

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**ANKARA ÇUBUK YÖRESİ TURŞULARINDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK  
ASİT BAKTERİLERİNİN TANIMLANMALARI, TEKNOLOJİK VE  
FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE STARTER  
OLARAK KULLANILMA OLANAKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Mehmet TOKATLI**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2013**

**Her hakkı saklıdır**

## ÖZET

Doktora Tezi

### ANKARA ÇUBUK YÖRESİ TURŞULARINDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN TANIMLANMALARI, TEKNOLOJİK VE FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE STARTER OLARAK KULLANILMA OLANAKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Mehmet TOKATLI

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK

Ankara Çubuk ilçesi turşularından izole edilen laktik asit bakterileri klasik ve moleküler tekniklerle tanımlanmış ve 117 suşun DNA dizi analiz sonucuna göre *Lb. brevis* (34), *P. ethanolidurans* (33), *Lb. plantarum* (33), *Lb. buchneri* (9), *P. parvulus* (3), *Lb. namurensis* (4), *Lb. diolivarans* (1) türlerine ait oldukları belirlenmiştir. Klasik tanımlama testi sonuçlarının bakterilerin tanımlanmasında yeterli olmadığı, bu testlerin sonuçlarının moleküler tanımlama testleri ile desteklenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Tanısı yapılan LAB'nin, turşu üretiminde starter kültür olabile potansiyellerini değerlendirmek amacıyla teknolojik özellikleri (farklı pH, tuz, sıcaklıkta gelişme, asit üretim hızı, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimi, proteolitik aktivite, biyojen amin üretimi, enzim profili) ve probiyotik özellikleri belirlenmiş; seçilmiş 4 bakteri kültürü ile üretilen turşuların analiz sonuçları doğal fermantasyon sonuçları ile kıyaslanmıştır.

Starter kültür kullanılan turşularda kontrol örneğine göre daha yüksek titrasyon asitliği değerleri (0.73 ±0,04 – 0.87 ±0,08 g/100 mL) ve daha düşük pH değerleri (3.26 ±0,06 - 3.43 ±0,03) elde edilmiş; fermantasyon daha kısa sürede (7 gün) tamamlanmıştır. Turşuda kullanılan starter kültürlerin fermantasyon sonuna kadar stabilitelerini korudukları ortamdaki baskın mikroorganizmalar oldukları belirlenmiştir. Duyusal değerlendirme sonuçlarına göre; starter kültür kullanılarak üretilen turşuların beğenilme oranı, starter kültür kullanılmadan doğal fermantasyon ile üretilen kontrol örneklerine kıyasla belirgin bir farklılık ortaya koymuştur.

**Ocak 2013, 183 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Turşu, Laktik asit bakterisi, Tanımlama, Teknolojik özellikler, Starter kültür

## ABSTRACT

Ph. D. Thesis

### IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM PICKLES IN ANKARA ÇUBUK REGION, DETERMINATION OF THEIR TECHNOLOGICAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES AND THEIR POTENTIAL FOR USING AS A STARTER CULTURE

Mehmet TOKATLI

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK

Lactic acid bacteria, isolated from Ankara, Çubuk region, identified by classic and molecular techniques; on the basis of DNA sequence analyses of 117 bacteria were determined as *Lb. brevis* (34), *P. ethanolidurans* (33), *Lb. plantarum* (33), *Lb. buchneri* (9), *P. parvulus* (3), *Lb. namurensis* (4), *Lb. diolivarans* (1). It was concluded that phenotypic characterization is not enough alone for the identification of lactic acid bacteria (LAB). Genotypic characterization by using molecular techniques was also required for achieving correct and precise results.

The suitable four bacteria cultures were selected to produce pickle by determining technological properties (growth ability at different pH value, salt concentration, temperature, production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and biogenic amine, acid production rate, proteolytic activity and enzyme profile) and probiotic properties of the identified LAB. The analysis results of those pickles were compared with natural fermentation results.

Higher titration acidity values ( $0.73 \pm 0,04 - 0.87 \pm 0,08$  g/100 mL) and lower pH values ( $3.26 \pm 0,06 - 3.43 \pm 0,03$ ) were obtained in the pickles fermented with starter culture and the fermentation was completed within shorter time (7 days). After the fermentation period, it was observed that starter cultures kept their stability and was dominant in pickles during the fermentation period.

According to the results of the sensory analyses, the acceptability of pickles produced by starter culture was not different from pickles produced with natural fermentation.

**January 2013, 183 pages**

**Key Words:** Pickle, Lactic acid bacteria, Identification, Technological properties, Starter culture

## ÖNSÖZ

Gıda sanayiinde ana hedef; hammaddelerin doğal niteliklerini korumaya özen gösterirken, diğer taraftan da bu hammaddelerden tüketicilerin beklentileri doğrultusunda gıda kodeksine uygun çok çeşitli gıda maddeleri üretmek, böylece insanların kaliteli ve güvenli gıdalarla yeterli ve dengeli beslenmesini sağlamaktır. Önümüzdeki yıllarda dünya nüfus artışının gelişmekte olan ülkelerde çok fazla olacağı, dünya genelinde beslenme alışkanlıklarının değişeceği ve yeni teknolojilerin ortaya konulacağı, bununla birlikte geleneksel doğal gıdaların giderek daha çok tercih edilmeleri nedeniyle önemlerinin artacağı beklenmektedir. Bu yarışta ülkemizin şansı, ekolojik gıdaların üretimi ve bunların hammaddeye en az zarar veren yeni teknolojilerle gıda sanayiinde işlenmesi üzerinedir. Çok eskilerden buyana bilinen ve üretilen turşu, uzun yıllar, ticari olmaktan çok ev ekonomisi ölçeğinde kalmıştır. Ancak; giderek toplu yaşamın gelişmesi ve kentsel nüfusun hızla artması, diğer çok sayıda besinlerde olduğu gibi turşuyu da büyük işletmelerde üretilen ve ticari boyutlarda önem taşıyan bir ürün durumuna getirmiştir.

Ankara'nın Çubuk ilçesinde geleneksel yöntemlerle üretilen turşuların, Türkiye çapında kalitesi oldukça iyi bilinmekle birlikte, üretimi çoğunlukla aile işletmeleri ölçeğinde kalmaktadır. Büyük bir üretim kapasitesine sahip olmasına karşılık, yörede ürün standardizasyonunu gerçekleştirebilmek mümkün olamamakta, ürün kalitesinde bölgesel farklılıklar yanında yıldan yıla değişen önemli dönemsel farklılıklar da gözlenmektedir.

TÜBİTAK (TOVAG) tarafından desteklenen (proje no: 108O491) tez çalışması ile, Ankara Çubuk yöresinden sağlanan turşu örneklerinden fermantasyondan sorumlu laktik asit bakterileri izole edilerek tanımlanmış, bu endojen suşların teknolojik ve bazı fonksiyonel özellikleri belirlenmiştir. Bu çalışma ile Çubuk yöresinde turşu fermantasyonunda büyük öneme sahip doğal kültürler tanımlanmış, endüstriyel anlamda starter kültür olarak kullanım olanakları değerlendirilerek, ürünün tat ve aroma standardizasyonuna katkı sağlamak hedeflenmiştir.

Çalışmalarımın planlanmasında ve yürütülmesinde emeği geçen ve çalışmalarımın her aşamasında desteğini ve ilgisini hiç esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı), çalışmalarımda önemli katkılarda ve önerilerde bulunan tez izleme komitesi üyeleri sayın Prof. Dr. Sedat DÖNMEZ (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı) ve Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı) hocalarıma, proje kapsamında birlikte çalıştığım değerli arkadaşlarım Araş. Gör. Derya DURSUN (Gaziantep Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı), Öğr. Gör. Nurdan ARSLANKOZ (Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Yeniçağa Meslek Yüksek Okulu) ve Araş. Gör. Simel BAĞDER (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı)'e, her zaman bana manevi destek veren değerli eşim ve oğluma sonsuz saygı ve sevgilerimi sunarım.

Mehmet TOKATLI  
Ankara, Ocak 2013

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	6
2.1 Fermantasyon Teknolojisi.....	6
2.2 Laktik Asit Bakterileri (LAB).....	14
2.2.1 <i>Lactobacillus</i> .....	16
2.2.2 <i>Leuconostoc</i> .....	18
2.2.3 <i>Lactococcus</i> .....	19
2.2.4 <i>Pediococcus</i> .....	20
2.3 Turşularda Yer Alan Laktik Asit Bakterileri.....	21
2.3.1 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .....	23
2.3.2 <i>Pediococcus pentosaceus</i> .....	23
2.3.3 <i>Lactobacillus brevis</i> .....	23
2.3.4 <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	24
2.3.5 <i>Streptococcus faecalis</i> .....	25
2.4 Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmalarında Uygulanan Yöntemler.....	25
2.5 Laktik Asit Bakterilerinin Önemi.....	28
2.5.1 Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktiviteleri.....	30
2.5.2 Probiyotik etki.....	38
2.5.3 Starter kültür kullanımı.....	39
2.6 Laktik Asit Bakterilerinin Asit Üretim Miktarları.....	42
2.7 Laktik Asit Bakterilerinin Farklı pH Değerlerinde Gelişme Özellikleri.....	43
2.8 Laktik Asit Bakterilerinin Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Özellikleri...	44
2.9 Laktik Asit Bakterilerinin Proteolitik Aktiviteleri.....	46
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	48
3.1 Materyal.....	48
3.1.1 Turşu ve salamura örnekleri.....	48
3.2 Yöntem.....	50
3.2.1 Turşu örneklerinin kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin belirlenmesi.....	50
3.2.1.1 Salamura örneklerinin pH değerinin belirlenmesi.....	50
3.2.1.2 Salamura örneklerinde toplam asitliğinin belirlenmesi.....	50
3.2.1.3 Salamura örneklerinde tuz miktarının belirlenmesi.....	51
3.2.1.4 Salamura örneklerinde toplam laktik asit bakteri sayısının belirlenmesi.....	51
3.2.2 Salamura örneklerinden laktik asit bakterileri (LAB)'nin izolasyonu.....	52
3.2.3 Laktik asit bakterileri (LAB)'nin tanımlanması.....	53
3.2.3.1 Fenotipik özelliklerin belirlenmesi.....	53
3.2.3.1.1 Koloni morfolojisi.....	53
3.2.3.1.2 Gram boyama testi.....	54
3.2.3.1.3 Hücre morfolojisi.....	54

3.2.3.1.4 Katalaz testi.....	55
3.2.3.1.5 Oksidaz testi.....	55
3.2.3.1.6 Glikozdan gaz oluşum testi.....	55
3.2.3.1.7 Farklı sıcaklık derecelerinde gelişme testi.....	56
3.2.3.1.8 Arjinin hidroliz testi.....	56
3.2.3.1.9 Karbonhidrat fermantasyon profillerinin belirlenmesi.....	56
3.2.3.2 Laktik asit bakterilerinin moleküler düzeyde tanımlanması.....	57
3.2.3.2.1 Toplam hücre protein profillerinin belirlenmesi.....	57
3.2.3.2.2 16S rRNA dizi analizleri.....	59
3.2.4 Laktik asit bakterilerinin teknolojik ve fonksiyonel özelliklerin belirlenmesi.....	61
3.2.4.1 LAB nin farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme özelliklerinin belirlenmesi....	61
3.2.4.2 LAB nin farklı pH değerlerinde gelişme özelliklerinin belirlenmesi.....	61
3.2.4.3 LAB'nin asit üretim miktarlarının ve hızlarının belirlenmesi.....	62
3.2.4.4 LAB'nin hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) üretim miktarlarının belirlenmesi.....	62
3.2.4.5 LAB'nin antimikrobiyal aktivitesinin ve bakteriyosin üretiminin belirlenmesi..	63
3.2.4.6 LAB'nin proteolitik aktivitesinin belirlenmesi.....	65
3.2.4.7 LAB'nin enzim profillerinin belirlenmesi (API ZYM).....	65
3.2.4.8 LAB'nin biyogen amin üretim özelliklerinin belirlenmesi.....	66
3.2.5 Laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliklerin belirlenmesi.....	66
3.2.5.1 LAB'nin pH 2,5'de canlı hücre oranının belirlenmesi.....	66
3.2.5.2 LAB'nin safra tuzuna dayanım düzeylerinin belirlenmesi.....	67
3.2.5.3 LAB'nin pepsin ve pankreatin varlığında canlı hücre oranının belirlenmesi.....	67
3.2.5.4 LAB'nin safra tuzlarını dekonjüge etme özelliklerinin belirlenmesi.....	68
3.2.5.5 LAB'nin bazı antibiyotiklere karşı dirençlerinin belirlenmesi.....	68
3.2.5.6 LAB'nin kolesterol asimilasyon özelliklerinin belirlenmesi.....	68
3.2.5.7 LAB'nin hücre yüzey hidrofobisite özelliğinin belirlenmesi.....	70
3.2.6 Seçilmiş starter kültürler ile hıyar turşusu üretimi.....	70
3.2.6.1 Fermantasyonun izlenmesi.....	70
3.2.7 Hıyar turşularında kimyasal ve mikrobiyolojik analizler.....	71
3.2.7.1 pH.....	71
3.2.7.2 Toplam titrasyon asitliği.....	71
3.2.7.3 Tuz tayini.....	72
3.2.7.4 Toplam indirgen şeker.....	73
3.2.7.5 Toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı.....	74
3.2.7.6 Toplam LAB sayımı.....	74
3.2.7.7 Toplam maya-küf sayımı.....	74
3.2.7.8 Toplam <i>enterobacteriaceae</i> sayımı.....	74
3.2.8 Hıyar turşu örneklerinin duyuusal analizi.....	75
3.2.9 Turşu örneklerinde starter kültürlerin stabiliteilerinin belirlenmesi.....	75
3.2.10 İstatiksel değerlendirme.....	75
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	76
4.1 Çubuk Turşu Örneklerinin Temini.....	76
4.2 Turşu ve Salamura Örneklerinin Kimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri.....	76
4.3 Turşu Örneklerinden Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Tanımlanmaları.....	79
4.4 Mikroorganizmaların Karbonhidrat Fermantasyon Profilleri ile Tanımlanmaları..	83
4.5 İzolatların Toplam Hücre Protein Profilleri.....	88

4.6 16S rRNA Dizi Analizleri.....	93
4.7 Laktik Asit Bakterilerinin Teknolojik ve Fonksiyonel Özellikleri.....	95
4.7.1 Laktik asit bakterilerinin farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme özellikleri.....	95
4.7.2 Laktik asit bakterilerinin farklı pH değerlerinde gelişme özellikleri.....	99
4.7.3 Laktik asit bakterilerinin asit üretim miktarları.....	102
4.7.4 Laktik asit bakterilerinin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> üretim miktarları.....	104
4.7.5 Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktiviteleri ve bakteriyosin üretim özellikleri.....	108
4.7.6 Laktik asit bakterilerinin proteolitik aktiviteleri.....	111
4.7.7 Laktik asit bakterilerinin enzim profillerinin belirlenmesi (API-ZYM).....	112
4.7.8 Laktik asit bakterilerinin biyojen amin üretim özellikleri.....	115
4.8 Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Özellikleri.....	117
4.8.1 Laktik asit bakterilerinin pH 2,5'de canlılık düzeyleri.....	117
4.8.2 Laktik asit bakterilerinin safra tuzu dayanım düzeyleri.....	120
4.8.3 Laktik asit bakterilerinin pepsin ve pankreatin varlığında canlılık düzeyleri.....	122
4.8.4 Laktik asit bakterilerinin safra tuzu dekonjüge etme özellikleri.....	124
4.8.5 Laktik asit bakterilerinin bazı antibiyotiklere karşı dirençleri.....	125
4.8.6 Laktik asit bakterilerinin kolestrol asimilasyon özellikleri.....	127
4.8.7 Laktik asit bakterilerinin hücre yüzey hidrofobisite özellikleri.....	130
4.9 Seçilmiş Starter Kültürler İle Turşu Üretimi ve Fermantasyon Denemesine Ait Bulgular.....	131
4.9.1 Turşu örneklerinde fermantasyon sürecinde meydana gelen kimyasal değişimler	132
4.9.2 Turşu örneklerinde fermantasyon sürecinde meydana gelen mikrobiyolojik değişimler.....	137
4.9.3 Fermantasyon sonunda turşu örneklerine ait duyu analizi sonuçları.....	139
4.9.4 Fermantasyon sonunda starter kültürlerin stabiliteyi.....	140
5. SONUÇ.....	142
KAYNAKLAR.....	147
EKLER.....	161
EK 1 İzole edilen laktik asit bakterilerine ait bazı fenotipik test sonuçları ve 16S rRNA dizi analiz sonuçları.....	162
EK 2 Bakterilerin SDS-PAGE hücre protein profilleri, API test ve 16S rRNA sonuçları.....	168
EK 3 16S rRNA dizi analiz sonuçlarına göre bakterilerin dendrogram üzerinde gösterimi (UPGMA).....	173
Ek 4 LAB türlerinin farklı tuz, pH değerlerindeki gelişme özellikleri ve asit üretim miktarları.....	174
EK 5 LAB'nin indikatörlere karşı genel antimikrobiyal aktiviteleri (zon çapları, cm)...	178
ÖZGEÇMİŞ.....	181

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	Bazı sebze fermantasyonlarında bulunan temel LAB türleri.....	22
Çizelge 2.2	Laktik asit bakterileri ile ilişkilendirilen bileşikler.....	24
Çizelge 3.1	Turşu ve salamura örneklerinin temin edildikleri yerler.....	48
Çizelge 3.2	Turşu ve salamura örneklerine ilişkin bilgiler.....	49
Çizelge 3.3	API-ZYM ile test edilen enzimler.....	66
Çizelge 4.1	Salamura örneklerine ait kimyasal ve mikrobiyolojik analiz sonuçları.....	78
Çizelge 4.2	LAB'nin arjinin hidroliz özellikleri.....	82
Çizelge 4.3	API sonuçlarına göre izolatların tür düzeyindeki dağılımları.....	84
Çizelge 4.4	API ile tanımlanan LAB'nin izole edildikleri örneklerle göre dağılımı.....	85
Çizelge 4.5	<i>Lactobacillus</i> cinslerinin gaz oluşturma yeteneğine göre sınıflandırılmaları	87
Çizelge 4.6	Laktik asit bakterilerinin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> üretim miktarları (µg H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /mL).....	107
Çizelge 4.7	Laktik Asit Bakterilerinin Proteolitik Aktiviteleri (OD <sub>410</sub> ).....	112
Çizelge 4.8	API-ZYM enzim kodları.....	113
Çizelge 4.9	Laktik asit bakteri türlerinin API ZYM test sonuçları.....	115
Çizelge 4.10	LAB türlerinin pH 2,5'de 0. ve 4. saat canlılık düzeyleri (log kob/mL).....	119
Çizelge 4.11	LAB türlerinin safra tuzu içeren (% 0,3) MRS besiyerinde 0. ve 4. saat canlılık düzeyleri (log kob/mL).....	122
Çizelge 4.12	LAB türlerinin pepsin ve pankreatin varlığında canlılık düzeyleri (log kob/mL).....	124
Çizelge 4.13	LAB'nin antibiyotik (C30, E15, AM10, TE30, K30) dirençlilikleri (zon çapı, cm).....	127
Çizelge 4.14	LAB'nin kolesterol asimilasyon düzeyleri (%).....	129
Çizelge 4.15	LAB'nin yüzey hidrofobisite özellikleri (%).....	130
Çizelge 4.16	Fermantasyon süresince salamura örneklerinin % asitlik, pH, % tuz ve indirgen şeker miktarları (g/L).....	134
Çizelge 4.17	Fermantasyon süresince salamuraadaki mikrobiyolojik sayım sonuçları (log kob/mL).....	139
Çizelge 4.18	Fermantasyon sonunda turşuların duyuşal değerlendirme sonuçları.....	140



