit standart kurve çıkarılmıştır. Standart kurve den 1 µg / ml hidrojen peroksit tekabül eden hidrojen peroksit değeri hesaplanmıştır.

Ölçülen örnek değerleri, standart hidrojen peroksit eğrisi ile karşılaştırılarak, bakterilerin oluşturduğu hidrojen peroksit üretimleri µg / ml olarak saptanmıştır.

Tüm işlemler, hidrojen peroksitin ışıktan etkilenmemesi için karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

Çözeltiler:

1 N H₂SO₄ Çözeltisi: 95 ml saf su üzerine, konturollü bir şekilde 5 ml H₂SO₄ ilave edilerek hazırlanmıştır.

Amonyum Molibden Çözeltisi: 0,12 g amonyum molibden 100 ml saf suda çözünerek hazırlanmıştır.

KI Çözeltisi: 16,6 g potasyum iyodür (KI) 100 ml saf suda çözünerek hazırlanmıştır. Bu çözelti kullanılacağı zaman taze olarak yapılmıştır.

3.2.4.3. Hidrojen sülfür üretiminin tespiti

İzole edilen *Lactobacillus* ve *Streptococcus* suşlarının Hidrojen Sülfür (H₂S) üretimleri TSI (Triple Sugar Iron Agar) katı besiyerinde gerçekleştirilmiştir (Fowler et. al.,1975).

TSI Besiyeri (Triple Sugar Iron Agar)

Maddeler	g/lt
Beef Extract	3,0
Yeast Extract	3,0
Peptone	15,0
Protease Peptone	5,0
Dextrose	10,0
Lactose	10,0
Sucrose	10,0
Ferrose Sulphata	0,2
Sodium Chloride	5,0
Sodium Thiosulphate	0,3
Phenol Red	0,024
Agar	12,0

Maddeler 1 litre distile suda çözümlenerek, pH 7,4±0.2 'ye 0,01 N H₂SO₄ ve 0,01 N NaOH 'le ayarlanmıştır ve 121 °C 'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Lactobacillus suşları MRS besiyerinde, *Streptococcus* suşları ise Elliker Broth besiyerinde 30±1 °C 'de 24 saatte aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerden paralel olarak plaklara 0,5 ml ilave edilerek drigalski spatülü ile homojen bir şekilde yayılmıştır. Örnekler 30 °C 'de 21 gün anaerobik şartlar altında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kültürlerin oluşturduğu H₂S, kolonilerin siyahlaşmasına neden olurken, H₂S oluşturmayan kültürlerin koloni renginin siyahlaşmadığı gözlenmiştir. Besiyerindeki kararmanın görsel olarak az veya çokluğu o suşun oluşturduğu H₂S miktarı hakkında kalitatif olarak bilgi vermiştir (Lee and Simard, 1984).

3.2.4.4. Proteolitik aktivitenin tespiti

Proteolitik aktivitenin tespiti, oluşan amino asitlere eş değer tirozin amino asiti alınarak saptanmıştır.

5 ml'lik steril yağsız süt tozu (%10'luk skim milk) besiyerine aktif kültürden %1 oranında inoküle edilmiştir. Örnekler 30 ± 1 °C'de 42 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örneklere 1 ml distile su ve 10 ml 0,72 N TCA (Triklorasetik Asit) ilave edilerek, karıştırılmış ve 10 dakika bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda örnekler Whatman 1 nolu filtre kağıdı ile süzölmüşlerdir. Filtratlardan 5 ml alınıp, 50 ml'lik erlene konulmuş ve üzerine 10 ml $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ çözeltisinden konulup, karıştırılmıştır. Örneklerin üzerine 3 ml fenol ayırıcı konularak, sürekli karıştırılmıştır (mavi rengin oluşumu). Bu işlem sonunda örnekler 4500 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda üstte kalan berrak mavi kısım alınmıştır. Örnekler 1/10-1/20 oranında sulandırılıp, spektrofotometrede (Miltonroy, Spectronic 20) 650 nm dalga boyunda O.D. olarak değerler ölçölmüş ve örneklerin proteolitik aktiviteleri standarda göre hesaplanmıştır (Beyatlı ve Tunail, 1982; Citti, et al., 1963).

Standart Çözeltinin Hazırlanışı:

0,02 , 0,2 , 0,4 , 0,6 , 0,8 , 1 mg tirozin/ml olacak şekilde tirozin standart çözeltisinden 5 ml'lik steril yağsız süt tozu (%10'luk) besiyerine ilave edilmiştir. Metoddaki işlemler aynen uygulanarak, standart kurve çıkarılmıştır. Standart kurvede 0,1 mg tirozin/ml'nin tekabül ettiği O.D. tespit edilmiştir.

Proteolitik Aktivitelerin Tespitinde Kullanılan Çözeltiler:

Triklorasetik Asit: 0,72 N TCA hazırlanmıştır. 58,86 g TCA 500 ml'ye distile su ile tamalanmıştır.

$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$: 75 g Na_2CO_3 ve 10 g tetra sodyum difosfat distile suda çözölmerek 500 ml'ye distile su ile tamalanmıştır.

Fenol Ayırıcı: 1 kısım Folin ciocalteus çözeltisi, 2 kısım saf su ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.2.4.5. Diasetil miktarının tespiti

%10 'luk yağsız süt tozu besiyeri, 20 'şer ml erlenlere dağıtılmış ve 121 °C 'de 10 dakika sterilize edilmiştir. Aktif *Streptococcus* suşları yağsız süt tozu besiyerine %1 oranında aşılanıp, 30±1 °C 'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örneklerin her birinin sokset cihazı ile 10 ml destilat toplayıncaya kadar destilasyonu yapılmıştır. 10 ml toplanan destilat 5 'er ml olacak şekilde ikiye bölünmüş ve örneklerin üzerine 1,5 ml hidroksilamin çözeltisi ilave edilerek, 75°C 'deki su banyosunda 20 dakika bırakılmıştır. Örnekler su banyosundan alınıp, soğumadan 0,5 ml aseton fosfat çözeltisi ilave edilmiş ve oda sıcaklığına varıncaya kadar soğumaya terkedilmiştir. Örneklerin hacmi, 1,5 ml alkali tartarat ve 0,1 ml demir sülfatın da ilavesinden sonra, %33 'lük dipotasyum hidrojen fosfat çözeltisi ile 10 ml 'ye tamamlanmıştır. Diasetil miktarı 530 nm dalga boyundaki spektrofotometrede (Miltonroy, Spectronic 20) okunmuştur (Pack et. al., 1964; Cogan, 1972; Karahan, 1992).

Bu metotla, sadece *Streptococcus* suşlarının diasetil tayini yapılmıştır.

Diasetil standartının hazırlanması:

%10 'luk 20 ml steril yağsız süt tozu besiyerine 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml olacak şekilde diasetil ilave edilmiştir. Metoddaki işlemlerin tümü uygulanarak her bir örneğin spektrofotometrede O.D. olarak ölçümü yapılmıştır.

Diasetil Miktarının Tespitinde Kullanılan Çözeltiler:

Hidroksilamin: 17,5 g hidroksilamin hidroklorit (NH₂OH.HCl) distile suda çözülerek, 500 ml 'ye tamamlanmıştır.

Aseton Fosfat: 29 g K_2HPO_4 (Dipotasyum hidrojen fosfat) veya 38 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ distile suda çözülerek 40 ml saf aseton eklenmiş ve distile su ile 200 ml 'ye tamamlandıktan sonra, kullanıldığı süre içinde $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.

Alkali Tartarat: 100 g Na-K tartarat [$COONa(CHOH)_2COOK \cdot 4H_2O$] distile suda çözülüp, 200 ml 'ye tamamlanarak, konsantre NH_4OH çözeltisi ile 22:3 oranında karıştırılmıştır.

Demir Sülfat: 5 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, %1 'lik H_2SO_4 içinde çözülerek aynı H_2SO_4 çözeltisi ile 100 ml 'ye tamamlanmıştır. Bu çözelti her çalışma için taze hazırlanmalıdır.

3.2.4.6. Asetaldehit miktarının tespiti

20 ml 'lik steril yağsız süt tozu (%10 'luk) besiyerine %1 oranında aktif kültürden aşılansak, $30 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler 1:1 oranında distile su ile seyreltilerek, 10 ml destilat toplanıncaya kadar sokslet cihazı ile destilasyonları yapılmıştır. Toplanan destilat behere aktarılmış ve üzerine 1 ml 0,25 M $NaHSO_3$ ve 0,1 N $NaOH$ ilave edilerek pH 9 'a 0,01 N H_2SO_4 ve 0,01 N $NaOH$ 'le ayarlanmıştır. pH 'sı 9 'a ayarlanan örneklerin ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak, 15-20 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu süre sonunda örneğin üzerine 1 ml nişasta indikatörü damlatılarak, konsantre haldeki iyot çözeltisi ile (0,1 N) koyu mor renge dönüşene kadar titre yapılmıştır. Burada iyot çözeltisinin harcanan miktarı önemli değildir. Oluşan koyu mor renkli çözelti üzerine 1-2 g $NaHCO_3$ eklenip, karıştırılmıştır. Karışım berraklaşınca seyreltik iyotla (0,05 N) titre edilip, harcanan iyot miktarı tespit edilmiştir.

$$\text{Asetaldehit (ppm)} = \frac{44 \times \text{İyottan Har. Miktar (ml)} \times \text{İyot Çöz. Kesin N} \times 1000}{\text{Örnek Miktarı} \times 2}$$

Yukarıdaki formüle göre örneklerin ppm olarak oluşturdukları asetaldehit miktarı saptanmıştır (Beyatlı ve Tunail, 1982 ; Lindsay and Day, 1965).

Asetaldehit Tespitinde Kullanılan Çözeltiler:

%1 'lik Nişasta Çözeltisi: 0,259 g nişasta 25 ml distile suda berraklaşınca kadar kaynatılmıştır ve çözelti taze olarak hazırlanmıştır.

0,1 N İyot Çözeltisi: 40 g KI (potasyum iyodür) ve 12,8 g resublime iyot üzerine su ilave edilip, karıştırılmış ve iyice çözüldükten sonra 1 lt 'ye distile su ile tamamlanmıştır.

0,05 N İyot Çözeltisi: 0,1 N hazırlanan iyot çözeltisinden $N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$ formülünden hesaplanan miktar kadar alınarak 1000 ml 'ye distile su ile tamamlanmış ve 0,05 N iyot çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltinin gerçek normalitesi formülde kullanıldığı için önemlidir ve $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Sodyum thiosülfat) kullanılarak yapılan titrasyonda bu çözeltinin gerçek normalitesi 0,0040 bulunmuş ve formülde de bu değer kullanılmıştır.

0,25 M Sodyum Bisülfat (NaHSO_3) Çözeltisi: 2,6 g NaHSO_3 veya 2 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 100 ml distile suda çözülmüştür. Bu çözelti taze olarak denemeden önce hazırlanmıştır.

3.2.5. İnhibisyon zonunun tespiti

Lactobacillus suşlarının MRS besiyerinde, *Streptococcus* suşları ise Elliker Broth besiyerinde 30 ± 1 °C 'de 24 saatte aktifleştirilmiştir. Aktif kültürler 5000 dev/dak ' da 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda berrak kısım $0,45 \mu\text{m}$ 'lik filtre kağıdı kullanılarak, mikrofiltrasyon yolu ile sterilize edilmiştir.

Araştırmada test mikroorganizma olarak *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* koagülaz (+), *Staphylococcus aureus* koagülaz (-), *Pseudomonas aeruginosa* , *Bacillus subtilis* bakterileri kullanılmıştır.

Test bakterileri Nutrient sıvı besiyerinde (*E. coli* $3,62 \times 10^8$ bak/ml, *S.aureus* koag (+) $2,14 \times 10^8$ bak/ml, *S.aureus* koag. (-) $1,17 \times 10^8$ bak/ml , *P.aeroginosa* $2,97 \times 10^8$ bak/ml, *B. subtilis* $2,82 \times 10^8$ bak/ml aktifleştirilmiştir. 24 saatlik aktifleştirilmiş kültürlerden 0,1 ml steril plaklara aktarıldıktan sonra, üzerine sterilize olmuş ve 50 °C 'ye kadar soğutulmuş Nutrient Agar 'dan 20 ml ilave edilip, karıştırılmıştır. Besiyeri bir süre oda sıcaklığında donmaya bırakılmış, 1 cm çapındaki steril bir çubukla üzerinde kuyular açılmıştır. Kuyuların tabanı ince bir tabaka besiyeri ile kaplanarak, 2 saat süre ile petriyer buzdolabında bekletilmiştir. Buzdolabında bekletilen plakların kuyularına, steril filtratlardan 100 µl ilave edilmiş, 37 ± 1 °C 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyuların çevresinde oluşan zonların çapı kompas yardımı ile ölçülmüştür (Reinheimer, et. al., 1990).

3.2.6. Bakteriosin ve/veya bakteriosin-benzeri maddelerin etkisi

Bakteriosin üretimi bir çok yöntemle tespit edilmektedir. Yöntemlerin çoğunluğu katı veya yarı katı besiyerinde bulunan indikatör organizmaların üremelerini difüzyon yoluyla inhibe etmesi esasına dayanır (Lewus and Montville, 1991).

Bakteriosinin tespitinde temel olarak 3 farklı metodun kullanıldığı söylenebilir. Bunlar; katalaz aktivitesi, oksijensiz ortamda üretim ve kısmi pürifikasyon (Spelhaug and Harlander, 1989).

Katalaz Aktivitesi: Spelhaug and Harlander (1989), hidrojen peroksit etkisini elimine etmek için katalaz enzimi uygulayarak bakteriosin tespiti yapmışlardır.

Oksijensiz Üretim: Spelhaug and Harlander (1989), *Pediococ* suşlarını MRS' de ve anaerobik ortamda hidrojen peroksiti elimine ederek inhibitör etkiyi tespit etmişlerdir.

Kısmi Bakteriosin Pürifikasyonu: *P. acidilactici* PAC 10 suşunu, 2 litre MRS Broth besiyerine %1 oranında aşılınmış ve 35°C 'de 18 saat inkübe edilmiştir. 18 saat

sonunda kültür pH'sı 6.0'a ayarlanmış; hücreler, 5 °C'de 15 dakika 16.500 g'de santifüj yapılmış; süpernatant sıvı 0,45 µm por çaplı filtreden süzölmüş ve süpernatant, seri 2 dilisyonla 5 ml indikatör hücrelerle ekilmiş, yumuşak MRS agara yerleştirilerek 32 °C'de inkübasyona terkedilerek bakteriosin oluşumu gözlenmiştir. İndikatör bakterilerin üremesini en yüksek derecede açık bir şekilde önleyerek zon oluşturan 5 µl bakteriosin, bir bakteriosin birimi olarak tanımlanır (Gonzalez and Kunka, 1987).

Bakteriosin Test Metodu: Çalışmamızda, izole edilen suşların bakteriosin üretimleri oksijensiz ortam kullanılarak, modifiye edilerek tespit edilmiştir (Ray et al., 1993).

Önceden hazırlanan 10 ml 0,002'lik şekerli MRS besiyerlerine %2 oranında aktif kültürle aşlanıp, anaerobik jarda 30 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonunda suşların inhibisyon etkileri Bölüm 3.2.5'de gösterildiği şekilde saptanmıştır.

3.2.7. PHB üretiminin tespiti

Lactobacillus ve *Streptococcus* suşlarının oluşturduğu PHB miktarları aşağıda belirtilen yöntemle göre saptanmıştır (Bowker, 1981).

1. *Lactobacillus* suşları MRS broth besiyerinde, *Streptococcus* suşları ise Elliker broth besiyerinde 30±1 °C'de 24 saatte aktifleştirilmiştir.
2. Aktifleştirilen kültürler 50 ml'lik uygun besiyerine inoküle edilerek, 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.
3. İnkübasyon sonunda besiyeri 10000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir.
4. Supernatant kısmı elimine edilip, tortu kısmı 50 °C'de pastör fırınında kurutulmuş ve kuru hücre ağırlığı tespit edilmiştir.
5. Kuru hücre kütlesi üzerine 10 ml Sodyum hipoklorit ilave edilmiş (hücre duvarının parçalanması için) ve 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir.

6. İnkübasyonun bitiminden sonra berrak bir görünüm oluşur. Hipoklorit (çamaşır suyu) kısmı sokslette uçurulur.
7. Tortu kısım üzerine 5 ml aseton ilave edilerek bir süre bekletilir. Aseton kısmı sokslette uçurulur.
8. Tortu kısım üzerine 5 ml etanol ilave edilip, bir süre bekletilir. Etanol sokslette uçurulur.
9. Tortu kısım üzerine 8 ml kloroform ilave edilerek bir süre bekletilir. Sokslette uçurularak biriktirilen kloroform ayrı bir tüpe aktarılır.
10. Kloroform su banyosunda uçurularak, tüpün dip kısmında kalan PHB üzerine 10 ml sülfürik asit ilave edilir ve 60 °C'de 1 saat kaynatılıp, soğutulur. Bu aşamada PHB krotonik asite dönüştürülmüştür.
11. Krotonik asit çözeltisi 235 nm'de UV spektrofotometrede ölçülerek O.D. değeri, tespit edilmiştir.
12. Ölçülen O.D. değeri, standart PHB değeri ile karşılaştırılıp, örneğin PHB miktarı saptanmıştır.

Standartın Hazırlanışı:

1.0-2500 µg/ml olacak şekilde değişen miktarlarda Polihidroksi bütirik asit (PHB) standartları hazırlanmış ve 1 µg/ml tekabül eden O.D. değeri açıklanan metoda göre saptanmıştır.

İstatistik Analiz:

Bakterilerin PHB üretimleri ile kuru hücre ağırlığı korelasyon Sperman'ın testine göre, aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir (Conver, 1971).

$$\rho = 1 - \frac{6\sum (x_i - y_i)^2}{n(n^2 - 1)}$$

Hesaplanan ρ değeri tablo değeri ile mukayese edilmiştir. ρ değerinin tablo değerinden büyük olduğu durumlarda PHB üretimi ile kuru hücre arasındaki ilişkinin önemli olduğu belirlenmiştir.

3.2.8. Plasmid DNA izolasyonu

5 *Lactobacil* ve 6 *Streptococ* suşlarının plasmid profilleri O'svullivian ve Klaenhammer'in (1993), metoduna göre çıkarılmıştır. Bu metoda göre, aktif *Lactobacil* suşları 8 ml'lik MRS broth'a, aktif *Streptococ* suşları 8 ml'lik Elliker broth'a %1 oranında aşılanmış ve 30 ± 1 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek, pelletler toplanmıştır. Pelletlerin üzerine 30 mg/ml lizozim içeren solüsyon-I'den 200 μ l ilave edilip, pelletler iyice çözülene kadar karıştırılmıştır. Örnekler 37 °C'de 15 dk bekletilmiş ve 400 μ l solüsyon-II'den ilave edilerek, elle iyice karıştırılmış ve 7 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Üzerine 300 μ l solüsyon-III'den ilave edilerek, elle karıştırılmış ve 15 dk 4 °C'de 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni bir eppendrof tüpüne alınarak, üzerine 650 μ l oda sıcaklığında bulunan izopropanol ilave edilmiştir. 10 dk buzda bekletildikten sonra, 15 dk 4 °C'de 13000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Süpernatant uzaklaştırılarak, pelletlerin üzerine steril distile su konmuş ve pelletler çözülmüştür. Daha sonra üzerine 200 μ l solüsyon-IV ve 350 μ l fenol:kloroform ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. 5 dk buzda bekletildikten sonra, 10 dk oda sıcaklığında santrifüj yapılmıştır. Üst kısımda oluşan beyaz faz yeni eppendrof tüpüne alınarak, üzerine 1000 μ l, -20 °C'den çıkarılmış %100'lük etil alkol ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. -20°C'de bir saat bekletildikten sonra 4 °C'de 15 dk 13000 rpm'de santrifüj edilmiş, alkol uzaklaştırılmıştır. Üzerine, oda sıcaklığındaki %70'lik etil alkol'den 1000 μ l ilave edilerek, 4 °C'de 5 dk 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Alkol uzaklaştırılarak, pelletler 37 °C'de kurutulmuştur. 40 μ l TE+RNaz 0,1 mg/ml ilave edilerek oda sıcaklığında bekletilmiştir. Örnekler, 2 μ l Loading Buffer ile boyanmıştır. %0,7'lik, seyreltilmiş 10 \times TAE tamponu ile hazırlanan agaroz, 1 μ l ethidyum bromid ile boyandıktan sonra, elektroforez tankına dökülmüş ve donduktan sonra tank seyreltilmiş 10 \times TAE tamponu ile doldurularak, tarak

çıkarılmıştır. Örnekler kuyulara 10 µl olarak, mikropipetle yüklenmiştir. 40 volt'ta 3-3,5 saat süre ile elektroforez işlemi yapılmıştır.

Suşların plasmid DNA'ların moleküler ağırlıkları Sambrook ve arkadaşlarının (1989) bildirdiği gibi hesaplanmıştır.

Plasmid DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler:

SOLÜSYON-I:

Sakkaroz	25g
Tris	0,605g
EDTA	0,037g
Distile su	100ml
pH	7,4-8,0

LİZOZİM ÇÖZELTİSİ: 1 ml solüsyon-I'e 30 mg lizozim ilave edilerek hazırlanmıştır.

SOLÜSYON-II:

SDS	3g
NaOH	0,8g
Distile su	100ml

SOLÜSYON-III:

Sodyum Asetat	40,8g
Distile su	100ml

SOLÜSYON-IV:

Amonyum Asetat	57,75g
Ethidium Bromide	0,05g
Distile su	100ml

10×TAE TAMPONU:

Tris	4,84g
Sodyum Asetat	2,72g
EDTA	0,74g
Distile su	1000ml
pH	8,1 (Glesiyel Asetik Asit ile ayarlanır)

TE TAMPONU (RNaz Çözeltisini Hazırlamak İçin):

Tris	0,12g
EDTA	0,03g
Distile su	100ml
pH	8,0

RNaz ÇÖZELTİSİ:

Hazırlanan TE tamponundan 1 ml alınarak, 0,1 mg RNaz ilave edilmiştir. -20 °C'de saklanmıştır.

LOADİNG BUFFER (BOYAMA TAMPONU):

Bromfenol blue	0,25g
Sakkaroz	40g
Distile su	100ml

ETHİDİUM BROMİD:

1 ml saf suya 10 mg ethidium bromid ilave edilerek hazırlanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *Lactobacillus* ve *Streptococcus* Suşlarının İzolasyonu ve İdentifikasyonu

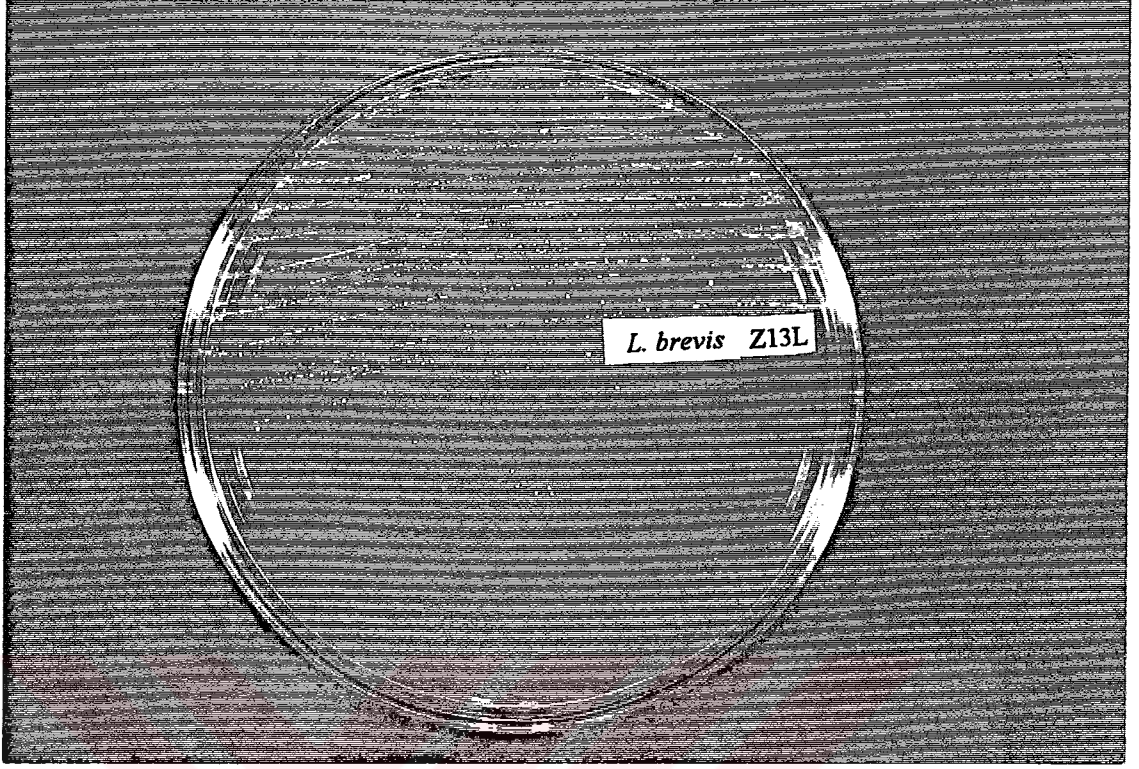
Ankara piyasasından temin edilen kefirlerden *Lactobacillus* ve *Streptococcus* suşlarının izolasyonu 3.2.1'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. İzolasyonda kullanılan MRS agar besiyerindeki *Lactobacillus brevis* Z13L suşunun üreme durumu Şekil 4.1 'de, Elliker agar besiyerindeki *Streptococcus durans* Z7S suşunun koloni yapısı Şekil 4.2 'de gösterilmektedir.

Çalışmada 21 adet *Lactobacillus* ve 21 adet de *Streptococcus* suşları izole edilmiştir. İzolatların identifikasyonu 3.2.3'de belirtildiği gibi yapılmıştır. Bu suşlarının izolasyon kaynakları Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2 'de verilmiştir.

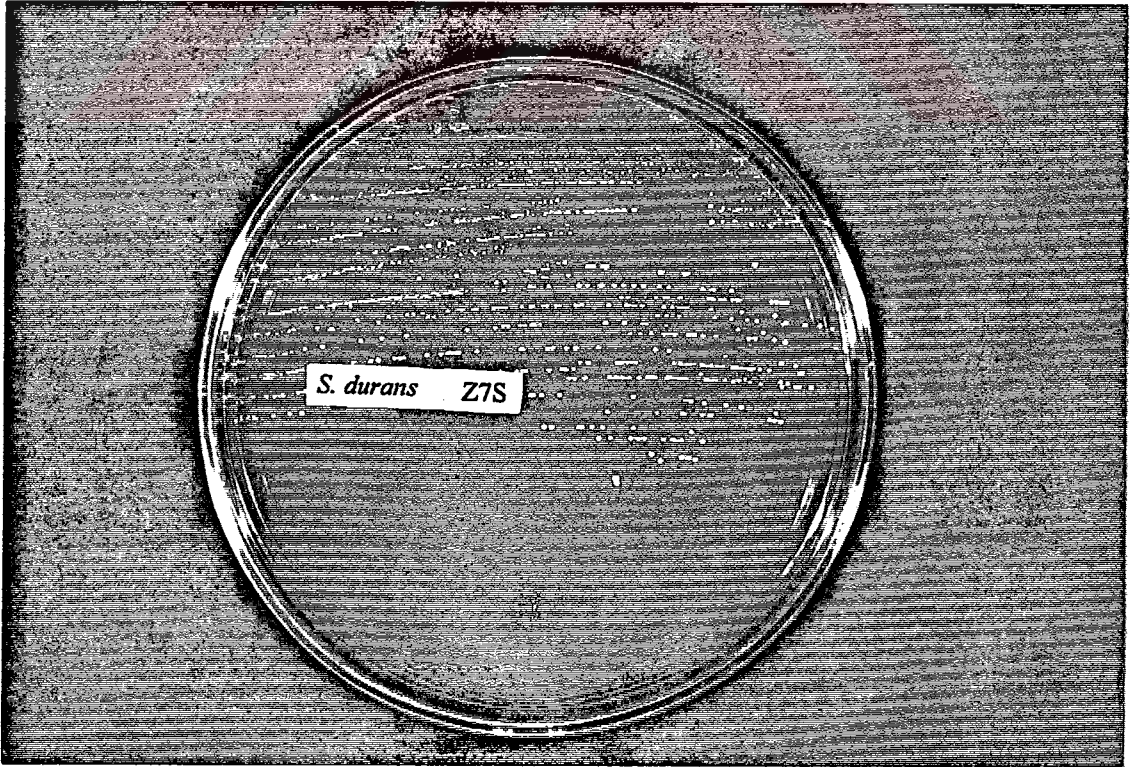
Lactobacillus suşlarının fizyolojik ve bazı özellikleri Çizelge 4.3 'de, identifikasyon testleri Çizelge 4.4 'de verilmiştir. *Streptococcus* suşlarının fizyolojik testleri Çizelge 4.5 'de, identifikasyon testleri Çizelge 4.6 'da verilmiştir.

İzole edilen *Lactobacillus* 'ların 1 adedi *L. acidophilus* , 2 adedi *L. helveticus*, 4 adedi *L. casei*, 3 adedi *L. bulgaricus*, 6 adedi *L. lactis*, 3 adedi *L. plantarum*, 2 adedi *L. brevis* olarak identifiye edilmiştir.

İzole edilen *Streptococcus* 'ların ise 4 adedi *S. lactis*, 3 adedi *S. thermophilus*, 3 adedi *S. durans*, 11 adedi *S. cremoris* olarak identifiye edilmiştir.



Şekil 4.1. MRS agar besiyerinde *L. brevis* Z13L suşunun üreme durumu



Şekil 4.2. Elliker agar besiyerinde *S. durans* Z7S suşunun üreme durumu

Çizelge 4.1. İdentifiye edilen *Lactobacillus* suşlarının izolasyon kaynağı

Kodlar	Tür Adı	İzolasyon Kaynağı
Z1L	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	A.O.Ç.
Z2L	<i>L. helveticus</i>	A.O.Ç.
Z5L	<i>L. helveticus</i>	SEK
Z3L	<i>L. casei</i>	A.O.Ç.
Z4L	<i>L. casei</i>	A.O.Ç.
Z6L	<i>L. casei</i>	A.Ü.Z.F.
Z7L	<i>L. casei</i>	SEK(Dane)
Z8L	<i>L.bulgaricus</i>	A.O.Ç.
Z14L	<i>L. bulgaricus</i>	SEK
Z18L	<i>L. bulgaricus</i>	SEK
Z9L	<i>L. lactis</i>	SEK
Z10L	<i>L. lactis</i>	A.O.Ç.
Z16L	<i>L. lactis</i>	SEK
Z17L	<i>L. lactis</i>	SEK
Z19L	<i>L. lacinis</i>	SEK
Z21L	<i>L. lactis</i>	A.Ü.Z.F.
Z11L	<i>L. plantarum</i>	A.O.Ç.
Z12L	<i>L. plantarum</i>	SEK
Z15L	<i>L. plantarum</i>	SEK
Z13L	<i>L. brevis</i>	A.Ü.Z.F.
Z20L	<i>L. brevis</i>	A.O.Ç.

Çizelge 4.2. İdentifiye edilen *Streptococcus* suşlarının izolasyon kaynağı

Kodlar	Tür Adı	İzolasyon Kaynağı
Z1S	<i>Streptococcus lactis</i>	A.Ü.Z.F.
Z2S	<i>S. lactis</i>	A.Ü.Z.F.
Z3S	<i>S. lactis</i>	A.O.Ç.
Z13S	<i>S. lactis</i>	SEK
Z4S	<i>S. thermophilus</i>	A.Ü.Z.F.
Z5S	<i>S. thermophilus</i>	A.Ü.Z.F.
Z12S	<i>S. thermophilus</i>	A.Ü.Z.F.
Z7S	<i>S. durans</i>	A.Ü.Z.F.
Z8S	<i>S. durans</i>	A.O.Ç.
Z15S	<i>S. durans</i>	SEK
Z6S	<i>S. cremoris</i>	SEK (Dane)
Z9S	<i>S. cremoris</i>	A.Ü.Z.F.
Z10S	<i>S. cremoris</i>	A.Ü.Z.F.
Z11S	<i>S. cremoris</i>	A.Ü.Z.F.
Z14S	<i>S. cremoris</i>	A.O.Ç.
Z16S	<i>S. cremoris</i>	A.O.Ç.
Z17S	<i>S. cremoris</i>	SEK
Z18S	<i>S. cremoris</i>	A.O.Ç.
Z19S	<i>S. cremoris</i>	A.O.Ç.
Z20S	<i>S. cremoris</i>	SEK
Z21S	<i>S. cremoris</i>	A.Ü.Z.F.

A.O.Ç. : Atatürk Orman Çiftliği

S.E.K. : Süt Endüstrisi Kurumu

A.Ü.Z.F. : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi

Çizelge 4.3. İzole edilen *Lactobacillus* suşlarının fizyolojik ve bazı özellikleri

	SUŞLAR																				
	Z1L	Z2L	Z3L	Z4L	Z6L	Z7L	Z8L	Z14L	Z18L	Z9L	Z10L	Z16L	Z17L	Z19L	Z21L	Z11L	Z12L	Z15L	Z13L	Z20L	
Hareket	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HO veya HE	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HE	HE
Gram reaksiyonu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Litmuslu sütte indirgeme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	-	+	+	+	(+)	+	+	+
15 °C'de gelişme	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
45 °C'de gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50 °C'de gelişme	(+)	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
%2 NaCl'de gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%4 NaCl'de gelişme	+	(+)	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+
%6.5 NaCl'de gelişme	+	-	+	+	-	+	-	-	-	(+)	+	-	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+

HO : Homofermentatif
HE : Heterofermentatif
+ : Üreme iyi
- : Üreme yok
(+): Üreme zayıf

Çizelge 4.4. İzole edilen *Lactobacillus* suşlarının identifikasyon testleri

ŞEKERLER	SUŞLAR																				
	Z1L	Z2L	Z5L	Z3L	Z4L	Z6L	Z7L	Z8L	Z14L	Z18L	Z9L	Z10L	Z16L	Z17L	Z19L	Z21L	Z11L	Z12L	Z15L	Z13L	Z20L
RİBOZ	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
LAKTOZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
SALSİN	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
MELBİYOZ	(+)	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
KSILOZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAFİNOZ	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
ESKULİN	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
CELLOBIYOZ	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
MALTOZ	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	(+)
MANNİTOL	-	-	-	+	-	+	+	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	(+)	-	-
SORBITOL	(+)	-	(+)	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
GLUKOZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GALAKTOZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SUCROZ	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	(+)	(+)	(+)	+	(+)	+	+	+	+
ARABİNOZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	+	(+)	+	+
ARJİNİN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANNOZ	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
TREHALOZ	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

+ : Üreme iyi

- : Üreme yok

(+) : Üreme zayıf

Çizelge 4.5. İzole edilen *Streptococcus* suşlarının fizyolojik testleri

	SUŞLAR																					
	Z1S	Z2S	Z3S	Z13S	Z4S	Z5S	Z12S	Z7S	Z8S	Z15S	Z6S	Z9S	Z10S	Z11S	Z14S	Z16S	Z17S	Z18S	Z19S	Z20S	Z21S	
Gram reaksiyonu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Litmuslu sitle indirgeme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 °C'de gelişme	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45 °C 'de gelişme	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60 °C 'de 30 dk. gelişme	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%2 NaCl'de gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%4 NaCl'de gelişme	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
%6.5 NaCl'de gelişme	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 9.6'da gelişme	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
%0.1'lik M. mavisi	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HO veya HE	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO

HO : Homofermentatif

HE : Heterofermentatif

+ : Öreme iyi

- : Öreme yok

(+): Öreme zayıf

Çizelge 4.6. İzole edilen *Streptococcus* suşlarının identifikasyon testleri

ŞEKERLER	SUŞLAR																					
	Z1S	Z2S	Z3S	Z13S	Z4S	Z5S	Z12S	Z7S	Z8S	Z15S	Z6S	Z9S	Z10S	Z11S	Z14S	Z16S	Z17S	Z18S	Z19S	Z20S	Z21S	
RİBOZ	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAKTOZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SALISİN	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	(+)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
MELİBİYÖZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSİLOZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	(+)	-	-	-	-	-	-
RAFİNOZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESKULİN	(+)	+	+	(+)	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	-
CELLİBİYÖZ	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MALTOZ	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
MANNİTOL	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-
SORBITOL	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
GLUKOZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GALAKTOZ	+	+	+	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SUCROZ	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
ARABİNOZ	-	-	-	+	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	(+)	-	-	-
ARJİNİN	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANNOZ	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TREHALOZ	+	+	+	+	(+)	+	(+)	+	+	+	-	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+

+: Üreme iyi
 -: Üreme yok
 (+): Üreme zayıf

4.2. *Lactobacillus* 'ların Metabolik Aktivitelerin Sonuçları

İzolasyonu ve identifikasyonu yapılan *Lactobacillus* suşlarının laktik asit, hidrojen peroksit, asetaldehit, proteolitik aktivite ve hidrojen sülfür üretimleri tespit edilmiştir.

4.2.1. *Lactobacillus* 'ların laktik asit üretimleri

Lactobacillus suşlarının oluşturduğu % laktik asit miktarları 3.2.4.1'de anlatıldığı gibi tespit edilmiş, sonuçlar Çizelge 4.7 ve Şekil 4.3 'de gösterilmiştir.

İzole edilen 21 adet *Lactobacillus* suşunun oluşturduğu yüzde laktik asit miktarı minimum %0,17, maksimum %1,14, ortalama %0,54 olarak bulunmuştur.

4.2.2. *Lactobacillus* 'ların hidrojen peroksit üretimleri

Lactobacillus suşlarının oluşturduğu hidrojen peroksit miktarı 3.2.4.2'de anlatıldığı gibi tespit edilmiş, sonuçlar Çizelge 4.7 ve Şekil 4.4 'de gösterilmiştir.

Lactobacillus suşlarının hidrojen peroksit üretimleri minimum 0,04 µg/ml, maksimum 0,19 µg/ml, ortalama 0,09 µg/ml olarak bulunmuştur.

4.2.3. *Lactobacillus* 'ların hidrojen sülfür üretimleri

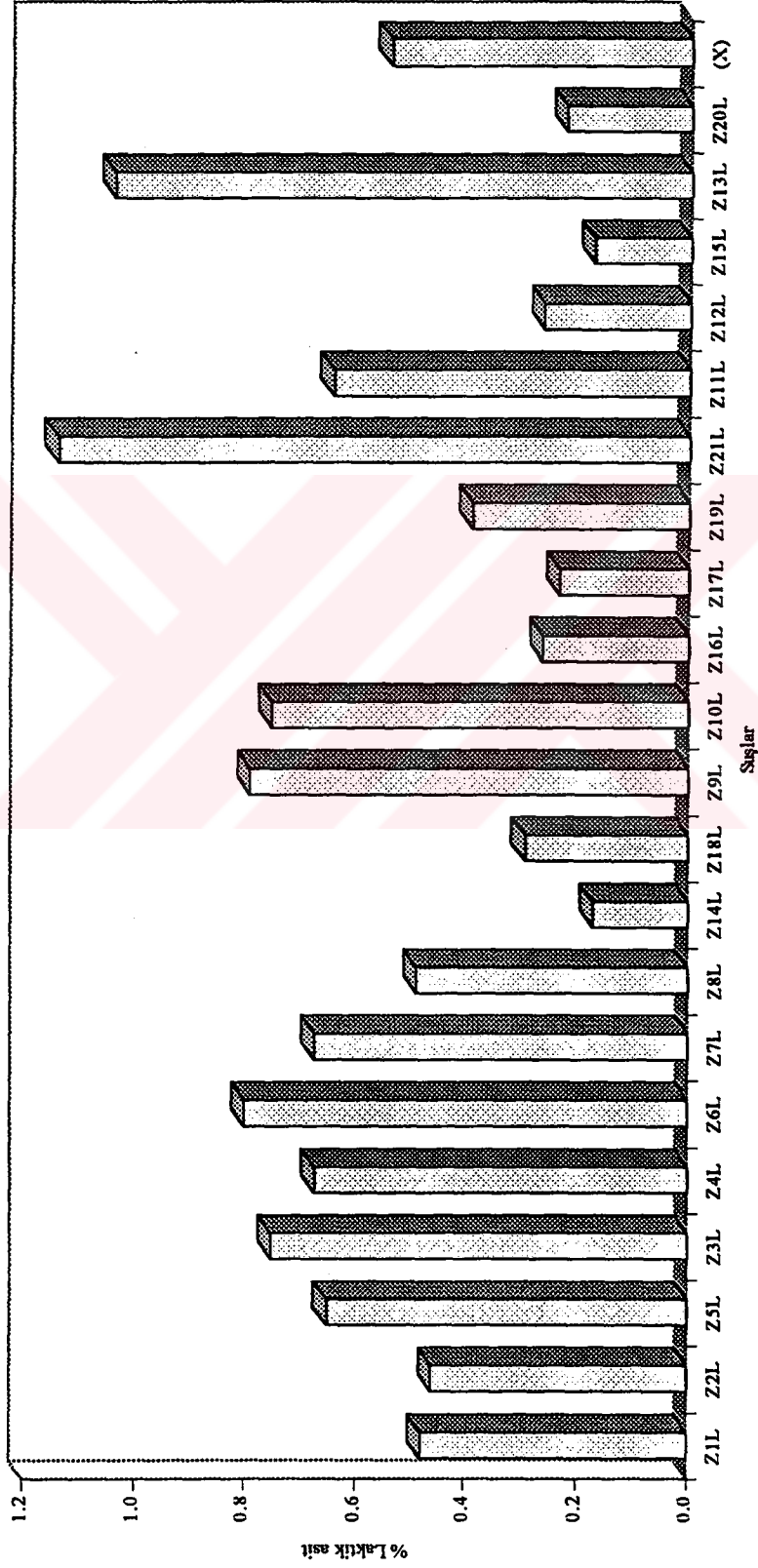
Lactobacillus suşların hidrojen sülfür üretimleri 3.2.4.3'de anlatıldığı gibi tespit edilmiştir. Suşların hidrojen sülfür üretimleri kalitatif değerlendirilmiştir (Çizelge 4.7).

H₂S üretimi orta olan *L. acidophilus* Z1L suşunun üreme durumu Şekil 4.5 'de gösterilmektedir.

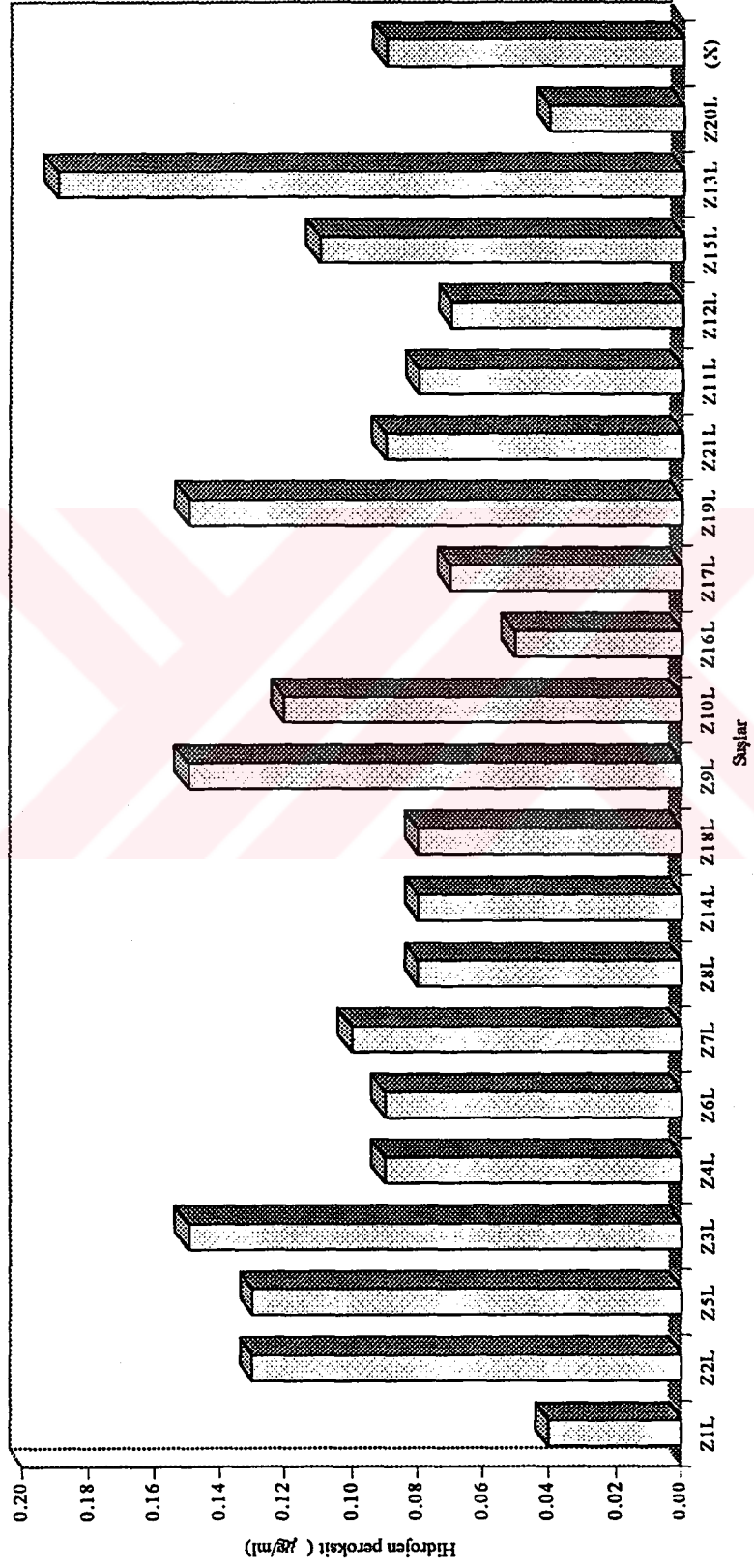
Çizelge 4.7. İzole edilen *Lactobacillus* suşlarının oluşturduğu bazı metabolik ürünlerin miktarları

Suş No	% Laktik asit	Hidrojen peroksit (µg/ml)	Asetaldehit (µg/ml)	Proteolitik aktivite (mg/ml)	Hidrojen sülfür (H ₂ S)
Z1L	0,48	0,04	1,76	0,14	++
Z2L	0,46	0,13	2,64	0,06	-
Z5L	0,65	0,13	2,29	0,06	-
Z3L	0,75	0,15	2,64	0,12	-
Z4L	0,67	0,09	3,26	0,10	-
Z6L	0,80	0,09	2,82	0,16	-
Z7L	0,67	0,10	2,64	0,13	-
Z8L	0,49	0,08	2,64	0,07	-
Z14L	0,17	0,08	1,32	0,00	++
Z18L	0,29	0,08	1,06	0,11	++
Z9L	0,79	0,15	3,08	0,09	-
Z10L	0,75	0,12	3,17	0,08	+
Z16L	0,26	0,05	2,20	0,02	++
Z17L	0,23	0,07	3,08	0,02	++
Z19L	0,39	0,15	3,34	0,09	+
Z21L	1,14	0,09	3,52	0,06	+
Z11L	0,64	0,08	4,40	0,01	++
Z12L	0,26	0,07	3,08	0,05	++
Z15L	0,17	0,11	2,20	0,06	++
Z13L	1,04	0,19	1,85	0,02	++
Z20L	0,22	0,04	0,88	0,03	++
Ortalama Değer (\bar{X})	0,54	0,09	2,56	0,07	

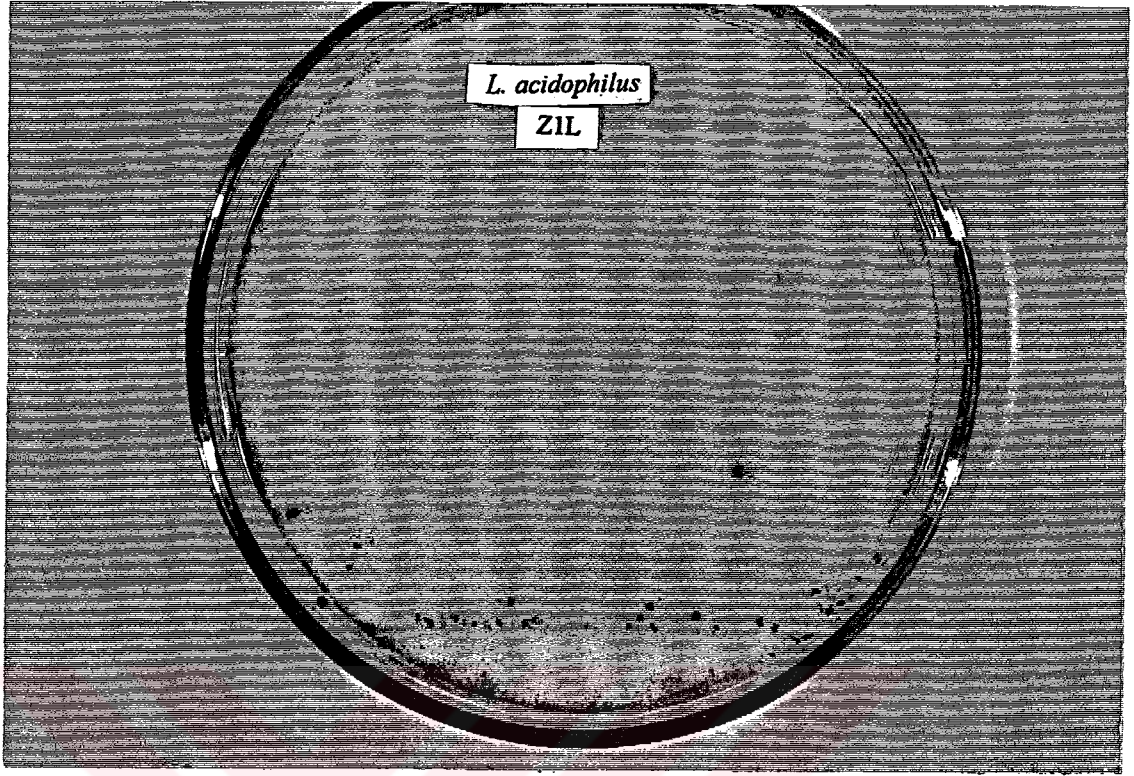
++ : H₂S üretimi orta
 + : H₂S üretimi zayıf
 - : H₂S üretimi yok



Şekil 4.3. *Lactobacillus* suşlarının oluşturduğu % laktik asit üretim miktarlarının histogramı



Şekil 4.4. *Lactobacillus* suşlarının oluşturduğu hidrojen peroksit üretim miktarlarının histogramı



Şekil 4.5. *L. acidophilus* Z1L suşunun TSI besiyerinde üreme durumu

4.2.4. *Lactobacillus* 'ların proteolitik aktivite üretimleri

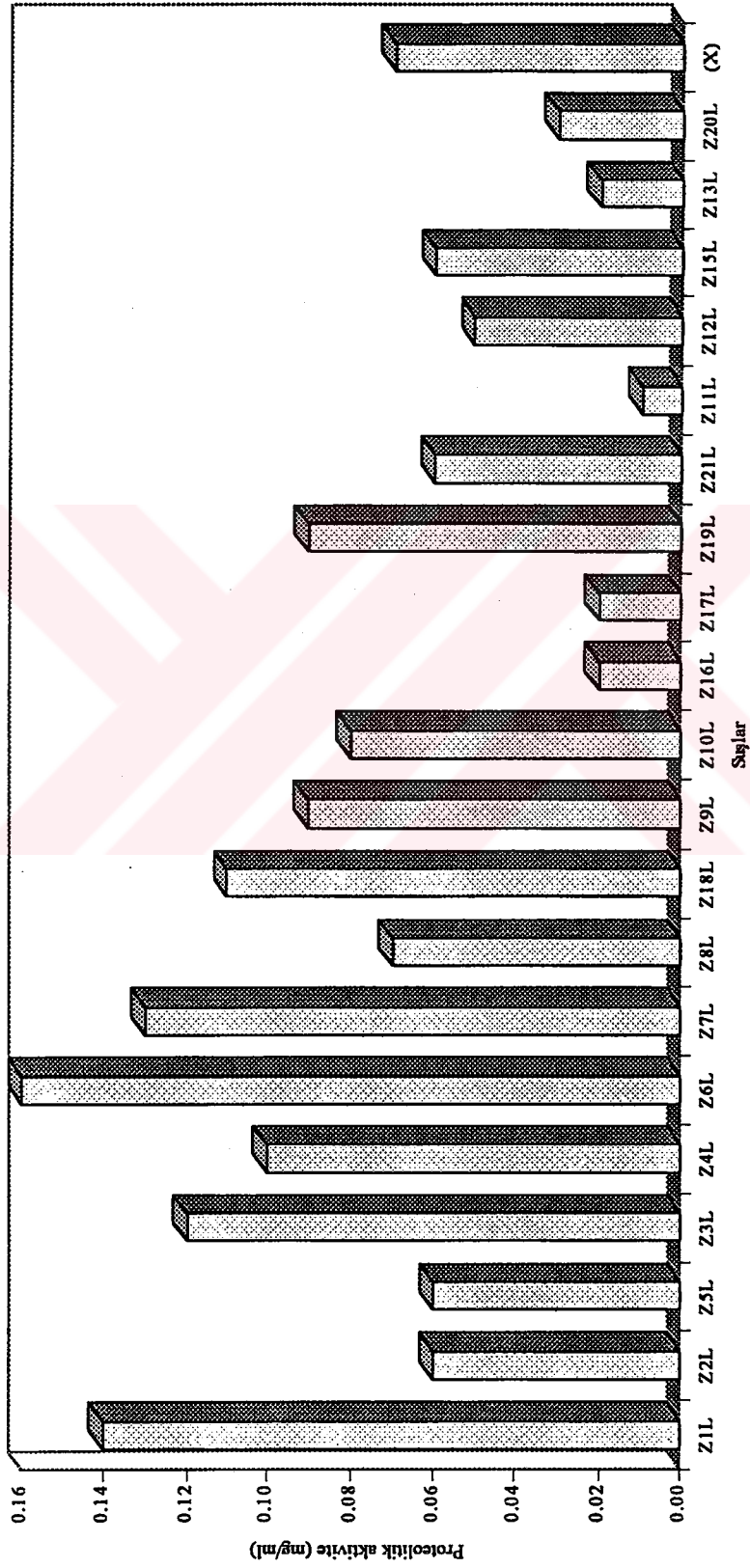
Lactobacillus suşlarının oluşturduğu proteolitik aktiviteleri 3.2.4.4'de anlatıldığı gibi tespit edilmiştir.