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Laktik asit bakterilerinin glikozu homolaktik ve heterolaktik yollarla parçalaması.....	15
Şekil 2.2	Bakteriyosinler tarafından hücrede por oluşum modelleri.....	36
Şekil 3.1	Hidrojen peroksit standart kurve grafiği.....	63
Şekil 3.2	Kolestrol miktarının belirlenmesinde kullanılan standart kurve (OPA metodu).....	69
Şekil 3.3	İndirgen şeker analizi için standart kurve.....	73
Şekil 4.1	Bakterilere ait SDS-PAGE hücre protein profilleri ile oluşturulan sistematik dendrogram (UPGMA).....	92
Şekil 4.2	Bazı bakterilerin 16S rRNA PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görünüşleri	94
Şekil 4.3.	16S rRNA dizi analiz sonuçlarına göre LAB'nin tür düzeyindeki dağılımı	95
Şekil 4.4	a. <i>Lb. plantarum</i> , b. <i>Pediococcus</i> spp., c. <i>Lb. brevis</i> , d. <i>Lb. buchneri</i> türlerinin farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme grafiği.....	98
Şekil 4.5	a. <i>Lb. plantarum</i> , b. <i>Pediococcus</i> spp., c. <i>Lb. brevis</i> , d. <i>Lb. buchneri</i> türlerinin farklı pH değerlerinde gelişme grafiği.....	101
Şekil 4.6	a. <i>Lb. plantarum</i> , b. <i>Pediococcus</i> spp., c. <i>Lb. buchneri</i> , d. <i>Lb. brevis</i> türlerinin farklı inkübasyon sürelerinde asit üretim miktarları (g laktik asit/100 mL).....	103
Şekil 4.7	<i>L. innocua</i> 'ya karşı antimikrobiyal aktivite (nokta ekim).....	110
Şekil 4.8	<i>M. luteus</i> ' a karşı antimikrobiyal aktivite (kuyu).....	110
Şekil 4.9	Bazı örnekler için API ZYM test stripleri.....	114
Şekil 4.10	a. <i>Lb. plantarum</i> , b. <i>Pediococcus ethanolidurans</i> , c. <i>Lb. brevis</i> suşlarının pH 2,5'de 0. ve 4. saat canlılık düzeyleri grafiği (log kob/mL).....	118
Şekil 4.11	LAB türlerinin safra tuzu içeren (% 0,3) MRS besiyerinde 0. ve 4. saat canlılık düzeyleri (log kob/mL).....	121
Şekil 4.12	LAB türlerinin pepsin ve pankreatin varlığında canlılık düzeyleri (log kob/mL).....	123
Şekil 4.13	Safra tuzu-MRS agar besiyerinde bazı suşlara ait safra dekonjügasyon denemeleri.....	125
Şekil 4.14	Bazı suşlara ait antibiyotik zonları.....	126
Şekil 4.15	Fermantasyon süresince salamura örneklerinde pH değişimi.....	132
Şekil 4.16	Fermantasyon süresince salamura örneklerinin titrasyon asitliği (% laktik asit) değerleri.....	133
Şekil 4.17	Fermantasyon süresince salamura örneklerinin tuz konsantrasyonları.....	135
Şekil 4.18	Fermantasyon süresince salamura örneklerinin indirgen şeker miktarı (g/L).....	136
Şekil 4.19	Fermantasyon süresince salamuradaki mikrobiyolojik sayım sonuçları (log kob/mL).....	138
Şekil 4.20	Fermantasyon sonunda turşuların duyuşal değerlendirme sonuçları.....	140

## 1. GİRİŞ

Fermantasyon teknolojisi hem bilinen en eski biyoteknoloji uygulaması hem de gıdaların muhafaza edilmesinde uygulanan etkin bir yöntemdir (Borgstorm 1986). Etanol, asetik asit ve laktik asit gibi çeşitli fermantasyon uygulamaları ile elde olunan fermente gıdalar (Beukes vd. 2001), insanlar tarafından yüz yıllardır tüketilmektedir (Hutkins 2006). 1970'li yıllardan bu yana, biyoteknolojik uygulamaların gelişmesine bağlı olarak, fermente gıdaların tüketimi oldukça artış göstermiştir (Board vd. 1995). Bunun nedenlerinden biri, tüketicilerin bu tür gıdaların sağlıklı ve doğal olduklarını düşünmeleridir. Fermente ürünlerde olması muhtemel mikroorganizmaların varlığı ve bu mikroorganizmaların metabolitleri tüketicilerde, ürünün güvenliği açısından bir soru işareti yaratmamaktadır. Fermente ürünlerin binlerce yıldır var olması ve tüketilmesi bu ürünlerin, bir bakıma zamanla test edildiği anlamını taşımaktadır (Mavhungu 2005).

Konserve ya da dondurulmuş gıdalar, ekonomik bakımdan ve kolay erişilebilirlik anlamında insanları pek tatmin etmeyen gıdalar olabilmektedir. Gıdaların, özellikle hasat edildikleri anda tüketilmeleri öngörülen meyve ve sebzelerin, daha sonra da tüketilebilmelerine olanak sağlayan muhafaza yöntemlerinden olan fermantasyon; uygulanabilirliği pratik, fazla enerji ve işgücü gereksinimi olmayan, ürünlerin organoleptik ve besinsel özelliklerini geliştirebilen, lezzet bakımından farklı tatların oluşmasına imkan sağlayan, insan sağlığına yararlı bileşikler ile faydalı gıdalar sunabilen ve tüketim alanı olarak geniş yelpazeye sahip ürünler ortaya koyabilen bir gıda işleme yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır (Steinkraus 1983).

Her ülke; bir bölge, alan ya da yöresel olarak sahip olduğu ürünleri, fermantasyon uygulamaları ile fermente gıdalara işleyebilmektedir. Böylece bu ürünlerin, zamana bağlı kalmaksızın tüketimi sağlanabilmektedir. Sonuç olarak; ortaya çıkan geleneksel fermente gıdalar, üretim bölgelerindeki doğal floradan kaynaklanan karakteristik özellikler ve yine bu bölgeye ait üretim yöntemlerindeki farklılıklarla önem kazanmaktadır.

Geleneksel olarak üretilen fermente birçok yiyecek ve içecekte, proses olarak laktik asit fermantasyonu kullanılmaktadır. Laktik asit fermantasyonu, meyve ve sebzelerin muhafazasında binlerce yıldır tercih edilen ve uygulanan bir metot olmasının yanı sıra gıdalarda, örneğin tat, aroma ve yapı oluşturduğu önemli değişiklikler ile de insanlar tarafından tüketilebilirliği oldukça yüksek gıdaların üretimine olanak veren bir prosestir. Bu prosesin uygulandığı gıdalar arasında turşu önemli bir yer tutmaktadır. Turşu yapımı, insanların gıda maddelerini uzun süre saklayabilmek, az oldukları ya da hiç bulunmadıkları yer ve dönemlerde bu ürünlerden yararlanabilmek için geliştirdikleri muhafaza yöntemleri içinde en eski olanlardan biridir. Bu anlamda, turşu ve turşu teknolojisi uzun ve zengin bir tarihe sahiptir (Aktan vd. 1998).

Turşu tüketimi son yıllara kadar ticari boyuttan uzak, evlerde üretilen bir ürün ve küçük çapta bir ekonomik kazanç kaynağı olarak görülmüştür. Ancak artan nüfus, gelişen toplumsal yapı, iç satımla birlikte dış satıma yönelik talep ve insanların ilgisiyle birlikte turşuya olan bu bakış açısı değişmiş ve tüketimi artmıştır. Özellikle iç pazardaki tüketicinin bilinçlenmesi ve dışa yönelik talebin artmasıyla birlikte turşunun, gıda sanayindeki önemi anlaşılmıştır. Ticari anlamdaki yaklaşım da, buna bağlı olarak farklılaşmış ve önem kazanmıştır. ABD’de turşuların artan taleple birlikte, mevcut marketlerdeki piyasa değerinin iki milyar doların üzerinde olduğu bildirilmektedir (Breidt vd. 2007). Böyle bir ticari öneme sahip turşu üzerinde endüstriyel boyutta bir üretime, standart üretim tekniklerinin oluşturulmasına ve kaliteli ürün elde etmeye yönelik çalışmaların yoğunlaştırılması büyük anlam ve önem taşımaktadır.

2009 yılı itibariyle konserve meyve- sebze ihracatının % 19’u turşu ve zeytin, % 18’i domates konserveleri ve salça ve % 14’ü sebze konserveleri ve salamura zeytinden oluşmaktadır. İhracatımızın önemli olduğu bu gruplarda da hıyar ve kornişon, tatlı biber, capsicum cinsi biber, diğer sebze ve sebze karışımları, zeytin, domates salçası, diğer sebze konserveleri ve patates ön plana çıkmaktadır. Hıyarlar, kornişonlar ve zeytinlerin bulunduğu grupta dünya ihracatı 2008 yılında 1,6 milyar doların üzerindedir. 2008 yılı verilerine göre ihracatta ilk üç sırayı Türkiye (212 milyon dolar), Almanya (210 milyon dolar) ve Meksika (139 milyon dolar)

almaktadır. Hıyar ve kornişon turşularının 2008 yılı dünya ihracatında Türkiye % 13'lük önemli bir paya sahiptir (Anonim 2010).

Ülkemizdeki turşu üretim ve tüketimi, yöresel olarak üretim yöntemleri ve tüketim alışkanlıkları bakımından değişiklik gösterebilmektedir. Ankara ilimizin Çubuk ilçesinde geleneksel yöntemlerle üretilen turşular, ülke çapında bilinmekte ve çok beğenilmektedir. Yöre verimli topraklara sahip olduğundan tarımsal üretim için son derece uygundur. Bu nedenle, başta tahıl ürünleri olmak üzere meyve ve sebze yetiştiriciliği de yapılmaktadır. Son yıla ait toplam sebze üretiminin 16.000 ton civarında, meyve üretiminin ise yaklaşık on bin ton olduğu bildirilmektedir. Çubuk'ta yetiştirilen meyve ve sebzelerin tat olarak çok hoş ve iyi kalitede olmasıyla birlikte, ürünlerin turşuya işlenmesi ile doğal özellikleri korunabilmekte, ayrıca turşu ile daha farklı tat, aroma, tekstür ve besinsel öğeler kazandırılabilmektedir (Anonim 2012).

Yörede yetiştirilen çok farklı ürünlerle turşu üretimi gerçekleştirilmektedir. Son yıllarda yaygınlaşan üretimle beraber ülke çapında ve ülke dışına da Çubuk turşuları pazarlanmaktadır. Önemli bir geçim kaynağı haline gelen turşuculuk ile 2008-2009 yılı içerisinde yaklaşık 10.000 ton üretim yapılmıştır (Anonim 2012). Çubuk'ta üretilen turşuların bilimsel olarak araştırılması, turşuların sahip olduğu özelliklerin belirlenmesi, turşu üretim potansiyelinin geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir.

Çubuk'ta yetiştirilen ürünlerin kendi doğal mikrofloraları ile doğal fermantasyonla üretilen turşuların tanıtılması ve pazarlanması amacıyla turşu festivalleri düzenlenmektedir. Böylece, yöreye has turşular piyasaya tanıtılmakta, tüketim alanı genişletilmekte, üreticilere ekonomik kazanç temin ederek yeni kazanç kaynaklarının ortaya çıkmasına imkan verilmektedir. Ayrıca, yörenin üretim kapasitesinin oldukça büyük ve ürünlerinin kaliteli olduğu düşünüldüğünde, ekonomik anlamda hem yöresel hem de ülke için ciddi bir potansiyel olması dikkat çekmektedir. Bunların yanı sıra, turşu üretiminin devamlılığı sağlanarak daha kaliteli ürünlerin oluşumu için çalışma alanları yaratılabilmelidir. Bu bağlamda, yörede üretilen turşularda laktik asit

fermantasyonunun seyri ve fermentasyondan sorumlu laktik asit bakterilerinin incelenmesi önemli olacaktır.

Fermente gıdalar elde edilirken, fermentasyondan sorumlu mikroorganizmalar substratın üzerindeki doğal mikroflorada bulunmakta ya da starter kültür olarak gıdalara eklenmektedir (Blandino vd. 2003). Starter kültür birden çok mikroorganizmadan oluşan mikrobiyal bir preparattır. Doğal fermentasyon yoluyla üretilen ürünlerde standart ürün elde etmek her zaman mümkün olmamaktadır. Fakat, starter kültürün birincil gıda ürününe eklenmesiyle fermentasyon sürecinin kontrol altında tutulması ile standart ürün elde edilmesi sağlanabilmektedir (Leroy ve Vuyst 2004).

Fermente gıdaların üretiminde starter kültür kullanımı, teknoloji ve bilimdeki ilerlemelere paralel olarak giderek artmaktadır. Ticari starter kültürlerin kullanımına olan ilginin artması, yöresel fermente gıdaların üretimdeki paylarını da giderek azaltmaktadır. Ancak; geleneksel fermente gıdaların, üretim yöntemlerindeki farklılıklar yanında, üretim bölgelerindeki farklı doğal floradan kaynaklanan karakteristik özellikler kazandıkları da bilinen bir gerçektir. Ülkemizde ticari starter kültür kullanımı, süt endüstrisi dışında henüz çok yaygın olmamakla birlikte, üretim bölgelerinden izole edilerek kültüre alınan yöresel suşların fermente gıdalarda starter kültür olarak kullanılması ile, hem yöresel gıda ürününe hem de üretildiği yöreye ayrı bir değer kazandıracağı düşünülmektedir.

Fermente gıdaların üretiminde, spontan fermentasyon uygulaması, artan sanayileşme ve ithal kültürlerin kullanımının yaygınlaşması ile giderek azalmakta ve bu kaynaklar yok olmaktadır. Ülkemizde, fermente ürünlerin üretiminde kullanabileceğimiz “ulusal gen kaynaklarımızdan” elde edilmiş starter kültürlerimiz bulunmamaktadır, bu amaçla yılda milyonlarca TL’lik kaynağımız yabancı ülkelere gitmektedir.

Gerek ürün kalitesi ve stabilitesi, gerekse halk sağlığı açısından çeşitli fermente ürünlerin üretiminde starter kültür kullanılması önerilmektedir. Ülkemizde laktik asit fermentasyonu ile üretilen salamuralı gıdaların neredeyse hemen tamamı starter kültür

kullanılmadan yapılmaktadır. Gerek damak zevkimize uygun standart kalitede ürünler üretmek gerek yurt dışına ödenen dövizi ülke ekonomisine kazandırmak için yerel starter kültür üretimi teşvik edilmelidir.

Ülkemizde, laktik asit fermantasyonu ile üretilmiş salamuralı gıdalardan laktik asit bakterilerinin izolasyonu, tanısı ve bazı teknolojik özelliklerinin belirlenmesi üzerine yapılmış çok az sayıda araştırmaya rastlanmış olup; bunların fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi üzerine yapılmış kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma kapsamında, Çubuk (Ankara) ilçesi turşularından izole edilerek tanımlanan LAB suşları starter kültür koleksiyonlarına ve bilimsel araştırmalara biyomateryal sağlayacak, yöresel bir ürün olan Çubuk turşularının standart bir yöntem ile üretilmelerine ve bu salamuralı ürün grubunun ülke ve yöre ekonomisine daha fazlı katkı sağlamasına yardımcı olacaktır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Fermantasyon Teknolojisi

Bilim dünyası tarafından fermente yiyecek ve içeceklerin değeri, son 150-200 yıl içerisinde, fermente gıdalardaki mikroorganizmaların ve enzimlerin keşfedilmesiyle birlikte anlaşılmıştır. Başlangıç itibariyle, fermente gıdalar ve dolayısıyla fermantasyonla kimyacılar ilgilenmiş ve bu konuyla ilgili olarak ilk çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Bu bağlamda ilk gelişmeler şarap ve biradaki mayaların incelenmesiyle başlamıştır (Hutkins 2006).

1857 tarihinde Louis Pasteur, yaptığı çalışmalarda fermantasyonu, ‘yaşamsız (cansız) bir fenomen olmaktan uzak, yaşayan bir proses’ şeklinde ifade etmiştir. Buna bağlı olarak, fermantasyonda yer alan ve fermantasyonu gerçekleştiren mikroorganizmaların önemine dikkat çekmiştir. Pasteur süt, şarap ve biradaki fermantasyonlarla ilgili olarak laktik ve etanol fermantasyonları üzerine detaylı olarak çeşitli çalışmalar ortaya koymuştur. Ayrıca, şarabın bozulmasından asetik asit fermantasyonunun sorumlu olduğunu belirlemiştir (Hutkins 2006).

Bilimsel gelişmelere bağlı olarak çeşitli fermantasyonların hangi gıdalarda gerçekleştiğine ve fermantasyonda hangi mikroorganizmaların etkili olduğuna ilişkin çalışmalar yapılmış ve fermente ürünler için mikroorganizma kültürleri oluşturulmuştur. 1900’lü yılların başında tereyağı, peynir gibi çeşitli süt ürünleri üzerine bu tarzda çalışmalar yapılmıştır. Buna benzer olarak ekmek, şarap, bira, fermente et ürünleri gibi gıdalarda da fermantasyon çalışmalarına bağlı çeşitli endüstriler oluşturulmuştur. Fermente gıdaların, insanlar tarafından ilk ‘işlenmiş’ gıdalar olarak üretilmesi ve tüketilmesi, fermente gıdalar üzerine birçok araştırma yapılmasını sağlamış ve bu çalışmalar fermantasyonun bir gıda endüstrisi olarak gelişmesine yardımcı olmuştur (Hutkins 2006).

Fermente gıdalarda, hammaddelerin içerisindeki karbonhidrat, protein, lipit vb. büyük moleküllü bileşenler, mikroorganizmalar tarafından, özellikle amilaz, proteaz ve lipaz enzimleriyle parçalanarak lezzet, aroma ve doku (tekstür) açısından tüketiciler için hoş ve cazip ürünler haline gelmektedir (Steinkraus 1997). Bu ürünler arasında; sucuk gibi et ürünleri, çok çeşitli mikroorganizmaların işlev görmesiyle birbirinden çok farklı özelliklere sahip peynir türleri, yoğurt gibi geleneksel gıdalar, sağlık açısından fonksiyonel gıda olarak nitelendirilen kefir gibi ürünler, meyve ve sebzelerin muhafazasında önemli bir yer tutan turşu, sauerkraut ve temel bir besin olan ekmek ile binlerce yıldır üretimi yapılagelen bira, şarap, sirke örnek olarak verilebilmektedir. Bu kadar geniş bir ürün yelpazesi sunan fermantasyon işlemi, ürünlere göre çeşitli kategorilere ayrılmıştır. Böylece fermente gıdalar, tüketiciler tarafından talebi yüksek olan gıdalar arasında yer almaktadır. Avrupa'da beslenmenin % 25 ve gelişmekte olan çoğu ülkede beslenmenin % 60 kadarını fermente gıdaların oluşturduğu tahmin edilmektedir (Stiles 1996).

Campbell ve Platt'e (1987) göre gıda fermantasyonları; içkiler, tahıl (hububat) ürünleri, süt ürünleri, balık ürünleri, meyve ve sebze ürünleri, baklagiller ve et ürünleri olmak üzere yedi sınıfa ayrılmaktadır. Sınıflara ayrılmış fermente gıdaların besinsel etkileri insanlara doğrudan ya da dolaylı olarak yansıyabilmektedir. Gıda fermantasyonları ile gıdaların protein içeriği yükseltilmekte ya da esansiyel amino asitlerin dengesi sağlanmakta ve kullanılabilirliği kolaylaşmaktadır. Yine benzer şekilde, gıdaların tiamin, riboflavin, niasin ya da folik asit gibi vitamin içerikleri zenginleşmekte veya kullanılabilirliği artmaktadır (Steinkraus 1997).

Çeşitli bölge ya da yörelerden elde edilen gıda hammaddelerinin fermantasyon prosesiyle işlenmeleri sonucu ortaya çıkan geleneksel fermente gıdalar, o bölge ya da yörelere has doğal mikroflora ve üretim yöntemleri sonucu, çeşitli fonksiyonel özellikler taşıyabilmektedirler. Bunlar; gıdada tat, aroma ve dokunun gelişimiyle birlikte diyeti zenginleştirmek; laktik asit, asetik asit ve alkol fermantasyonları sayesinde gıdaları önemli oranda muhafaza etmek; proteinler, esansiyel amino asitleri, esansiyel yağ asitleri ve vitaminler açısından gıdaları zenginleştirmek; gıda



fermantasyonu süresince detoksifikasyonu sağlamak; pişirme süresinde azalma gerçekleştirmektir (Steinkraus 1995).

Bunların yanı sıra, geleneksel gıdaların üretilmesine bağlı olarak ortaya çıkabilecek önemli sosyal öğeler de söz konusudur. Kırsal ve kentsel çevrelerin her ikisinde de iş fırsatları ve gelir elde etme olanakları sağlanması sonucu fakirlikte (yoksullukta) azalma potansiyeli oluşturabilir. Buna bağlı olarak; sürdürülebilir bir geçim kaynağı modeli ve düşük gelirlili kent insanları için elverişli bir üretim şekli olabilmesinin yanında, geleneksel adet ve inançlarla ilişkilendirilmesi sonucu ilgili bölgeye kültürel bir kimlik kazandırabileceği de belirtilmektedir (Mavhungu 2005).

Sebzelerin yetiştiği her yerde, bir gıda işleme yöntemi olarak fermentasyon uygulaması söz konusudur. Çünkü fermentasyon, çok eski ve etkin bir muhafaza yöntemi olmasının yanı sıra, sezon dışında ve uzun mesafelerde gıdaların bozulmadan tüketilebilmesini sağlayan bir yöntemdir. Ayrıca; sebze fermentasyonu lezzet olarak farklı, beslenme özellikleri açısından da değerli bir son ürün sunmaktadır. Fermente sebzelerin üretimi, çoğunlukla, kuru tuzlama veya salamuraya (tuzlu suya) bırakma yöntemlerinin uygulanmasıyla gerçekleşmektedir. Bu yöntemlerle uygulanan fermente sebze teknolojisinin, 2000 yılı aşkın bir süre önce Avrupa, Orta Doğu ve Asya ile Amerika'nın birkaç ülkesinde başladığı bildirilmektedir. Buna göre, genellikle, tuz veya salamura, işlenmemiş (çiğ) materyale bir koruyucu olarak eklenmekte ve sonra, çeşitli katkılarla ve uygun sıcaklıkta depolamayla fermente ürün elde edilmektedir (Hutkins 2006, Breidt 2007).