Lactobacillus suşlarından *L. bulgaricus* Z14L suşunda proteolitik aktivite tespit edilmezken, proteolitik aktivitesi tespit edilen suşlardan minimum üretimi *L. plantarum* Z11L (0,01 mg tirozin/ml), maksimum üretimi *L. acidophilus* Z1L (0,14 mg tirosin/ ml) suşlarının gerçekleştirdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.7, Şekil 4.6).

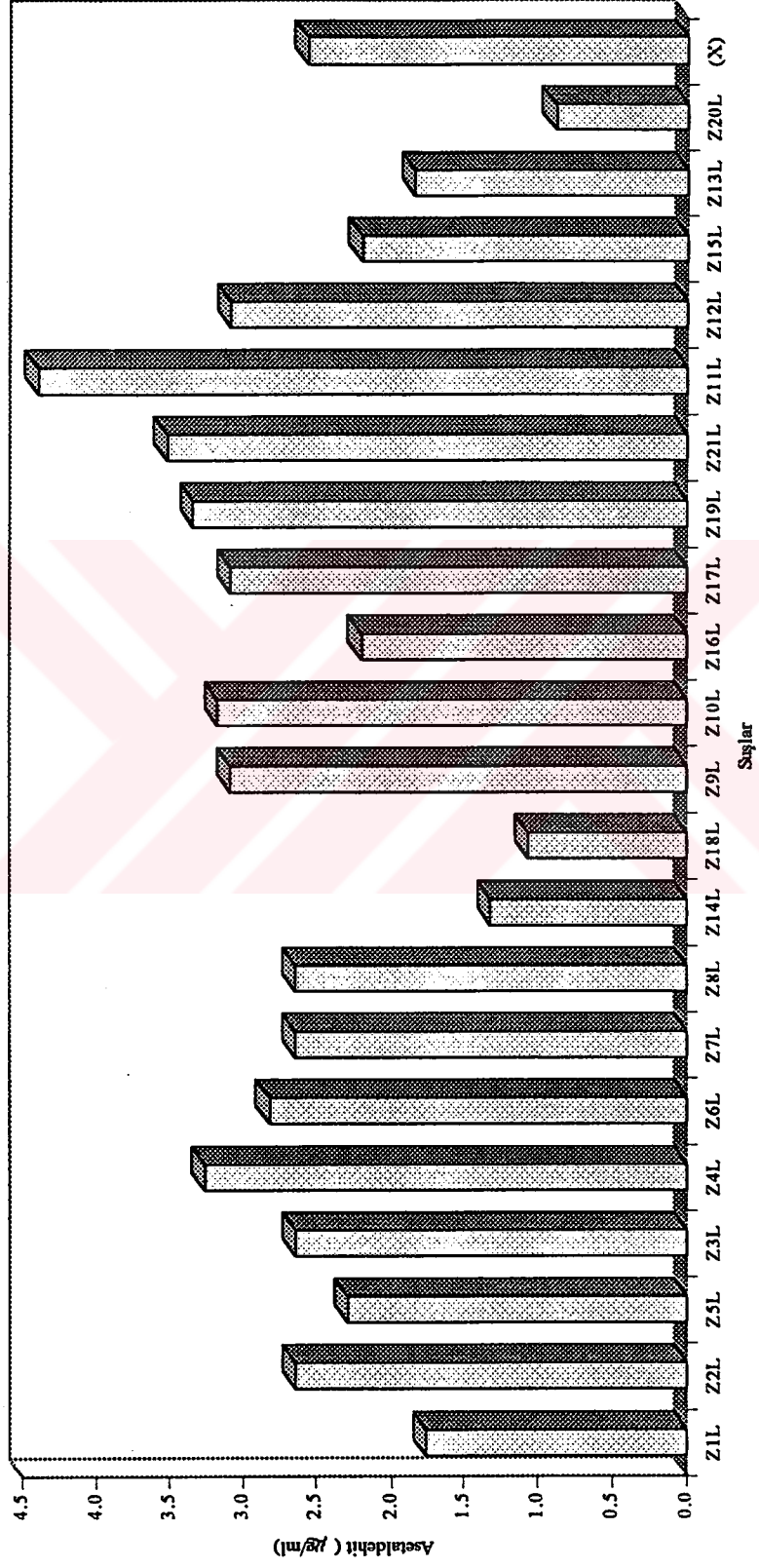
4.2.5. *Lactobacillus* 'ların asetaldehit üretimi

İzole edilen *Lactobacillus* suşlarının asetaldehit üretimleri 3.2.4.6'da anlatıldığı gibi tespit edilmiştir

Lactobacillus suşlarının oluşturduğu asetaldehit miktarı minimum 0,88 µg/ml, maksimum 4,40 µg7ml, ortalama 2,56 µg/ml olarak bulunmuştur (Çizelge 4.7, Şekil 4.7).



Şekil 4.6. *Lactobacillus* suşlarının oluşturduğu proteolitik aktivite üretim miktarlarının histogramı



Şekil 4.7. *Lactobacillus* suşlarının oluşturduğu asetaldehit üretim miktarlarının histogramı

4.3. *Lactobacillus*'ların İnhibisyon Etkisi

Lactobacillus suşlarının *E. coli*, *S. aureus* koag.(+), *S. aureus* koag.-, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* bakterileri üzerine antimikrobiyal etkisi agar diffüzyon yöntemi ile tespit edilmiş ve Çizelge 4.8, Şekil 4.8 - Şekil 4.12'de gösterilmiştir.

L. casei Z7L suşu minimum (4,80 mm), Z4L suşu maksimum (7,40 mm) zon çapında *E. coli* üzerinde antimikrobiyal etki gösterirken, diğer *Lactobacillus* suşlarının antimikrobiyal etki göstermediği tespit edilmiştir.

L. casei Z4L suşu *S. aureus* koag.(+) üzerinde maksimum (12,00 mm) zon çapında, *L. lactis* Z21L suşu minimum (5,60 mm) zon çapında antimikrobiyal etki göstermiştir. Diğer suşlar antimikrobiyal etki göstermemiştir.

L. casei Z3L, Z4L ve Z7L ve *L. bulgaricus* Z8L suşlarının *S. aureus* koag.(+) üzerindeki genel inhibisyon etkileri Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'de gösterilmiştir.

L. helveticus Z2L suşu ve *L. bulgaricus* Z8L suşu *S. aureus* koag.-) üzerinde maksimum (10,40 mm) zon çapında, *L. lactis* Z21L suşu minimum (4,00 mm) zon çapında antimikrobiyal etki gösterirken, diğer suşlar antimikrobiyal etki göstermemiştir.

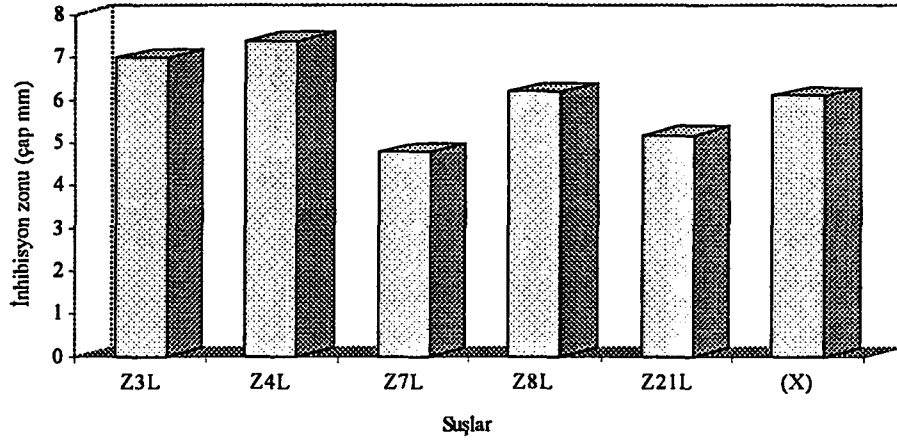
L. acidophilus Z1L ve *L. helveticus* Z2L suşlarının *S. aureus* koag(-) üzerindeki genel inhibisyon etkileri Şekil 4.15'de gösterilmiştir.

B. subtilis üzerinde, *L. helveticus* Z2L (3,80 mm), *L. casei* Z4L (5,00 mm), *L. bulgaricus* Z18L (4,20 mm) suşları antimikrobiyal etki gösterdiği, diğer *Lactobacillus* suşlarının antimikrobiyal etki göstermediği tespit edilmiştir.

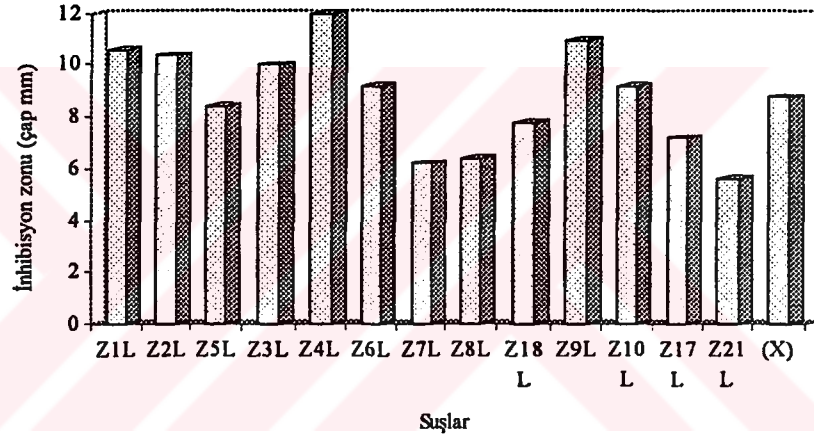
P. aeruginosa üzerinde, *L. helveticus* Z5L, *L. casei* Z6L suşları minimum (6,20 mm) zon çapında, *L. bulgaricus* Z18L maksimum (11,00 mm) zon çapında antimikrobiyal etki göstermiştir. Diğer *Lactobacillus* suşları antimikrobiyal etki göstermemiştir.

Çizelge 4.8. *Lactobacillus* suşlarının test bakterileri üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun çap değerleri

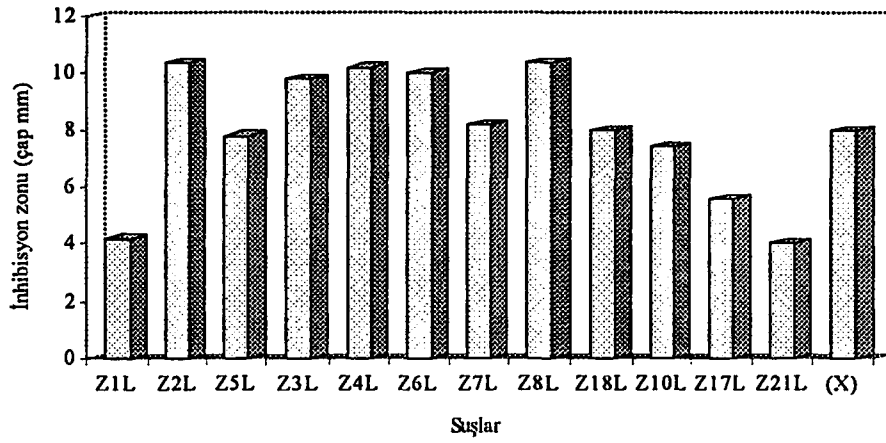
Suş No	ZON ÇAPLARI (mm)				
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i> koag(+)	<i>S. aureus</i> koag(-)	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Z1L	0,00±0.00	10,60±0.03	4,20±0.01	0,00±0.00	0,00±0.00
Z2L	0,00±0.00	10,40±0.02	10,40±0.02	3,80±0.04	8,80±0.04
Z5L	0,00±0.00	8,40±0.02	7,80±0.05	0,00±0.00	6,20±0.01
Z3L	7,00±0.01	10,00±0.05	9,80±0.03	0,00±0.00	7,40±0.03
Z4L	7,40±0.03	12,00±0.02	10,20±0.01	5,00±0.05	6,40±0.02
Z6L	0,00±0.00	9,20±0.04	10,00±0.01	0,00±0.00	6,20±0.01
Z7L	4,80±0.03	6,20±0.03	8,20±0.03	0,00±0.00	0,00±0.00
Z8L	6,20±0.01	6,40±0.03	10,40±0.02	0,00±0.00	0,00±0.00
Z14L	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z18L	0,00±0.00	7,80±0.06	8,00±0.06	4,20±0.01	11,00±0.03
Z9L	0,00±0.00	11,00±0.02	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z10L	0,00±0.00	9,20±0.02	7,40±0.03	0,00±0.00	0,00±0.00
Z16L	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z17L	0,00±0.00	7,20±0.04	5,60±0.02	0,00±0.00	0,00±0.00
Z19L	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z21L	5,20±0.03	5,60±0.02	4,00±0.02	0,00±0.00	0,00±0.00
Z11L	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z12L	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z15L	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z13L	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z20L	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Ortalama Değer (\bar{x})	6,12	8,77	8,00	4,33	7,67



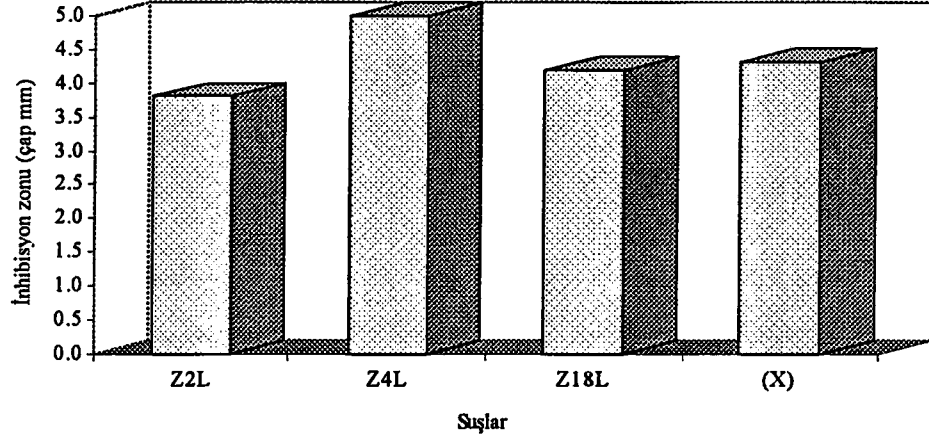
Şekil 4.8. İnhibisyon gösteren *Lactobacillus* suşlarının *E. coli* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu histogramı



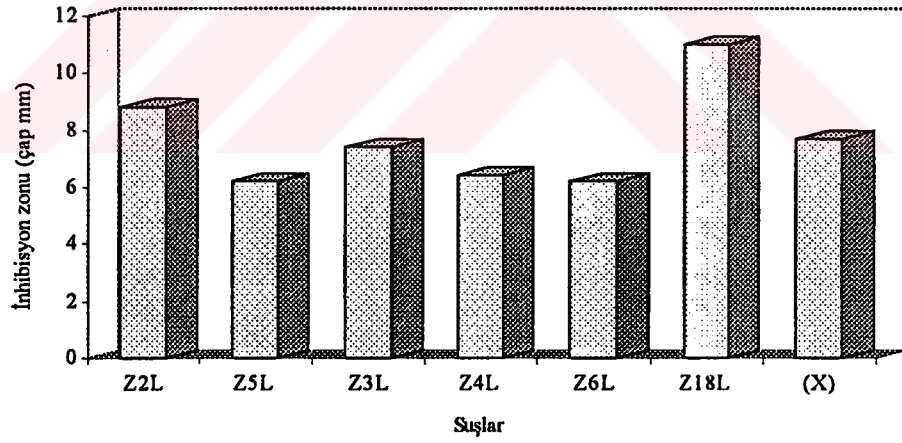
Şekil 4.9. İnhibisyon gösteren *Lactobacillus* suşlarının *S. aureus* koag.(+) üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu histogramı



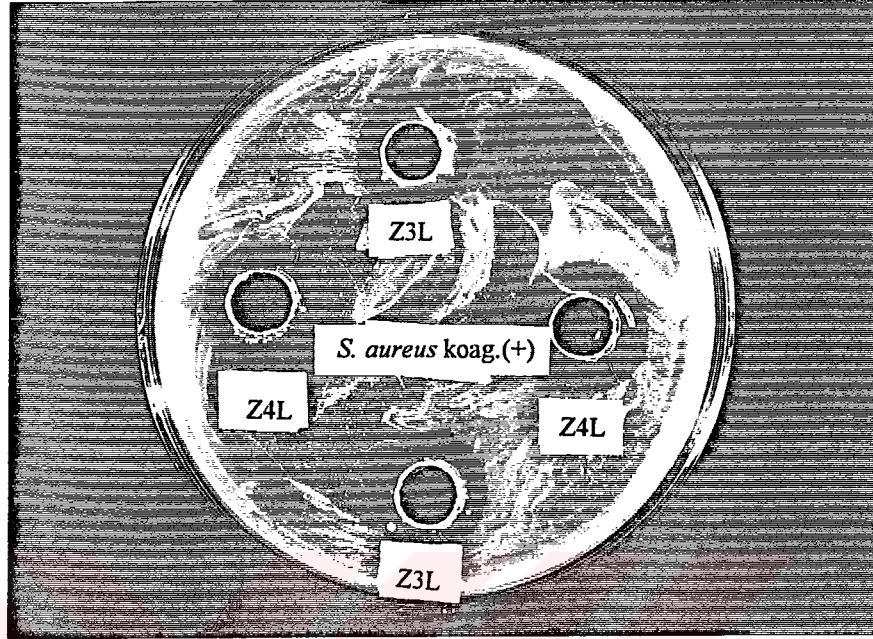
Şekil 4.10. İnhibisyon gösteren *Lactobacillus* suşlarının *S. aureus* koag.(-) üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu histogramı



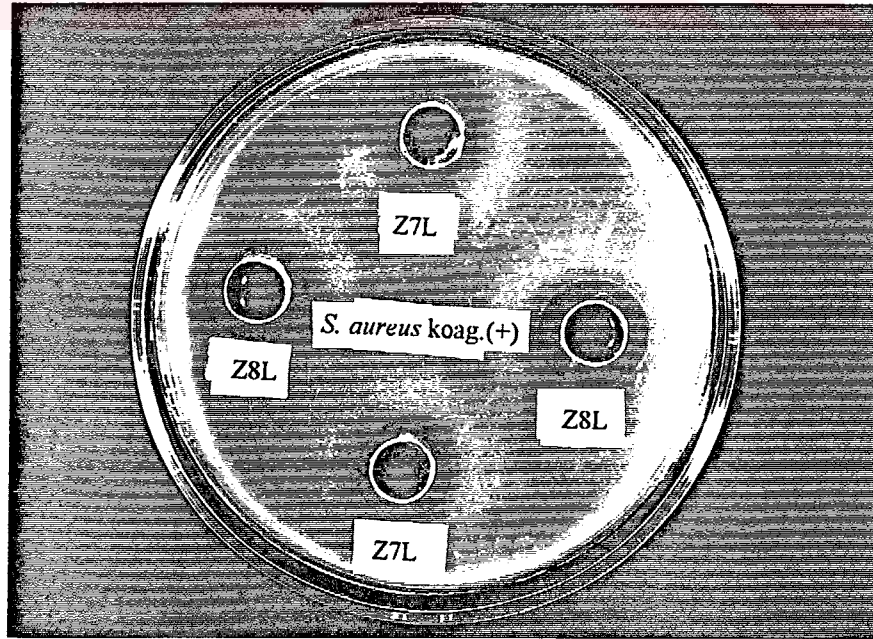
Şekil 4.11. İnhibiyon gösteren *Lactobacillus* suşlarının *B. subtilis* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun histogramı



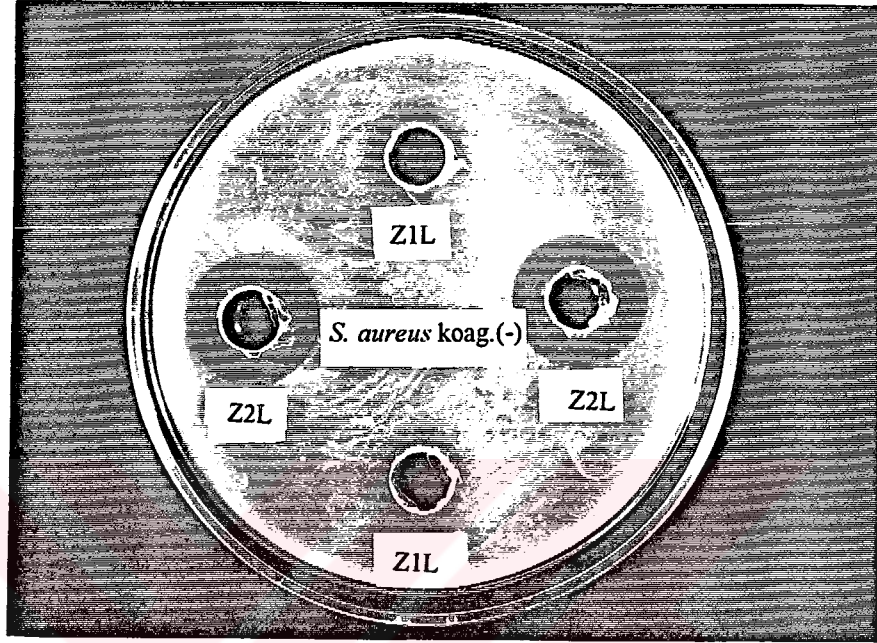
Şekil 4.12. İnhibiyon gösteren *Lactobacillus* suşlarının *P. aeruginosa* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun histogramı



Şekil 4.13. *S. aureus* koag.(+) üzerine *L. casei* Z3L ve Z4L suşlarının oluşturduğu inhibisyon zonu



Şekil 4.14. *S. aureus* koag.(+) üzerine *L. casei* Z7L ve *L. bulgaricus* Z8L suşlarının oluşturduğu inhibisyon zonu



Şekil 4.15. *S. aureus* koag.(-) üzerine *L. acidophilus* Z1L ve *L. helveticus* Z2L suşlarının oluşturduğu inhibisyon zonu

4.4. *Lactobacillus* 'ların Bakteriosin ve/veya Bakteriosin Benzeri Madde Üretimleri

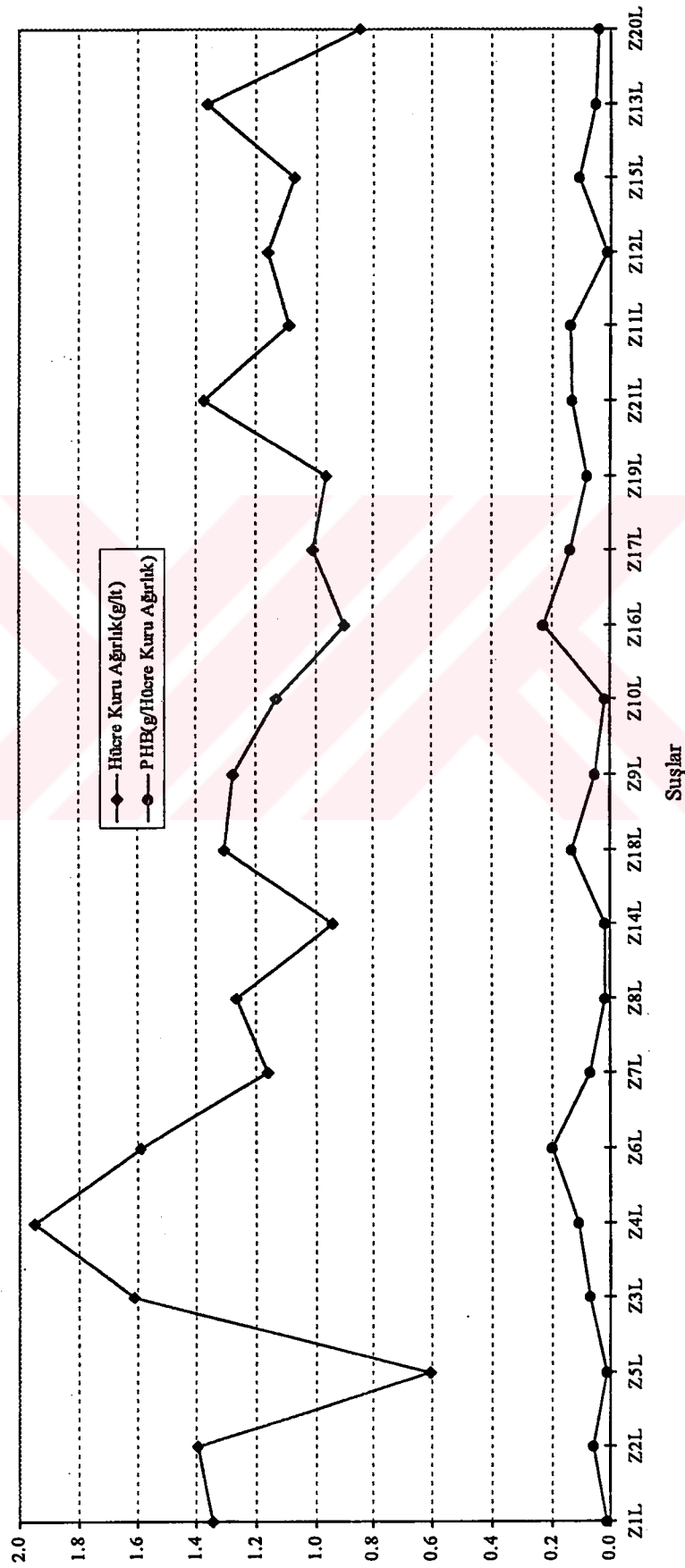
Lactobacillus suşlarının bakteriosin etkileri *E. coli*, *S. aureus* koag.(+), *S. aureus* koag.(-), *B. subtilis*, *P. aeruginosa* üzerinde uygulanmış, suşların bakteriosin inhibisyon etkisi göstermediği tespit edilmiştir.