Fermente sebze teknolojisinin temeli laktik asit fermentasyonuna dayanmaktadır. Birçok Orta Asya, Orta Doğu ve Afrika ülkelerinde laktik asit fermentasyonu ile elde edilmiş gıdalar yaygın olarak tüketilmektedir. Bu gıdaların, söz konusu ürünlerin fermente edilmemiş halleriyle kıyaslandığında, besinsel değerleri ve sindirilebilirlikleri oldukça yüksektir. Ayrıca; laktik asit fermentasyonu sonunda ürünün organoleptik özelliğinin iyileştiği, fermentasyon sırasında pH'nın ve oksidasyon-redüksiyon potansiyelinin düşürülmesi, inhibitör bileşiklerin üretilmesi ve esansiyel besinler için

rekabet edilmesi sonucunda çoğu bozulmanın engellendiği ve birçok patojen mikroorganizmanın inhibe olduğu belirtilmektedir (Karapınar ve Hancıoğlu 1997).

Laktik asit fermantasyonunun gerçekleştiği önemli proseslerden biri turşudur. Turşu en yaygın tanımıyla; meyve ve sebzelerin belli konsantrasyonlarda tuz içeren salamura veya kendi öz suları içinde, laktik asit bakterilerince fermente edilmesiyle oluşan veya dışarıdan ilave edilen laktik asidin ve ortamdaki tuzun koruyucu etkisi sonucu dayanıklılık kazanan bir üründür (Aktan vd. 1998). Bu tanımla beraber turşu üretiminde, laktik asit fermantasyonu ve tuzun önemli iki temel faktörü oluşturduğu görülmektedir. Turşu fermantasyonunda, hammaddeden gelen doğal flora içerisindeki laktik asit bakterilerinin, şekerleri asitlere dönüştürmesi ile laktik asit fermantasyonu gerçekleşmekte ve hammaddeye göre farklı ürünler elde edilmektedir (Hutkins 2006). Laktik asit fermantasyonu ile ayrıca, mikrobiyal bozulmaya ve toksin üretimine karşı gıdalarda direnç sağlanmakta, patojenik mikroorganizmaların gelişimi engellenmekte, ürünün besinsel değeri artırılmaktadır (Steinkraus 1983). Üretimde kullanılan salamura içindeki tuzun, konsantrasyonuna bağlı olarak, turşuda mikrobiyal aktivitenin boyutunu ve tipini belirlemek, hammaddedeki pektinolitik ve proteinolitik hidrolizleri sınırlayarak ürün dokusunda yumuşamayı kontrol etmek ve bozulmanın engellenmesine yardımcı olmak gibi önemli görevleri bulunmaktadır (Steinkraus 1983, Fleming vd. 1992).

Meyve ve sebzelerin dayanıklı hale getirilmesi amacıyla geliştirilen bir yöntem olan turşu, çoğunlukla hıyarla ilişkilendirilen bir ürün konumundadır (Aktan vd. 1998). Fakat çok sayıda meyve ve sebzelerin laktik asit fermantasyonuna tabi tutulmasıyla çok çeşitli turşular elde edilebilmektedir. Lahana, biber, taze fasulye, patlıcan, kavun, kiraz, kapari hıyardan sonra üretimi yaygın olarak gerçekleştirilen turşu çeşitleridir. Bitkisel kökenli gıda ürünlerinin içerdikleri bileşenler oldukça önemlidir. Meyve ve sebzeler, içerdikleri yüksek miktardaki mineraller, vitaminler, diyet lifleri, fenolik maddeler ve antioksidan fitokimyasallar gibi fonksiyonel gıda bileşenleri açısından oldukça zengin ve sağlıklı gıdalardır (Luckow ve Delahunty 2004). Meyve ve sebzelerin, turşuya işlenmeleri sırasında bu özelliklerinin turşuya yansması, turşunun besin içeriği bakımından önemlidir. Meyve ve sebzelerin diyetlerde çok miktarda yer alması birçok tüketim şekli oluşturmaktadır. Taze tüketilmesinin yanı sıra pastörize edilmiş, pişirilmiş, haşlanmış,

mikrodalgada pişirilmiş olarak tüketimi söz konusudur. Ancak, uygulanan işlemlerle meyve ve sebzeler çabuk bozulabilmekte, fiziksel ve kimyasal özellikleri istenmeyen doğrultuda değişebilmektedir. Laktik asit fermantasyonunun basit ve önemli bir biyoteknolojik işlem olarak meyve ve sebzelere uygulanması sonucunda, meyve ve sebzelerde gıda güvenliği, raf ömrü, beslenme ve duyuşsal özellikler sürdürülebilme ve iyileştirilebilmektedir (Muñoz vd. 2009).

Turşu üretim yöntemleri temel olarak ikiye ayrılmaktadır (Aktan vd. 1998):

1) Laktik asit fermantasyonu: Laktik asit bakterileri tarafından gerçekleştirilen fermantasyon sonucu oluşan laktik asit ve ortamdaki tuzun koruyucu etkisiyle turşu elde edilir. Fermantasyonun iki farklı uygulaması söz konusudur. En yaygın yöntem olarak yer alan ‘asitli salamuralı fermantasyon’ uygulamasında, asetik asit ve salamura içindeki hammadde fermantasyona tabi tutulur. Bir diğere yöntem olan ‘salamuralı fermantasyon’ uygulamasında ise salamura içindeki hammadde fermantasyona bırakılır. Bu şekilde uygulanan işleme ‘stok işleme’ adı da verilmektedir.

2) Konserve: Fermantasyon işlemi yapılmaksızın, doğrudan kavanoz veya teneke kutulara yerleştirilen hammadde üzerine asit ve tuzdan oluşan salamuranın konularak, pastörizasyon prosesinin uygulandığı yöntemdir. Üretim amacına bağlı olarak bu yöntem de iki farklı şekilde uygulanmaktadır. Kavanoz veya tenekelelerdeki asit ve tuz içeren salamura içerisine hammaddenin konularak pastörizasyon işleminin gerçekleştiği ‘kavanoz veya teneke işleme’ ilk yöntemi oluşturmaktadır. Diğere bir uygulama ise kampanya dönemini uzatmak ve yıl boyunca işletmeyi çalışır halde tutmak amacıyla, hammaddenin daha sonra kavanoz veya tenekelelere işlenmek üzere sirkeli salamura içinde bekletilmesine dayalı stok veya yarı mamul işlemedir.

Turşulardaki laktik asit fermantasyonu, bir üretim tekniğı olarak tüm turşularda uygulanmamaktadır. Laktik asit fermantasyonu gerçekleştirilmeksizin üretilen turşular, Amerika’da tüketilen turşuların yaklaşık yarısını oluşturmaktadır. Bu durumda, salamuraya koruyucu olarak asetik asit katılmakta ve fermantasyon aşaması atlanarak turşu üretilmektedir. Çoğunluk itibariyle, fast-food tarzı yiyeceklerde bu şekilde

üretmiş turşular kullanılmaktadır. Amerika'da turşular genellikle üç grupta toplanır. Üretim proseslerinin farklı olması nedeniyle; taze paketlenmiş, soğutulmuş ve fermente edilmiş turşular olarak gruplandırılır; Taze paketlenmiş turşular, sirke ve çeşitli tatlandırıcılarla karıştırılarak ve pastörize edilerek üretilen turşulardır. Soğutulmuş turşular, yine sirke ve çeşitli tatlandırıcıların katıldığı, ısı işlem olarak soğutmanın uygulandığı, zayıf bir fermantasyon işleminin gerçekleştirildiği turşu grubunu oluşturur. Fermente edilmiş turşular ise, gerçek turşu olarak da nitelendirilir ve bu turşu çeşidinde, tam olarak bir fermantasyon uygulanmasıyla diğer turşulardan oldukça farklı tat, aroma ve tekstür oluşumu söz konusudur (Hutkins 2006).

Meyve ve sebzelerin doğal florası maya, küf ile Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler olmak üzere oldukça fazla miktarda ve çok çeşitli mikroorganizma gruplarını içermektedir. Bahsedilen mikroorganizma gruplarının içerisinde, hammaddenin, kendi doğası gereği doku yüzeyinden ve havadan kaynaklanan, turşuda esas olarak fermantasyonu gerçekleştiren laktik asit bakterilerinin dışında, istenmeyen mikroorganizmalar da bulunabilmektedir. *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus* ve çeşitli küf türleri hammadde üzerinde baskın olarak yer almaktadır. Bununla birlikte *Enterobacter*, *E. coli*, *Klebsiella* gibi fakültatif anaeroblar ile *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia* ve *Rhodotorula* gibi çeşitli mayalar da bulunmaktadır (Hutkins 2006). Laktik asit bakterilerinin miktarı değişken olmakla birlikte, UV ışınları, sıcaklık ve kullanılabilir besinler gibi faktörler sayılarının sınırlı olmasını etkilemektedir (Fleming vd. 1987). Turşu fermantasyonunu gerçekleştiren başlıca *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* cinslerine ait laktik asit bakterilerinin sebzelerde düşük seviyelerde yer alması şaşırtıcıdır. *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Escherichia* ve *Bacillus* cinslerinin toplam popülasyonu  $10^7$  kob/g gibi yüksek bir seviyedeysen, laktik asit bakterileri yaklaşık  $10^3$  kob/g seviyesindedir (Hutkins 2006).

Turşularda laktik asit fermantasyonu ürün kalitesi açısından oldukça önemlidir. Ayrıca, fermantasyonun seyrini etkileyen oldukça karmaşık, değişken (kararsız) ve birbirine bağlantılı olan faktörler de söz konusudur. Salamura uygulamaları, çevresel koşullar ve başlangıçtaki mikrobiyal popülasyon öncelikli faktörleri oluşturmaktadır (Etchells vd. 1975).

Fermantasyonda mikrobiyal aktivite için, laktik asit bakterilerinin gelişmesini teşvik edecek ve laktik olmayan floranın baskılanmasını sağlayacak şekilde ortam koşullarının ayarlanması gerekmektedir. Sebzelerdeki laktik asit bakteri seviyesi düşük olsa bile, birkaç faktörün bir arada oluşturulmasıyla birlikte turşunun olgunlaşması için gerekli ortam yaratılabilir. Yeterli tuz miktarı, uygun sıcaklık ve anaerobik ortam temel faktörleri oluşturmaktadır. Ayrıca, kontrollü bir fermantasyon ile koşulları standardize edilmiş bir prosesin uygulanması yararlı olabilmektedir. Starter kültür kullanımına bağlı olarak gerçekleştirilen kontrollü fermantasyon ile istenilen doğrultuda fermantasyonun sağlanabileceği belirtilmektedir (Hutkins 2006).

Turşu yapımında hammaddenin salamuraya konulmasıyla birlikte, florasından kaynaklanan mikroorganizmalar ile doğal bir fermantasyonun başladığı ve doğal fermantasyonun daha çok uygulandığı bildirilmiştir (Palop vd. 2000). Bu sırada laktik asit bakterilerinin aktivitesini ve ürün kalitesini önemli derecede etkileyebilecek mikrobiyal etkileşimler gerçekleşmektedir (Fleming vd. 1987). Floranın doğal fermantasyon süresince değişmesi nedeniyle fermantasyon başlangıç, birincil fermantasyon, ikincil fermantasyon ve fermantasyon sonrası olmak üzere dört aşamayla kategorize edilir. Bu aşamalar sırasında florada birtakım değişimler meydana gelmektedir. Hammaddenin salamura içerisine yerleştirilmesiyle, hızlı bir şekilde mayalar ile Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerinin geliştiği gözlenir. Başlangıç pH değeri 5,5 seviyesindedir ve mevcut fermente edilebilir şekerlerden glikoz ve früktoz, laktik asit bakterileri için uygun substrat konumundadır (Fleming vd. 1987). Aerobik spor oluşturan mikroorganizmalardan *Enterobacteriaceae* üyeleri de aynı substrat için rekabetçi durumundadır. Bu aşamanın sonunda, pH'nın düşmesiyle laktik asit bakterileri üstün konuma gelir ve birincil fermantasyon başlar. Bu aşamada laktik asit üreten beş bakteri türünün aktif olduğu ve gelişimlerine göre muhtemel sıralamasının; *Streptococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus cerevisiae*, *Lb. brevis* ve *Lb. plantarum* şeklinde olduğu bildirilmektedir (Fleming vd. 1992). Tuzun etkisiyle birlikte, genel bir sıralamayla laktik asit bakterilerinden *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Lb. plantarum* türleri toplam asidin üreticileri olarak baskın konuma geçmektedirler. Bu sıralamayı türlerin başlangıçtaki sayıları, gelişme oranları, tuz ve asit dirençlilikleri etkilemektedir. *L. mesenteroides*'in aside direnci diğer

bakteriler kadar yüksek olan bir tür olmasa da, fermantasyonu başlatan mikroorganizma olduğu, bunun nedeninin hammaddede diğer laktik asit bakterilerine oranla daha yüksek miktarda bulunmasından kaynaklandığı belirtilmektedir (Fleming vd. 1987). Asit direnci çok yüksek olan *Lb. plantarum* ise fermantasyonu sonlandıran mikroorganizma olarak rol oynamaktadır (Fleming vd. 1992).

Laktik asit bakterileri (LAB) dışında hammadde florasındaki diğer mikroorganizmalardan mayalar da birincil fermantasyon aşamasında aktiftirler. Eğer birincil aşamadan ortamda fermente edilebilir şeker kalırsa ikincil fermantasyon aşamasında da yer alırlar (Fleming vd. 1992). Mayaların oksidatif ve fermantatif faaliyetleri bozulma etmeni olarak değerlendirilir ve fermantasyonda yer almaları, genellikle istenmez. Fermantatif mayaların oluşturduğu CO<sub>2</sub> kaynaklı bozulmalara neden olurlar. Oksidatif mayalar ise fermantasyonla oluşan laktik asidi kullanarak asitliği azaltırlar ve diğer bozulma etmenlerinin faaliyetlerine olanak verirler. Bunların dışında, artık şekerleri kullanarak fermantasyonu tamamlamaları ile ürüne yönelik olumlu etki de sağlayabilirler. Ayrıca, metabolizmaları sonucu diasetil gibi aroma maddeleri üreterek, az da olsa, ürünün aroma gelişimine yardımcı olurlar. Bir diğer mikroorganizma grubu olan küfler ise selülitik ve pektinolitik aktiviteleri ile turşularda yumuşamaya neden olduklarından gelişmeleri istenmez (Aktan vd. 1998).

Son aşamada ise fermantasyonun seyri, gerçekleştirildiği kabın (tankın) açık ya da kapalı olmasına göre değişmektedir. Çünkü tankın açık veya kapalı olması mikroorganizmaların gelişimini etkilemektedir. Eğer kapalı tanklar kullanılıyorsa herhangi bir mikrobiyal aktivite söz konusu değildir. Açık tanklarda ise salamura yüzeyinde tüm mikroorganizmalar gelişebilmektedir (Aktan vd. 1998).

Doğal fermantasyonla, tüketilebilirlik anlamında, genellikle kabul edilebilir ürünler elde edilmekte, ancak son üründe bozulmalar meydana gelebilmektedir (Daeschel ve Fleming 1987). Bunların dışında, fermantasyonun kontrol ve güvenliğinin sağlanamamasına bağlı olarak ürüne istenen niteliklerin kazandırılmaması, ürün ve üretime yönelik standardizasyonun oluşturulamaması ile ardışık bir üretimin

sağlanamayarak talebin etkin bir biçimde karşılanamaması doğal fermantasyona ilişkin olumsuzlukları yansıtmaktadır. Kontrollü fermantasyon uygulamasının sonucunda ise oluşabilecek olumsuzluklar giderilebilmekte, fermantasyon istenilen doğrultuda yönlendirilebilmekte ve gelişmesi istenen starter kültür için gerekli çevre koşulları sağlanabilmektedir (Özçelik ve İç 1996).

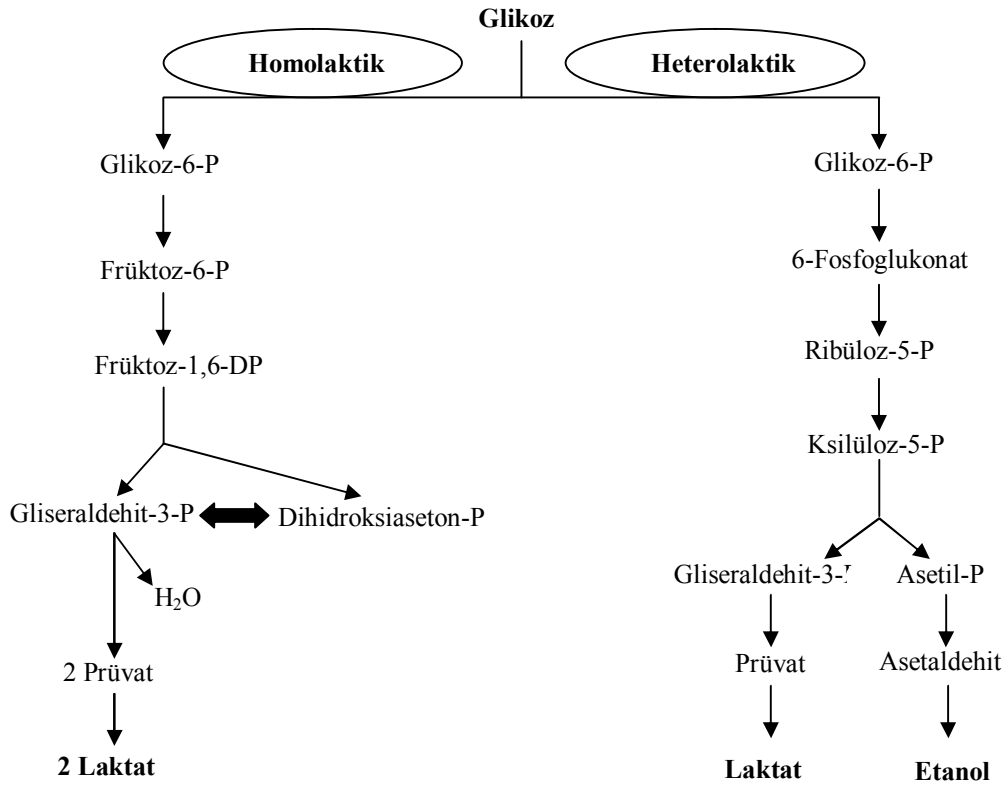
## 2.2 Laktik Asit Bakterileri (LAB)

Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılmasına ilişkin yapılan çalışmalarda, morfolojik açıdan çok değişken özellik gösteren bir familya olduğu ve üyelerinin ise fizyolojik açıdan oldukça benzerlik gösterdiği ortaya konulmuştur. Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında geleneksel olarak kullanılan taksonomik sınıflandırmanın temeli; fizyolojik, morfolojik, farklı sıcaklık, farklı pH değerleri ve tuz konsantrasyonlarında gelişme yeteneği, arjinin parçalanması ve karbonhidrat katabolizması gibi biyokimyasal özelliklerin incelenmesini içeren fenotipik özelliklere dayanmaktadır (Gobbetti vd. 2005, Botina 2006). Tüm LAB üyeleri Gram pozitif, katalaz negatif, *Sporolactobacillus inulinus* hariç spor oluşturmeyen, fakültatif anaerobik, *Pediococcus* cinsi hariç tek düzlemde bölünen ve bazı istisnalar hariç hareketsiz, çubuk ya da kok şekilli, oksidaz ve benzidin negatif bakteriler olarak tanımlanmaktadır. Mutlak fermantatif olmalarının yanı sıra fermantasyon ürünü olarak laktik asit üretmektedirler. Hem grubu (katalaz, sitokrom) içermeksizin oksijen varlığında gelişebilen nadir mikroorganizma özelliğini taşımaktadırlar. LAB'nin doğal olarak buldukları yaşam alanları süt ve süt ürünleri, işlenmemiş taze veya çürümüş bitkiler, insan ve hayvanların bağırsak mukoza ve içerikleridir (Carr vd. 2002, Karasu 2006). Gıdalarla ilişkilendirilen LAB ise, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Wiessella*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus* ve *Leuconostoc* cinslerinden oluşmaktadır (Vandamme vd. 1996).

LAB'nin fermantasyon sonucu oluşturduğu ürünler (Şekil 2.1), genetik ve fizyolojik farklılıklara bağlı olarak glikozun parçalanması ile değişiklik gösterir ve bu şekilde bakteriler homofermantatifler ve heterofermantatifler olarak gruplandırılır (Jay 2005).

Homofermantatif iz yolunun takibi sonucu şekerin % 90'dan fazlası laktik aside dönüşürken, heterofermantatif iz yoluyla % 50 kadarı laktik aside, kalan kısmın % 20-25'i CO<sub>2</sub>'e ve % 20-25'i de asetik asit ile etanole dönüşür (Titsler vd. 1952, Hutkins 2006).