4.5. *Lactobacillus* 'ların PHB Üretimi

Lactobacillus suşlarının PHB üretimleri Çizelge 4.9 ve Şekil 4.16 'da verilmiştir. *L. lactis* Z16L (%25,55) suşu yüksek seviyede PHB üretirken *L. acidophilus* Z1L (%0,52) suşu düşük seviyede PHB üretmiştir.

Çizelge 4.9. *Lactobacillus* suşlarının PHB üretimleri

Suş No	Hücre Kuru Ağırlık (g/l)	PHB (g/Hücre Kuru Ağırlık)	PHB (% Verim)
Z1L	1,34 ± 0,04	0,01±0,001	0,52
Z2L	1,39 ± 0,13	0,06 ± 0,01	4,32
Z5L	0,61 ± 0,07	0,01±0,001	2,13
Z3L	1,61 ± 0,01	0,07 ± 0,02	4,34
Z4L	1,95 ± 0,01	0,11 ± 0,02	5,64
Z6L	1,59 ± 0,03	0,20 ± 0,01	12,57
Z7L	1,16 ± 0,12	0,07 ± 0,01	6,03
Z8L	1,26 ± 0,04	0,02 ± 0,01	1,59
Z14L	0,94 ± 0,02	0,02±0,004	1,70
Z18L	1,30 ± 0,08	0,13 ± 0,01	10,00
Z9L	1,27 ± 0,23	0,05 ± 0,01	3,93
Z10L	1,13 ± 0,09	0,02±0,003	1,42
Z16L	0,90 ± 0,04	0,23 ± 0,05	25,55
Z17L	1,01 ± 0,07	0,14 ± 0,00	13,86
Z19L	0,96 ± 0,10	0,08 ± 0,01	8,33
Z21L	1,37 ± 0,03	0,13 ± 0,01	9,49
Z11L	1,09 ± 0,05	0,14 ± 0,00	12,84
Z12L	1,16 ± 0,06	0,01±0,004	1,03
Z15L	1,07 ± 0,03	0,11 ± 0,01	10,28
Z13L	1,36 ± 0,10	0,05 ± 0,01	3,67
Z20L	0,85 ± 0,03	0,04 ± 0,01	4,71



Şekil 4.16. *Lactobacillus* suşlarının kuru hücre ağırlığı ve PHB üretimleri

4.6. *Streptococcus* 'ların Metabolik Aktivitelerin Sonuçları

Streptococcus suşlarının laktik asit, hidrojen peroksit, asetaldehit, proteolitik aktivite, diasetil ve hidrojen sülfür üretimleri tespit edilmiştir.

4.6.1. *Streptococcus* 'ların laktik asit üretimleri

Streptococcus suşlarının oluşturduğu % laktik asit miktarları 3.2.4.1'de anlatıldığı gibi tespit edilmiş, sonuçlar Çizelge 4.10 ve Şekil 4.17 'de gösterilmiştir.

Streptococcus suşlarının oluşturduğu laktik asit miktarı minimum %0,23, maksimum %0,99, ortalama %0,63 olarak hesaplanmıştır.

4.6.2. *Streptococcus* 'ların hidrojen peroksit üretimleri

Streptococcus suşlarının oluşturduğu hidrojen peroksit miktarı 3.2.4.2'de anlatıldığı gibi tespit edilmiştir (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.18).

Streptococcus suşlarından *S. lactis* Z13S, *S. durans* Z7S, Z8S,Z15S ve *S. cremoris* Z9S, Z16S, Z17S, Z19S, Z20S, Z21S suşlarının hidrojen peroksit üretmedikleri tespit edilmiştir. Hidrojen peroksit üreten suşlarda maksimum H₂O₂ üretimi 0,17 µg/ml, minimum üretim 0,01 µg/ml, ortalama 0,08 µg/ml olarak bulunmuştur.

4.6.3. *Streptococcus* 'ların hidrojen sülfür üretimleri

Streptococcus suşlarının hidrojen sülfür üretimleri 3.2.4.3'de anlatıldığı gibi tespit edilmiş, suşların hidrojen sülfür üretimleri kalitatif değerlendirilmiştir (Çizelge 4.10).

4.6.4. *Streptococcus* 'ların proteolitik aktivite üretimleri

Streptococcus suşlarının oluşturduğu proteolitik aktiviteleri 3.2.4.4'de anlatıldığı gibi tespit edilmiştir.

Streptococcus suşlarından *S. lactis* Z2S, Z3S, *S. thermophilus* Z5S, Z12S, *S. durans* Z7S, Z8S, *S. cremoris* Z14S, Z16S suşlarında proteolitik aktivite tespit edilememiştir. *S. cremoris* Z18S suşunda minimum (0,01 mg tirosin/ml), *S. cremoris* Z20S suşunda maksimum (0,09 mg tirosin /ml) proteolitik aktivite bulunmuştur (Çizelge 4.10, Şekil 4.19).

4.6.5. *Streptococcus* 'ların diasetil üretimi

Streptococcus suşlarının diasetil miktarı 3.2.4.5'de anlatıldığı gibi tespit edilmiş ve hiç bir suşun diasetil üretmediği bulunmuştur.

4.6.6. *Streptococcus* 'ların asetaldehit üretimi

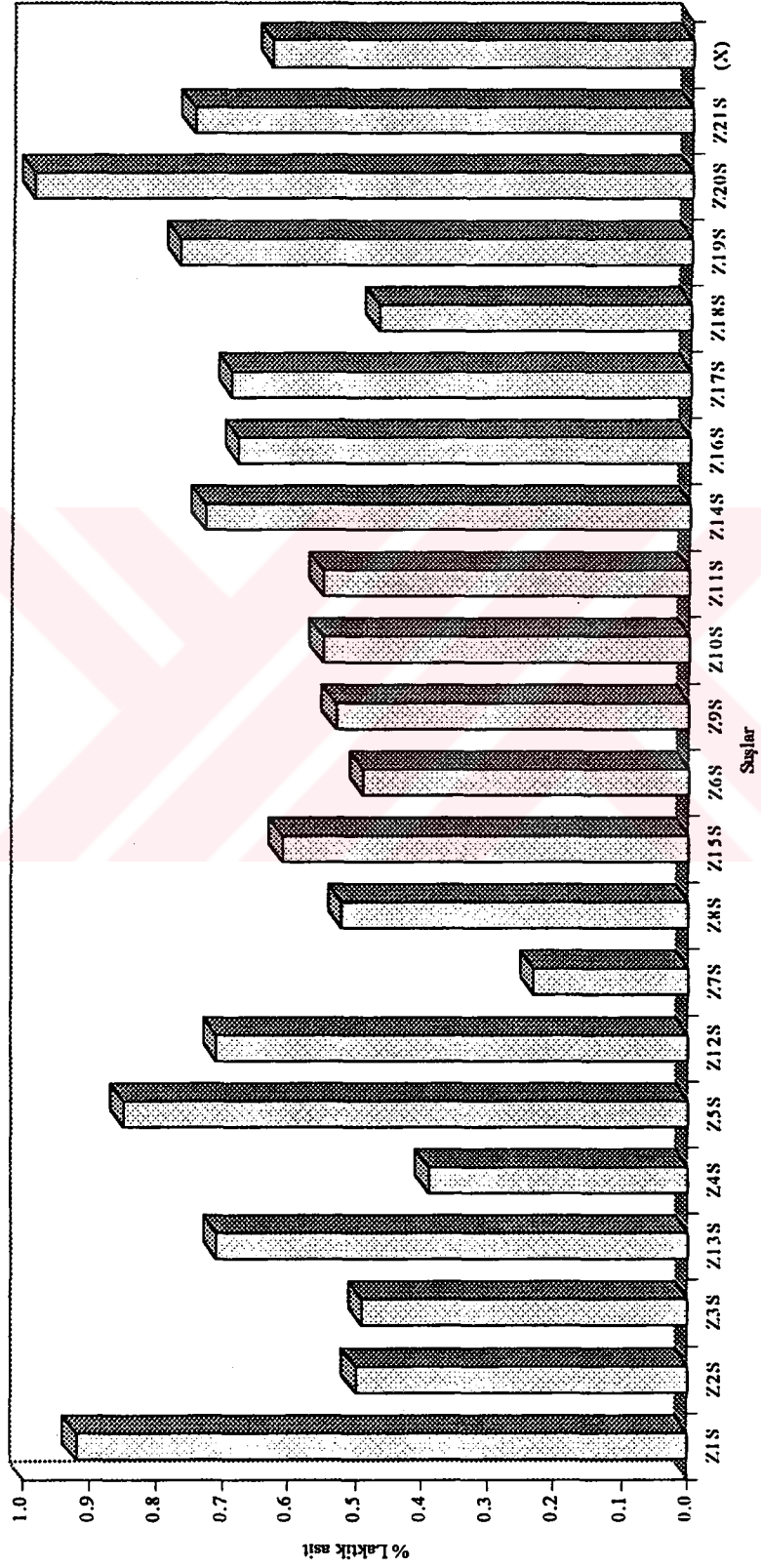
İzole edilen *Streptococcus* suşlarının asetaldehit üretimleri 3.2.4.6'da anlatıldığı gibi tespit edilmiştir

İzole edilen *Streptococcus* suşlarının minimum 0,18 µg/ml, maksimum 3,96 µg/ml, ortalama 2,20 µg/ml asetaldehit ürettiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.10, Şekil 4.20).

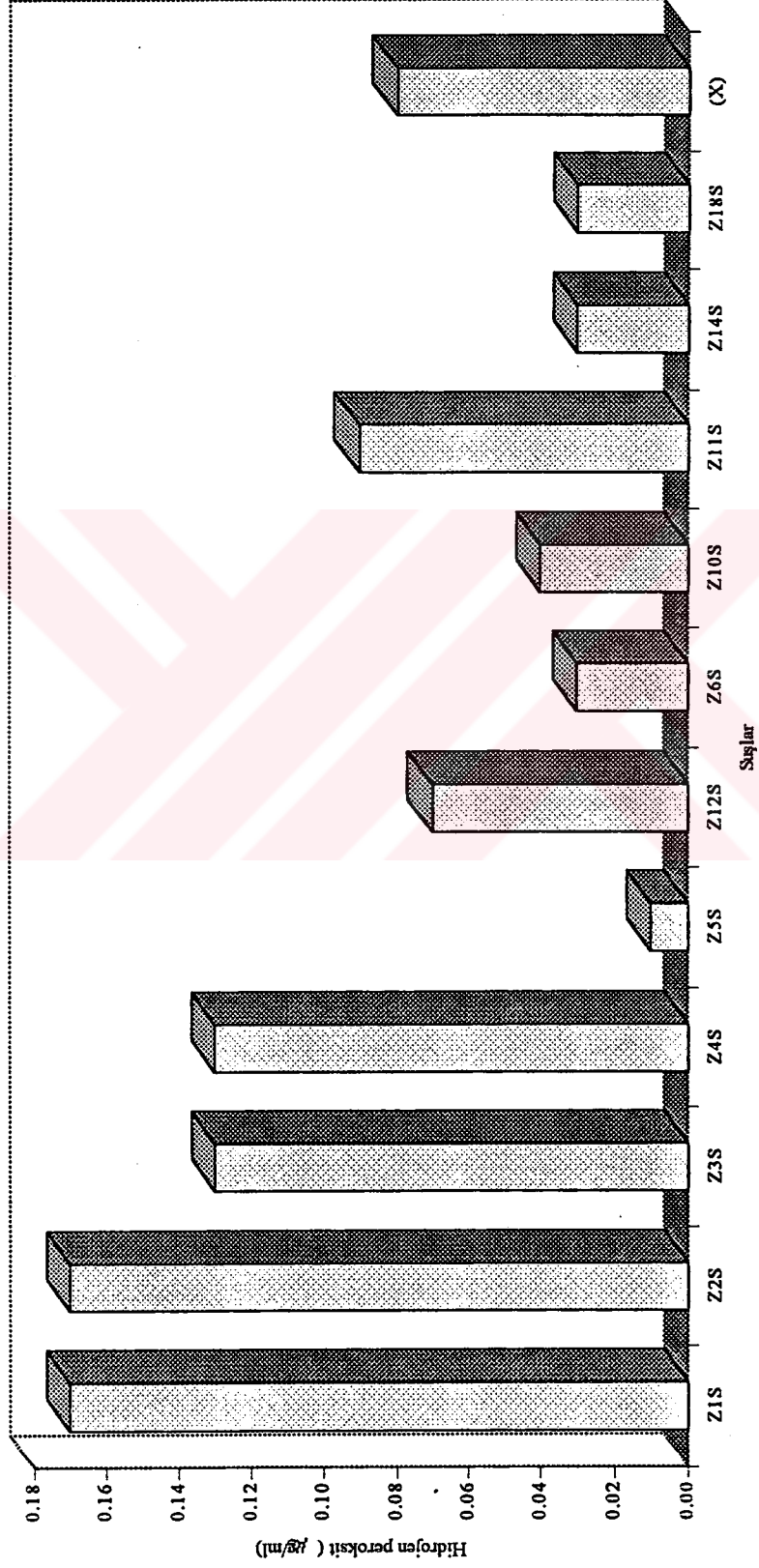
Çizelge 4.10. İzole edilen *Streptococcus* suşlarının oluşturduğu bazı metabolik ürünlerin miktarları

Suş No	% Laktik asit	Hidrojen peroksit (µg/ml)	Asetaldehit (µg/ml)	Proteolitik aktivite (mg/ml)	Diasetil (µg/ml)	Hidrojen sülfür (H ₂ S)
Z1S	0,92	0,17	3,96	0,03	0,00	-
Z2S	0,50	0,17	1,14	0,00	0,00	+
Z3S	0,49	0,13	1,32	0,00	0,00	-
Z13S	0,71	0,00	1,76	0,05	0,00	+
Z4S	0,39	0,13	2,38	0,02	0,00	-
Z5S	0,85	0,01	3,08	0,00	0,00	+
Z12S	0,71	0,07	2,90	0,00	0,00	-
Z7S	0,23	0,00	2,64	0,00	0,00	-
Z8S	0,52	0,00	0,18	0,00	0,00	-
Z15S	0,61	0,00	2,64	0,07	0,00	+
Z6S	0,49	0,03	2,02	0,05	0,00	+
Z9S	0,53	0,00	1,85	0,04	0,00	-
Z10S	0,55	0,04	1,94	0,01	0,00	-
Z11S	0,55	0,09	2,90	0,01	0,00	-
Z14S	0,73	0,03	1,32	0,00	0,00	+
Z16S	0,68	0,00	3,61	0,00	0,00	+
Z17S	0,69	0,00	1,76	0,07	0,00	+
Z18S	0,47	0,03	0,62	0,01	0,00	+
Z19S	0,77	0,00	2,82	0,07	0,00	+
Z20S	0,99	0,00	3,69	0,09	0,00	+
Z21S	0,75	0,00	1,76	0,07	0,00	+
Ortalama Değer (\bar{X})	0,63	0,08	2,20	0,04	0,00	

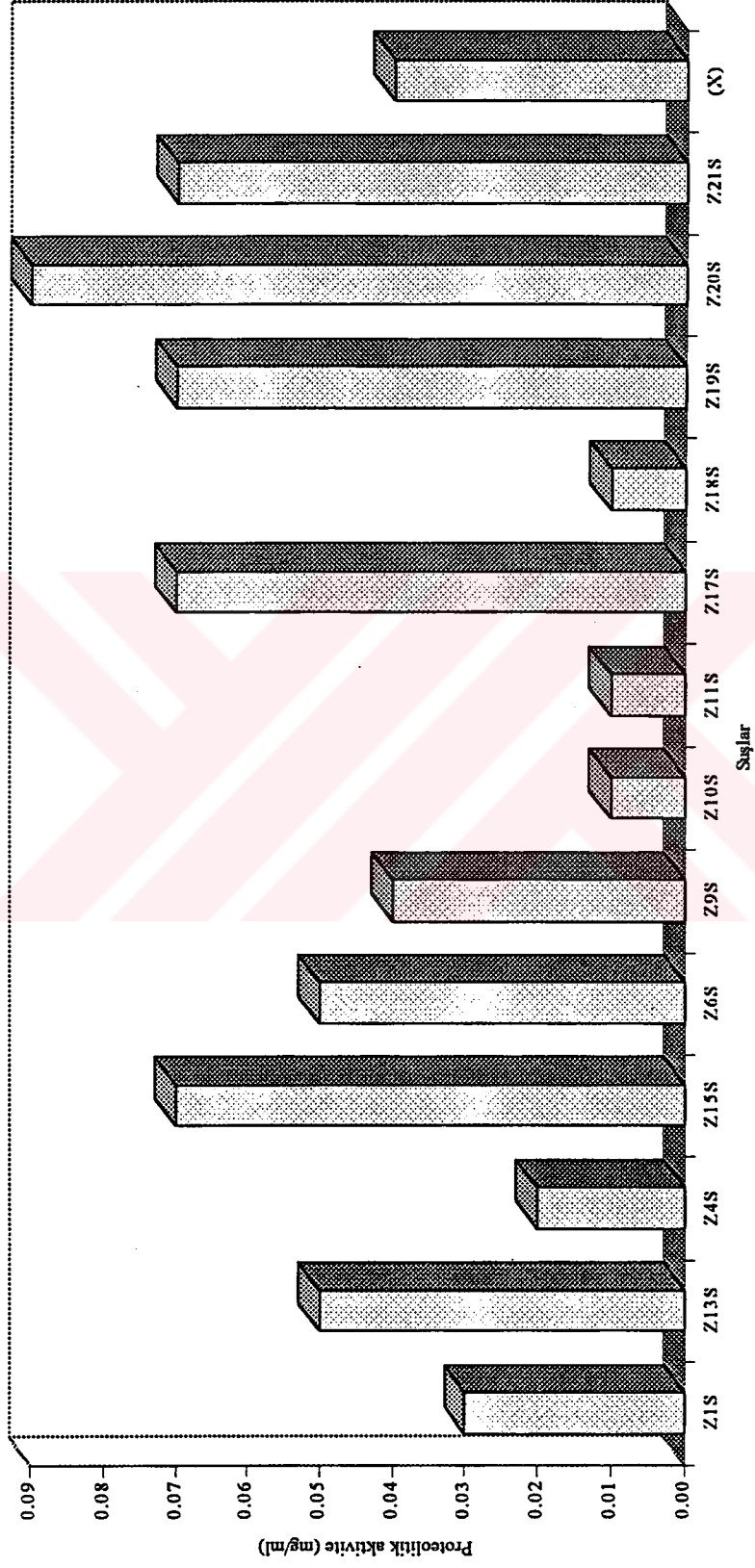
++ : H₂S üretimi orta
 + : H₂S üretimi zayıf
 - : H₂S üretimi yok



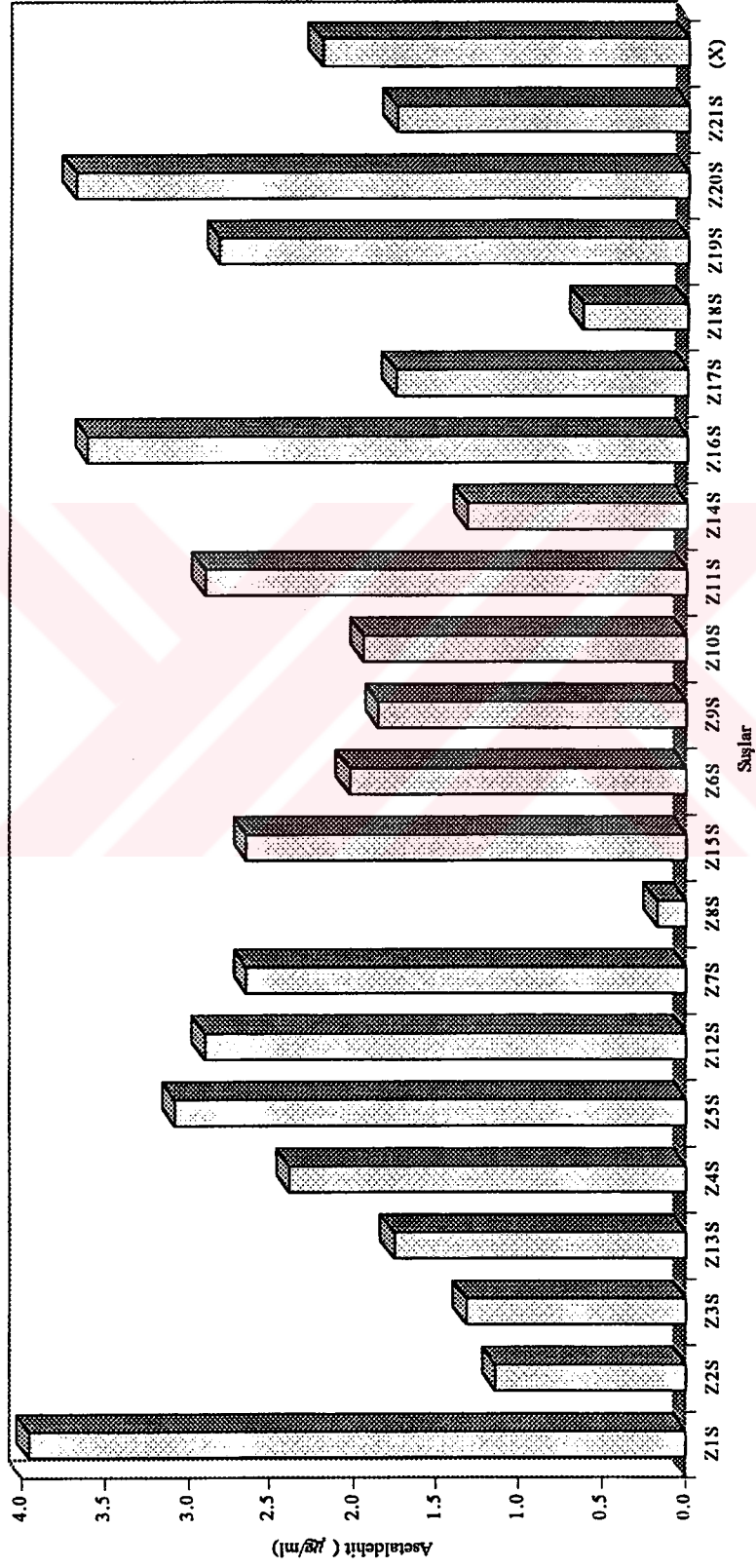
Şekil 4.17. *Streptococcus* suşlarının oluşturduğu % laktik asit üretim miktarlarının histogramı



Şekil 4.18. Hidrojen peroksit üreten *Streptococcus* suşlarının histogramı



Şekil 4.19. Proteolitik aktivite gösteren *Streptococcus* suşlarının histogramı



Şekil 4.20. Asetaldehit üreten *Streptococcus* suşlarının histogramı

4.7. *Streptococcus* 'ların İnhibisyon Etkisi

Streptococcus suşlarının *E. coli*, *S. aureus* koag.(+), *S. aureus* koag.(-), *B. subtilis*, *P. aeruginosa* bakterileri üzerine antimikrobiyal etkisi agar diffüzyon yöntemi ile tespit edilmiş ve Çizelge 4.11, Şekil 4.21 - Şekil 4.25 'de gösterilmiştir.