Homofermantatifler aldolaz ve heksoz izomeraz enzimlerine sahiptir, ancak fosfoketolaz enzimleri yoktur. Bu nedenle, Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) iz yoluna göre 2 laktat/glikoz oluştururlar. Heterofermantatiflerin ise fosfoketolaz enzimleri vardır, ancak aldolaz ve heksoz izomeraz enzimlerinden yoksundurlar. Bu sebeple, glikozu indirgemek için heksoz monofosfat (HMP) ya da früktoz-6-fosfat iz yolunu kullanırlar ve laktik asidin yanı sıra son ürün olarak CO<sub>2</sub>, asetik asit ve etanol oluştururlar (Jay 2005). LAB temel olarak dört büyük cinsten oluşur; *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* (Carr vd. 2002).



Şekil 2.1 Laktik asit bakterilerinin glikozu homolaktik ve heterolaktik yollarla parçalaması (Fitzgerald ve Caplice 1999)



### 2.2.1 *Lactobacillus*

*Lactobacillus* cinsi sekizden fazla tür içermekle birlikte, yapıla gelen taksonomik çalışmalarla birlikte 2005 yılı Ocak ayına ait son verilere göre, bu cinse yedi yeni tür ve alt tür eklenmiştir. Bu cinse ait tüm üyeler spor oluşturmeyen, çomak şeklinde bakteri olmakla birlikte bu tanımlama morfolojik açıdan yeterli değildir. Çünkü, farklı boyutlardaki çubuk uzunluklarının yanı sıra kıvrık, eğri veya oldukça ince formda olmak üzere çok değişik şekillerde bulunabilmektedirler. Ayrıca, koloni morfolojisi agar plaklarında değişken olabilmekte; bazı koloniler geniş yuvarlak formlar oluştururken, bazıları küçük ya da düzensiz koloniler oluşturabilmektedir. *Lactobacillus* cinsi, diğer LAB cinsleri içinde ekolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve genetik yapı olarak en çok çeşitlilik gösteren grup olarak yer almaktadır. *Lactobacillus* türleri ekolojik olarak geniş bir yaşam alanında yer almaları nedeniyle doğada her yerde bulunabilen organizma olarak tanımlanırlar. Meyve ve sebzelerde, süt ve et ürünlerinde, meyve suları ve fermente içeceklerde, tahıl ürünlerinde, hayvan ve insan bağırsak sistemlerinde bulunurlar (Hutkins 2006).

Laktobasil gurubu, sahip oldukları farklı fizyolojik özellikleri sonucunda mezofilik, psikrotrofik, termodurik ve termofilik türler içermektedir. Optimum gelişme sıcaklık aralığı geniş olmakla birlikte, 30-45 °C'de gelişebilirler. Bazı türleri, düşük su aktivitesine, yüksek tuz konsantrasyonuna ve ozmotik basınca dirençlilik gösterir. Bazı türleri ise etanol-tolerant ve safra-tolerant olarak nitelendirilir. Ayrıca, birçok tür de aero-tolerant özelliğindedir (Hutkins 2006). Gıdalarda pH 4 seviyesinde asit üretebildikleri ve bu asit seviyesine dayanabildikleri için asidurik veya asidofilik özelliktedirler (Holzaphel ve Stiles 1997).

Farklı iz yolları kullanarak şekerleri metabolize ederler (Holzaphel ve Stiles 1997). Früktoz-1,6-bisfosfat aldolaz enziminin varlığına bağlı olarak fizyolojik açıdan zorunlu homofermantatif, fakültatif heterofermantatif ve früktoz-1,6-bisfosfat aldolaz enzimini içermeyen zorunlu heterofermantatif şeklinde üç gruba ayrılırlar (Fitzgerald ve Caplice 1999). *Lactobacillus* cinsinin yaklaşık üçte birlik bir kısmını heterofermantatif türler

oluşturur (Holzaphel ve Stiles 1997). Zorunlu homofermantatifler, heksozları EMP yolu ile laktik aside indirgeyebilirken, pentozları ve glukonatu parçalayamazlar. Fakültatif heterofermantatif grup, heksozlardan EMP yoluyla laktik asit oluşturmasının yanı sıra asetik asit, formik asit ve etanol de oluşturabilirler. Pentoz fosfoketolaz içermeleri nedeniyle pentoz şekerleri laktik asit ve asetik aside fermente edebilmektedir. Son grup olan zorunlu heterofermantatifler ise fosfoglukonat iz yoluyla heksozları laktik asit, asetik asit, etanol ve CO<sub>2</sub>'e parçalar. Pentozları ise laktik asit ve asetik aside fermente ederler (Fitzgerald ve Caplice 1999). Metabolik çeşitliliklerine bağlı olarak birçok tür zengin besin ortamına ihtiyaç duyar. Proteolitik ve lipolitik olmadıklarından hızlı gelişme için amino asitlere, peptidlere ve yağ asitlerine gereksinim duyarlar. Bazı suşların gelişebilmesi için özellikle çeşitli vitamin, nükleotid ve diğer besinlere gerek vardır. Fermente edilebilir karbonhidratlar temel besini oluşturmakla beraber glikoz, früktoz, laktoz gibi şekerlerin yanı sıra mannitol, sellobiyoz gibi şekerleri fermente edebilen türler de mevcuttur (Hutkins 2006). Genel olarak laktik asit bakterilerinin % 35-40 gibi düşük bir guanin, sitozin (G+C) oranına sahip olmalarına rağmen, genetik yapı olarak çok çeşitlilik gösteren *Lactobacillus* türleri, % 32 - % 55 G+C oranına sahip olmaktadır (Hutkins 2006).

Orla ve Jensen (1919) tarafından *Lactobacillus* cinsi, glikoz fermantasyonu süresince oluşturdukları laktik asidin miktarına göre homofermantatif ve heterofermantatif olarak sınıflandırılmaktadır. Ayrıca, değişik sıcaklık isteklerine ve biyokimyasal reaksiyonlarına göre *Betabacterium*, *Streptobacterium* ve *Termobacterium* olmak üzere üç gruba ayrılmıştır (Mavhungu 2005).

*Betabacterium*: Glikozdan CO<sub>2</sub> oluşturan heterofermantatif *Lactobacillus* türlerini içeren bir gruptur. Beslenmeleri sırasında tiamine gereksinimleri vardır. Optimal gelişme sıcaklıkları 15 °C'dir. *Lb. brevis* ve *Lb. fermentum* fermente gıdaların üretiminde önemli türleri oluşturmaktadır. Schillinger'e göre *Betabacterium* iki temel gruba ayrılmıştır: Riboz ve arginin negatif olan *L. fructosus*, *L. sanfrancisco*, *L. viridescens*; ribozu fermente edebilen ve arginini hidrolize eden *L. buchneri*, *L. carnis*, *L. collinoides*, *L. confusus*, *L. divergens*, *L. fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. halotolerans*, *L. kandleri*, *L. kefir* ve *L. minor* (Carr vd. 2002).

*Streptobacterium*: Çoğu gıda ürünlerinde ve endüstriyel fermantasyonlarda kullanılan oldukça geniş bakteri türü içeren homofermantatif bir gruptur. Doğal habitat olarak lahana gibi çeşitli bitkiler, mısır, süt ve peynirlerde bulunurlar. Ayrıca kırmızı et ve vakumla paketlenmiş etlerde de yer alırlar (Carr vd. 2002). Riboz ve pentoz şekerlerini fermente edebilirler, glikoz yerine glikonattan CO<sub>2</sub> oluştururlar, en uygun gelişimi 30 °C'de gösterirler ve % 1,5 üzerinde laktik asit üretebilirler (Carr vd. 2002, Jay 2005). Schillinger vd. (1987)'ne göre, *Streptobacterium* grubu mannitolu fermente edebilme özelliklerine göre iki ana gruba ayrılmıştır. Mannitol pozitif grup; *L. agilis*, *L. casei* spp. *casei*, *L. casei* spp. *rahamnosus*, *L. casei* spp. *pseudopiantarum*, *L. coryniformis*, *L. maltaromicus*, *L. piscicola*, *L. plantarum*. Mannitolu kullanmayan grup ise; *L. alimentarius*, *L. amylophlus*, *L. bavaricus*, *L. casei* spp. *tolerans*, *L. curvatus*, *L. farciminis*, *L. sake*, *L. sharpeae*, *L. yamanashiensis* (Carr vd. 2002).

*Thermobacterium*: Termofilik ve homofermantatif olan bu grup ne glikoz ne de glikonattan CO<sub>2</sub> oluşturabilir. Optimal gelişme sıcaklıkları 40-45 °C'dir, 15 °C'de gelişemezler ve % 30'un üzerinde laktik asit üretebilirler. Ribozu fermente ve arginini hidolize edemezler. *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* spp. *lactis*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. leichmanii*, *L. salivarius* bu grubu oluşturan türlerdir (Carr vd. 2002).

### **2.2.2 *Leuconostoc***

İlk olarak Van Tieghem tarafından (1878) keşfedilen bu bakteri cinsi (Mavhungu 2005), Gram pozitif, heterofermantatif, kok şeklinde olup, çiftler ya da zincirler halinde bulunur ve hareketsizdir (Carr vd. 2002). Spor oluşturmayan fakültatif anaerobik bu bakteri cinsi agarlı besi yerinde küçük, gri (boz) ve flat (yassı) koloniler oluşturur (Hucker vd. 1957). Katalaz ve arginin negatif olup sitokromları yoktur. Ayrıca; proteolitik aktivite göstermez, indol oluşturmaz ve nitratları indirgeyemez (Sneath vd. 1986). Glikozdan, D (-) formda laktat oluşturur. *Lactobacillus* ve *Pediococcus* cinslerine göre gelişebilmek için 4,5 ve üzerinde pH değerlerindeki ortama gereksinim duyar (Carr vd. 2002). LAB arasında bitkilerde baskın tür olarak yer alan *Leuconostoc*

cinsi, meyve ve sebzelerin yüzeyi ve içi, süt ürünleri gibi farklı doğal yaşam alanlarında bulunur (Mavhungu 2005). Birçok süt ürününün fermantasyonunda, sauerkraut, turşu ve çeşitli et ürünlerinin üretiminde önemli roller üstlenir (Kitchell ve Shaw 1975) Gıdalarda *Leuconostoc* türlerini önemli kılan birkaç özellik söz konusudur: Diasetil ve diğer aroma bileşikleri üretebilirler ve böylece çeşitli gıdalara karakteristik olabilecek nitelikte aroma sağlarlar. Tuza direnç göstererek, sauerkraut ve dereotu turşu fermantasyonlarında, *Leu. mesenteroides* türü ile laktik asit fermantasyonun ilk aşamasını gerçekleştirirler. Sebze ürünlerinde fermantasyonu diğer laktiklere göre daha hızlı bir şekilde başlatabilirler. Yüksek şekere dirençlilikleri (özellikle % 55-60'lara kadar direnç gösterebilen *Leu. mesenteroides*) ile şuruplarda, sıvı keklerde ve dondurma karışımlarında gelişebilirler (Mavhungu 2005).

### 2.2.3 *Lactococcus*

*Lactococcus* cinsi filogenetik yapısına göre beş farklı türden oluşmaktadır: *L. garviae*, *L. lactis*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* (Hutkins 2006). Laktik asit fermantasyonlarına ilişkin, laktokoklar üzerinde yapılan genetik çalışmaların merkezini kazein parçalanması, sitrattan diasetil üretimi ve faj saldırılarına dirençlilikleri oluşturmaktadır. Ayrıca, bakteriyosin gibi inhibitör maddelerini üretme özellikleri de çalışılan konular arasında yer almaktadır. *Lactococcus* cinsi, endüstriyel starter kültür teknolojisinde uzun bir geçmişe ve geniş bir kullanım alanına sahiptir (Holzaphel ve Stiles 1997). Türlerin hepsi hareketsiz, zorunlu homofermantatif, fakültatif anaerob ve optimum gelişme sıcaklığı 30 °C'dir. 10 °C'de gelişme gösterebilmeleri ile *Streptococcus* cinsinden, 45 °C sıcaklığında gelişmemeleri ile de *Enterococcus* cinsinden ayrılırlar (Carr vd. 2002, Kıran 2006). Mikroskopik morfolojisinde değişkenlik göstermesiyle birlikte, genellikle çift ya da zincir koklar halinde yer alırlar (Hutkins 2006). Yaygın olarak çiğ süt ve süt ürünlerinde bulunurlar (Carr vd. 2002).

*L. lactis*'in, ekonomik olarak oldukça değerli olan *L. lactis* spp. *lactis* (önceki sınıflandırmaya göre adı *L. lactis* spp. *diacetylactis*) ve *L. lactis* spp. *cremoris* olmak üzere iki alt türü bulunmaktadır. Bu nedenle, gıdalar üzerindeki etkilerinin

araştırılmasına yönelik biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri çalışılmıştır. LAB arasında ticari olarak en önemli türleri oluşturmakla birlikte, fermente süt ürünlerinde önemli görevler üstlenmişlerdir (Holzaphel ve Stiles 1997). Sert peynirlerin çoğunun ve birkaç kültürlü süt ürünlerinin üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadırlar (Teuber 1995). *Cl. botulinum* gibi çeşitli Gram pozitif bakterilere ve sporlarına karşı etki gösteren lantibiyotik ve nisin gibi önemli bakteriyosinleri üretme yeteneğindedirler (Holzaphel ve Stiles 1997).

#### **2.2.4 *Pediococcus***

1884 yılında Wochnschre F. Balcke tarafından tanımlanan zorunlu homofermantatif *Pediococcus* cinsi, hücre organizasyonu gereği ‘Sarcinae’ olarak bilinmekteydi. Mikroskopik morfolojisi incelendiğinde iki düzlemde bölünerek tetrad yapı gösterdiği anlaşılmıştır. Bu özelliği ile LAB arasında tek cins konumundadır (Sakamoto ve Konings 2003, Mavhungu 2005). Biralarda bozulmaya sebep olması nedeniyle, Louis Pasteur tarafından çalışılan ilk bakteriler arasında yer almaktadır (Holzaphel ve Stiles 1997). Amonyak tuzlarını azot kaynağı olarak kullanamadığından ve nitratları nitritlere indirgeyemediğinden karmaşık (kompleks) nitrojen bileşiklerine gereksinim duyar. Fakültatif anaerobik olan bu LAB cinsi, EMP iz yoluyla glikozu fermente eder ve CO<sub>2</sub> üretmeksizin L (-) veya DL (-) formda laktat oluşturur. Bitki ve hayvanlara apatojenik olan tüm *Pediococcus* türleri bitki materyalleri, süt, tuzlu sular, hayvan idrarı ve bira gibi doğal yaşam alanlarında bulunmaktadır (Mavhungu 2005, Hutkins 2006).

16S rRNA sekans analizlerine göre Pediokoklar 6 tür içermektedir; *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus*. Yeniden sınıflandırılması sonucunda *P. halophilus* türü *Tetragenococcus* cinsine dahil edilmiştir. Optimum gelişme sıcaklıkları 25 °C ile 50 °C arasındadır. 4,2 pH değerindeki asidik ortamda ve % 6,5 oranındaki tuz konsantrasyonunda yaşabilmeleri ile diğer laktik asit bakterilerinden ayrılmaktadırlar (Hutkins 2006).

*P. acidilactici* ve *P. pentosaceus* türleri doğal olarak çiğ sebzelerde bulunurlar ve uygun koşullar altında fermente sebzelerin üretiminde anahtar rol üstlenirler (Hutkins 2006). Ayrıca, özellikle farklı tip sosislerde starter kültür olarak ve peynirlerin olgunlaştırılma aşamasında kullanılmaları söz konusudur (Carr vd. 2002, Hutkins 2006). *P. acidilactici* ve *P. pentosaceus* bakteriyosin üretme yeteneğinde olan türlerdir. *P. pentosaceus*, Pediosin A üretmesi sonucu fermente sebzelerde koruyucu özellik gösterir (Mavhungu 2005). Bunların yanı sıra, *P. damnosus* türü biralarda diasetil üretmesi nedeniyle ciddi sorunlar oluşturmaktadır (Sakamoto ve Konings 2003).

### 2.3 Turşularda Yer Alan Laktik Asit Bakterileri

*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* ve *Tetragenococcus* cinsleri doğrudan gıda fermantasyonlarıyla ilişkili LAB'dir. Ayrıca, *Enterococcus* cinsi de gıda fermantasyonlarında yaygın olarak yer almaktadır (Hutkins 2006). Karbonhidratlardan laktik asit ve diğer asitleri üretebilmesi LAB'nin önemli ve temel özelliğini oluşturmaktadır (Radler 1975). *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* tanımlamaya ilişkin LAB'nin karakterini taşıyan başlıca cinsler olup, bitkilerle ilişkilendirilen cinsleri de kapsamaktadır. Söz konusu cinslere ait türler arasında; *L. arabinosus*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. fermentum*, *L. leichmannii*, *L. plantarum*, *Leu. dextransicum*, *Leu. mesenteroides*, *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. pentosaceus*, *Stp. faecalis*, *Stp. faecalis* var. *liquefaciens*, *Stp. faecium*, *Stp. lactis* yer almaktadır (Fleming vd. 1987, Nout ve Rombouts 1992). Bununla birlikte, genel olarak meyve ve sebze fermantasyonlarıyla ilişkilendirilen LAB türleri çizelge 2.1'de verilmiştir (Muñoz vd. 2009).

Turşu yapımı, gerek dünya çapında gerek Çubuk turşularında çoğunluk olarak hıyar materyali üzerinden gerçekleştiğinden, turşunun hammadde kaynaklı mikroorganizma içeriği de hıyar üzerinden incelenmiştir. LAB'nin sayıları hıyarlarda oldukça düşük olmasına karşın salamuralı ortama hemen adapte olup, hızla gelişmeye başlarlar. Hammadde kaynaklı diğer mikroorganizmalardan koliform grubu bakteriler, fermantasyon sırasında asit gelişimine bağlı olarak kısa sürede inhibe olurken, diğer bir istenmeyen mikroorganizma grubu olan mayalar ise ortamdaki fermente edilebilir

şekerler için LAB ile rekabet ederler. Doğal fermantasyonlardan izole edilen LAB, turşu ortamına hakim olma durumlarına (sıralarına) göre *Leu. mesenteroides*, *Stp. faecalis* (güncel sınıflandırması *Enterococcus faecalis*) *P. pentosaceus* (önceki sınıflandırması *Pediococcus cerevisiae*), *L. brevis*, *L. plantarum* şeklinde sıralanır. Bu türler arasında, genellikle ticari fermantasyonlarda *P. pentosaceus*, *L. brevis*, *L. plantarum* kullanılmaktadır (Pederson ve Albury 1950).

Çizelge 2.1 Bazı sebze fermantasyonlarında bulunan temel LAB türleri (Munoz vd. 2009)

Sebze	Laktik asit bakterileri
Zeytin	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus pentosus</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
Lahana	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>
Hıyar	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus pentosus</i> <i>Leuconostoc</i> sp. <i>Pediococcus</i> sp.
Patlıcan	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus pentosus</i> <i>Lactobacillus brevis</i>
Kapari	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus paraplantarum</i> <i>Lactobacillus pentosus</i> <i>Lactobacillus brevis</i>

### **2.3.1 *Leuconostoc mesenteroides***

Küre şeklinde, uzun ya da kısa çiftler halinde bulunan mikroaerofilik bu tür Gram pozitif reaksiyon verir. Fakültatif anaerobik olup, indol reaksiyonu göstermez ve nitratları indirgeyemez. Glikoz, früktoz, galaktoz, mannoz, ksiloz, arabinoz ve sakkarozdan asit oluşturur. Laktoz, rafinoz, salisin ve mannitolden, genellikle dekstrin, nişasta, inulin, sorbitol, ramnoz ve gliserolden de nadiren asit oluşturabilir. Gelişimleri için optimum sıcaklık aralığı 21-25 °C'dir. Yaşam alanı olarak, *Leuconostoc* cinsinin en aktif türüdür. Fermente sebzelerde, bitki materyallerinde ve hazır et ürünlerinde bulunur (Hucker and Pederson 1930).

### **2.3.2 *Pediococcus pentosaceus***

Küre şekilli bu tür tek hücre halinde, çiftler halinde ya da tetrad formda olabilmektedir. Asitli ortamda ise tetrad yapısı üstün gelmektedir. Hareketsiz, Gram pozitif'dir. Alkali ortamda gelişemezken, patates ortamında sınırlı bir gelişme gösterir. Glikoz, früktoz, galaktoz, mannoz ve maltozdan asit üretebilir. Laktoz, rafinoz, salisin, sükroz, arabinoz ve amigdalinden genellikle asit oluşturabilirken, ksiloz ve ramnozdan bazen oluşturmaktadır. Mannitol, alfametil glikozid, inulin, dekstrin ve nişastadan asit üretememektedir. Optik olarak inaktif laktik asit üretmesinin yanı sıra iz miktarda asetik asit ve karbon dioksit, asetilmetilkarbinolü okside ederek diasetil üretebilmektedir. Pürin, pirimidin, niasin, pantotenik asit, riboflavin gibi besinlere gelişimleri sırasında gereksinim duymaktadır. Mikroaerofilik olup, 25-32 °C'de optimum gelişme gösterir. Sıcaklık gelişim aralığı ise 7-45 °C'dir. Doğal yaşam alanları bira, sauerkraut ve turşu gibi fermente ürünlerdir (Pederson 1949).