Streptococcus suşlarından *S. thermophilus* Z5S (6,40 mm) ve *S. cremoris* Z6S (4,80 mm) suşlarının *E. coli* üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği, diğer suşların antimikrobiyal etki göstermediği tespit edilmiştir.

S. durans Z7S suşu *S.aureus* koag.(+) üzerinde minimum (5,40 mm) zon çapında, *S. cremoris* Z16S suşu maksimum (12,60 mm) zon çapında antimikrobiyal etki göstermiştir.

S. aureus koag.(-) üzerinde *S. thermophilus* Z4S maksimum (13,60 mm) zon çapında, *S. durans* Z7S minimum (3,80 mm) zon çapında antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir.

S. cremoris Z9S, Z10S ve Z16S ve *S. durans* Z15S suşlarının *S. aureus* koag.(+) ve koag.(-) üzerindeki genel inhibisyon etkileri Şekil 4.26 ve Şekil 4.27 'de gösterilmiştir.

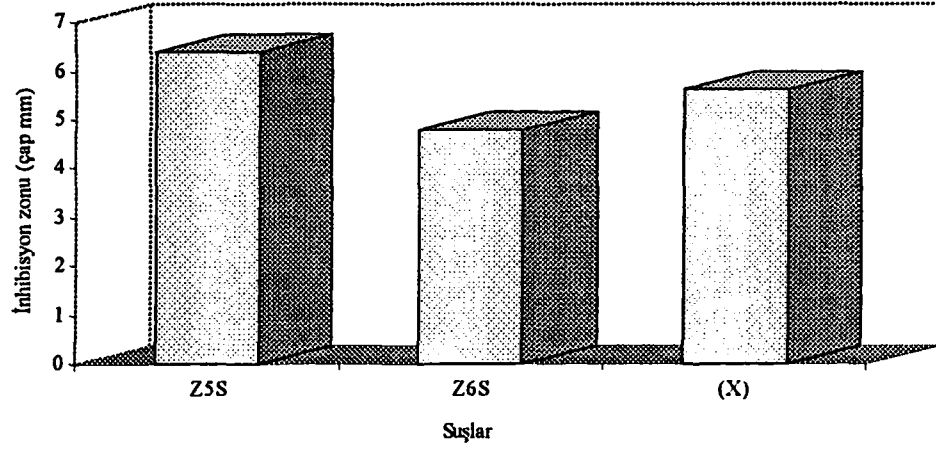
B. subtilis üzerinde *S. thermophilus* Z12S, *S. durans* Z7S, *S. cremoris* Z11S suşlarının antimikrobiyal etki göstermediği, antimikrobiyal etki gösteren suşlardan *S. thermophilus* Z5S maksimum (8,00 mm) zon çapında, *S. cremoris* Z10S minimum (2,60 mm) zon çapında antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir.

S. durans Z15S, *S. lactis* Z13S, *S. cremoris* Z16S ve Z14S suşlarının *B. subtilis* üzerindeki genel inhibisyon etkileri Şekil 4.28 ve Şekil 4.29 'de gösterilmiştir.

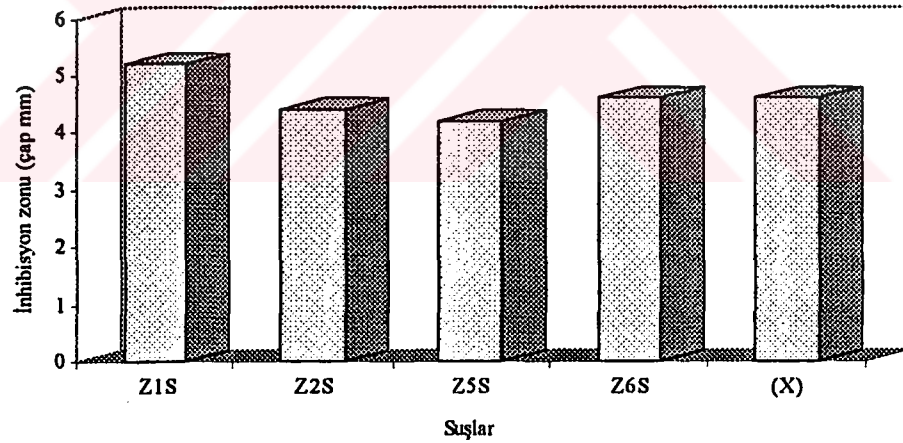
P. aeruginosa üzerinde, *S. lactis* Z1S (5,20 mm), Z2S (4,40 mm), *S. thermophilus* Z5S (4,20 mm), *S. cremoris* Z6S (4,60 mm) suşlarının antimikrobiyal etki gösterdiği, diğer suşların antimikrobiyal etki göstermediği belirlenmiştir.

Çizelge 4.11. *Streptococcus* suşlarının test bakterileri üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonuunun çap değerleri

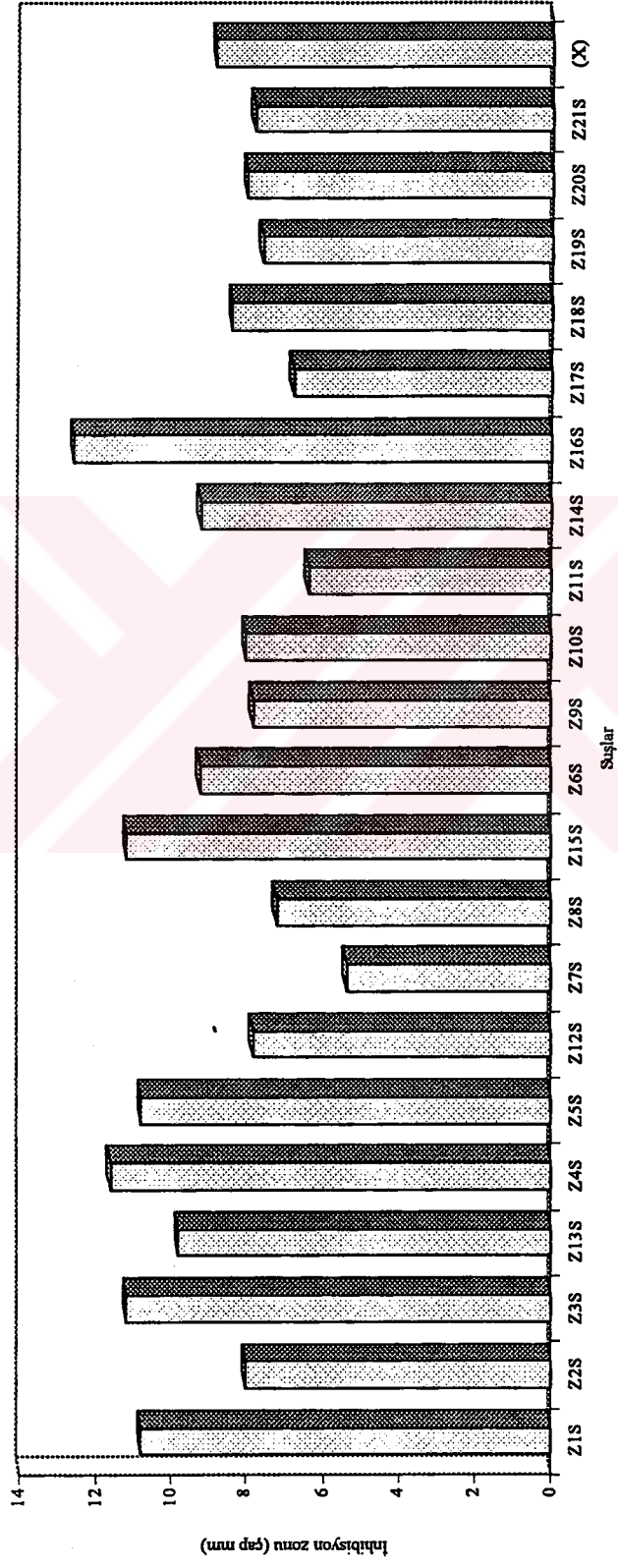
Suş No	ZON ÇAPLARI (mm)				
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i> koag(+)	<i>S. aureus</i> koag(-)	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Z1S	0,00±0.00	10,80±0.01	9,80±0.02	6,80±0.04	5,20±0.01
Z2S	0,00±0.00	8,00±0.02	8,00±0.01	6,40±0.02	4,40±0.01
Z3S	0,00±0.00	11,20±0.02	12,40±0.01	4,80±0.03	0,00±0.00
Z13S	0,00±0.00	9,80±0.04	10,60±0.05	3,80±0.02	0,00±0.00
Z4S	0,00±0.00	11,60±0.05	13,60±0.02	4,60±0.01	0,00±0.00
Z5S	6,40±0.02	10,80±0.04	9,60±0.01	8,00±0.02	4,20±0.02
Z12S	0,00±0.00	7,80±0.01	8,00±0.01	0,00±0.00	0,00±0.00
Z7S	0,00±0.00	5,40±0.01	3,80±0.02	0,00±0.00	0,00±0.00
Z8S	0,00±0.00	7,20±0.02	7,20±0.01	5,60±0.02	0,00±0.00
Z15S	0,00±0.00	11,20±0.01	9,20±0.01	5,00±0.02	0,00±0.00
Z6S	4,80±0.03	9,20±0.04	7,20±0.01	4,80±0.01	4,60±0.01
Z9S	0,00±0.00	7,80±0.01	11,40±0.01	3,20±0.01	0,00±0.00
Z10S	0,00±0.00	8,00±0.02	12,60±0.01	2,60±0.02	0,00±0.00
Z11S	0,00±0.00	6,40±0.02	6,80±0.02	0,00±0.00	0,00±0.00
Z14S	0,00±0.00	9,20±0.02	7,60±0.04	4,00±0.01	0,00±0.00
Z16S	0,00±0.00	12,60±0.04	8,60±0.02	3,60±0.01	0,00±0.00
Z17S	0,00±0.00	6,80±0.04	10,00±0.03	4,60±0.01	0,00±0.00
Z18S	0,00±0.00	8,40±0.02	9,80±0.04	5,20±0.02	0,00±0.00
Z19S	0,00±0.00	7,60±0.04	7,80±0.01	4,20±0.02	0,00±0.00
Z20S	0,00±0.00	8,00±0.01	8,60±0.02	3,60±0.02	0,00±0.00
Z21S	0,00±0.00	7,80±0.04	10,20±0.04	5,40±0.02	0,00±0.00
Ortalama Değer (\bar{X})	5,60	8,84	9,18	4,79	4,60



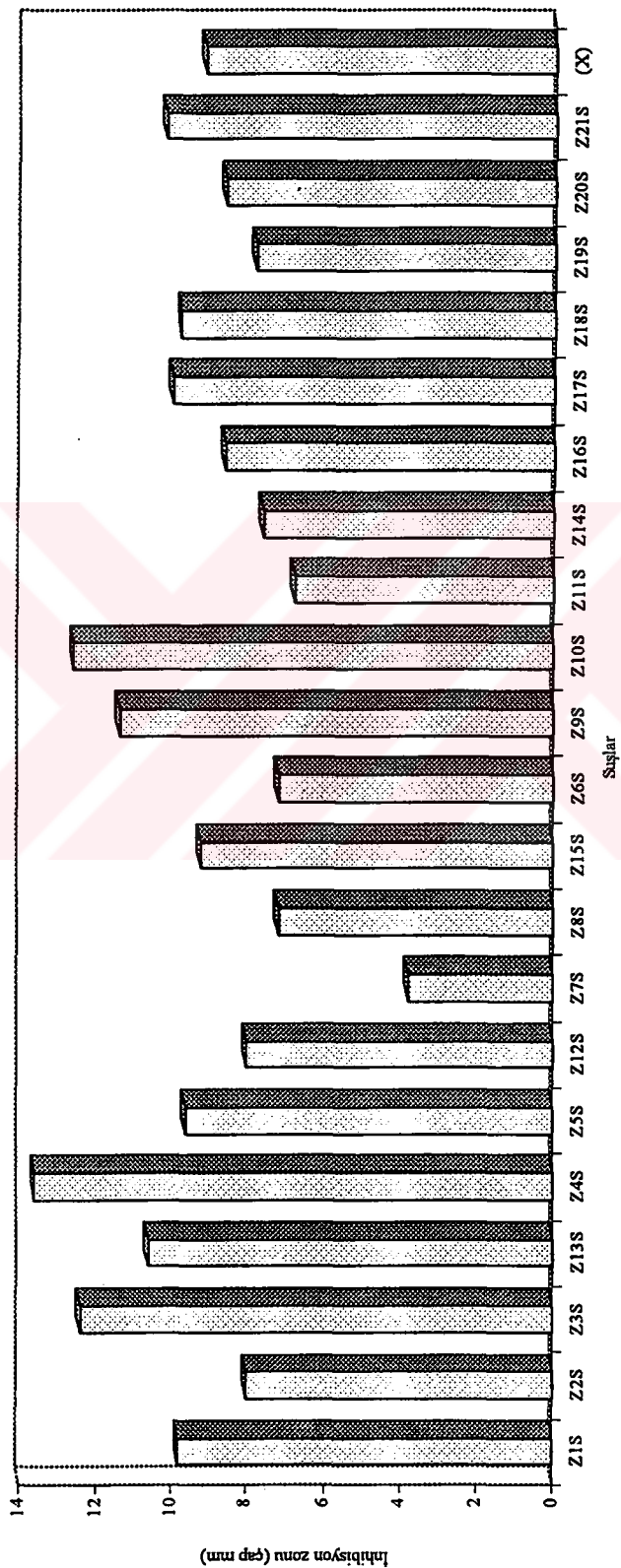
Şekil 4.21. İnhibisyon gösteren *Streptococcus* suşlarının *E. coli* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun histogramı



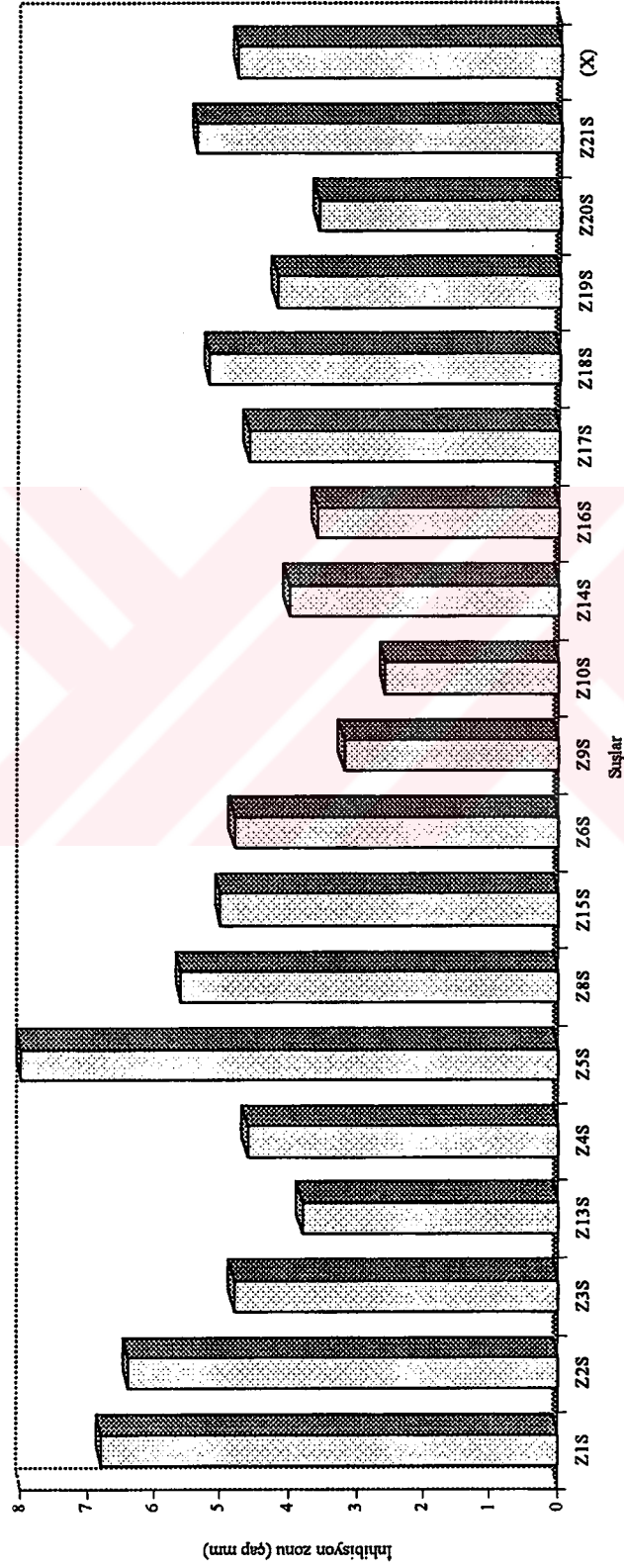
Şekil 4.22. İnhibisyon gösteren *Streptococcus* suşlarının *P.areroginosa* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun histogramı



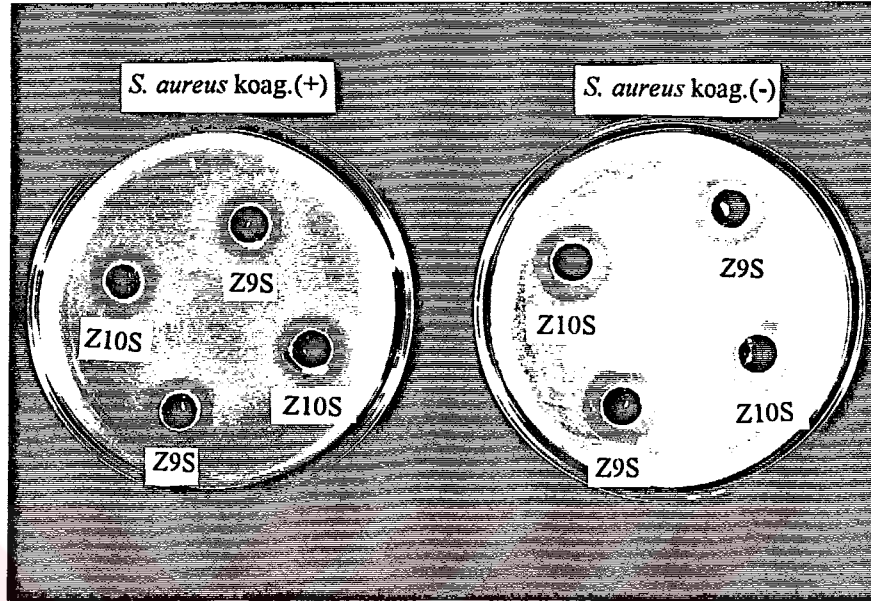
Şekil 4.23. *Streptococcus* suşlarının *S. aureus* koag.(+) üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun histogramı



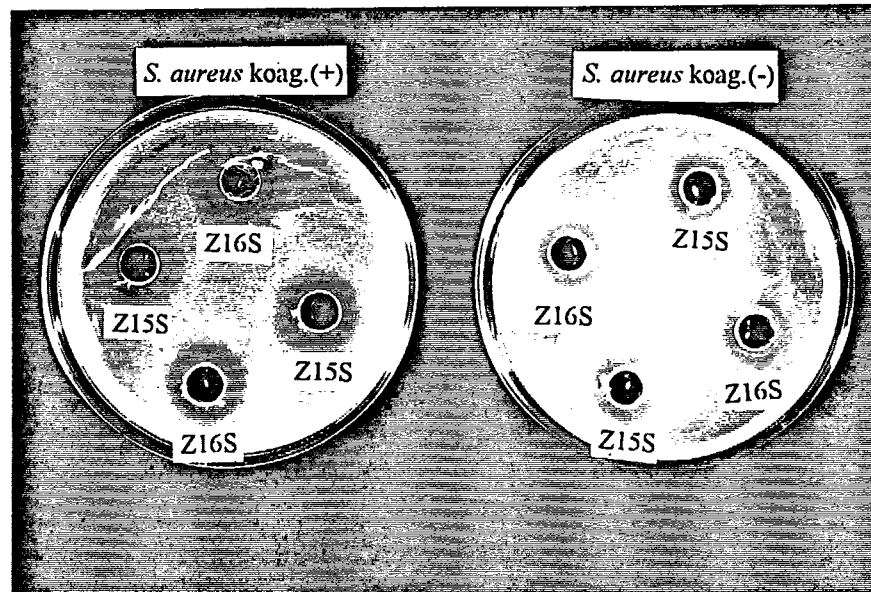
Şekil 4.24. *Streptococcus* suşlarının *S. aureus* koag. (-) üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun histogramı



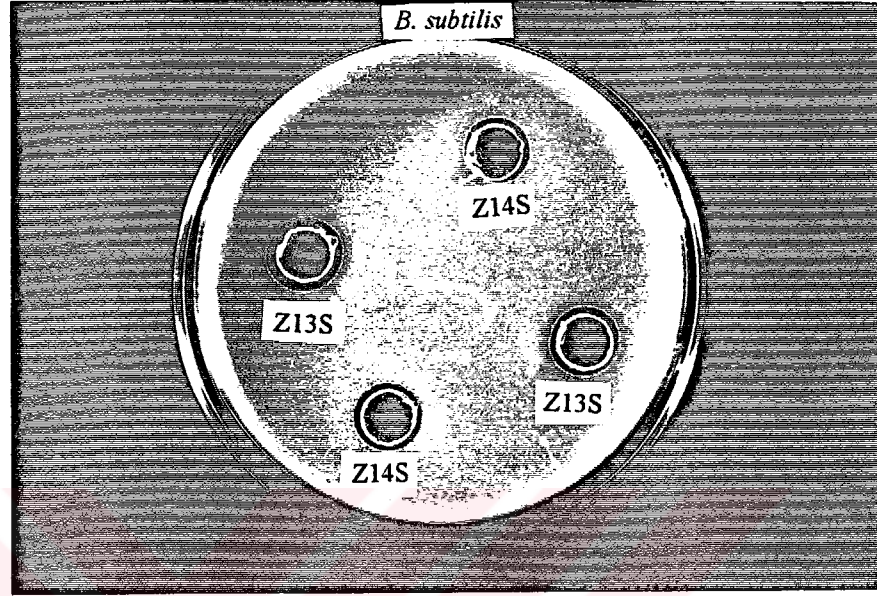
Şekil 4.25. İnhibisyon gösteren *Streptococcus* suşlarının *B. subtilis* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun histogramı



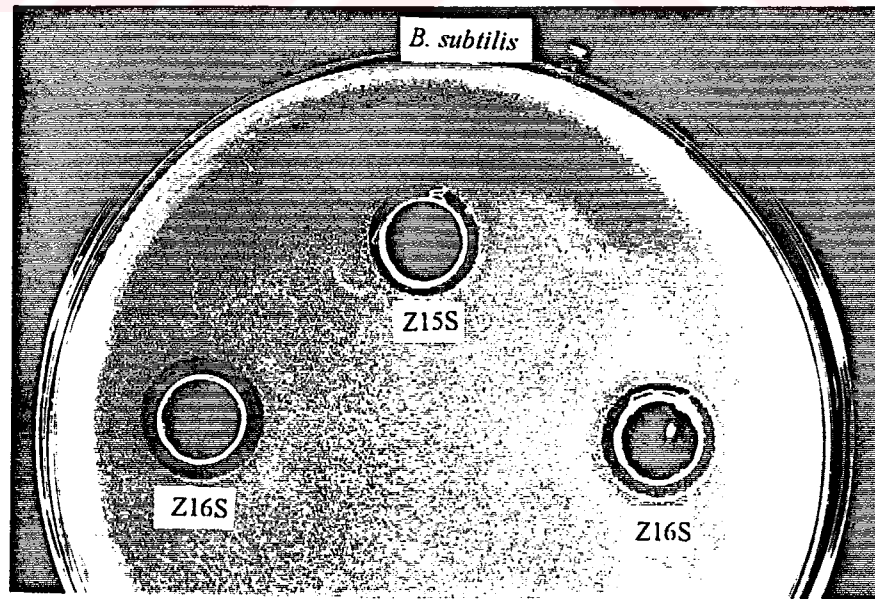
Şekil 4.26. *S. aureus* koag.(+) ve *S. aureus* koag.(-) üzerine *S. cremoris* Z9S ve Z10S suşlarının oluşturduğu inhibisyon zonu



Şekil 4.27. *S. aureus* koag.(+) ve *S. aureus* koag.(-) üzerine *S. durans* Z15S ve *S. cremoris* Z16S suşlarının oluşturduğu inhibisyon zonu



Şekil 4.28. *B. subtilis* üzerine *S. lactis* Z13S ve *S. cremoris* Z14S suşlarının oluşturduğu inhibisyon zonu



Şekil 4.29. *B. subtilis* üzerine *S. durans* Z15S ve *B. cremoris* Z16S suşlarının oluşturduğu inhibisyon zonu

4.8. *Streptococcus*'ların Bakteriosin ve/veya Bakteriosin Benzeri Madde Üretimleri

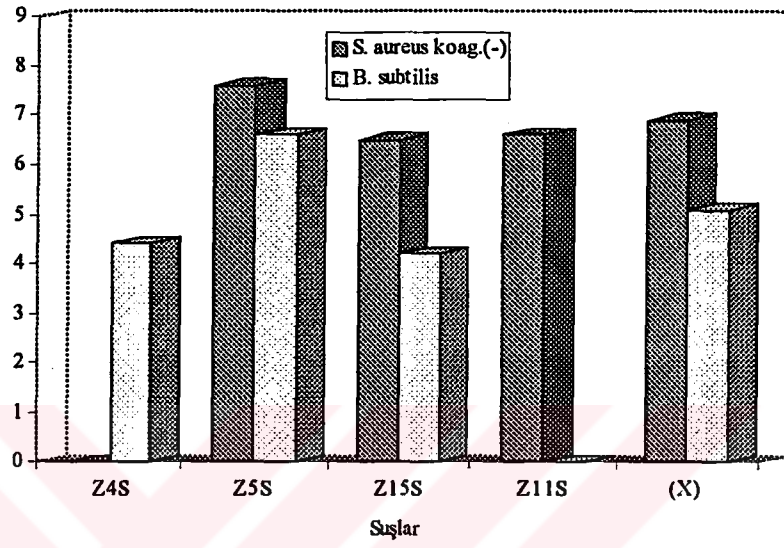
Streptococcus suşlarının bakteriosin inhibisyon etkilerine *E. coli*, *S. aureus* koag.(+), *S. aureus* koag.-), *B. subtilis*, *P. aeruginosa* üzerinde bakılmıştır. Suşların, *E. coli*, *S. aureus* koag.(+) ve *P. aeruginosa* üzerinde bakteriosin inhibisyon etkisi göstermediği tespit edilmiştir. *S. thermophilus* Z5S (7,60 mm), *S. durans* Z15S (6,50 mm) ve *S. cremoris* Z11S (6,60 mm) suşlarının *S. aureus* koag.-) üzerinde bakteriosin inhibisyon etkisi gösterdiği, diğer suşların göstermediği belirlenmiştir. *B. subtilis* üzerinde *S. thermophilus* Z4S (4,40 mm), Z5S (6,60 mm) ve *S. durans* Z15S (4,20 mm) bakteriosin inhibisyon etkisi gösterdiği, diğer suşların göstermediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.30).