### **2.3.3 *Lactobacillus brevis***

Çubuk şekilli, kısa zincirler halinde tek tek bulunmaktadır. Gram pozitif, hareketsiz ve jelatini sıvılaştıramaz özelliindedir. Kalsiyum laktatı karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir. Arabinoz, ksiloz, glikoz, früktoz, galaktoz ve maltozdan asit



oluşturmaktadır. Laktoz, sakkaroz, mannoz ve rafinoz fermantasyonları türlerine göre değişmekle beraber, salisin, mannitol, gliserol, ramnoz, dekstrin, inulin ve nişastayı nadiren fermente edebilmektedir. Früktozu glikozdan daha kolay fermente etmektedir. Aldoheksozları fermente ederek laktik asit, asetik asit, etil alkol ve CO<sub>2</sub> üretirken, pentozlardan laktik asit ve asetik asit üretmektedir. Optimum gelişim sıcaklığı 30 °C olup, 15 °C altında ve 37 °C üzerinde zayıf bir gelişme göstermektedir. Doğada geniş bir alanda yer almaktadır. Özellikle bitkilerde ve hayvansal ürünlerde bulunmaktadır (Orla-Jensen 1919).

#### **2.3.4 *Lactobacillus plantarum***

Çubuk şeklinde, tek hücre halinde ya da kısa zincirler halinde bulunur. Uygun koşullar söz konusu olduğunda kısa çubuklar halindedir. Olumsuz koşullarda, örneğin fermente sebzelerde asitlik arttıkça, daha uzun yapı oluşturur. Gelişimi sırasında sıvı ortamda birkaç gün sonra berraklaşan bir bulanıklık görülür. Bazı suşlar ise bulanıklaşmayla birlikte küçük parçalar oluşturur (flokulasyon). Harrison ve Hansen tarafından keşfedilen bir suş dışında hareketsiz olan bu tür diğer LAB türleri gibi Gram pozitif'dir. Suşlarının büyük çoğunluğu glikoz, früktoz, mannoz, galaktoz, arabinoz, sakkaroz, maltoz, laktoz, rafinoz ve salisin kaynaklarından asit meydana getirir. Bir kısmı sorbitol, mannitol, dekstrin, gliserol ve ksilozu fermente edip asit oluştururken; ramnoz, nişasta ve inulini genelde fermente etmez. Fermantasyon sırasında heksoz şekerlerden esas olarak laktik asit, çok küçük miktarlarda ise asetik asit ve karbondioksit oluşturur. Pentozlardan ise asetik ve laktik asit oluşturur. Sıvı ortamda yaklaşık % 1,2 kadar bir asitlik meydana getirir.

Tuza dirençliliği % 5,5 düzeyine ulaşabilmektedir. Mikroaerofilik olan *L. plantarum* 10-40 °C sıcaklık aralığında gelişebilmektedir. En uygun sıcaklık gelişimi ise 30 °C'dir. Ancak özel besi ortamında nitratları indirgeyebilmektedir. Doğada oldukça geniş bir alana yayılmıştır, ancak özellikle fermente sebzelerde ve hayvansal ürünlerde yer alır (Orla-Jensen 1919).

### 2.3.5 *Streptococcus faecalis*

Yumurtaya benzer biçimde çiftler ya da kısa zincirler halinde bulunmaktadır. Fermente edilebilir karbonhidratları içeren sıvı besi ortamlarında bulanıklık ve yoğun bir çökelti (tortu) oluşturarak gelişim göstermektedir. Farklı renklerde koloni oluşturabilmektedir. Birkaç suşu hareketlidir. 60 °C'de yarım saat kadar canlı kalabilirken, sıcaklık gelişim aralığı 10-45 °C'dir. % 40 ve üzerinde oranlardaki safrada, pH 9,6 değerinde ve % 6,5 tuz içeren ortamda gelişebilmektedir. Glikoz, maltoz, laktoz, teraloz ve salisinden asit üretir. Sadece birkaç tür tarafından, aerobik koşullarda parçalanabilen gliserölü, ayrıca eskulini fermente edebilir. Mannitol ve sorbitölü yalnızca çok özel durumlarda kullanırken, inulin ve rafinozu nadiren fermente eder. Nişasta ve jelatini hidrolize edemez. İnsanların ve sıcakkanlı hayvanların bağırsaklarında doğal olarak yaşam alanı bulur (Andrews ve Horder 1906).

### 2.4 Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmalarında Uygulanan Yöntemler

Orla-Jensen'nin morfolojik, fizyolojik ve ekolojik açıdan laktik asit bakterilerinin tanımlanmasına ilişkin yaptığı ilk sınıflandırma, LAB'nin endüstriyel, ekonomik ve bilimsel açıdan gittikçe değer kazanmasıyla birlikte, fonksiyonlarının belirlenmesine yönelik çalışmalarla gelişme göstermiştir. Diğer bir ifadeyle, bakteriyel taksonomiye klasik bir sınıflandırma yaklaşımıyla birlikte bakterilerin moleküler karakterlerinin belirlenmesinin de önemi ortaya çıkmıştır. LAB'nin hangi enerji kaynaklarını kullanabildiklerine yönelik karbonhidrat fermantasyon karakterleri, kullandıkları fermantasyon yolları, laktik asit üretim düzeyleri, peptidoglukan tabakalarının analizi, yağ asit kompozisyonları, DNA'nın % G+C düzeyleri, gen ürünlerinin elektroforetik özellikleri, DNA-DNA hibridizasyonu yeni çalışmalarda yer alan konular olarak araştırılmaya başlanmıştır (Holzapfel ve Stiles 1997). Bunların yanı sıra, türlerin tam olarak birbirinden ayrılabilmesini ve kesin bir taksonominin oluşturulabilmesini sağlayan yöntemler ile de sınıflandırmaya dair yeni yaklaşımlar elde edilmiştir. Bu yaklaşımlar DNA yapılarının detaylı olarak incelenmesine dayanmaktadır. Sonuç

olarak, LAB'ne uygulanan modern taksonomik metotlar fenotipik ve genotipik analizleri birlikte içermektedir.

Süt teknolojisinde büyük roller üstlenmesi nedeniyle, LAB'nin tanımlanmasına yönelik ilk kapsamlı çalışmalar süt ve süt ürünleri üzerinden gerçekleştirilmiştir. En iyi karakterize edilmiş laktik asit bakterileri, süt fermantasyonları ile ilişkilendirilen LAB olmuştur. Değişik açılardan birbirinden farklı niteliklere sahip süt ürünlerinde bulunan çeşitli LAB'nin tür seviyesindeki tanımlanmalarına ilişkin fiziksel ve biyokimyasal kriterlerin belirlenmesinin yanı sıra, hücre duvarı ya da toplam protein profillerini belirleyen Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) uygulamasının kullanımı da yaygınlaşmıştır.

Hébert vd. (2000), Arjantin ve İtalyan yöresel sert peynirlerinden izole edilen 6 termofilik suşa temel sınıflandırma ve API 50 CH analizlerini uygulamışlardır. *Lactobacillus helveticus* ve *L. delbrueckii* ssp. *lactis* türleri arasındaki kesin farklılığı, SDS-PAGE yöntemiyle hücre duvarı protein profillerini belirleyerek ortaya koymuşlardır. Sonuç olarak, SDS-PAGE uygulamasıyla daha güvenilir ve hızlı sonuçlar alınabileceği bildirilmiştir.

Laktik asit fermantasyon işleminin uygulandığı farklı gıdalarda da LAB'ni tanımlamaya ilişkin değişik yöntemler kullanılmaktadır. Pot vd. (1993), endüstriyel anlamda büyük önem taşıyan, bağırsak florasına etkilerinden dolayı insan beslenmesine ve sağlığına yararlı etkileri bulunan, ancak heterojen *Lb. acidophilus* suşlarının tanımlanmasını ve sınıflandırılmasını düzenlemek/geliştirmek için iki görüntüleme metodu kullanmışlardır. SDS-PAGE, rRNA sekans analizi ve oligonükleotid prob hibridizasyonu ile *Lactobacillus acidophilus* suşları birbirinden kesin bir şekilde ayrılmaya çalışılmıştır. Toplam hücre proteinlerinin belirlenmesinde SDS-PAGE yönteminin fazla sayıdaki suşların hızlı bir şekilde görüntülenmesine olanak verdiği belirtilmiştir. Protein modellerinin SDS-PAGE ile yapılan numerik (sayısal) analiz sonucu, *Lb. acidophilus* suşlarındaki heterojenitenin doğru olduğunu göstermiştir. Bu yöntemin diğer çalışmalarla birlikte kullanılması ile kesin bir tanımlama ortaya konulmuştur.

Güney İtalya'ya özgü bir ekmek çeşidi olan *Cornetto*'nun ekşi hamurundan izole edilen 41 laktik asit bakteri suşunun tanımlaması yapılmış ve teknolojik karakterizasyonu incelenmiştir. Toplam hücre proteinleri SDS-PAGE ile tanımlanmış, asit üretme özellikleri, antimikrobiyal aktiviteleri ve EPS üretimleri görüntülenmiştir. İzolatların % 49'u *Lb. plantarum*, % 17'si *Leuconostoc mesenteroides*, % 15'i *Lb. curvatus*, %12'si *Lb. paraplantarum*, % 5'i *Weissella cibaria*, % 2'si *Lb. pentosus* olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, araştırılan özelliklerine göre ekmek üretimi için kullanılacak starter kültür belirlenmiştir (Zotta vd. 2008).

Çeşitli süt ürünleri ve sucuktan izole edilen toplam 36 adet laktik asit bakterisi çeşitli biyokimyasal analizlerle ve API 50 CH test kiti ile tanımlanmış, SDS-PAGE metodu ile toplam protein profilleri belirlenmiştir. Ayrıca, tüm LAB'nin plazmit DNA'ları incelenmiştir. Türlerin sınıflandırılmasına ilişkin olarak temel tanımlama testlerine, API 50 CH ve SDS-PAGE analizlerinin birbirini destekleyici sonuçlar verdiği tespit edilmiştir (Yüksekdağ ve Beyatlı 2009).

Çeşitli çalışmalarda, temel izolasyon ve tanımlama testleri kullanılarak turşularda tür bazında tanımlamalar yapılmıştır. Costilow vd. (1956), 84 farklı hıyar turşusunu incelemiş ve 848 adet bakteri izolasyonunu yaparak tür bazında belirlemişlerdir. İzolatların 333 adeti *L. plantarum*, 188'i *L. brevis*, 284 adet de *P. cerevisiae* türleri içerisinde sınıflandırılmış, 43 adet izolatın ise diğer türlerden olduğu bildirilmiştir (İç 2000).

Ogabi ve Pamir (1973) Türk turşuları üzerine yaptıkları bir araştırmada 51 turşu örneği ile çalışmışlardır. Bu turşulardan toplam 502 adet bakteri izole etmişler ve tüm izolatların Lactobacillaceae familyasından olduğunu görmüşlerdir. Bu familyaya ait bakteriler *Lactobacillus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinslerinden 102 *L. plantarum*, 33 *L. casei*, 207 *L. brevis*, 72 *L. buchneri*, 13 *P. damnosus*, 17 *Leu. mesenteroides* olarak tür bazında belirleyebilmişlerdir. 59 izolatın ise tür olarak ayrımı yapılamamıştır.

Diğer bir araştırmada ise Samsun yöresine ait değişik türde 39 turşunun LAB içeriği ve starter kültür olarak kullanılabilirlik özellikleri incelenmiş, 100 adet LAB izole edilmiştir. Bakterilerin 40 adeti *L. plantarum* var. *plantarum*, 26'sı *L. plantarum* var. *pentosus*, 14 tanesi *L. plantarum* var. *arabinosus*, 20'si *L. casei* olarak belirlenmiştir. Starter kültür denemelerinde, starter kültür kullanılarak üretilen turşuların duyu ve içerik yönünden daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür (Evren ve Şahin 1993).

Turgut (2006), hıyarları doğal ve *L. plantarum* suşuyla starter kültürü fermentasyona tabi tutarak biyojen amin oluşumunu incelemiş ve biyojen amin miktarını HPLC ile belirlemiştir. Starter kültür kullanılarak üretilen turşularda, biyojen amin oluşumunun baskılandığı, dolayısıyla turşularda starter kültür kullanımının yararlı olabileceği vurgulanmıştır.

Palop vd. (2000), İspanya'nın geleneksel bir fermente ürünü olan *Almagro*'nun doğal fermentasyonu sonucu toplam 149 laktik asit bakterisi izole etmişlerdir. Suşlardan 148'nin, fiziksel ve morfolojik karakterlerinin incelenmesiyle *Lactobacillus* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Daha ileri bir karakterizasyon analizi olan API 50 CH sistemi uygulanmıştır. APILAB Plus bilgisayar programına göre suşların tanımlanması gerçekleştirilmiş, ancak kesin olmayan sonuçlar elde edilmiştir. Palop vd. (2003) daha sonra yaptıkları çalışmalarında, SDS-PAGE metoduyla laktik asit bakterilerinin toplam hücre protein profillerini belirleyerek, önceki araştırma bulgularını destekleyici sonuçlar elde etmişlerdir.

## 2.5 Laktik Asit Bakterilerinin Önemi

Fermente süt ürünlerinin, sebze ve et ürünlerinin yapımında, şarap gibi ürünlerin işlenmesinde laktik asit bakterileri çok önemli roller üstlenmektedirler. LAB'nin bu fermentasyonlarda oynadıkları rolü anlayabilmek ve özellikle yönlendirebilmek için, üzerlerinde oldukça yoğun araştırmalar yapılmış olup; sonuç olarak LAB genetik, fizyolojik ve uygulamalar yönünden en iyi karakterize edilmiş (tanımlanmış) mikroorganizmalar arasında yer almaktadırlar. Bahsedilen gıdalarla ilişkilendirildiğinde

LAB'nin geniş bir mikroorganizma grubundan oluştuğu görülmektedir. 'Laktikler' olarak da adlandırılan bu mikroorganizma grubu, gıda endüstrisinde büyük bir ekonomik öneme sahiptir. Ayrıca, ziraat ve tıp gibi alanlarda yapılan çalışmalarla birlikte LAB önemli araştırmaların konusu haline gelmiştir.

Son on yılda, tüketicilerin taze, sağlıklı ve hazırlanması kolay olan gıdalara ilgisinin artması üzerine taze meyve ve sebzelerden elde edilen ürünlere olan talep hızla artış göstermiştir. Bu ürünlerden biri olan turşunun, taze meyve ve sebzelerin mevsim dışı ve her an kullanılabilmesine olanak tanıyan bir ürün olmasının yanı sıra, üretim yöntemi olarak da laktik asit fermantasyonunun kullanılması tüketicilerde güven uyandırmıştır. Bu güvenin oluşmasında etken faktörler olarak; insanlık tarihinin ilk keşfettiği üretim yöntemlerinden biri olması ve buna bağlı olarak çok uzun zamandır kullanılması, doğal hammaddeler üzerinden yine doğal bir üretim gerçekleştirilebilmesi ve gelişen teknolojiye adaptasyonunun sağlanabilmesi gösterilmektedir. Bununla birlikte LAB, FDA tarafından GRAS (Generally Recognized as Safe) olarak kabul edilmektedir (Stiles 1996).

LAB'nin fermente gıdaların üretiminde kullanılması ve gıda endüstrisinde önemli derecede ekonomik değere sahip olması, üzerinde çok çalışılan bir organizma grubu olmasına neden olmuştur. Yapılan çalışmalar çerçevesinde gıda endüstrisinde, bazı fizyolojik özelliklerinden dolayı yeni uygulamalara açık bulunan bu mikroorganizmaların, insan sağlığına yararları olduğu da belirtilmektedir. Bakteriyosin gibi önemli antimikrobiyal bileşiklerin üretimi, probiyotik etkisi, starter kültür olarak kullanımı LAB'nin yaygın olarak bilinen önemli özellikleri arasındadır. Bunların dışında; multidrug rezistansı (çoklu ilaç dirençliliği), ozmoregülasyon (su basıncı düzenlemesi), proteoliziz (protein parçalanması), otolizin (eritrosinleri parçalayan hemolizin) ve bakteriofajlar LAB ile ilişkilendirilen yeni çalışma alanlarını oluşturmaktadır. Ayrıca, LAB'nin genetik özelliklerinin araştırılması ve tanımlanması 'gıdada kullanılabilir/gıda saflığında' (food-grade) niteliğinin oluşturulmasına ilişkin önemli genetik işlemleri (modifikasyon, seleksiyon ve ekspresyon) ortaya çıkarmaktadır (Konings vd. 2000).

### 2.5.1 Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktiviteleri

Laktik asit bakterileri “güvenli bakteriler” olarak kabul edilmektedir ve koruyucu kültürlerin özelliklerini taşımaktadır. Gıdalarda, sadece gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaları inhibe etmek veya raf ömrünü uzatmak için kullanılan ve gıdanın duyuşal özelliklerinde değişime sebep olmayan antogonistik kültürlere koruyucu kültürler denilmektedir (İşleroğlu vd. 2008). Laktik asit bakterilerinin diğer mikroorganizmalara karşı gösterdikleri antagonistik aktivite, ürettikleri laktik asit, asetik asit, hidrojen peroksit, bakteriyosin, diasetil, alkol ve karbondioksit gibi metabolitlerden kaynaklanmaktadır. LAB’ın temel antimikrobiyal etkisi laktik asit üretimi ile pH’daki düşüş olarak belirtilmektedir (Çon ve Gökalp 2000).

Organik asit, hidrojen peroksit, karbon dioksit, diasetil, asetaldehit, etanol ve bakteriyosin gibi geniş spektrumlu antimikrobiyal bileşikler üretmesi LAB’den biyolojik koruyucular olarak yararlanılmasını sağlamaktadır (Fitzgerald ve Caplice 1999). Gıdalarda, farklı amaçlarla kullanılan katkı maddeleri bulunmaktadır. Bu maddeler arasında yer alan koruyucu maddelerin çoğu kimyasal kökenlidir. Tüketici sağlığı üzerinde olumsuz etkilerde bulunabileceği belirlenen koruyucu madde katkılı gıdalara alternatif olarak, doğal koruyucu içeren gıdaların tüketilmesi, bu anlamda önem taşımaktadır.

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

Çon ve Karasu (2009) tarafından, turşudan ve fermente yeşil zeytinden izole edilen *L. plantarum* suşlarının *Yersinia lipolitica* haricinde *Lb. sake*, *Listeria monocytogenes*, *E. feacium*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *A. hydrophila* üzerinde farklı derecelerde antimikrobiyal

etki gösterdiği; *Lb. brevis* suşlarının ise *A. hydrophila*, *Yersinia lipolytica* haricinde *Lb. sake*, *Listeria monocytogenes*, *E. faecium*, *E. coli*, *P. vulgaris* üzerinde farklı antimikrobiyal etkilerinin olduğu belirtilmiştir.

Tamang vd. (2009) tarafından fermente sebzelerden izole edilen *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. curvatus*, *P. pentosaceus*, *P. acidilactici*, *Leuconostoc* spp. , *Enterococcus durans* suşlarının *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde farklı antimikrobiyal etkilerinin olduğu, *Listeria monocytogenes* ve *E. faecium* üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Organik asitlerin mikroorganizmalar üzerine inhibitör olarak tesir etmesi asitin sahip olduğu farklı üç potansiyel etkiye bağlanmaktadır (Çon ve Gökalp 2000). Güçlü asitler, düşük eksternal pH'ya sahiptir. Fakat hücre membranından geçememektedir. Bu asitler hücre yüzeyinde var olan enzimler üzerinde de, düşük pH nedeniyle, enzimleri denatüre ederek inhibitör etkide bulunabilmektedir. Ayrıca, hücre içi ve dışı pH farkı çok büyük olduğu zaman hücre zarının proton geçirgenliği sonucu sitoplazmik pH'nın düşüşüne de neden olabilmektedir. Zayıf asitler, hücre membranından geçebilmektedir. Bu asitlerin birinci etkisi sitoplazmik pH'yı düşürmeleri nedeniyle olmaktadır. Fakat, doğrudan disosiyeye olmamış yapılar da metabolizma üzerine özel inhibitör etkiye sahiptir. Sülfid, nitrat, karbonat gibi asit potansiyelli iyonlar düşük pH'da potansiyel inhibitördür.

Fermantasyon sırasında üretilen organik asitlerin çeşitleri ve miktarları bakteri türlerine, kültür bileşimine ve gelişme koşullarına bağlı olmaktadır. Organik asitlerin antimikrobiyal etkileri pH'daki düşüş ve moleküllerin disosiyeye olmayan yapılarından kaynaklanmaktadır ve pH'daki düşme ile hücre sitoplazmasında asidifikasyona neden olmaktadır. Disosiyeye olmamış asit hücre membranına doğrudan dağılmakta ve hücre membran geçirgenliğini etkileyerek substrat transport sisteminin geçirgenliğini bozmaktadır (Yang 2000).



LAB'nin ürettiği bileşiklerin gösterdiği aktivite sonucu, bağışıklık gücünü arttırıcı, kanseri önleyici, serum kolestrol seviyesini düşürücü gibi yararlı fizyolojik etkilerinin olduğu belirtilmektedir (Kullisaar vd. 2002). Ayrıca, bağırsak sistemine yerleşmeleri ile ürettikleri organik asitler sayesinde bağırsak ortam pH'sını kontrol ettikleri, kabızlığı, laktoz intoleransını ve patojen bakterilerin neden olduğu ishali etkin biçimde engelleyebildikleri ifade edilmektedir (Kim vd. 2000). Bunlara ek olarak, fermantasyonun antimikrobiyal etkisi, gıda hijyen uygulamalarına bir yardımcı olarak görülebilmektedir (Adams ve Nicolaidis 1997).

Laktik asit, laktik asit fermantasyonu sırasında oluşan temel bir metabolittir. Düşük pH değerlerinde, fazla miktarda laktik asit dissosiyeye olmamış yapıda bulunmaktadır ve bu nedenle birçok bakteri, küf ve maya için toksik etki göstermektedir. Farklı mikroorganizmalar laktik aside karşı değişik duyarlılık gösterebilmektedir. Örneğin; pH 5,0 değerinde laktik asit spor formunda bakterilere inhibitör etki gösterirken, maya ve küflere karşı etkisiz olabilmektedir (Fitzgerald ve Caplice 1999).

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

Gill ve Newton tarafından yapılan bir çalışmada, ette bulunan Gram negatif psikrotroflar üzerine laktik asidin inhibitör etkisinin pH düşüşüne bağlı olduğu, dissosiyeye olmamış formundan etkilenmediği bildirilmiştir (Çon ve Gökalp 2000).

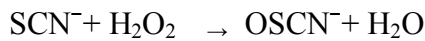
Asetik asit ve propiyonik asit, laktik asit bakterileri tarafından heterofermantatif yolla üretilmekte, hücre içinin asidik bir yapı kazanmasına ve protein denatürasyonuna neden olmaktadır. Yüksek pKa değerleri yüzünden (laktik asit 3,08, asetik asit 4,75, propiyonik asit 4,87) antimikrobiyal etkileri laktik asitten daha fazladır. Ayrıca; asetik asit, laktik asit ile sinerjistik etkiye sahiptir. Laktik asit ortam pH'sını azaltırken, asetik asidin toksik etkisini arttırmaktadır (Yang 2000).

Laktik asit, asetik asit ve p-amino benzoat ile 3,5 pH'ya getirilmiş ortamda *Escherichia coli*'nin 4 suşu geliştirilmiş ve DNA'nın tek iplikçiğinde kırılmayı onaramayan (DNA polimeraz I enzimi içermeyen) pol A1 suşunda her üç asitin de yüksek toksik etkide bulunduğu görülmüştür (Çon ve Gökalp 2000).

Asetaldehit ve etil alkolün biyolojik korumaya karşı katkısı çok yüksek seviyelerde olmamasına rağmen antimikrobiyal etki gösterebilmektedirler (Fitzgerald ve Caplice 1999). Etil alkol heterofermantatif LAB tarafından üretilmektedir. Heterofermantatiflerin en aktif olduğu doğal fermantasyonun ilk aşamalarında, etil alkolün belirgin bir etkisi söz konusu olmaktadır (Adams ve Nicolaidis 1997).

Hidrojen peroksit, oksijen varlığında flavoprotein oksidazlar ve nikotinamid adenin hidroksi dinükleotid peroksidazların etkisiyle, laktik asit bakterileri tarafından üretilmektedir. Oksitleyici bir bileşik olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin mikroorganizmalar üzerine inhibisyon etkisi, metabolik işlemlerde esansiyel olan enzimlerin sülfidril gruplarını etkileyerek, disülfid köprüleri oluşturmasına bağlanmaktadır. DNA'da hasara neden olan süperoksit ve hidroksil gibi bakterisidal serbest radikallerin üretilmesine de öncülük etmektedir (Yang 2000).

Normal koşullarda hidrojen peroksitin antimikrobiyal etkisi laktoperoksidazların ve Thiocyanate (SCN) varlığından kaynaklanmaktadır. Laktoperoksidaz, SCN'nin hidrojen peroksit tarafından oksidasyonunu katalizlemektedir.



OSCN<sup>-</sup>'nin açığa çıkması sonucunda bakteri membranında yapısal bir değişiklik ve hasar meydana gelmektedir. Bunun yanında temel antimikrobiyal etkisinin glikolizis sonucunda da olduğu belirtilmektedir. Glikoz transport sistemini, heksokinaz aktivitesini, Gliseraldehit 3-fosfatdehidrogenaz aktivitesini sülfidril grupları oksidasyonu nedeniyle inhibe etmektedir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin hücreler üzerine inhibitör etkisi onun konsantrasyonu ve muamele süresi ile mikrobiyal yük, sıcaklık, pH, inorganik

iyonlar, UV veya diğerk koruyucularla muamele edilmiş olması gibi faktörlerden etkilenmektedir (Çon ve Gökalp 2000).

Değişik *Lactobacillus* türlerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimi ile ilgili, literatürde bazı araştırmalara rastlanmaktadır. Bu çalışmalarda 5 °C'de *Lb. bulgaricus* ve *Lb. lactis* türlerinin, *Staphylococcus aureus*'u inhibe edebilecek düzeyde (6-12 µg/mL), yine *Lb. plantarum*'un ise *Pseudomonas* cinslerinin adaptasyon periyodunu (lag faz) uzatacak düzeyde (3-13 µg/mL) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ürettiği, ayrıca laktik Streptococcus cinslerinin de buzdolabında depolanan sütlerde, psikrotrofik bakterilerin gelişmesini önleyecek düzeyde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ürettiği saptanmıştır. 1970 yılında yapılan bir çalışmada, kıyılmış sığır etine *Streptococcus lactis* ve *Leuconostoc citrovorum* inoküle edilmiş ve bu bakterilerin 7 °C'de depolamada Gram negatif bakterilerin gelişmesini önlediği saptanmıştır. 1972 yılında başka bir araştırmacı tarafından, *Streptococcus diacetilactis*'in kıyılmış sığır eti, süt ve peynirde Gram negatif bakterilerin gelişmesini önlediği saptanmıştır (Anonim 2011).

1980 yılında yayınlanan bir araştırmada *Lb. acidophilus*'un az yağlı ve yağsız sütte 37 °C ve 4 °C'de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimini etkileyen faktörlerle ilgili olarak, bu bakterinin iki suşunun (A ve B) düşük düzeyde, diğerk iki suşunun ise (C ve D) yüksek düzeyde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ürettiği bildirilmiştir. 4 °C'de çalkalamalı kültürde, *Lb. acidophilus* C ve D suşlarının özellikle buzdolabı koşullarında bozulmaya neden olan *Pseudomonas fragi* türünün gelişmesini önleyecek düzeyde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ürettiği saptanmıştır (Anonim 2011).

Toksoy vd. (1999) tarafından yapılan bir araştırmada, sucuk ve sosislerden izole edilen 39 adet *Lb. plantarum* suşunun ürettiği H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının, 1,80-3,45 µg/mL arasında olduğu belirtilmiştir.

Zalán vd. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, kullanılan 4 adet *Lb.* suşunun MRS sıvı besiyerinde, 72 saat sonunda, 2-6 µg/mL hidrojen peroksit ürettiği belirtilmiştir. *Lb. plantarum* 2142 suşunun 24 saat sonunda (2,45 µg/mL) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ürettiği; böylece, *L. monocytogenes* ve *B. cereus* gelişimini inhibe ettiği belirtilmiştir.

Adeniyi vd. (2006), Nijerya fermente süt ürünlerinden izole edilen *Lb. plantarum* N2 suunun 5,44 µg/mL hidrojen peroksit ürettiğini bildirmişlerdir.

Erdoğrul vd. (2002) tarafından fermente sucuklardan izole edilen *Lb. pentocaceus* sularının % 0,41 - 0,81 µg/mL hidrojen peroksit ürettiği bildirilmiştir.

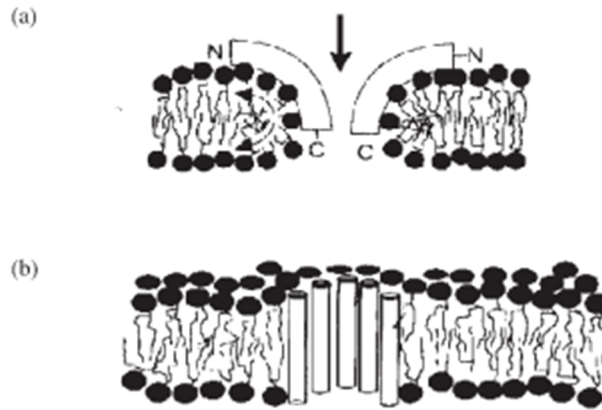
Sitrat metabolizmasının bir ürünü olan diasetil, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* suçlarını da içeren birçok LAB tarafından üretilmektedir. Arjinin kullanımına müdahale etmesinden dolayı Gram negatif bakteriler, mayalar ve küfler diasetile hassasiyet göstermektedirler (Fitzgerald ve Caplice 1999). *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus* spp., *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *S. aureus* ve *Y. enterocolitica* diasetile hassasiyeti olan mikroorganizmalar arasında yer almaktadır (Adams ve Nicolaidis 1997).

Karbondioksit, genel olarak heterofermantatif LAB tarafından üretilir. Karbondioksit anaerobik bir ortam oluşturarak, enzimatik dekarboksilasyonu inhibe etmekte, lipid membran yapısında birikerek, bu yapının geçirgenlik fonksiyonunu kaybetmesine neden olmaktadır. Karbondioksit etkili bir Şekilde gıdalarda bozulma yapan mikroorganizmaların gelişimini engellemektedir. Özellikle, Gram negatif psitrotrofik bakterilerde % 10 civarında toplam bakteri miktarını % 50 azaltmaktadır ve % 20-50 civarında CO<sub>2</sub> güçlü bir antifungal etkiye sahiptir (Yang 2000). *Pseudomonas fluorescens* ile yapılan araştırma sonucunda, ekstraselllar CO<sub>2</sub> konsantrasyonundaki her 1mM artışın, hücre içi pH'da 0,03 birimlik de neden olduğu; ancak CO<sub>2</sub> varlığında elde edilen gelişme inhibisyonunun temel nedeninin hücre içi pH d olmadiğı belirlenmiştir (on ve Gökalp 2000).

Bakteriyosinler bakteriler tarafından sentezlenen protein yapısındaki bileşiklerdir. Bakteriyosinler, genellikle üretici tre yakın akraba olan Gram-pozitif türler üzerinde etki göstermektedir, üretici türlere karşı ise herhangi bir etkisi yoktur (Montville vd. 2001). Birçok laktik asit bakterisi çeşitli bakteriyosinleri üretebilme yeteneğine sahiptir. LAB tarafından üretilen bakteriyosinler, çeşitli fermente olan ve olmayan gıdalarda

bulunmaktadır. Birçok bakteriyosin genetik ve biyokimyasal olarak tanımlanmıştır. Bakteriyosinlerin yapıları, fonksiyonları, biyosentezleri ve etki mekanizmaları belirlenmiştir. Bakteriyosinler, duyarlı mikroorganizmalar üzerinde farklı etki mekanizmalarına sahiptirler. Hücrenin sitoplazmik zarına bağlanarak, hücre içerisine girip, zarda gözenekler oluşturmaktadır. Böylece düşük molekül ağırlığına sahip hücre bileşenlerinin hücre dışına sızmasına yol açmaktadır. Bununla birlikte, iyonların, özellikle de ATP kaybı ve hücre içi pH dengesinin korunmasında etkili olan  $K^+$  iyonunun hücre dışına sızması, hücrede enerji tüketimine neden olmaktadır. Hücrede meydana gelen bu değişimler, DNA ve RNA gibi hücre için hayati önemi olan makro moleküllerin degradasyonuna, bu moleküllerle birlikte protein ve peptidoglikan gibi biyolojik yapıların bozulmasına yol açmaktadır (Konings vd. 2000, Cleveland vd. 2001).

Bakteriyosinler, pozitif yüklü moleküller olup, stoplazmik zar üzerinde etkili olmalarında sahip oldukları hidrofobik kısımlar önemli rol oynamaktadır. Hücre zarında bulunan negatif yüklü fosfat gruplarının etkisiyle ortaya çıkan elektrostatik etkileşim sonucu bakteriyosin hücre zarına tutunmaktadır ( Kurt ve Zorba 2005).



Şekil 2.2 Bakteriyosinler tarafından hücrede por oluşum modelleri (De Martinis vd. 2002)  
a. Wedge b. Barrel-Stave

Hidrofobik kısım zar yapısının içine girerek gözenek oluşumuna yol açmaktadır. Ancak oluşan gözenekler farklılık göstermektedir. Örneğin; nisin daha çok “Barrel-stave” ve “Wedge” olarak isimlendirilen modellerde gözenek oluşumunu sağlamaktadır. “Barrel-Stave” modelde, herbir nisin molekülü dikey bir şekilde zara bağlanarak, zarda bir iyon kanalı oluşturmaktadır. “Wedge” modelde ise, belirli sayıda nisin molekülü fosfolipidlerin baş gruplarıyla interaksiyona girdikten sonra, lipit-protein gözeneği oluşmaktadır. Bakteriyosinler bütün duyarlı türler üzerinde aynı etkiye sahip olmayıp, ortam pH’sı ve kritik inhibisyon konsantrasyonu gibi faktörlerden etkilenmektedir (Cleveland vd. 2001).

Bakteriyosinlerin gıdalarda koruyucu olarak ilk kullanımları, resmi olarak 1951 yılı olmasına rağmen, insanoğlu 8000 yıldır farkında olmadan bakteriyosinlerden faydalanmaktadır. 1928 yılında çeşitli laktokok türlerinin diğer laktik asit bakterileri üzerinde inhibitör etki gösterdikleri belirlenmiştir. Nisin ilk olarak 1953 yılında ticari olarak İngiltere’de satışa sunulmuştur ve günümüzde yaklaşık 50 ülkede kullanılmaktadır. 1969 yılında Gıda ve Tarım Organizasyonu/Dünya Sağlık Organizasyonu Gıda Katkıları Uzman Kurulu tarafından gıdalarda kullanımının güvenli olduğu onaylanmıştır. Nisin, 1983 yılında Avrupa gıda katkı maddeleri listesinde E234 olarak numaralandırılmış, 1988’de FDA tarafından peynir üretiminde kullanımına izin verilmiştir (Akkoç vd. 2009).

Schillinger ve Lucke (1989) tarafından taze ve fermente gıdalardan izole edilmiş bakteriyosinogenik suşların varlığı kanıtlanmıştır (Fitzgerald ve Caplice 1999). Fermente bir gıda olan turşuda yer alan LAB’den *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* cinslerine ait türler antimikrobiyal protein olan bakteriyosinleri salgılayabilme özelliğindedir. Antimikrobiyal aktivite, konakçının hücre duvarına spesifik olarak adsorbsiyonu ile başlar. İyonların hücreye sızması ve liziz olayı ile bakterisidal etki kendini gösterir ve hassas hücrelerin hemen ölmesine neden olur. Bakteriyosinler ancak pronaz, fisin ve tripsin gibi proteolitik enzimlerle aktivitesini kaybetmektedir. Pişirmeye ve düşük pH değerlerine dirençlidir. LAB’nin ürettiği bakteriyosinler, starter kültürlerin rekabetçi niteliklerini arttırabilmektedir.

Ayrıca, bakteriyosin üretebilme özelliklerine göre, fermantasyon için seçilecek starter suşlar belirlenebilmektedir (Nout ve Rombouts 1992).

*L. lactis* ssp. *lactis* tarafından üretilen nisin, yaklaşık altmış yıldır bilinen ve GRAS olarak kabul gören bir lantibiyotik olmakla birlikte peynir, konserve sebzeler, sterilize süt ürünleri, bira ve şarap fermantasyonlarında ticari olarak kullanılan bir bakteriyosindir (Nout ve Rombouts 1992).

Tüketiciler, kimyasal katkı maddelerinin yol açabileceği olumsuz sağlık etkileri nedeniyle doğal gıdaları tüketmek istemektedir. Az işlem görmüş fakat raf ömrü uzun gıdalar elde etmek için en uygun koruma yöntemlerine ilgi giderek artmaktadır. Bu nedenle bakteriyosinler doğal koruyucular olarak düşünülebilir. Gıdalara inokule edilen LAB bakteriyosin üretmektedir. Bakteriyosinler saf ya da yarı saf olarak gıdalara eklenebilmekte ya da gıdaların üretim süreci boyunca bakteriyosin üreten suşlar seçilmektedir.

### **2.5.2 Probiyotik etki**

Laktik asit bakterileri genel olarak iki grupta sınıflandırılmaktadır. Yoğurt, peynir gibi ürünlerin yapımında kullanılan çiğ süt ve bağırsak kaynaklı LAB ilk grubu oluşturmaktadır. İkinci grup salamura meyve ve sebzeler, kimuchi, soya sosu, miso gibi geleneksel Asya gıdalarının üretiminde kullanılan meyve ve sebzeleri içeren bitkisel kökenli LAB'den meydana gelmektedir. Bahsedilen türde gıdaların tüketilmesiyle vücuda alınan LAB, diğer mikroorganizmaların aksine, midedeki gastrik asit ve pankreatik salgılara karşı dirençlilik gösterir. Özellikle bitkisel kaynaklı ürünlerle vücuda giren LAB, mide ve bağırsaktaki sert/zor koşullara hayvansal kaynaklı LAB'den daha dirençlidir (Muñoz vd. 2009).

Sindirim sistemine geçerek canlı kalmayı başarabilen LAB'nin probiyotik olma özelliği söz konusudur. Probiyotik terimi genellikle, organizmaların sağlığını olumlu yönde etkileyen bakterileri ifade etmektedir (FAO/WHO 2001). Patojen organizmaları canlı ve

cansız ortamda inhibe edebilme özelliğine sahip probiyotiklerin antibiyotik kullanımına alternatif olması, kolonik kanserojenlerin sentezlenmesini sağlayan intestinal (bağırsak) bakteriyel enzimleri inhibe etmesi, sınırlı besinler için rekabetçi olması, sindirime enzimatik katkı sağlaması, epitel ve mukoz adheransı (yapışıklığı) inhibe etmesi, çözülmüş organik materyallerin doğrudan alınmasına yardımcı olması, vücut direncini arttırması insan ve hayvan beslenmesine ilişkin probiyotiklerin çeşitli yararlı etkilerini ortaya koymaktadır. Bunlara ek olarak, patojen mikroorganizmalara karşı bağışıklık sistemini güçlendirici ve antiviral etkileri olduğu düşünülmektedir (Rolfe 2000, Balcázar vd. 2006). Tümörler ve bağışıklık sistemi üzerine yapılan araştırmalar sonucunda, LAB'nin bağışıklık sistemini uyardığı ve gözle görülür biçimde etkilediği fark edilmiştir (Mavhungu 2005). Bir başka araştırma, bağırsak mikroflorasının, peptid hormonların ve nöropeptidlerin düzenleyicisi appeptidlere karşı otoantibadilerin sentezlenmesine etkisinin bulunabileceğini göstermiştir. Ayrıca, bağırsak mikroflorasının, kabızlığa sebep olan bağırsaktaki dengesizlikleri ve bağırsakların peristaltik hareketini düzenleyici etkisi olduğu bildirilmiştir (Higashikawa vd. 2009). Probiyotik laktik asit bakterilerinin güncel sınıflandırmasına göre; *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Enterococcus* probiyotik cinsleri oluşturmaktadır. *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *B. longum*, *B. animalis* genel olarak probiyotik etki gösteren türlere örnek olarak karşımıza çıkmaktadır (Klein vd. 1998). Mide ve safra tuzuna dirençli olan probiyotik mikroorganizmalarla fermente olmuş ürünlerin tüketimi ile sindirim sistemine yerleşen bakteriler bağırsaklara yerleşip hızlı bir şekilde çoğalarak baskın konuma geçerler ve etkilerini gösterirler (Nahaisi 1986).

### **2.5.3 Starter kültür kullanımı**

İşlenmemiş gıda materyallerinin, yapılarında bulunan mikroorganizmalarla fermantasyona bırakılması sonucu doğal fermantasyon gerçekleşir ve tüketim anlamında kabul edilebilir özelliklerde ürün elde edilebilir. Bu şekilde uygulanan bir yöntem küçük ölçekteki üretimlerde, gelişmemiş ya da az gelişmiş ülkelerde ve ev tipi üretimlerde gerçekleştirilebilir. Ancak, endüstriyel boyutta bir üretim söz konusu olduğunda doğal fermantasyon, ürüne yönelik istenen sonuçları her zaman sağlayamayabilir. Bu anlamda fermente gıda ve içeceklerin standart bir kalitede olması oldukça önem taşımaktadır.



Ürünün istenen duyuşsal özelliklerde ve standartlara uygun tüketim güvenliğinde olması, uygulanan üretim yönteminin teknolojik, hijyenik ve standart koşullarda gerçekleştirilmesi doğal (geleneksel) ve modern (teknolojik) fermantasyonlar arasındaki farkı ortaya çıkaran önemli unsurları meydana getirmektedir. Ayrıca; ürünün besleyici, sağlık ve ekonomik değerinin iyileştirilmesi ile gıda güvenlik risklerinin azaltılması da son ürün kalitesine yönelik katkı sağlayacak özellikleri oluşturmaktadır. İşlenmemiş materyallere katılan starter kültürler, fermente bir ürüne ilişkin istenen ve olması gereken tüm özellikleri sağlayabilmektedir. Bu nedenle; ticari boyuttaki fermantasyonlarda starter kültür kullanımı temel bir zorunluluk olarak görülmektedir.