4.9. *Streptococcus*'ların PHB Üretimi

Streptococcus suşlarından *S. lactis* Z13S, *S. thermophilus* Z12S, *S. cremoris* Z6S, Z10S, Z11S, Z18S, Z19S suşlarının PHB üretmedikleri tespit edilmiştir. PHB üretimleri tespit edilen *Streptococcus* suşlarından maksimum seviyede verimi *S. durans* Z7S (%13,69), minimum seviyede verimi *S. cremoris* Z20S (%0,61) suşlarının gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.31).

Çizelge 4.12. *Streptococcus* suşlarının test bakterileri üzerinde oluşturduğu bakteriosin zon çap değerleri

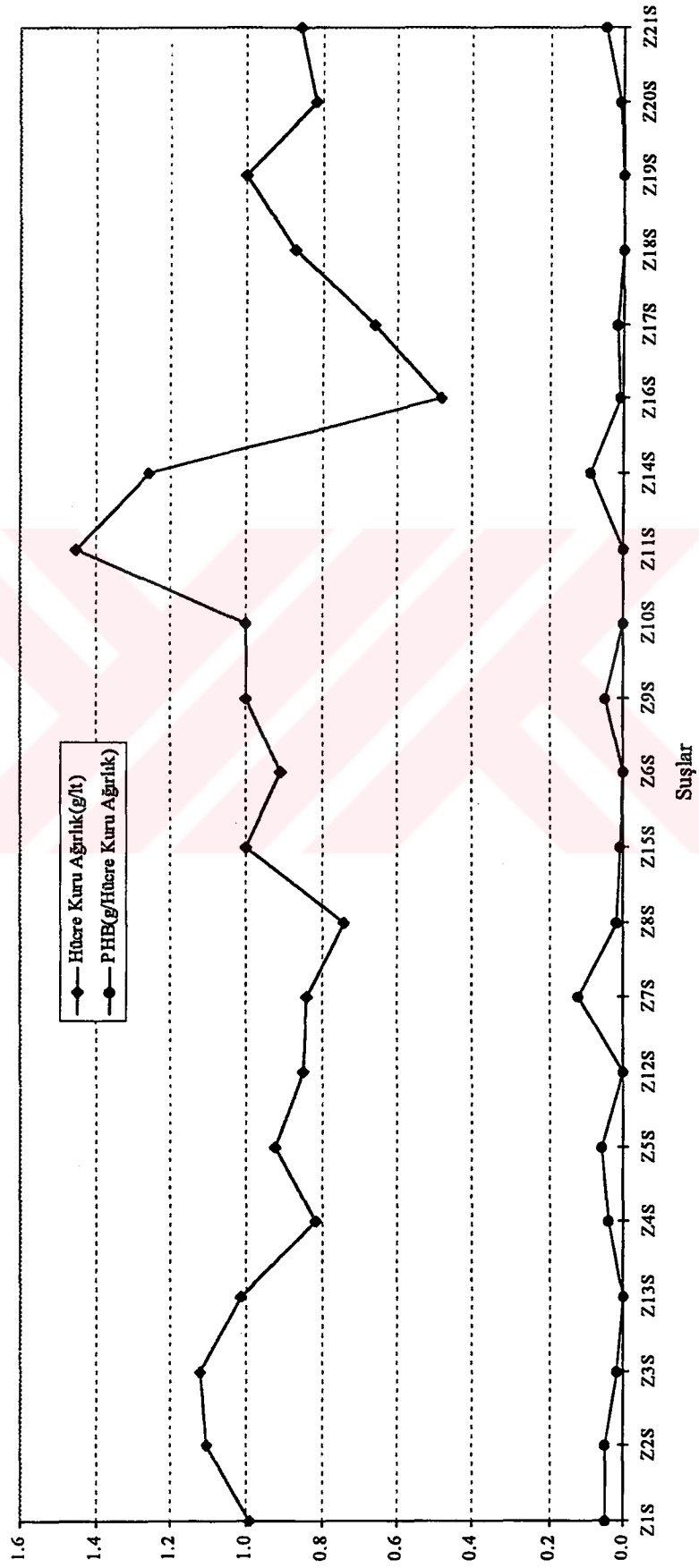
	ZON ÇAPLARI (mm)				
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i> koag(+)	<i>S. aureus</i> koag(-)	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Z1S	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z2S	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z3S	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z13S	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z4S	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	4,40±0.01	0,00±0.00
Z5S	0,00±0.00	0,00±0.00	7,60±0.01	6,60±0.02	0,00±0.00
Z12S	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z7S	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z8S	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z15S	0,00±0.00	0,00±0.00	6,50±0.01	4,20±0.03	0,00±0.00
Z6S	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z9S	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z10S	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z11S	0,00±0.00	0,00±0.00	6,60±0.01	0,00±0.00	0,00±0.00
Z14S	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z16S	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z17S	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z18S	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z19S	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z20S	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Z21S	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
Ortalama Değer (\bar{X})	0,00	0,00	6,90	5,07	0,00



Şekil 4.30. *Streptococcus* suşlarının *S. aureus* koag.(-) ve *B.subtilis* üzerinde oluşturduğu bakteriosin inhibisyon zonunun histogramı

Çizelge 4.13. *Streptococcus* suşlarının PHB üretimleri

Suş No	Hücre Kuru Ağırlık (g/lt)	PHB (g/Hücre Kuru Ağırlık)	PHB (% Verim)
Z1S	0,99 ± 0,03	0,05±0,01	4,54
Z2S	1,10 ± 0,02	0,05±0,01	4,09
Z3S	1,12 ± 0,04	0,02±0,01	1,79
Z13S	1,01 ± 0,03	0,00±0,00	0,00
Z4S	0,82 ± 0,02	0,04±0,00	4,88
Z5S	0,92 ± 0,00	0,06±0,01	6,52
Z12S	0,85 ± 0,05	0,00±0,00	0,00
Z7S	0,84 ± 0,00	0,12±0,02	13,69
Z8S	0,74 ± 0,06	0,02±0,01	3,24
Z15S	1,00 ± 0,02	0,01±0,01	1,20
Z6S	0,91 ± 0,00	0,00±0,00	0,00
Z9S	1,00 ± 0,04	0,05±0,01	4,50
Z10S	1,00 ± 0,00	0,00±0,00	0,00
Z11S	1,45 ± 0,03	0,00±0,00	0,00
Z14S	1,26 ± 0,12	0,09±0,01	6,75
Z16S	0,48 ± 0,08	0,01±0,001	1,25
Z17S	0,66 ± 0,02	0,02±0,01	2,88
Z18S	0,87 ± 0,05	0,00±0,00	0,00
Z19S	1,00 ± 0,06	0,00±0,00	0,00
Z20S	0,82 ± 0,00	0,01±0,003	0,61
Z21S	0,86 ± 0,02	0,05±0,01	5,23



Şekil 4.3.1. *Streptococcus* suşlarının kuru hücre ağırlığı ve PHB üretimleri

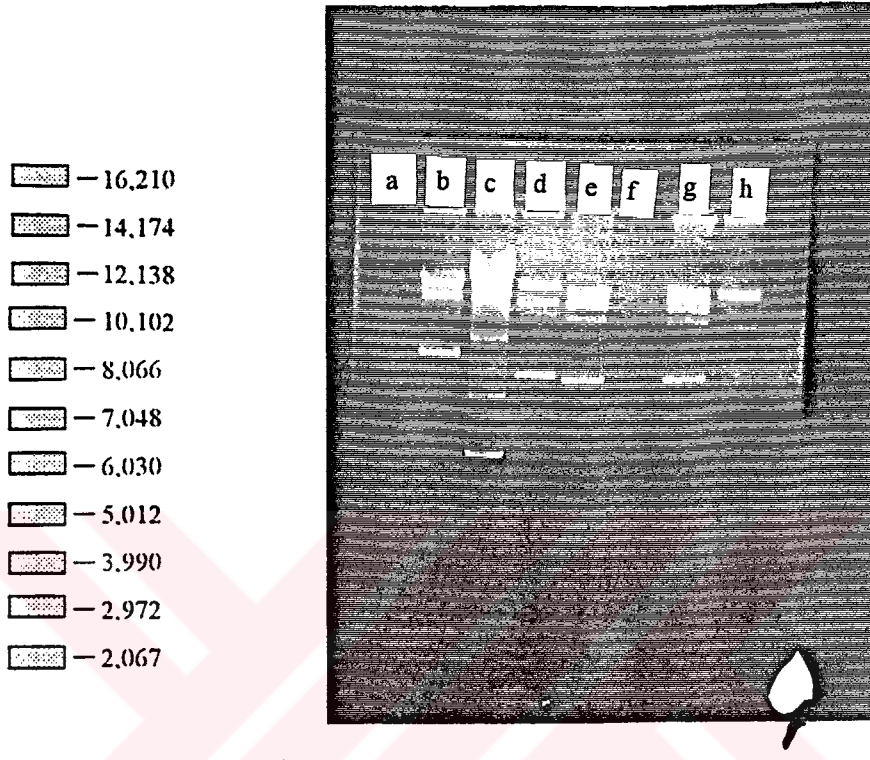
4.10. Plasmid DNA

O'svillivian ve Klaenhammer'in (1993) metoduna göre, plasmid profilleri çıkarılan *Lactobacillus* suşlarından *L. casei* Z4L, *L. bulgaricus* Z8L suşlarında plasmid DNA belirlenememiştir. Plasmid profilleri çıkarılan diğer *Lactobacillus* suşlarından *L. acidophilus* Z1L suşunda ve *L. casei* Z3L suşunda 3 plasmid, *L. brevis* Z13L suşunda 5 plasmid belirlenmiştir.

Plasmid profilleri çıkarılan *Streptococcus* suşlarından *S. thermophilus* Z5S, *S. cremoris* Z6S ve Z10S suşlarında plasmid DNA tespit edilememiştir. *S. lactis* Z1S suşunda 4 plasmid, *S. lactis* Z3S suşunda 2 plasmid ve *S. durans* Z15S suşunda 5 plasmid belirlenmiştir.

Çizelge 4.14. Bazı *Lactobacillus* ve *Streptococcus* suşlarının plasmid DNA profil ve moleküler ağırlıkları

Suşlar	Plasmid Profil Sayısı	Moleküler Ağırlık
<i>L. acidophilus</i> Z1L	3	13,42 - 7,02 - 3,58
<i>L. casei</i> Z3L	3	25,42 - 21,34 - 11,47
<i>L. brevis</i> Z13L	5	34,23 - 25,42 - 20,42 - 9,13 - 2,59
<i>S. lactis</i> Z1S	4	23,70 - 20,61 - 17,15 - 8,67
<i>S. lactis</i> Z3S	2	23,49 - 16,41
<i>S. durans</i> Z15S	5	21,89 - 18,39 - 17,29 - 8,89 - 4,42



Şekil 4.32. Bazı *Lactobacillus* ve *Streptococcus* suşlarının plasmid DNA profilleri

- | | |
|------------------------------|----------------------------|
| a. Marker | c. <i>S. lactis</i> Z1S |
| b. <i>L. casei</i> Z3L | f. <i>S. cremoris</i> Z10S |
| c. <i>L. acidophilus</i> Z1L | g. <i>S. durans</i> Z15S |
| d. <i>L. brevis</i> Z13L | h. <i>S. lactis</i> Z3S |

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda, kefirde izole ettiğimiz *Lactobacillus* ve *Streptococcus* türleri, diğer araştırmacıların bulguları ile benzerlik göstermiştir.

Angula ve arkadaşları (1993), yaptıkları çalışmada kefir tanelerinde *Lactobacillus casei* subsp. *tolerans*, *L. casei* subsp. *pseudoplantarum*, *L. casei* subsp. *rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. brevis* ve *L. kefir* türlerinin bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Lee ve Kim (1986), kefirde *Streptococ*, *Leuconostoc*, *Lactobacil* ve maya türleri izole etmişlerdir.

Ergüllü ve Üçüncü (1983), kefir mikroflorası üzerine yapmış oldukları araştırmada *Streptococ*, *Leuconostoc*, *Lactobacil* cinslerini tespit etmişler ve kefir örneklerinde *Staphylococ*, *Micrococ*, *Pseudomonas*, *Clostridium* ve *Bacillus* gibi bakterilere rastlanmadığını bildirmişlerdir.

Çizelge 4.7, Şekil 4.3'de tanımlanan *Lactobacillus* suşlarının yüzde laktik asit üretim miktarları %0,17-1,14 arasında bulunmuş, ortalama %0,54 olarak hesaplanmıştır.

L. helveticus suşlarından Z2L suşu %0,46, Z5L suşu %0,65 oranında laktik asit üretmişlerdir. *L. casei* suşları arasında Z4L ve Z7L suşları en düşük seviyede (%0,65) laktik asit ürettiği gözlenirken, Z6L suşu en yüksek oranda (%0,80) laktik asit üretmiştir. *L. bulgaricus* suşlarından Z14L suşu en düşük oranda (%0,17), Z8L suşu en yüksek oranda (%0,49) laktik asit üretmişlerdir. *L. lactis* suşları arasında Z17L suşunun en düşük (%0,23), Z21L suşunun en yüksek (%1,14) oranda laktik asit ürettiği gözlenmiştir. *L. plantarum* suşları arasında Z15L en düşük oranda (%0,17), Z11L suşu en yüksek (%0,64) oranda, 2 adet olan *L. brevis* suşlarından Z20L en

düşük oranda (%0,22), Z13L en yüksek (%1,04), *L. acidophilus* Z1L suşu ise %0,48 oranında laktik asit üretmişlerdir. Sonuçlara göre, *L. lactis* Z21L ve *L. brevis* Z13L suşları, diğer suşlara kıyasla en yüksek miktarda laktik asit oluşturmuşlardır.

Çizelge 4.10, Şekil 4.17'de tanımlanmış *Streptococcus* suşlarının % laktik asit üretim miktarları %0,23-0,99 arasında bulunmuş, ortalama %0,63 olarak hesaplanmıştır.

S. lactis suşları arasında Z3S suşunun en düşük (%0,49), Z1S suşunun en yüksek (%0,92) oranda, *S. thermophilus* suşları arasında Z4S suşu en düşük (%0,39), Z5S suşu en yüksek (%0,85) oranda, *S. durans* suşları arasında Z7S suşu en düşük (%0,23), Z15S suşu en yüksek (%0,61) oranda, *S. cremoris* suşları arasında Z18S suşu en düşük (%0,47), Z20S suşu en yüksek (%0,99) oranda laktik asit üretmişlerdir. Sonuçlara göre, *S. cremoris* Z20S, *S. lactis* Z1S, *S. thermophilus* Z5S, *S. durans* Z15S suşları diğer suşlara kıyasla daha yüksek laktik asit üretmişlerdir.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlardan, *Lactobacillus* ve *Streptococcus* tür ve suşlarının laktik asit üretimlerinin farklı olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar diğer araştırmacıların sonuçları ile desteklenmiştir (Beyatlı ve Tunail, 1982; Aslım, 1994; Tulumoğlu, 1996; Toksoy, 1996; İlyaslı, 1997). Tulumoğlu (1996), araştırmasında *L. bulgaricus* suşlarının %0,36-1,36, *L. lactis* suşlarının %0,72-1,44 arasında laktik asit ürettiğini saptamıştır. İlyaslı (1997), araştırmasında *L. hilgardii* suşlarının %0,02-0,08, *L. cellobiosus* suşlarının %0,08-0,09 oranında laktik asit ürettiğini belirlemiştir.

İzole ve teşhis ettiğimiz bakterilerin laktik asit üretimine bakıldığında *Lactobacillus* suşlarının laktik asit üretimi, *Streptococcus* suşlarına göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Benzer sonuçlara, yapılan diğer çalışmalarda da rastlamak mümkündür. Aslım (1994) ve Beyatlı ve Tunail (1982), izole ettikleri *Lactobacillus bulgaricus*

suşlarının *Streptococcus thermophilus* suşlarından daha yüksek laktik asit üretimine sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Birçok araştırmacı, laktik asit bakterilerinin, değişik konsantrasyonlarda hidrojen peroksit ürettiklerini bildirmiştir (Dahiya and Speck, 1968).

İdentifiye edilen *Lactobacillus* suşlarının hidrojen peroksit üretim miktarları 0,04-0,19 µg/ml arasında bulunmuş, ortalama 0,09 µg/ml olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.7, Şekil 4.4).

L. acidophilus Z1L suşu 0,04 µg/ml, *L. helveticus* (Z2L, Z5L) suşları 0,13 µg/ml, *L. casei* (Z3L, Z4L, Z6L, Z7L) suşları 0,09-0,15 µg/ml arasında, *L. bulgaricus* (Z8L, Z14L, Z18L) suşları 0,08 µg/ml, *L. lactis* (Z9L, Z10L, Z16L, Z17L, Z19L, Z21L) suşları 0,05-0,15 µg/ml arasında, *L. plantarum* (Z11L, Z12L, Z15L) suşları 0,07-0,11 µg/ml arasında, *L. brevis* (Z13L, Z20L) suşları 0,19-0,04 µg/ml hidrojen peroksit ürettikleri tespit edilmiştir.

Streptococcus suşlarının hidrojen peroksit üretim miktarları 0,01-0,17 µg/ml arasında bulunmuş, ortalama 0,08 µg/ml olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.18).

Streptococcus suşlarından *S. lactis* Z13S, *S. durans* Z7S, Z8S, Z15S ve *S. cremoris* Z9S, Z16S, Z17S, Z19S, Z20S, Z21S suşlarının hidrojen peroksit üretmedikleri tespit edilirken, diğer *Streptococcus* suşlarında 0,01-0,17 µg/ml arasında değişen hidrojen peroksit üretimi belirlenmiştir. En fazla hidrojen peroksit, *S. lactis* Z1S (0,17 µg/ml), Z2S (0,16 µg/ml), Z3S (0,13 µg/ml), *S. thermophilus* Z4S (0,13 µg/ml) suşlarının sahip olduğu, minimum zon çapında hidrojen peroksit üretimine de *S. thermophilus* Z5S (0,01 µg/ml), *S. cremoris* Z18S, Z14S ve Z6S (0,03 µg/ml) suşlarının sahip olduğu belirlenmiştir.

Araştırmada, bazı istisnalar hariç, yüksek miktarda laktik asit oluşturan bir suşun hidrojen peroksit üretimi az bulunmuştur. Örneğin; hidrojen peroksit üretimi 0,15 µg/ml gibi yüksek olan *L. casei* Z3L suşunda, laktik asit üretiminin (%0,75) yüksek olduğu gözlenmiştir. Aynı durum *S. lactis* Z1S suşunda da görülmüştür. Hidrojen peroksit üretimi yüksek olan Z1S suşu (0,17 µg/ml), yüksek laktik asit üretimine (%0,92) sahiptir. *S. lactis* Z13S, *S. durans* Z8S, Z15S, *S. cremoris* Z9S, Z16S, Z17S, Z19S, Z20S, Z21S suşlarında hidrojen peroksit üretimi gözlenmezken, bu suşların yüksek laktik asite sahip oldukları belirlenmiştir.

Ayrıca, yaptığımız çalışmada *Lactobacillus* suşlarının , *Streptococcus* suşlarından daha yüksek hidrojen peroksit ürettiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7, Şekil 4.4. ve Çizelge 4.10, Şekil 4.18'de *Lactobacillus* ve *Streptococcus* tür ve suşlarının hidrojen peroksit üretimlerinin farklı olduğu görülmektedir. Bu durum Toksoy (1993), Tulumoğlu (1996), İlyaslı (1997) çalışmaları ile desteklenmiştir. Tulumoğlu (1996), Silivri yoğurtlarından izole ettiği *L. bulgaricus* suşlarının 7,18-8,88 µg/ml, *L. lactis* suşlarının 1,50-4,94 µg/ml arasında hidrojen peroksit ürettiğini belirlemiştir. Toksoy (1993), sucuk ve sosis örneklerinden izole ettiği *L. plantarum* suşlarının 1,80-3,45 µg/ml arasında hidrojen peroksit ürettiğini saptamıştır. İlyaslı (1997), İstavrit (*Trachurus trachurus*) balığından izole ettiği *Lactobacillus* türlerinin 1,74-4,46 µg/ml hidrojen peroksit ürettiğini tespit etmiştir.

Laktik asit bakterilerinin farklı miktarlarda hidrojen peroksit üretmelerinin nedeni, bu bakterilerin oksijen oksidoredüktaz aktivitelerinin farklı olmasından ileri geldiği bildirilmiştir (Reinheimer et al., 1990).

Araştırmada kullanılan *Lactobacillus* suşlarından *L. helveticus* Z2L, Z5L, *L. casei* Z3L, Z4L, Z6L, Z7L, *L. bulgaricus* Z8L, *L. lactis* Z9L suşlarının hidrojen sülfür

üretmedikleri tespit edilmiştir. *L. acidophilus* Z1L, *L. bulgaricus* Z14L, Z18L, *L. lactis* Z16L, Z17L, *L. plantarum* Z11L, Z12L, Z15L ve *L. brevis* Z13L, Z20L suşlarının hidrojen sülfür üretimi orta derecede olarak tespit edilirken, *L. lactis* Z10L, Z19L, Z21L suşlarının hidrojen sülfür üretimleri zayıf olarak bulunmuştur (Çizelge 4.7).

S. lactis Z1S, Z3S, *S. thermophilus* Z4S, Z12S, *S. durans* Z7S, Z8S, *S. cremoris* Z9S, Z10S, Z11S suşlarının hidrojen sülfür üretmedikleri, *S. lactis* Z2S, Z13S, *S. thermophilus* Z5S, *S. durans* Z15S, *S. cremoris* Z6S, Z14S, Z16S, Z17S, Z18S, Z19S, Z20S, Z21S suşlarının ise hidrojen sülfür üretimleri zayıf olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.10).

Hanna ve arkadaşları (1983), bazı *L. plantarum* suşlarının hidrojen sülfür oluşturduklarını bildirmişlerdir. Sharpe ve Franklin (1962), bazı laktik asit bakterilerinin hidrojen sülfür oluşturmadıklarını ve bunların sülfid redüktaz ve sistein desulfohidraz enzimlerinden yoksun olduklarını bildirmişlerdir. İlyaslı (1997), *L. hilgardii*, *L. confusus*, *L. fermentum*, *L. cellobiosus* ve *L. fructivorans* bakterilerinin tür ve suşlarının hidrojen sülfür üretmediğini tespit etmiştir. Toksoy (1993), *Lactobacillus* ve *Streptococcus* suşlarından bazılarının değişik oranlarda H₂S ürettiğini bildirmiştir.

Lactobacillus suşlarından *L. bulgaricus* Z14L suşunda proteolitik aktivite tespit edilmezken, *L. acidophilus* Z1L suşu 0,14 mg tirozin/ml, *L. helveticus* (Z2L, Z5L) suşları 0,06 mg tirozin/ml, *L. casei* (Z3L, Z4L, Z6L, Z7L) suşları 2,64-3,26 mg tirozin/ml arasında, *L. bulgaricus* (Z8L, Z18L) suşları 0,07-0,11 mg tirozin/ml, *L. lactis* (Z9L, Z10L, Z16L, Z17L, Z19L, Z21L) suşları 2,20-3,34 mg tirozin/ml arasında proteolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7, Şekil 4.6).

Streptococcus suşlarından *S. lactis* Z2S, Z3S, *S. thermophilus* Z5S, Z12S, *S. durans* Z7S, Z8S, *S. cremoris* Z14S, Z16S suşlarında proteolitik aktivite tespit edilememiştir. *S. lactis* (Z1S, Z13S) suşları 0,03-0,05 mg tirosin/ml, *S. thermophilus* Z4S suşu 0,02 mg tirosin/ml, *S. durans* Z15S suşu 0,07 mg tirosin/ml, *S. cremoris* (Z6S, Z9S, Z10S, Z11S, Z17S, Z18S, Z19S, Z20S, Z21S) suşları 0,01-0,09 mg tirosin/ml arasında proteolitik aktivite gösterdikleri saptanmıştır (Çizelge 4.10, Şekil 4.19).

Bazı araştırmacılar, yaptıkları çalışmalarda laktik asit üretimi yüksek olan suşların aynı zamanda proteolitik aktivite değerlerinin de yüksek, laktik asit üretimi düşük suşların proteolitik aktivitelerinin de düşük olduğunu göstermişlerdir (Sezgin vd., 1987; Beyatlı ve Tunail, 1982).

Araştırmamızda ise, bakterilerin laktik asit üretimi ile proteolitik aktivite arasında bir bağlantının olmadığı gözlenmiştir. Örneğin; *S. thermophilus* Z5S suşunun laktik asit üretme yeteneği yüksek iken, proteolitik aktivite göstermemiştir. *S. cremoris* Z20S suşu maksimum seviyede proteolitik aktivite (0,09 mg tirosin/ml) ve maksimum seviyede laktik asit (%0,99) üretimi göstermiştir.

Benzer sonuçlar, Aslım (1994) ve İlyaslı (1997) çalışmalarında da saptanmıştır. Aslım (1994), *L. bulgaricus* X1L suşunun 8,23 mg/ml laktik asit üretirken, 0,18 mg/ml tirosin ürettiğini, ŞX9L, X10L ve Y10L suşlarının proteolitik aktivitelerinin yüksek olduğunu, buna karşılık laktik asit üretimlerinin değişiklik gösterdiğini bildirmiştir. İlyaslı (1997), *L. hilgardii* F15L suşunun laktik asit üretiminin yüksek iken proteolitik aktivitesinin düşük olduğunu, *L. hilgardii* F19L suşunun 0,13 mg tirosin/ml gibi yüksek bir proteolitik aktiviteye sahipken, laktik asit üretiminin düşük (%0,05) olduğunu belirtmiştir.

Rajagopal ve Sandine (1990), *L. bulgaricus* suşlarının proteolitik aktivitesini 61-144 µg tirosin/ml, *S. thermophilus* suşlarının proteolitik aktivitesini de 2,4-14,8 µg tirosin/ml olarak tespit etmişlerdir.

Beyatlı ve Tunail (1982), *L. bulgaricus* suşlarının proteolitik aktivitelerini 0,13-0,79 µg tirosin/5 ml arasında belirlemişlerdir.

Laktik asit bakterilerinin proteolitik aktiviteleri önemlidir. Bir ihtimal, yüksek proteolitik aktivite gösteren *Lactobacillus* ve *Streptococcus* türlerinin proteinleri parçalaması sonucu bazı amino asitler ile diğer bazı maddeler oluşabilir, bu maddelerin oluşumu ile arzu edilmeyen tat ve koku meydana gelebilir.

Çeşitli fermente süt ürünlerindeki aroma maddesinin oluşumunda diasetilin katkısı olduğu bilinmekte ve özellikle tereyağı, krema ve peynir yapımında yeterli miktarda diasetilin olması istenmektedir (Karahan, 1992; Aslım, 1994).

Lactobacillus suşlarının diasetil üretimi çalışılmamıştır. 21 *Streptococcus* suşunun hiç birinin de diasetil üretmediği tespit edilmiştir.

Lactobacillus ve *Streptococcus* suşlarının asetaldehit üretimleri de tespit edilmiştir. Buna göre *Lactobacillus* suşlarının 0,88-4,40 µg/ml arasında, *Streptococcus* suşlarının 0,18-3,96 µg/ml arasında asetaldehit ürettiği saptanmıştır. Bazı yüksek asetaldehit üretimine sahip suşların, laktik asit üretimi ve proteolitik aktivitelerinin de yüksek olduğu belirlenmiştir (*L. casei* Z3L, Z4L, Z6L, Z7L, *L. lactis* Z9L, Z10L, *S. lactis* Z1S, *S. durans* Z15S, *S. cremoris* Z20S). Bazı suşların asetaldehit ve laktik asit üretimleri de düşük bulunmuştur (*L. acidophilus* Z1L, *L. bulgaricus* Z14L, Z18L, *L. lactis* Z16L, *L. brevis* Z20L, *S. lactis* Z2S, Z3S, *S. cremoris* Z18S).

Yapılan çeşitli araştırmalarda, süt ürünlerinin tat oluşumunda asetaldehit üretiminin önemli rol oynadığı, asetaldehit üretim miktarının tür ve suşlara göre farklılık gösterdiği ve *Streptococcus* bakterilerinden daha çok *Lactobacillus* bakterilerinin asetaldehit ürettiği sonucuna varılmıştır (Hamdan et. al., 1971; Manca de Nadra et. al., 1988; Zaurari and Desmazeaud, 1991; Tekinşen ve Atasever, 1994).

Çalışmada, izole edilen *Lactobacillus* ve *Streptococcus* 'ların bazı test bakterileri üzerindeki inhibisyon etkileri de araştırılmıştır. Kültürlerin bazıları test bakterileri üzerinde değişik oranlarda inhibisyon etki gösterdiği tespit edilmiştir.

L. casei Z3L (7,00 mm), Z4L (7,40 mm), Z7L (4,80 mm), *L. bulgaricus* Z8L (6,20 mm), *L. lactis* Z21L (5,20 mm) suşları *E. coli* üzerinde antimikrobiyal etki gösterirken, diğer *Lactobacillus* suşlarının (*L. acidophilus* Z1L, *L. helveticus* Z2L, Z5L, *L. casei* Z6L, *L. bulgaricus* Z14L, Z18L, *L. lactis* Z9L, Z10L, Z16L, Z17L, Z19L, *L. plantarum* Z11L, Z12L, Z15L, *L. brevis* Z13L, Z20L) *E. coli* üzerinde antimikrobiyal etki göstermediği tespit edilmiştir.

L. bulgaricus Z14L, *L. lactis* Z16L, Z19L, *L. plantarum* Z11L, Z12L, Z15L, *L. brevis* Z13L, Z20L suşları *S. aureus* koag (+) üzerinde antimikrobiyal etki göstermemiştir. *L. acidophilus* Z1L suşu 10,60 mm, *L. helveticus* Z2L, Z5L suşları 10,40-8,40 mm, *L. casei* Z3L, Z4L, Z6L, Z7L suşları 8,20-10,20 mm arasında, *L. bulgaricus* Z8L, Z18L suşları 10,40-8,00 mm, *L. lactis* Z10L, Z17L, Z21L suşları 4,00-7,40 mm arasında *S. aureus* koag (+) üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir.

S. aureus koag (+) üzerinde *L. casei* Z4L suşu maksimum (12,00 mm) zon çapında, *L. lactis* Z21L suşu minimum (5,60 mm) zon çapında antimikrobiyal etki göstermiştir.

B. subtilis üzerinde *L. helveticus* Z2L (3,80 mm), *L. casei* Z4L (5,00 mm), *L. bulgaricus* Z18L (4,20 mm) suşlarının antimikrobiyal etki gösterdiği, diğer

Lactobacillus suşlarının (*L. acidophilus* Z1L, *L. helveticus* Z5L, *L. casei* Z3L, Z6L, Z7L, *L. bulgaricus* Z8L, Z14L, *L. lactis* Z9L, Z10L, Z16L, Z17L, Z19L, Z21L, *L. plantarum* Z11L, Z12L, Z15L, *L. brevis* Z13L, Z20L) antimikrobiyal etki göstermediği tespit edilmiştir.

L. helveticus Z2L (8,80 mm), Z5L (6,20 mm), *L. casei* Z3L (7,40 mm), Z4L (6,40 mm), Z6L (6,20 mm), *L. bulgaricus* Z18L (11,00 mm) suşlarının *P. aeruginosa* üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği, diğer *Lactobacillus* suşlarının (*L. acidophilus* Z1L, *L. casei* Z7L, *L. bulgaricus* Z8L, Z14L, *L. lactis* Z9L, Z10L, Z16L, Z17L, Z19L, Z21L, *L. plantarum* Z11L, Z12L, Z15L, *L. brevis* Z13L, Z20L) ise antimikrobiyal etki göstermediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.8 - Şekil 4.12).

Streptococcus suşlarından *S. thermophilus* Z5S suşu 6,40 mm çapında ve *S. cremoris* Z6S suşu 4,80 mm çapında *E. coli* 'ye karşı inhibisyon zonu tespit edilirken, diğer suşlar (*S. lactis* Z1S, Z2S, Z3S, Z13S, *S. thermophilus* Z4S, Z12S, *S. durans* Z7S, Z8S, Z15S, *S. cremoris* Z9S, Z10S, Z11S, Z14S, Z16S, Z17S, Z18S, Z19S, Z20S, Z21S) inhibisyon zonu oluşturmamıştır.

Streptococcus suşlarının tümü *S. aureus* koag (+) ve *S. aureus* koag (-) üzerinde inhibisyon zonu göstermiştir.

S. lactis (Z1S, Z2S, Z3S, Z13S) suşları 8,00-11,20 mm arasında, *S. thermophilus* (Z4S, Z5S, Z12S) suşları 7,80-11,60 mm arasında, *S. durans* (Z7S, Z8S, Z15S) suşları 5,40-11,20 mm arasında, *S. cremoris* (Z6S, Z9S, Z10S, Z11S, Z14S, Z16S, Z17S, Z18S, Z19S, Z20S, Z21S) suşları 6,40-12,60 mm arasında *S. aureus* koag (+) 'e karşı inhibisyon zonu oluşturmuştur.

S. lactis suşları 8,00-12,40 mm arasında, *S. thermophilus* suşları 8,00-13,60 mm arasında, *S. durans* suşları 3,80-9,20 mm arasında, *S. cremoris* suşları 6,80-12,60 mm arasında *S. aureus* koag (-) 'e karşı inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir.

B. subtilis üzerinde *S. thermophilus* Z12S, *S. durans* Z7S, *S. cremoris* Z11S suşlarının antimikrobiyal etki göstermediği belirlenmiştir. *S. lactis* (Z1S, Z2S, Z3S, Z13S) suşları 3,80-6,80 mm arasında, *S. thermophilus* (Z4S, Z5S) suşları 4,60-8,00 mm, *S. durans* (Z8S, Z15S) suşları 5,60-5,00 mm, *S. cremoris* (Z6S, Z9S, Z10S, Z14S, Z16S, Z17S, Z18S, Z19S, Z20S, Z21S) suşları 2,60-5,40 mm arasında *B. subtilis* 'e karşı inhibisyon zonu göstermiştir.

P. aeruginosa 'ya karşı *S. lactis* Z1S (5,20 mm), Z2S (4,40 mm), *S. thermophilus* Z5S (4,20 mm), *S. cremoris* Z6S (4,60 mm) suşlarının antimikrobiyal etki gösterdiği, diğer suşların (*S. lactis* Z3S, Z13S, *S. thermophilus* Z4S, Z12S, *S. durans* Z7S, Z8S, Z15S, *S. cremoris* Z9S, Z10S, Z11S, Z14S, Z16S, Z17S, Z18S, Z19S, Z20S, Z21S) antimikrobiyal etki göstermediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.11, Şekil 4.21 - Şekil 4.25).

Antimikrobiyal etkinin asit üretimi ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir. Çünkü, bazı suşlarda asit üretimi yüksek olduğundan inhibisyonik etkinin fazla olduğu (*L. casei* Z3L, Z4L, Z6L, *L. lactis* Z9L, *L. bulgaricus* Z8L, *S. lactis* Z1S, *S. thermophilus* Z5S), bazı suşlarda da asit üretimi düşük olduğundan inhibisyon etkisinin de düşük olduğu (*L. acidophilus* Z1L, *L. bulgaricus* Z14L, *L. lactis* Z16L, Z19L, *L. plantarum* Z12L, Z15L, *L. brevis* Z20L, *S. durans* Z7S, *S. cremoris* Z18S) gözlenmiştir.

Genel olarak *Streptococcus* suşlarının, *Lactobacillus* suşlarından daha yüksek antimikrobiyal etkiye sahip oldukları gözlenmiştir. Bu sonucun, *Lactobacillus* suşlarının laktik asit üretiminin düşük olması ile ilgili olabileceği sanılmaktadır.

Bir çok araştırmacı yaptıkları çalışmalarda laktik asit bakterilerinin patojen mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkilerinin olduğunu ve bu etkinin çoğunlukla laktik asit üretimi sonucu oluşan düşük pH 'dan ileri geldiğini bildirmişlerdir (Kılıç, 1990; Rubin and Vaughan, 1979).

Reddy ve arkadaşları (1984), *L. bulgaricus* ve *L. acidophilus* 'un antimikrobiyal etkilerini incelediklerinde *L. bulgaricus* 'un DDS14 suşunun bütün test mikroorganizmalarından yüksek inhibisyon oluşturduğu, *S. aureus* 'da 9-12 mm, *E. coli* 'de de 5-8 mm 'lik inhibisyon zonu meydana getirdiğini tespit etmişlerdir.

Prasad ve Ghoderek (1990), bazı fermente süt ürünlerinden izole ettikleri 250 *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. fermentum* ve *L. acidophilus* suşlarının antimikrobiyal aktivitelerini incelediklerinde 72 suşun antimikrobiyal aktivite göstermediğini, diğer suşların da antimikrobiyal aktivitelerinin farklılık gösterdiğini saptamışlardır.

Çalışmamızda yüksek miktarda hidrojen peroksit oluşturan suşların bir kısmı yüksek inhibisyon etki gösterirken, bir kısmı bu etkiyi göstermemiştir.

Laktik asit bakterilerinin bazı test bakterileri (*E. coli*, *S. aureus* koag (+), *S. aureus* koag (-), *B. subtilis*, *P. aeruginosa*) üzerinde bakteriosin etkisi çalışılmış, *Lactobacillus* suşlarının bakteriosin inhibisyon etkisi göstermediği, *Streptococcus* suşlarında da *S. thermophilus* Z4S (*B. subtilis* üzerinde 4,40 mm), Z5S (*S. aureus* koag (-) üzerinde 6,60 mm), *S. durans* Z15S (*S. aureus* koag (-) üzerinde 6,60 mm, *B. subtilis* üzerinde 4,20 mm), *S. cremoris* Z11S (*S. aureus* koag(-) üzerinde 6,60 mm) suşlarında bakteriosin inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.12, Şekil 4.30).

Çalışmamızda ayrıca, kefirde izole edilen ve identifikasyonu yapılan 42 suşun PHB üretimleri de belirlenmiştir.

Yapılan araştırmalarda, mikroorganizmaların PHB üretimleri, Beta-ketothiolase ve Acetoacetyl-CoA enzimlerinin aktivitesine bağlı olduğu gösterilmiştir. PHB üretmeyen mikroorganizmaların özellikle Acetoacetyl-CoA enziminden yoksun olduğu bildirilmiştir (Rees et. al., 1993).

Lactobacillus türleri arasında en düşük PHB'yi *L. acidophilus* Z1L, *L. helveticus* Z5L, *L. plantarum* Z12L (0,01 g/lt) suşlarının ürettiği belirlenirken, *L. lactis* Z16L (0,23 g/lt) suşunun en yüksek PHB'yi ürettiği belirlenmiştir. Hücre kuru ağırlığına göre PHB verimine bakıldığında ise en iyi verim *L. lactis* Z16L (%25,55) suşunda tespit edilmiştir (Çizelge 4.9, Şekil 4.16).

Hücre kuru ağırlığı ile PHB üretimi arasındaki ilişki bazı suşlarda bulunurken, bazı suşlarda bu ilişkinin olmadığı görülmüştür. Tüm hücrelerin genelinde korelasyon yapıldığında ρ değeri 0,173 bulunmuştur. 0.05 düzeyinde tablo değeri ile mukayese edildiğinde $0,173 < 0,369$ olduğundan hücre kuru ağırlığı ile PHB üretimi arasındaki ilişkinin önemli olmadığı belirlenmiştir.

S. lactis Z13S, *S. thermophilus* Z12S, *S. cremoris* Z6S, Z10S, Z11S, Z18S, Z19S suşlarının PHB üretmedikleri saptanmıştır. PHB üretimi tespit edilen *Streptococcus* türleri arasında en düşük PHB 'yi *S. durans* Z15S (0,01 g/lt) ve *S. cremoris* Z20S (0,01g/lt) suşlarının ürettiği belirlenirken, *S. durans* Z7S (0,12 g/lt) suşunun en yüksek PHB 'yi ürettiği bulunmuştur. Hücre kuru ağırlığına göre PHB verimine bakıldığında ise en iyi verim *S. durans* Z7S (%13,69) suşunda belirlenmiştir (Çizelge 4.13, Şekil 4.31).

PHB üreten tüm hücrelerin genelinde korelasyon testi yapıldığında ρ değeri 0,331 bulunmuştur. 0.05 düzeyinde tablo değeri ile mukayese edildiğinde $0,331 < 0,459$ olduğundan hücre kuru ağırlığı ile PHB üretimi arasındaki ilişkinin önemli olmadığı belirlenmiştir.

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, *Streptococcus* suşlarının, *Lactobacillus* suşlarından daha az PHB ürettiği tespit edilmiştir.

Endüstriyel PHB üretiminde *Lactobacillus* ve *Streptococcus* türlerinin kullanılmasının iyi sonuç vermiyeceği sonucuna varılmıştır.

Çalışmada, aynı cins ve türe ait olmasına rağmen suşlar arasında PHB üretimi ve veriminde farklılık gözlenmiştir.

Literatür araştırmalarında, PHB üretiminde en iyi verimi *Rhizobium* sp. ve *Alcaligenes* sp.'den alındığı belirtilmiştir (Tombolini and Nuti, 1989; Tanaka et al., 1993; Kim et al., 1994).

Çalışmamızda bazı laktik asit bakterisi, tür ve suşlarında kuru hücre ağırlığı ile PHB üretimi arasında ilişki görülebilmiştir. Bazı tür ve suşlarda kuru hücre ağırlığı arttıkça PHB üretiminde arttığı belirlenmiştir. Bu ilişki her tür ve suşun PHB üretim kapasitesinin genetik olarak kontrol edildiğini ve suşlara göre farklılık gösterdiğini düşündürmektedir.

Çalışma sonucu değerlendirildiğinde, *Lactobacillus* ve *Streptococcus* tür ve suşlarının değişik miktarlarda metabolik ürünler sentezlediği ve bazı kontaminant ve patojen bakteriler üzerinde değişik oranlarda inhibisyonik etki gösterdiği tespit edilmiştir. İnhibisyonik etkisi yüksek olan bazı suşların plasmid DNA'ları da izole edilmiştir.

Yapılan çeşitli araştırmalarda laktik asit bakterilerinde, laktik asit üretimi, proteolitik aktivite ve diasetil üretiminin plasmid DNA ile kontrol edildiği sonucuna varılmıştır (Kempler and McKay, 1979; Prestini et al., 1983; Herman and McKay, 1985; Kok and Venema, 1988).

L. acidophilus Z1L suşunun 13,42, 7,02 ve 3,58 kb ağırlığında üç plasmid içerdiği, *L. casei* Z3L suşunun 25,42, 21,34 ve 11,47 kb ağırlığında üç plasmid içerdiği, *L. brevis* Z13L suşunun 34,23, 25,42, 20,42, 9,13 ve 2,59 kb ağırlığında beş plasmid içerdiği, *L. casei* Z4L, *L. bulgaricus* Z8L suşlarının plasmid içermediği tespit edilmiştir.

S. lactis Z1S suşunun 23,70, 20,61, 17,15 ve 8,67 kb ağırlığında dört plasmid içerdiği, *S. lactis* Z3S suşunun 23,49, 16,41 kb ağırlığında iki plasmid içerdiği, *S. durans* Z15S

suşunun 21,89, 18,39, 17,29, 8,89 ve 4,42kb ağırlığında beş plasmid içerdiği, *S. thermophilus* Z5S, *S. cremoris* Z6S ve Z10S suşlarının plasmid içermediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.14, Şekil 4.32).

Herman ve McKay (1985), *S. thermophilus*'un 23 suşunda 1,4-2,2 M dalton ağırlığında değişen 5 plasmid tespit etmişlerdir.

Girard ve arkadaşları (1987), çiğ süttten izole ettikleri *S. thermophilus*'un 41 adedinde plasmid bulamamışlar, 6 adedinde 1, 3 adedinde de 2 plasmid saptamışlardır. Bu plasmidlerin ağırlığı 2,9-7,6 kb arasında bulunmuştur.

Kempler ve McKay (1979), *S. lactis* subsp. *diacetylactis* 18-16 suşunda belirledikleri 6 plasmidden 5.5 M dalton'luk plasmidin sitrat fermentasyonu ile ilişkisi olduğunu, 41 M dalton'luk plasmidin de laktoz fermentasyonunu kontrol ettiğini göstermişlerdir.

Somkuti ve Steinberg (1986), inceledikleri 35 suşdan 13 suşda 2,2-14,75 kb ağırlığında sıralanan 9 farklı plasmid tespit etmişlerdir. Yalnız üç suşda birden fazla plasmidin olduğunu belirtmişlerdir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Bar, N., Harris, N.D. and Rill, R.L., 1987, Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*, **J. Food Scien.**, 52(2), 411-415.
- Adam, R.C., 1971, Süt III, E. Ü. Ziraat Fak. Yayınları, No: 170, 43-50, Bornova-İzmir.
- Akbari, M., 1994, Sucuk ve Sosislerden İzole Edilen Bazı Atasal ve Mutant *Lactobacillus plantarum* ve *Pediococcus pentosaceus* Suşlarının Metabolik ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, G. Ü. Fen Bilimleri Enst., Ankara.
- Angula, L., Lopez, E. and Lema, C., 1993, Microflora present in kefir grains of the Galician Region (North-West of Spain), **J. Dairy Researc.**, 60, 263-267.
- Anon., 1989, Kefir ve özellikleri broşürü, E. Ü. Ziraat Fak. Tarım Ürünleri Teknolojisi Böl., Süt Tekno. Anabilim Dalı, İzmir.
- Anon., 1990, Biodegradable plastic hits the production line, **News Scien.**, 126, 36.
- Anon., 1994, Biodegradable plastic using lactic acid bacteria, **Genetic Eng. and Biotech. Monitor.**, 1, 64.
- Aslım, B., 1994, *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* Bakterilerinin Metabolik ve Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Bazı Fiziksel ve Kimyasal Mutagenlerin Etkisi, **Doktora Tezi**, G. Ü. Fen Bil. Enst., Ankara.

- Attaie,R., Whalen, P.J., Shahani, K.M. and Amer, M.A., 1987, Inhibition of growth of *Staphylococcus aureus* during production of acidophilus Yogurt, **J. Food Protec.**, 50(3), 224-228.
- Babina, N.A., 1971, Quantitative characteristics of the microflora of kefir cultures, **Moloch. Prom.**, 32(2), 18-19, Alınmıştır, D.S.A., 1980, 33(7), 3630.
- Barefoot, S.F. and Klaenhammer, T.R., 1983, Detection and activity of Lacticin B, A bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*, **Appl. Envir. Microbiol.**, 45(6), 1808-1815.
- Barefoot, S.F. and Nettles, C.G., 1993, Antibiosis revisited, bacteriocins produced by dairy starter cultures, **J. Dairy Scien.**, 76, 2366-2379.
- Berthier, F., 1993, On the screening of hydrogen peroxide-generating lactic acid bacteria, **Lett. Appl. Microbiol.**, 16, 150-153.
- Beyatlı, Y. ve Tunail, N., 1982, Yoğurtlardan izole edilen kimi bakterilerin starter olarak seçilme olanakları, **T.O.A.G.**, 414, Ankara.
- Beyatlı, Y., 1994, Bazı laktik asit bakterilerinde tespit edilen plasmid DNA 'ların fonksiyonları, **Kükem**, 17(1), 51-59.
- Bills, D.D., Yang, C.S., Morgan, M.E. and Bodyfelt, F.W., 1972, Effect of sucrose on the production of acetaldehyde and acids by Yogurt culture bacteria, **J. Dairy Scien.**, 55(11), 1570-1573.
- Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C. and Ray, B., 1991, Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, Pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H, **Appl. Envir. Microbiol.**, 57(4), 1265-1267.

- Bonartseva, G.A., Myshkina, V.I. and Zagreba, E.D., 1989, Relationship between poly- β -hydroxybutyrate and nitrogenase and hydrogenase activity in some strain of *Rhizobium*, *Microbiology*, 58, 920-922.
- Bottazzi, V. and Dellaglio, F., 1967, Acetaldehyde and diacetyl production by *Streptococcus thermophilus* and other lactic streptococci, *J. Dairy Res.*, 34, 109-113.
- Bowker, R.R., 1981, Manual of methods for general bacteriology, **American Socie. for Microbiol.**, Washington DC, 20006.
- Braunegy, G., Sonnleitnei, B. and Lafferty, R.M., 1978, A rapid gas chromatographic of poly- β -hydroxybutyrate in microbial, *Biotechnol.*, 6, 29-37.
- Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E., 1974, *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th Edition., The Willams and Wilkins Company, Baltimore, 1246p.
- Budwill, K., Fedoruk, P.M. and Page, W.J., 1992, Methanogenic degradation of poly-3- hydroxyalkanolates, *Appl. Envir. Microbiol.*, 58, 1398-1401.
- Byrom, D., 1987; Polymer Synthesis by microorganisms: Technology and economics, *Trends Biotechnol.*, 5, 246-250.
- Carminati, D., Giraffa, G. and Bossi, M.G., 1988, Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*, *J. Food Protec.*, 52(9), 614-617.
- Cerna, J. and Hrabova, H., 1977, Biologic enrichment of fermented milk beverages with vitamin B₁₂ and folic acid, *Milchwessens.*, 32(5), 274-277.

- Citti, J., Sandine, W.E. and Elliker, P.R., 1963, Some observations on the Hull method for measurement of proteolysis in milk, *J. Dairy Sci.*, 46, 337.
- Clementi, F., Gobetti, M. and Rossi, J., 1989, Carbon dioxide synthesis by immobilized yeast cells in kefir production, *Milchwissens.*, 44(2), 70-74.
- Cogan, T.M., 1972, Modification of the Prill-Hammer method for determining diacetyl, *J. Dairy Sci.*, 55(3), 382-384.
- Collins, E.B. and Aramaki, K., 1980, Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*, *J. Dairy Sci.*, 63(3), 353-357.
- Collins, C.H., Lyne, P.M. and Grange, J.M., 1989, Microbiological methods, Butterworth and Co (Publishers) Ltd, pp. 407.
- Conver, W.J., 1971, Practical nonparametric statistics, John Wiley and Sons. Inc., New York.
- Cruikshank, R., 1972, Medical Microbiology, 11th. ed. Livingstone, London.
- Çetin, E.T., 1983, Endüstriyel Mikrobiyoloji, İst. Tıp Fak. Vakfı Yayını, 418s.
- Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J.F., Simard, R.E., Huang, J. and Lacroix, C., 1991, Detection and activity of a bacteriosin produced by *Leuconostoc mesenteroides*, *Appl. Envir. Microbiol.*, 57(12), 3450-3455.
- Daeschel, M.A., 1989, Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives, *Food Technol.*, January, 164-167.