Doğal fermantasyonun fiziksel ve kimyasal olarak kontrol edilmesi, ancak starter kültürün fermantasyon sisteminde kullanılmasıyla etkili olabilmektedir (Daeschel ve Fleming 1987). Pederson ve Albury (1956) tarafından hıyar turşularında bir starter kültür uygulaması olan saf kültür fermantasyonu gerçekleştirilmiş, bu uygulama için homofermantatif *Lb. plantarum* türü kullanılarak bu bakterinin fermantasyonu tek başına sonuçlandırdığı görülmüştür. Ancak diğer türlerin, örneğin *Leuconostoc mesenteroides*'in heterofermantatif iz yolunu izlemesi sonucu oluşturduğu bileşikler ile ürüne yönelik tat ve aroma gibi özellikleri kazandıramadığı bildirilmiştir (Hutkins 2006). *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Lb. brevis* türleriyle de saf kültür çalışmaları yapılmıştır. Ancak, fermantasyonu başlatarak ilk kontrol mekanizmasını gerçekleştiren bu türler, fermantasyonu tamamlamada başarılı olamamışlardır. Hammaddeden gelen mikroorganizmalar dinamik bir ekosistem ile değişen bir fiziksel ve kimyasal çevre sunmaktadır. Bu koşullar çerçevesinde, tek bir tür laktik asit bakterisi içeren starter kültürün, optimal bir gelişme gösterememesi ve iyi derecede rekabetçi olamaması nedeniyle fermantasyonun istenilen düzeyde gerçekleşmesini sağlayamadığı; ayrıca fermantasyonu, fermantasyon boyunca değil, yalnızca bir aşaması süresince kontrol edebildiği bildirilmiştir (Daeschel ve Fleming 1987). Bunların yanı sıra, saf kültür elde etme işlemlerinin, ticari, ekonomik ve teknik anlamda pratik olmadıkları belirtilmektedir (Etchells vd. 1964). Saf kültürlerin fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik bakımdan bir entegrasyon sağlayamaması sonucu, çoklu ya da karışık mikroorganizma içeren bir starter kültürün kullanılması öngörülmüş ve böylece fermantasyonda yaşanabilecek tüm bu sorunların giderilebileceği ileri

sürülmüştür (Daeschel ve Fleming 1987). Turşu üretiminde, karışık bir kültürden oluşan starter kültür teknolojisinin uygulanmasıyla; fermantasyon kontrol edilebilmekte ve güvenliği sağlanabilmekte, ürün tekstür, tat, aroma yönünden iyileştirilebilmekte ve standart özellikte bir üretim tekniği geliştirilebilmektedir (Hutkins 2006).

Gıda fermantasyonlarında bakteri ve mayaların rolleri keşfedildiğinden beri fermantasyonları kontrol etmek, istenilen doğrultuda yönlendirebilmek ve koşullarını iyileştirebilmek için çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların odak noktasını oluşturan starter kültür teknolojisi, 1900'lü yıllardan bu yana gelişim göstermiş olup çeşitli fermantasyon alanlarında kullanılmaktadır. Başta süt endüstrisi olmak üzere et, ekmek, bira, şarap ve sirke fermantasyonlarında starter kültür teknolojisi uygulanmaktadır. Doğal fermantasyon tekniklerinin uygulandığı sauerkraut ve turşu fermantasyonlarında da artık starter kültür kullanımına bağlı kontrollü bir fermantasyon gerçekleştirilmektedir (Hutkins 2006).

Meyve-sebze fermantasyonlarında, tek bir suştan oluşan saf kültürün ve/veya çoklu mikroorganizma içeren bir kültürün starter olarak kullanılmasına yaklaşık elli yıl önce başlanmış (Daeschel ve Fleming 1987), günümüzde de çeşitli adaptasyonların uygulanmasıyla birlikte devam edilmektedir. Genel olarak, sebze fermantasyonlarından izole edilen türler starter kültür olarak kullanılmaktadır. İzole edilen türler arasında *Leuconostoc mesenteroides*, *Lb. brevis*, *Pediococcus acidilactici*, *Lb. plantarum* yer almaktadır. Sebze fermantasyonu spesifik bir uygulamayı gerektirdiği için suş seçimi, ürüne istenen özelliklerin verilebilmesi açısından oldukça önem taşımaktadır (Hutkins 2006). Ayrıca, bazı türlerin yüksek seviyede biyojen amin üretebildiği göz önünde bulundurulduğunda starter kültür olacak suş/suşların önemi artmaktadır (Halasz vd. 1999).

Standart bir ürün ve üretim tekniğinin oluşturulması ile istenilen duyuşal özelliklerin sağlanmasının yanı sıra, istenilen boyutta üretim kolaylığı, üretim hızı ve veriminde artış, spesifik özelliklerin adaptasyonu, biyojen amin oluşumunda baskılama/azaltma, depolama sürecinde stabilizasyon gibi nitelikler de fermente sebze teknolojisinde starter

kültür kullanımına bağlı olarak elde edilebilecek faydalardır (Halasz vd. 1999, Hutkins 2006).

## 2.6 Laktik Asit Bakterilerinin Asit Üretim Miktarları

Laktik asit bakterileri tarafından karbonhidratlar fermente edilerek laktik asit oluşturulmakta ve laktik asit fermantasyonu gerçekleşmektedir. Laktik asit fermantasyonun gıda, eczacılık, deri ve tekstil endüstrisi gibi birçok alanda uygulaması bulunmaktadır (Rodríguez-Couto ve Sanromán 2006).

Bulut (2003) tarafından peynirden izole edilen *Lactococcus* ve *Enterococcus* cinslerinin 24 saat sonunda 5,950 mg/mL, *Lactobacillus* suşlarının ise 6,247 mg/mL laktik asit ürettiği belirtilmiştir.

Cheriguene vd. (2006), keçi sütünden izole ettikleri *L. paracasei* türleri tarafından 0,39-0,76 g/100 mL, *L. rhamnosus* türleri tarafından 0,75-0,80 g/100mL, *L. plantarum* türleri tarafından 0,55-0,68 g/100 mL, *E. faecium* türleri tarafından 0,59-0,60 g/100 mL laktik asit üretildiğini bildirmişlerdir.

Çon ve Karasu (2009) tarafından turşudan ve fermente yeşil zeytinden izole edilen *L. plantarum* ve *L. pentosus* suşlarının, 1,60-1,95 g/100 mL laktik asit ürettikleri belirlenmiştir.

Herreros vd. (2003), İspanyol keçi peynirinden izole ettikleri *Leuconostoc mesenteroides* türleri tarafından 0,22-0,26 g/100 mL, *L. plantarum* türleri tarafından 0,19-0,21 g/100 mL, *L. brevis* türleri tarafından 0,19-0,23 g/100 mL, *L. casei* suşları tarafından 0,18-0,22 g/100 mL laktik asit üretildiğini belirtmişlerdir.

Erdoğrul vd. (2002) tarafından fermente sucuklardan izole edilen *Pediococcus pentosaceus* türlerinin % 0,11-0,32 laktik asit ürettiği bildirilmiştir.

## 2.7 Laktik Asit Bakterilerinin Farklı pH Değerlerinde Gelişme Özellikleri

Her mikroorganizmanın gelişebildiği bir minimum, maksimum ve optimum pH değeri vardır. Bakteriler gelişecekleri ortamın pH'sı açısından daha seçicidirler. Mikroorganizmaların gelişebildiği pH aralığı aynı cinsin türlerine, hatta aynı türün farklı suşlarına, üreme ortamına, ortamın bileşimine ve diğer çevre faktörlerine bağlı olarak değişmektedir. *Lactobacillus* türleri gelişme ortamındaki sitrik, hidroklorik, fosforik ve tartarik asitlerin varlığında, asetik asit ve laktik asit varlığına kıyasla daha düşük pH değerlerinde gelişebilmektedir. Uygun olmayan pH değerlerinde mikroorganizmaların hücre geçirgenliği ve enzim aktiviteleri olumsuz yönde etkilenmektedir. Bakteri hücreleri normalde negatif yük fazlalığına sahip olma eğilimindedirler (Temiz 1999).

Organik asitler düşük pH değerlerinde iyonize değildirler ve bu şekilde negatif yüklü hücrelerin içine girebilmekte ve daha sonra burada iyonize olarak hücre içi pH'yı değiştirebilmektedir. Yüksek pH değerlerinde ise aynı durum iyonize olmamış zayıf bazlar için geçerlidir. Hücre içi pH'sının değişmesi ise özellikle Deoksiribonükleik asit (DNA), Ribonükleik asit (RNA) ve bazı enzimlerin fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilemektedir. Örneğin; hücre içi pH'sının bazik yöne kayması RNA amino asit transferaz enzimini inhibe etmekte ve protein sentezi durmaktadır. Ortam pH'sı yalnızca gelişmeyi değil, aynı zamanda mikroorganizmaların canlılıklarını sürdürme özelliğini de etkilemektedir (Temiz 1999).

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

Kıran (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, hazır gıdalardan izole edilen ve çeşitli kültür koleksiyonlarından temin edilen laktik asit bakterilerinden hiçbirinin pH 2,0 ve pH 3,0'da gelişemediği; pH 4,0, pH 5,0 ve pH 6,0'da hepsinin geliştiği belirtilmiştir. pH 9,6'da *P. pentocaceus* türlerinin bir kısmının geliştiği bazıların zayıf gelişme

gösterdiği, *L. plantarum*, *L. brevis* ve *L. fermentum* türlerinin geliştiği; *Leuconostoc* suşlarının ise zayıf gelişme gösterdiği belirtilmiştir.

Tangüler (2010) tarafından şalgam suyundan izole edilen *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* cinslerinin pH 4,0'da gelişme gösterdiği, fakat pH 9,6'da hiçbir bakterinin gelişme gösteremediği belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada kontrol olarak kullanılan *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii* türlerinden *L. buchneri* hariç diğer 4 bakterinin pH 4,4'de gelişebildiği, fakat 5 bakteriden hiçbirinin pH 9,6'da gelişemediği belirtilmiştir.

## **2.8 Laktik Asit Bakterilerinin Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Özellikleri**

Tuzun koruyucu özelliğinden dolayı gıda işleminde kullanımı Mısır'da, Roma'da ve Anadolu'da yıllar öncesinde bilinmektedir. Tuzun gıdalar üzerindeki etkisini birçok değişik faktör belirlemektedir (Aktan 1998). Bakteriler gıdanın içerisinde yüksek tuz gibi çeşitli ozmotik streslere maruz kalmaktadır. Bu durumlarda, özellikle turgor basıncı (şişme) ve hidrasyon (su kaybetme) bakteriler için çok önemlidir (Dikici 2009).

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

Tuz konsantrasyonu, fermantasyonun gidişini yönlendiren ve son ürün kalitesini etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Düşük tuz konsantrasyonlarında (% 5-8) fermantasyon hızlı, yüksek tuz konsantrasyonlarında (% 10 ve üzeri) yavaş olarak gerçekleşir veya hiç gerçekleşmez. Tuz konsantrasyonunun fermantasyonda rol alan mikroorganizmaların faaliyetleri üzerine etkisi seçici özellik göstermektedir. Bu

bakımdan ürüne ve prosese göre ayarlanması önem taşır. Tuzlama işlemi doğrudan ya da salamura şeklinde uygulanmaktadır (Aktan 1998).

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

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

İşleroğlu vd. (2008), yöresel bir peynirden izole ettikleri *E. faecalis*' in % 3, % 4 ve % 6,5 tuz konsantrasyonlarında gelişebildiğini, fakat % 10 tuz konsantrasyonunda gelişmediğini belirtmişlerdir.

Sánchez ve Palop (2000) bir çeşit patlıcan turşusu olan Almagro'dan izole ettikleri *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. brevis*, ve *L. fermentum* türlerinin % 4 tuz konsantrasyonunda geliştiğini, % 6,5 tuz konsantrasyonunda belirli oranlarda bütün türlerde gelişme görülebildiğini, % 8 tuz oranında ise *L. fermentum* haricinde diğer türlerde gelişme olduğunu belirtmişlerdir.

Adnan ve Tan (2007), iki geleneksel Malezya ürününden ve kırmızı biber püresinden izole ettikleri laktik asit bakterileri arasında, % 1,5, % 2,5 ve % 5 tuz konsantrasyonlarında tüm *L. brevis* ve *L. plantarum* türlerinin geliştiğini, % 7,5 ve % 10 tuzda *L. brevis* ve *L. plantarum* türlerinin gelişmediğini belirtmişlerdir

## 2.9 Laktik Asit Bakterilerinin Proteolitik Aktiviteleri

Laktik asit bakterilerinde proteolitik sistemin önemi, LAB'nin proteince zengin ortamlarda hızla gelişebilmesinden kaynaklanmaktadır. Proteinazların ve peptidazların birlikte etkisi sonucu, hücre için gerekli küçük peptidler ve esansiyel aminoasitler oluşmaktadır (Kok 1990).

Laktik asit bakterilerinin proteolitik sistemi proteinazlardan, peptid ve amino asit sistemlerinden ve sitoplazmik peptidazlardan oluşmaktadır (Moulay 2006). Laktik asit bakterilerinin proteolitik sistemi sitoplazma dışındaki enzimler, transport sistemi ve hücre içi enzim sistemi olmak üzere üçe ayrılmaktadır ( Johnson ve Steele 2001).

Laktokoklarda hücre dışı proteinazlar (PrtP), kazein kullanımında ilk aşamayı katalize etmektedir. Proteinazların hücre dışı aktiviteleri sonucunda kazeinlerde farklı uzunlukta oligopeptidler oluşmaktadır. Kazeinden türeyen oligopeptidler, hücre dışı peptidazlar tarafından hidrolize edilmekte ve oluşan peptidler aminopeptidazlar tarafından hücre içine alınmaktadır.

Hücre dışı oligopeptid hidrolizinde sınırlı bir aktivite gösteren aminopeptidazların kazein türevi oligopeptidler üzerindeki enzimatik faaliyeti ile serin, treonin, glutamin, valin, lösin, alanin ve lizin gibi aminoasitler serbest kalmakta ve serin-lösin ya da glisin-serin içeren dipeptidler üretilmektedir. Oluşan bu amino asit ya da di ve tri peptid transport sistemleri üzerinden hücre içine alınmaktadır (Akçelik ve Şanlıbaba 2000).

Azotlu bileşiklerin sitoplazmik membran boyunca yer değişmesi özel transport sistemleri sayesinde olmaktadır. Özel transport sistemleri di/tripeptid transport sistemleri ve oligopeptid transport sistemlerinden (Opp) oluşmaktadır (Johnson ve Steele 2001).

Hücre içi peptidler, peptidazlar tarafından hidrolize edilmektedir. Peptidazlar endopeptidazlar ve ekzopeptidazlar olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Amino peptidazlar, tripeptidazlar ve dipeptidazlar ekzopeptidazlar grubundadır. Endopeptidazların ve ekzopeptidazlar sayesinde peptidler serbest aminoasitlere dönüşerek laktokokların gelişimine katkıda bulunmaktadır. LAB'nin proteolitik sistemi sütte gelişme kabiliyetlerine ve peynirlerde tadın gelişimine katkıda bulunmaktadır. Sütte bulunan serbest amino asitlerin miktarı LAB'nin gelişerek yüksek bir hücre yoğunluğuna sahip olması için yeterli değildir. Bu yüzden sütte bulunan peptidleri ve süt proteinlerini kullanarak amino asitlerin ortaya çıkarılması gerekmektedir. Proteoliz yoluyla peptidlerin ve amino asitlerin oluşumu, direk ya da dolaylı yoldan tat oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Tat oluşumu olumlu ya da olumsuz etki yapabilmektedir. İyi kalitede süt ürünlerinin oluşumunda LAB'nin proteolitik etkisi önemlidir (Johnson ve Steele 2001).

Bitkisel kökenli laktik asit bakterilerinin proteolitik aktivitesi ya çok azdır ya da yoktur ve diğer mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında amino asitleri indirgeme özellikleri düşüktür (Daeschel vd. 1987). Ekstraselüler proteinazlar dışında *Lb. plantarum* proteinin indirgenmesi için birçok gene sahiptir ve Opp sistemi için birçok geni kodlayabilmektedir. Diğer laktobasiller, laktokoklara benzer bir şekilde PrtP proteinlerine sahiptir (Axelsson 2004).



### 3 MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Turşu ve salamura örnekleri

Laktik asit bakterileri (LAB)'nin izole edilebilmesi için gerekli turşu örnekleri, 16.09.2008 - 01.12.2008 tarihleri arasında, 3 farklı dönemde, Ankara İli Çubuk ilçesinden temin edilmiştir. Bu amaçla; Çubuk ilçesinin farklı bölgelerinde faaliyette bulunan 14 ayrı ticari işletme, 2 ev üreticisi ve Ankara'da 1 satış marketi olmak üzere toplam 17 yer ziyaret edilerek (Çizelge 3.1), farklı hammaddelerden üretilmiş ve fermantasyonun değişik sürelerindeki 38 adet turşu ve salamura örneği alınmıştır.

Çizelge 3.1 Turşu ve salamura örneklerinin temin edildikleri yerler

Sıra No	İşletme ve Yer Kodu	Üretim Birimi
1	HY	Ticari işletme
2	HB	Ticari işletme
3	VT	Ticari işletme
4	FH	Ticari işletme
5	EÜ	Ticari işletme
6	İT	Ticari işletme
7	GT	Ticari işletme
8	MB	Ticari işletme
9	TT	Ticari işletme
10	ZT	Ticari işletme
11	AT	Ticari işletme
12	UK	Ticari işletme
13	KT	Ticari işletme
14	ET	Ticari işletme
15	E <sub>1</sub>	Ev üreticisi
16	E <sub>2</sub>	Ev üreticisi
17	MT	Satış marketi

Küçük ambalajlara kurulmuş turşu örnekleri orijinal ambalajı ile, büyük bidonlardan ise steril kaplara salamura örnekleri alınarak laboratuvara getirilmiştir. Örnekler +4 °C'de

muhafaza edilmiştir. Temin edilen turşu ve salamura örnekleri, kimyasal, mikrobiyolojik analizler ve laktik asit bakterilerinin izolasyonu için kullanılmıştır. Çalışma kapsamında, turşu ve salamura örneklerinin temin edildikleri yerler ve örneklere ilişkin diğer bilgiler çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Turşu ve salamura örneklerine ilişkin bilgiler

Turşu Örnek Kodu	İşletme ve Yer Kodu	Örnek Alım Tarihi	Örnek Fermantasyon Süresi (gün)	Örnek Tipi	Örnek Miktarı (mL)
1T	HY-1	16.09.2008	15-20	hıyar	100
2T	HY-2	16.09.2008	15-20	patlıcan	1000
3T	HY-3	16.09.2008	15-20	patlıcan	1000
4T	HY-4	16.09.2008	20-25	hıyar	100
5T	HB-1	16.09.2008	15-20	hıyar	1000
6T	HB-2	16.09.2008	15-20	hıyar	100
7T	VT	16.09.2008	30	hıyar	100
8T	FH-1	16.09.2008	20-25	domates ezmesi	100
9T	FH-2	16.09.2008	30	hıyar	100
10T	EÜ	16.09.2008	20	hıyar	100
11T	İT	16.09.2008	60	hıyar	30
12T	GT	16.09.2008	30	hıyar	30
13T	M-1	16.09.2008	10	hıyar	30
14T	M-2	16.09.2008	15-20	domates	30
15T	TT	16.09.2008	20	lahana	30
16T	ZT-1	16.09.2008	20	havuç	30
17T	ZT-2	16.09.2008	20	hıyar	30
18T	ZT-3	16.09.2008	20-25	domates	30
19T	AT-1	16.09.2008	20-25	hıyar	30
20T	AT-2	16.09.2008	20-25	hıyar	30
21T	AT-3	16.09.2008	30	hıyar	30
22T	AT-4	16.09.2008	20	hıyar	30
23T	UK-1	16.09.2008	20-25	hıyar	30
24T	UK-2	16.09.2008	20-25	hıyar	1000
25T	KT-1	16.09.2008	20-25	hıyar	1000
26T	KT-2	16.09.2008	10	hıyar	30
27T	KT-3	16.09.2008	30	hıyar	30
28T	KT-4	16.09.2008	15-20	fasülye	30
29T	ET	16.09.2008	20-25	hıyar	1000
30T	E <sub>1</sub> -1	15.11.2008	20	hıyar	500
31T	E <sub>1</sub> -2	15.11.2008	20	hıyar	500
32T	E <sub>1</sub> -3	15.11.2008	20	hıyar	500
33T	E <sub>1</sub> -4	15.11.2008	20	hıyar	500
34T	E <sub>2</sub>	15.11.2008	25	biber	500
35T	MT-1	01.12.2008	30	biber	200
36T	MT-2	01.12.2008	30	biber	200
37T	MT-3	01.12.2008	30	lahana	200
38T	MT-4	01.12.2008	30	karişik	200

## **3.2 Yöntem**

### **3.2.1 Turşu örneklerinin kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin belirlenmesi**

Laktik asit bakterileri (LAB)'nin izolasyonu için temin edilen turşu örneklerinden (38 adet) alınan tüm salamuralarda paralelli olarak pH ölçümü, titrasyon asitliği (% laktik asit) ve tuz (%) analizleri yapılarak, örneklerin kimyasal özellikleri ortaya konulmuştur. Ayrıca, turşu örneklerinin toplam laktik asit bakteri sayımları da yapılmıştır.