- Dahiya, R.S. and Speck, M.L., 1967, Hydrogen peroxide formation by *Lactobacilli* and its effect on *Staphylococcus aureus*, **J. Dairy Sci.**, 51(10), 1568-1572.
- de Giori, G.S., de Valdez, G.F., de Holgado, A.P.R. and Oliver, G., 1985, Effect of pH and temperature on the proteolytic activity of lactic acid bacteria, **J. Dairy Sci.**, 68, 2160-2164.
- de Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. 1960, A medium for the cultivation of *Lactobacilli*, **J. Appl. Bacteriol.**, 23, 130-138.
- Demirci, M. ve Gündüz, H., 1994, Süt Teknolojisi El Kitabı, Hasad Yayıncılık, 184s.
- Drinan, D.F., Tobin, S. and Cogan, T.M., 1976, Citric acid metabolism in hetero and homofermentative lactic acid bacteria, **Appl. Envir. Microbiol.**, 31(4), 481-486.
- Duitschaever, C.L., Kemp, N. and Emmons, D., 1987, Pure culture formulation and procedure for the production of kefir, **Milchwissens.**, 42(2), 80-82.
- Duitschaever, C.L., Kemp, N. and Smith, A.K., 1988, Microscopic studies of the microflora of kefir grains and of kefir made by different methods, **Milchwissens.**, 43(8), 479-481.
- Eralp, M., 1974, Peynir Teknolojisi, A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, No:533, 331s., Ankara.
- Ergüllü, E. ve Üçüncü, M., 1983, Kefir mikroflorası üzerine bir araştırma, **Gıda**, 8(1), 3-10.
- Feng Xu, F., Linsay, E.P. and Yu, P.L., 1990, Molecular cloning and expression of a proteinase gene from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H2 and construction of new Lactococcal Vector pFX1, **Arch. Microbiol.**, Sept., 99-104.

- Fernandes, C.F., Shahani, K.M. and Amer, M.A., 1987, Therapeutic role of dietary *Lactobacilli* and lactobacillic fermented dairy products, **FEMS- Microbiol. Review.**, 46, 343-356.
- Fitzsimmons, N. and Berry, D.R., 1994, Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*: Evidence for the involvement of a peroxidase system, **Microbios**, 80, 125-133.
- Fowler, G.G., Jarvis, R. and Tramer, J., 1975, Some methods for microbiological assay, **The Soci. for Appl. Bact. Tech. Series.**, No:8, 91-105.
- Frank, J.F. and Marth, E.H., 1977, Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* by homofermentative lactic acid bacteria in skim milk, **J. Food Protect.**, 40(11), 754-759.
- Gajdusek, S., 1962, Significance of proteolytic bacteria for the ripening of kefir, **Sborn. Vysoke Skoly Chem. v Praze., Potravin. Tech.**, 6(3), 331, Alınmıştır D.S.A., 1964, 26(2), 391.
- Geis, A., Singh, J. and Teuber, M., 1983, Potential of lactic streptococci to produce bacteriosin, **Appl. Envir. Microbiol.**, 45(1), 205-211.
- Georgantas, S., 1970, Microbial flora of Greek Kefir, **Lattle**, 44(8), 568-570, Alınmıştır, D.S.A., 1972, 34(7), 3289.
- Gerhardt, P., 1981, Manual of methods for general bacteriology, **American Society for Microbiology**, Washington DC.
- Girard, F., Lauterire, M. and Novel, G., 1987, DNA-DNA homology between plasmids from *Streptococcus thermophilus*, **Lait.**, 67(4), 537-544.

- Gonzalez, C.F. and Kunka, B.S., 1987, Plasmid-associated bacteriosin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*, *Appl. Envir. Microbiol.*, 53(10), 2534-2538.
- Gürsel, İ. ve Hasırcı, V., 1995, Mikroorganizmal kökenli biyopolimerler, *Tübitak, Bilim ve Teknik Dergisi*, 97-98.
- Halkman, K., 1991, Tarım Mikrobiyolojisi, A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, No:1214, 82s., Ankara.
- Hamdan, Y., Kunsman, D.E. and Deane, D., 1971, Acetaldehyde production by combined yogurt culture, *J. Dairy Scien.*, 54(7), 1080-1082.
- Hanna, M.O., Savell, J.W., Smith, G.C., Purser, D.E., Dardner, F.A. and Vanderzant, G., 1983, Effect of growth of individual meat bacteria on pH colour and odor of aseptically prepared vacuum-packaged round steaks, *J. Food Protect.*, 46, 216-219.
- Hanzlikova, A., Jandera, A. and Kune, F., 1984, Formation of poly-3-hydroxybutyrates by a soil microbial community during batch and heterocontinuous cultivation, *Folia Microbiol.*, 29, 233-241.
- Harris, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.E. and Klaenhammer, T.R., 1989, Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*, *J. Food Protect.*, 52(6), 384-387.
- Harvey, R.J. and Collins, E.B., 1963, Roles of citrate and acetoin in metabolism of *Streptococcus diacetylactis*, *J. Bacteriol.*, 86, 1301-1307.

- Hermann, R.E. and McKay, L.L., 1985, Isolation and partial characterization of plasmid DNA *Streptococcus thermophilus*, **Appl. Envir. Microbiol.**, 50(4), 1103-1106.
- Hirota, T. and Kikuchi, T., 1976, Studies on kefir grains. I. Isolation and classification of microorganisms from kefir grains and their characteristics, **Reports of Researc Lab., Snow Brand Milk Products Co.**, 74, 63-82, Alınmıştır, D.S.A., 1981, 43(8), 5422.
- İlyaslı, F., 1997, İstavrit (*Trachurus trachurus*) Balığından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik ve Antimikrobiyal Aktivitesinin İncelenmesi, **Yüksek Lisans Tezi**, G. Ü. Fen Bilm. Enst., Ankara.
- Janssen, P.H. and Harfoot, C.B., 1990, Ilyibacter delafieldi sp-nov-1, ametabolically restricted anaerobic bacterium fermenting PHB, **Arch. Microbiol.**, 154, 253-259.
- Joerger, M.C. and Klaenhammer, T.R., 1986, Characterization and purification of Helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481, **J. Bacteriol.**, 167(2), 439-446.
- Juven, B.J., Meinersmann, R.J. and Stern, N.J., 1991, Antagonistic effects of *Lactobacilli* and *Pediococci* to control intestinal colonization by human enter pathogens in live poultry, **J. Appl. Bacteriol.**, 70, 95-103.
- Juven, B.J., Schved, F. and Lidner, P., 1992, Antagonistic compounds produced by a chicken intestinal strain of *Lactobacillus acidophilus*, **J. Food Protect.**, 55(3), 157-161.
- Kaletta, C. and Entian, K.D., 1989, Nisin, a peptide antibiotic: Cloning and sequencing of the nis A gene and posttranslational processing of its peptide product, **J. Bacteriol.**, 171(3), 1597-1601.

- Kaneke, T., Suzuki, H. and Takahashi, T., 1987, The effects of metal ions on diacetyl production by *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* 3022, **Agric. Biol. Chem.**, 51(9), 2315-2320.
- Kaptan, N., 1982, Toplum sağlığında kefirin önemi, **Tübitak, Bilim ve Teknik Dergisi**, 176 (33), 33-35.
- Karagözlü, C., 1990, Farklı Isıl İşlem Uygulanmış İnek Sütlerinden Kefir Kültürü ve Tanesi ile Üretilen Kefirlerin Dayanıklılığı ve Nitelikleri Üzerine Araştırmalar, **Yüksek Lisans Tezi**, E. Ü. Fen Bil. Enst. Tarım Ürünleri Tekno., İzmir.
- Karahan, A.G., 1992, *Streptococcus diacetylactis*'den Yüksek Düzeyde Diasetil Oluşturan Mutantların Eldesi ve Bunların Doğal Suşa Oranla Faj Duyarlılıklarının Belirlenmesi, **Doktora Tezi**, A.Ü. Fen Bil. Enst., Gıda Bilimi ve Teknol. Ana Bilim Dalı, Ankara.
- Kempler, G.M. and McKay, L.L., 1979, Characterization of plasmid DNA in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, Evidence for plasmid linked citrate utilization, **Appl. Envir. Microbiol.**, 37(2), 316-323.
- Keppler, K., Geisen, R. and Holzapfel, W.H., 1994, An α -amylase sensitive bacteriocin of *Leuconostoc carnosum*, **Food Microbiol.**, 11, 39-45.
- Kheraskov, S., 1964, Kefir from camels' milk, **Mol. Prom.**, 25(8), 30-31,' Alınmıştır, D.S.A., 1964, 26(11), 3168.
- Kılıç, S., 1990, Yoğurt kültürünü oluşturan *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* bakterilerinin antibakteriyal özellikleri üzerine bir araştırma, **Gıda**, 15(6), 333-338.

- Kim, B.S., Lee, S.C., Lee, S.Y., Chang, M.N. and Chang, Y.K., 1994, Production of poly-3-hydroxybutyric acid by fed batch culture of *Alcaligenes eutrophous* with glucose concentration control, **Biotechnol. Bioeng.**, 43, 892-898.
- King, P.P., 1982, Biotechnology, an industrial view, **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 32, 2-8.
- Klaenhammer, T.R., 1988, Bacteriosins of lactic acid bacteria, **Biochimie.**, 70, 337-349.
- Klupsch, H.J., 1984, Produktverbesserung am beispiel kefir, **Deut-Mol-Zeit.**, 15, 466-473.
- Kneifel, W. and Mayer, H.K., 1991, Vitamin profiles of kefirs made from milk of different species, **Int. J. Food Scien. and Technol.**, 26(4), 423-428.
- Koçak, C. ve Gürsel, A., 1981, Kefir, **Gıda**, 6(4), 11-14.
- Kojic, M., Svircevic, J., Banina, A. and Topisirović, L., 1991, Bacteriocin-producing strains of *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* 550, **Appl. Envir. Microbiol.**, 57, 1835-1837.
- Kojima, S., Takizawa, S., Tamura, S., Fujinaga, S., Benna, Y. and Nakase, T., 1993, An improved medium for the isolation of *Lactobacillus* from kefir grains, **Biosci. Biotech. Biochem.**, 57(1), 119-120.
- Kok, J. and Venema, G., 1988, Genetics of proteinases of lactic acid bacteria, **Biochimie**, 70, 475-488.

- Konar, A. ve Şahan, N., 1989, İnek, keçi ve koyun sütlerinden üretilen kefirlerin özellikleri ve bu özelliklere olgunlaştırma süresinin etkisi üzerine bir araştırma, Bursa I. Uluslararası Gıda Sempozyumu, 184-187.
- Kot, E, Furmanov, S. and Bezkorovainy, A., 1996, Hydrogen peroxide production and oxidation of ferrous iron by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *J. Dairy Scien.*, 79(5), 758-766.
- Krukowski, K. and Rusiecki, M., 1963, Influence of some factors involved in the culture of grains on the organoleptic and chemical properties of kefir, *Przegl. Mlecz.*, 11(10), 10-11, Alınmıştır, D.S.A., 1965, 27(5), 1517.
- Kwak, H.S., Park, S.K. and Kim, D.S., 1996, Biostabilization of kefir with a nonlactose-fermenting yeast, *J. Dairy Scien.*, 79(6), 937-942.
- Law, R.A. and Kolstad, J., 1983, Proteolytic systems in lactic acid bacteria, *Ant. van Leeuwen.*, 49, 225-245.
- Lee, B.H. and Simard, R.E., 1984, Evaluation of methods for detecting the production of H₂S, volatile sulfides and greening by *Lactobacilli*, *J. Food Scien.*, 49, 981-983.
- Lee, K.S. and Kim, D.S., 1986, Microbiological characteristics of kefir cultures, *Korean J. Dairy Scien.*, 8(4), 266-274, Alınmıştır, D.S.A., 1987, 49(6), 3773.
- Leie, D., Wosten, H., Bron, S., Oskam, L. and Venema, G., 1990, Conjugal mobilization of Streptococcal plasmid pMV 158 between strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *J. Bacteriol.*, 172(1), 45-52.

- Leroi, F. and Pidoux, M., 1993, Characterization of interactions between *Lactobacillus hilgardii* and *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains, **J. Appl. Bacteriol.**, 74, 54-60.
- Lewus, C.B. and Montville, T.J., 1991, Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, **J. Microbiol. Method.**, 13, 145-150.
- Lewus, C.B., Kaiser, A. and Montville, T.J., 1991, Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from meat, **Appl. Envir. Microbiol.**, 57(6), 1683-1688.
- Lindgren, S.E. and Dobrogosz, W.J., 1990, Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations, **FEMS- Microbiol. Review.**, 87, 149-164.
- Lindsay, R.C. and Day, E.A., 1965, Rapid quantitative method for determination of acetaldehyde in lactic starter culture, **J. Dairy Scien.**, 48, 665-669.
- Manca de Nadra, M.C., Amorosa, M.J. and Oliver, G., 1989, Acetaldehyde metabolism in *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* isolated from market yogurt, **Microbiol. Aliments-Nutrition**, 6(3), 269-272.
- Marshall, V.M., Cole, W.N. and Brooker, B.E., 1984, Observations on the structure of kefir grains and the distribution of the microflora, **J. Appl. Bacteriol.**, 57(3), 491-497.
- Marshall, V.M., Cole, W.N. and Farrow, J.A.E., 1984, A note on the heterofermentative *Lactobacillus* isolated from kefir grains, **J. Appl. Bacteriol.**, 56, 503-505.
- Mc Laughlin, B.C., 1956, An agar culture medium for lactic acid *Streptococci* and *Lactobacilli*, **J. Dairy Scien.**, 36, 1611-1612.

- Merin, U. and Rosenthal, I., 1986, Production of kefir from UHT milk, *Milchwissens.*, 41(7), 395-396.
- Mortvedt, C.I., Nissen-Meyer, T., Sletten, K. and Nes, I.F., 1991, Purification and amino acid sequence of Lactocin S, a bacteriosin by *Lactobacillus sake* L45, *Appl. Envir. Microbiol.*, 57, 1829-1834.
- Mukai, T., Toba, T., Itoh, T. and Adachi, S., 1990, Structural investigation of the capsular polysaccharide from *Lactobacillus kefiranoferiens* K1, *Carbohydr. Researc.*, 204, 227-232.
- Muriana, P.M. and Klaenhammer, T.R., 1987, Cojugal transfer of plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88, *Appl. Envir. Microbiol.*, 53(3), 553-560.
- Muriana, P.M. and Klaenhammer, T.R., 1991, Purification and partial characterization of Lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088, *Appl. Envir. Microbiol.*, 57, 114-121.
- Murphy, M.G. and Condon, S., 1984, Comprasion of aerobic and anaerobic growth of *Lactobacillus plantarum* in glucose medium, *Arch. Microbiol.*, 138(1), 49-53.
- Niketic, G. and Vukenovic, D., 1975 Technology of kefir manufacture in Tetra Pak cotainers, *Mijekarstvo*, 25(5), 115-118, Alınmıştır, D.S.A., 1976, 38(2), 720.
- Okereke, A. and Montville, T.J., 1991, Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria, *J. Food Protect.*, 54, 349-353.

- O'svullivian, D.J. and Klaenhammer, T.R., 1993, Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp., **Appl. Envir. Microbiol.**, 59(8), 2730-2733.
- Pack, M.Y., Sandine, W.E., Elliker, P.R., Day, E.A. and Lindsay, R.C., 1964, Owades and Jacovac method for diacetyl determination in mixed strain starters, **J. Dairy Scien.**, 47, 981-986.
- Patrick, W.A. and Wagner, H.B., 1949, Determination of hydrogen peroxide in small concentrations, **Analyt. Chemist.**, 21(10), 1279-1280.
- Petit, C. Vilchez, F. and Marczak, R., 1989a, Influence of citrate on the diacetyl and acetoin production by fully grown cells of *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, **Current Microbiol.**, 19, 319-323.
- Petit, C., Vilchez, F. and Marczak, R., 1989b, Formation and stabilization of diacetyl and acetoin concentration in fully grown cultures of *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, **Biotech. Letter.**, 19, 319-323.
- Pidoux, M., Brilloet, J.M. and Quemener, B., 1988, Characterization of the polysaccharides from a *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains, **Biotech. Letter.**, 10(6), 415-420.
- Piodux, M., Marshall, V.M., Zanoni, P. and Brooker, B., 1990, *Lactobacilli* isolated from sugary kefir grains capable of polysaccharide production and minicell formation, **J. Appl. Bacteriol.**, 69, 311-320.
- Prasad, M.M. and Ghodeker, D.R., 1990, Effect of mutagenic agents on the antibiotic producing *Lactobacilli* isolated from Indian fermented milk products, **XXIII. Int. Dairy Congress.**, Vol:2, 368, Montreal.

- Prescott, C.S. and Dunn, G.C. 1987, *Industrial Microbiology*, Published on Distributors, Delhi, India, pp.882.
- Prestini, P., Bottazzi, V., Vescova, M. and Morelli, L., 1983, Relationship among plasmid DNA, lactose fermentation and proteolytic activity in *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus bulgaricus*, *Annali della Facolta di Agraria*, 23(1), 71.
- Rajagopal, S.N. and Sandine, W.E., 1990, Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk, *J. Dairy Scien.*, 73, 894-899.
- Rasic, J.L. and Kurman, J.A., 1978, *Yogurt technology, manufacture and preparation*, D.K. 27, 20, Vanlose Copenhagen, 466 pp.
- Ray, B., Motlagh, A. and Johnson, M.C., 1993, Processing of prepediocin in *Pediococcus acidilactici*, *FEMS-Microbiol. Review.*, 12, 119.
- Raya, R.R., Manca de Nadra, M.C., Ruiz-Holgado, A.P. and Oliver, G., 1986, Acetaldehyde metabolism in lactic acid bacteria, *Milchwessens.*, 14(7), 397-399.
- Reddy, G.V., Shahani, K.M., Friend, B.A. and Chandan, R.C., 1984, Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus* III. Production and partial purification of bulgarican from *Lactobacillus bulgaricus*, *J. Cult. Dairy Product.*, 8(5), 7-11.
- Rees, G.N., Vasiliadis, G., May, J.W. and Buyly, R.C., 1993, Production of poly-beta-hydroxybutyrate in *Alcaligenes* spp. isolated from activated sludge, *Appl. Microbiol. Biotech.*, 38, 734-737.

- Reinheimer, J.A., Demkow, M.R. and Condioti, M.C., 1990, Inhibition of Coliform bacteria by lactic cultures, **The Aust. J. Dairy Technol.**, May, 5-9.
- Reiter, B. and Harnuly, G., 1984, Lactoperoxidase antibacterial system: Natural occurrence, biological functions and partical applications, **J. Food Protect.** 47(9), 724-732.
- Renner, E. and Saldamlı, I., 1983, Beslenme açısından fermente süt ürünleri, **Gıda**, 8(6), 297-311.
- Rosi, J., 1978, The kefir microorganisms: acetic acid bacteria, **Scienza Tecnica Lattiero-Caseria**, 29, 221-227.
- Rubin, H.E. and Vaughan, F., 1979, Elucidation of the inhibitory factors of yogurt against *Salmonella typhimurium*, **J. Dairy Sci.**, 62, 1873-1879.
- Sambrook, J., Fritseh, E.F. and Maniatis, T., 1989, Factors affecting the rate of DNA migration in agarose gels, **Molecular Cloning**, 643-645.
- Savoy-de-Giori, G., Font-D-Valdez, G., Ruiz-Holgado, A.P. and Oliver, G., 1985, Effect of growth temperature on acid production by lactic acid bacteria, **Microbiologie-Aliment. Nutrit.**, 2, 243-246.
- Sezgin, E., Atamer, M. ve Gürsel, A., 1987, Yerli ve yabancı starter kullanılarak yapılan yoğurtların kaliteleri üzerine bir araştırma, **Gıda**, 12(3), 175-177.
- Sezginer, A., 1980, Kefirin hikayesi, **Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi**, 151(13), 37-39.
- Sharpe, M.E. and Franklin, J.G., 1962, Production of hydrogen sulfide by *Lactobacilli* with special reference to strains isolated from cheddar cheese, (Abst.) 8th Int. Cong. Microbiol., 46.

- Shimazu, Y., Vehara, M. and Watanabe M., 1985, Transformation of citric acid to acetic acid, acetoin and diacetyl by wine making lactic acid bacteria, *Agric. Biol. Chem.*, 49(7), 2147-2157.
- Somkuti, G.A. and Steinberg, D.H., 1986, Distribution and analysis of plasmids in *Streptococcus thermophilus*, *J. Indust. Microbiol.*, 1, 157-163.
- Spelhaug, S.R. and Harlander, S.K., 1989, Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*, *J. Food Protect.*, 52(12), 856-862.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W., 1976, Bacteriocins of gram-positive bacteria, *Bacteriol. Review.*, 40(3), 722-756.
- Tanaka, K., Katumune, K. and Ishizaki, A., 1993, Fermentation production of poly-beta-hydroxybutyric acid from xylose by a two stage culture method employing *Lactococcus lactis*, *Biotech. Letter.*, 15, 1217-1222.
- Tekinşen, O.C. ve Atasever, M., 1994, Süt Ürünleri Üretiminde Starter Kültür, *Selçuk Ü. Vet. Fak. Yayını*, 150s., Konya.
- Temiz, A., 1994, Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, 266s., Ankara.
- Toba, T., Abe, S., Arihara, K. and Adachi, S., 1986, A medium for the isolation of capsular bacteria from kefir grains, *Agric. Biol. Chem.*, 50(10), 2673-2674.
- Toba, T., Arihara, K. and Adachi, S., 1987, Comparative study of polysaccharides from kefir grains, an encaosuled homofermentative *Lactobacillus* species and *Lactobacillus kefir*, *Milchwissens.*, 42(9), 565-568.

- Toba, T., Yoshioka, E. and Itoh, T., 1991a, Potential of *Lactobacillus gasseri* isolated from infant faeces to produce bacteriocin, **Letter. Appl. Microbiol.**, 12, 228-231.
- Toba, T., Yoshioka, E. and Itoh, T., 1991b, Acidophilucin A, a new heat-labile bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LAPT 1060, **Letter. Appl. Microbiol.**, 12, 106-108.
- Toksoy, A., 1993, Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Oluşturduğu Antimikrobiyal Maddelerin Kontaminant Mikroorganizmalar Üzerine İnhibisyon Etkisi, **Yüksek Lisans Tezi**, G.Ü. Fen Bil. Enst., Ankara.
- Toksoy, A., 1996, *Lactobacillus plantarum* ve *Pediococcus pentosaceus* Suşlarının Metabolik ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi, **Doktora Tezi**, G.Ü. Fen Bil. Enst., Ankara.
- Tombolini, R. and Nuti, M.D., 1989, Poly (Beta-hydroxyalkanolates) biyosynthesis and accumulation by different species, **FEMS-Microbiol.**, 60, 299-304.
- Tulumoğlu, Ş., 1996, Silivri Yoğurtlarından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik ve Antimikrobiyal Aktiviteleri, **Doktora Tezi**, G.Ü. Fen Bil. Enst., Ankara.
- Tunail, N. ve Köşker, Ö., 1989, Süt Mikrobiyolojisi, A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, No:1116, 138s., Ankara.
- Tzanetaki, E.L. and Mastrojiannaki, A.V., 1988, Diacetyl and acetaldehyde concentrations during ripening of Kefalatyri Cheese, **J. Food Scien.**, 53(2), 663-664.

Vedamuthu, E.R., 1977, Exotic fermented dairy foods, **J.Food Protect.**, 40(11), 801-802.

Wiese, W., 1986, Kefir, ein Sauermicherzeugnis im wiederstreit Zwieschen hersteller, Lebensmittelüberwachung und nerbraucher, **Deut-Mol-Zeit**, 9, 227-229.

Yamane, Y., 1993, Yield poly-D(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources a therotical, **Biotech. Bioeng.**, 4, 165-170.

Yatazaw, M., Yoshida, S. and Maeda, E., 1984, Fine structure of root nodules of *Aeschynomene indica* L, **Soil Sci. Nut.**, 30, 405-416.

Yaygın, H., 1995, Yoğurt, III. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu 2-3 Haziran 1994-İstanbul, Milli Prodüktivite Merkezi Yayınları, No:548.

Yetişmeyen, A., 1995, Süt Teknolojisi, A.Ü. Ziraat Fak Yayınları, No:1420, 229s., Ankara.

Yokoi, H., Watanabe, T. and Fujii, Y., 1990, Isolated and characterization of polysaccharide-producing bacteria from kefir grains, **J. Diry Scien.**, 73(7), 1684-1689.

Yokoi, H., Watanabe, T., Fujii, Y., Mukai, T., Toba, T. and Adachi, S., 1991, Some taxonomical characteristics of encapsulated *Lactobacillus* sp. KPB-167B isolated from kefir grains and characterization of its extracellular polysaccharide, **Inter. J. Food Microbiol.**, 13, 257-264.

Yokoi, H. and Watanabe, T., 1992, Optimum culture conditions for production of Kefiran by *Lactobacillus* sp. KPB- 167B isolated from kefir grains, **J. Ferment. Bioeng.**, 74(5), 327-329.

Yöney, Z., 1967, Yoğurt Teknolojisi, A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, Ankara.

Zaurari, A. and Desmazeud, M.J., 1991, Characterization of thermophilic lactic acid bacteria, isolated from Greek yogurts II. strains of *Lactobacillus delbrueckii* var. *thermophilus*, *Lait-Lyon*, 71(4), 463-482.



ÖZGEÇMİŞ

1973 yılında Samsun'da doğdu. İlk öğrenimini Diyarbakır, orta ve lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 1995 yılında Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünden, bölüm birincisi olarak mezun oldu. 1995 Eylül döneminde, aynı üniversitenin Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Nisan 1997 tarihinde Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı ve halen aynı bölümde görevine devam etmektedir.