#### **3.2.1.1 Salamura örneklerinin pH değerinin belirlenmesi**

LAB'nin izolasyonunda kullanılan turşu salamura örneklerinin pH değerleri, pH metre (Mettler Toledo Seven Easy pH, China) ile belirlenmiştir. Cihazın kalibrasyon işlemlerinde pH 4,0 ve pH 7,0 tampon çözeltileri (Hamilton Duracal Buffer, Switzerland) kullanılmıştır.

#### **3.2.1.2 Salamura örneklerinde toplam asitliğinin belirlenmesi**

Salamura örneklerinde toplam asitliğin belirlenmesi için 1 mL örnek alınarak, üzerine belli miktar (40 mL) saf su ilave edilmiş ve 2-3 damla % 1'lik fenolftaleyn (Merck, Germany) indikatörü eşliğinde, ayarlı 0,01 N NaOH (Merck, Germany) çözeltisiyle hafif pembe renk oluşuncaya kadar titre edilmiş ve harcanan alkali miktarı kaydedilmiştir ( $V_1$ ). Ayrıca, aynı şartlar altında örnek içermeyen şahit titre edilerek harcanan alkali miktarı kaydedilmiştir ( $V_2$ ). Sonuçlar aşağıda verilen formüle göre hesaplanarak 2 paralelin ortalaması alınmış ve toplam asitlik, % laktik asit cinsinden ifade edilmiştir (Anonim 1993, Aktan ve Kalkan 2000).

$$\% \text{ Asitlik} = \frac{V.F.E}{m} \cdot 100$$

V: Titrasyonda harcanan ( $V_1-V_2$ ) NaOH miktarı (mL)

F: Titrasyonda kullanılan bazın normalitesi

E: 1 mL NaOH'ın eşdeğeri asit miktarı (g)

Laktik asit için E: 0,09g

m: Örnek miktarı (mL)

### 3.2.1.3 Salamura örneklerinde tuz miktarının belirlenmesi

Salamura örneklerinde tuz miktarı, Mohr yöntemi esas alınarak belirlenmiştir. Bu amaçla, salamura örneklerinden 1 mL alınarak yaklaşık 40 mL saf su ile seyreltilerek, üzerine 1 mL % 5'lik potasyum dikromat ( $K_2CrO_4$ ) (Merck, Germany) çözeltisinden ilave edilmiş ve ayarlı 0,1 N  $AgNO_3$  (Merck, Germany) çözeltisiyle kremit kırmızısı renk oluşuncaya kadar titre edilmiştir. Harcanan  $AgNO_3$  çözeltisinin miktarı ( $V_1$ ) kaydedilmiştir. Şahit deneme olarak, aynı şartlarda örnek içermeyen numune titre edilerek harcanan  $AgNO_3$  miktarı ( $V_2$ ) kaydedilmiştir. Sonuçlar aşağıda verilen formüle göre hesaplanarak 2 paralelin ortalaması alınmış ve toplam tuz miktarı % NaCl cinsinden ifade edilmiştir (Anonim 1993, Aktan ve Kalkan 2000).

$$\% \text{ Tuz} = \frac{V.N.(0.0585)}{m} \cdot 100$$

V: Titrasyonda harcanan ( $V_1-V_2$ )  $AgNO_3$  miktarı (mL)

N: Titrasyonda kullanılan  $AgNO_3$  Normalitesi

m: Örnek miktarı (mL)

### 3.2.1.4 Salamura örneklerinde toplam laktik asit bakteri sayısının belirlenmesi

Toplam laktik asit bakterileri (LAB)'nin sayımı için; aseptik şartlarda turşu salamuralarından 1 mL örnek alınarak, 9 mL % 0,85 NaCl içeren steril fizyolojik tuzlu

su (FTS) içerisinde,  $10^{-1}$  ve  $10^{-7}$  aralığında seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilüsyondan, yayma plak yöntemine göre 0,1 mL örnek Man-Rogosa Sharpe (MRS-S) Agar (Merck, Germany) ve M17 Agar (Merck, Germany) içeren petrilere aktarılmıştır. Ekim yapılan petrilere 30 °C'deki inkübatörde (Binder, USA) 3 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Man vd. 1960). İnkübasyon sonunda her iki besiyerinde de muhtemel toplam laktik asit bakteri sayımı yapılarak, örneklerin laktik asit bakteri yükleri belirlenmiştir. Farklı dilüsyonlara ait petrilere sayımı yapılan koloniler üzerinden salamura örneklerindeki toplam laktik asit bakteri miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanarak, sonuçlar log kob/mL cinsinden ifade edilmiştir (Halkman 2005). MRS besiyerinde *Laktobasillerin*, *Laktokokların* gelişmesini baskılayabilme olasılığına karşın, iki farklı besiyerine ayrı ayrı ekimler yapılarak sayım gerçekleştirilmiştir.

$$N = \frac{C}{[V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d]}$$

N: Örneğin 1 g veya 1 mL'sindeki mikroorganizma sayısı

C: Sayımı yapılan tüm petrilere toplam koloni sayısı

V: Sayımı yapılan petrilere aktarılan hacim (mL)

n<sub>1</sub>: İlk seyreltiden ekim yapılan petri adedi

n<sub>2</sub>: İkinci seyreltiden ekim yapılan petri adedi

d: Sayımı yapılan ardışık iki seyreltiden konsantr olanının seyreltme oranı

### 3.2.2 Salamura örneklerinden laktik asit bakterileri (LAB)'nin izolasyonu

Salamura örneklerinde LAB'nin sayımı amacı ile MRS ve M17 Agar besiyerleri üzerinde gelişen kolonilerin morfolojik özellikleri subjektif olarak incelenmiş; birbirinden farklı koloni morfolojisi gösteren tüm mikroorganizmalar ve bir petri üzerinde 10 koloniden az olanların hepsi öze yardımıyla alınmıştır. 10 mL'lik MRS veya M17 sıvı (Merck, Germany) besiyerlerine aktarılan koloniler, 30 °C'de 2-3 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübe edilen mikroorganizmalar tekrar uygun katı besiyerine sürme plak yöntemiyle aktarılarak, saf kültür oluşturmaları sağlanmıştır. Petrilere tek düşerek oluşan saf kültürler öze yardımı ile alınarak 10 mL'lik MRS veya

M17 sıvı besiyerlerinde, uygun koşullarda geliştirilmiştir. Gelişen izolatlar, izolasyonun gerçekleştirilmesinden sonraki ilk bir hafta içerisinde her iki günde bir, daha sonraki dönemde ise haftada bir olmak üzere aktifleştirilmiştir. Aktifleştirme işlemi (pasaj), 10 mL olarak hazırlanmış uygun steril taze sıvı besiyerlerine, bir önceki pasajdan 100 µL örnek aktararak gerçekleştirilmiştir. Saf kültürleri elde edilen mikroorganizmalar, tanımlama testlerinin uygulanma süresi boyunca +4 °C'de saklanmıştır (López-Díaz vd. 2000, Plessis vd. 2004).

Muhtemel laktik asit bakterisi olduğu düşünülen, Gram pozitif, Katalaz negatif ve Oksidaz negatif olarak belirlenmiş kültürler katı besiyerine tek koloni düşürme tekniği ile sürme yapılarak saflık kontrolünden geçirilmiş ve 5 mL'lik sıvı besiyerine alınıp geliştirilmiştir. 18-24 saatlik taze kültürler, toplam hacmin % 30 (mL/mL)'u gliserol olacak şekilde, steril koşullarda, gliserol (Merck, Germany) ilave edilerek tüp karıştırıcı ile (Heidolph MR Hei-Standard, Germany) iyice karıştırılmıştır. 1 mL'lik karyotüplere gliserollü kültür alınmış ve -65 °C'de muhafaza edilmiştir (Lages vd. 1999). Bu aşamadan sonra, izolatlar fenotipik tanımlama testleri uygulanmıştır. Testlerin uygulama aşaması öncesinde, kültürler aktifleştirilerek kullanılmıştır. Aktifleştirme işlemi için örnekler, gliserollü kültürlerden öze yardımıyla alınmış ve sıvı besiyerinde geliştirilmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlanarak kültürler uygulanacak testler için hazır hale getirilmiştir (Halkman 2005).

### **3.2.3 Laktik asit bakterileri (LAB)'nin tanımlanması**

#### **3.2.3.1 Fenotipik özelliklerin belirlenmesi**

##### **3.2.3.1.1 Koloni morfolojisi**

MRS veya M17 katı besiyerlerine sürme plak yöntemiyle ekimi yapılan mikroorganizmalar, 30 °C'de 2-3 gün inkübe edilerek oluşan kolonilerin morfolojileri incelenmiş ve opaklık (mat, şeffaf), boyut (küçük, büyük), form (dairesel, düzensiz),

renk (beyaz, sarı), profil (konveks, kubbeli, buruşuk) özellikleri açısından değerlendirilerek tipik koloni morfolojileri belirlenmiştir (Halkman 2005).

### **3.2.3.1.2 Gram boyama testi**

Gram boyama testinde, izolatların 10 mL'lik MRS veya M17 sıvı besiyerinde 30 °C'de geliştirilmiş 18-24 saatlik taze kültürleri kullanılmıştır. Aseptik koşullarda, kültürlerden bir öze dolusu (10 µL) örnek alınarak, temiz bir lam üzerine homojen şekilde yayılmış ve hava yoluyla kurutulmuştur. Alevden geçirilerek kültürler fikse edildikten sonra, Gram boyama setinin (Merck, Germany) üzerinde belirtilen talimatlar doğrultusunda boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Buna göre; kristal violet çözeltisi ile lam üzerindeki örnek 1 dakika süresince muamele edilmiş, süre sonunda lugol çözeltisi damlatılarak 1 dk bekletilmiştir. Damıtık su ile 5 saniye süreyle yıkama işlemi yapıldıktan sonra, 10-15 saniye dekolorizasyon çözeltisi ile muamele edilmiştir. Tekrar damıtık su ile 5 saniye yıkanan örneklerin üzerine safranin çözeltisi damlatılarak 1 dakika süreyle bekletilmiştir. Damıtık su ile tekrar 5 saniye yıkanan lam, hava akımı yardımı ile kurutulmuştur. Kuruyan lamdaki örnek üzerine immersiyon yağı (Merck, Germany) damlatılarak 100X objektifte ışık mikroskopunda (CME Leica, USA) incelenmiştir. Boyama sonucunda eflatun-mor renkli hücreler Gram pozitif, pembe-kırmızı renkli hücreler ise Gram negatif olarak değerlendirilmiştir.

### **3.2.3.1.3 Hücre morfolojisi**

Gram boyama aşamasında mikroorganizmaların hücre morfolojileri de incelenmiştir. İzole edilen mikroorganizmalar mikroskop altında hücre morfolojileri bakımından kok (yuvarlak) ve basil (çubuk) olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, bu aşamada mikroskopta, maya hücreleri oldukları anlaşılan izolatlar da, çalışma kapsamında çıkarılmışlardır.

#### **3.2.3.1.4 Katalaz testi**

Gram pozitif olarak belirlenen bakterilerin katalaz enzimi üretip üretmediklerini tespit etmek amacıyla, % 30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Germany) çözeltisi kullanılmıştır. 10 mL'lik MRS veya M17 sıvı besiyerinde 30 °C'de 18-24 saat geliştirilen taze kültürlerin üzerine 3-4 damla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi damlatılarak gaz çıkışının olup olmadığı gözlenmiş; gaz oluşturanlar Katalaz pozitif, oluşturmayanlar ise Katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Saginur 1982, William vd. 2001).

#### **3.2.3.1.5 Oksidaz testi**

Gram pozitif ve Katalaz negatif olarak belirlenen izolatlar, MRS veya M17 katı besiyerinde 30 °C'de 2-3 gün süreyle geliştirilmiş ve oluşan koloniler Oksidaz test kiti (Merck, Germany) ile teste tabi tutulmuşlardır. Katı besiyerinde gelişen kolonilerden plastik öze yardımıyla alınarak, oksidaz test kartları üzerindeki alana aktarılmış ve yaklaşık 1 dk bekletilerek renk değişimine göre sonuçlar değerlendirilmiştir. Test kartı üzerinde mavi rengin oluşması Oksidaz pozitif olarak kaydedilmiştir (López-Diaz vd. 2000).

#### **3.2.3.1.6 Glikozdan gaz oluşum testi**

Glikozun fermente edilmesiyle ortamda gaz oluşup oluşmadığını anlamak amacı ile, 10 mL MRS ve M17 sıvı besiyerleri içeren tüplere sterilizasyondan önce ters olarak Durham tüpleri yerleştirilmiş ve sterilize edilmiştir. Steril besiyerlerine, 18-24 saatlik taze kültürlerden % 0,1 oranında aşılama yapılarak, örnekler 30 °C'de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda Durham tüplerinin tabanında gaz oluşumunun varlığı kontrol edilmiştir. Gaz oluşturan kültürler heterofermentatif, oluşturmayanlar ise homofermentatif laktik asit bakterisi olarak değerlendirilmiştir (Hitchener vd. 1982, Randazzo vd. 2004).



### **3.2.3.1.7 Farklı sıcaklık derecelerinde gelişme testi**

Muhtemel laktik asit bakteri kültürlerinin farklı sıcaklıklarda gelişmelerinin belirlenmesi amacı ile uygun besiyerinde 24 saat süre ile aktifleştirilmiş kültürlerden, % 0,1 oranında 10 mL steril MRS ve M17 sıvı besiyerlerine aşılanarak 10 °C, 15 °C ve 45 °C sıcaklık derecelerinde kültürler 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüplerdeki gelişme dereceleri pozitif (+) ve negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Randazzo vd. 2004).

### **3.2.3.1.8 Arjinin hidroliz testi**

Laktik asit bakterilerinin fenotipik karakterizasyonuna yardımcı biyokimyasal test olarak, bakterilerin arjinini dekarboksile ederek amonyak oluşturmaları sonucu ortamın pH'sını yükseltmeleri ilkesinden yararlanılmıştır. Bu amaçla ornitin dekarboksilaz / arjinin dihidrolaz (Sigma, USA) temel besiyerine arjinin monohidroklorit (Merck, Germany) (5 g L-arjinin monohidroklorit / 1000 mL) ilave edilerek hazırlanan besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri, 24 saatlik kültürlerle aşılanmış ve 30 °C'de 1 hafta inkübe edilmiştir. L-arjinin monohidroklorit içeren tüplerde eflatundan sarıya dönen rengin tekrar eflatuna dönmesi ve aynı izolatin aşılandığı kontrol tüplerinde (L-arjinin monohidroklorit içermeyen) ise oluşan sarı rengin değişmeksizin kalması, pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir. Kontrol tüpleri ile birlikte L-arjinin monohidroklorit içeren tüplerde rengin sarı olarak kalması ise negatif sonuç olarak kabul edilmiştir. Kontrol tüpleri ile birlikte L-arjinin monohidroklorit içeren tüplerde, rengin eflatun olarak kalması durumunda ise gelişme yetersiz görülmüştür (Arda 2000).

### **3.2.3.1.9 Karbonhidrat fermantasyon profillerinin belirlenmesi**

Bakterilerin karbonhidrat fermantasyon karakterizasyonu hakkında bilgi sağlayarak tanımlamayı kolaylaştıran API (Analytical Profile Index) sistemi, laktik asit bakterilerinin tür düzeyinde belirlenebilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. API 50 CH test kitinden alınan sonuçlar, sisteme uygun bilgisayar programının veri

tabanında yer alan bakteri türleri ile karşılaştırılarak, tanımlama işlemi gerçekleştirilmektedir. Test sonuçları, ilgili programda “% tanımlama” şeklinde ifade edilmektedir.

Kültürlerin tür düzeyinde belirlenebilmesi amacıyla API 50 CH test kitinden (BioMerieux, France) yararlanılmıştır. Test kiti, 1 tanesi kontrol olmak üzere toplam 50 kuyucuktan oluşmaktadır. Analiz aşamasında kit içerisindeki bromkresol moru indikatörü içeren steril ‘API 50 CHL’ sıvı besiyerine 18 saatlik taze bakteri kültürlerinden, bulanıklıkları standart konsantrasyonda (2 McFarland veya  $A_{550}=0,5-0,6$ ) olacak şekilde ayarlanarak aşılama yapılmıştır. Kuyucukların içerisine, hazırlanan bu sıvı besiyerinden ilave edilerek üzerleri mineral yağ ile kapatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan kitler 30 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 24. ve 48. saatleri sonunda, kuyucuklardaki renk değişimleri, çizelge üzerine kaydedilmiştir. Renk değişiminin kaydedilmesi aşamasında, rengin mordan sarıya dönmesi pozitif (+), mor rengin değişmemesi negatif (-), ara renkler ise şüpheli (?) olarak değerlendirilmiştir. Kit üzerinde 25. kuyucukta yer alan eskulin testinde ise renk siyaha dönüştüğünde pozitif (+) olarak değerlendirilmiştir. Renk değişimlerine bağlı olarak ortaya çıkan sonuçlar, ‘API Identification Software’ (APILAB PLUS PROGRAM, BioMerieux) programında değerlendirilerek, izolatlar yüzde cins, tür veya alt tür düzeyinde belirlenmiştir.

### **3.2.3.2 Laktik asit bakterilerinin moleküler düzeyde tanımlanması**

#### **3.2.3.2.1 Toplam hücre protein profillerinin belirlenmesi**

Klasik fenotipik testler ve API 50 CH test kitleri ile tanımlamaları gerçekleştirilen LAB’nin moleküler düzeyde belirlenmesi için, Laemmli (1970) tarafından belirtilen yöntem modifiye edilerek ve Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) tekniği kullanılarak toplam hücre protein profilleri ortaya konmuştur. Bu amaçla, LAB’nin hücre proteinleri, farklı yöntemlerin kombine edilmesiyle izole edilmiştir (Angelis vd. 2001, Swida ve Binek 2005, Kim ve Adachi 2007). Elde edilen proteinler, poliakrilamid jelde yürütülerek oluşan protein bantları jel

görüntüleme sisteminde (Gel Logic 200 Imaging System Kodak, USA) görüntülenerek moleküler büyüklükleri hesaplanmıştır.

**Toplam hücre proteinlerinin izolasyonu:** Moleküler tanımlamaları yapılacak olan LAB'nin hücre proteinlerinin izolasyonu amacı ile kültürler MRS sıvı besiyerinde 30 °C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Elektroforez işleminde yürütülecek olan proteinlerin miktarını optimize etmek amacı ile inkübasyon sonrası 10 mL'lik sıvı besiyerinde, spektrofotometrede (UV-1208 Shimadzu, Japan) absorbansı  $A_{600}:2-2,5$  olacak şekilde hücre konsantrasyonu ayarlanan kültürler santrifüj (10 dk, 6000 rpm) edilerek sıvı faz uzaklaştırılmıştır. Çökeltideki kalıntı proteinlerin uzaklaştırılması için örnek 10 mL saf su ile yıkanarak tekrar aynı şartlarda (10 dk, 6000 rpm) santrifüj edilmiş ve sıvı faz uzaklaştırılarak çökelti toplanmıştır. Bakteri hücre duvarını parçalamak için, elde edilen hücre çökeltisi üzerine 100 µL lizozim enzim çözeltisi (Biochemica Applichem GmbH, Germany) ilave edilerek, 37 °C'de su banyosunda 1 saat süresince her 10 dk'da bir karıştırılarak bekletilmiştir. Lizozim enzimi ile muamele edilen hücreler -20 °C'de dondurulduktan sonra 1000 amplitude'da yaklaşık 1-2 dk süreyle kademeli olarak sonikasyon (VC 130 Sonics Vibra Cell, USA) işlemine tabi tutulmuştur (Angelis vd. 2001, Swida ve Binek 2005, Kim ve Adachi 2007).

Sonikasyon sonrası karıştırılan örneklerin içerisine 500 µL SDS-PAGE örnek tamponu (3,8 mL saf su, 1 mL 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,8 mL gliserol, 1,6 mL % 10 SDS, 0,8 mL β-mercaptoethanol, 0,4 mL % 0,05 bromophenol blue) ilave edilerek 10 dk karıştırılan örnekler su banyosunda 95 °C'de 5 dk bekletildikten sonra tüplere alınarak santrifüj edilmiş (10 dk, 12000 rpm, Biofuge 15 Heraeus Sepatech, Germany) ve elektroforez işlemi sıvı fazda gerçekleştirilmiştir.

**Elektroforez işlemi:** Örneklerdeki proteinlerin moleküler ağırlık profilleri Laemmli (1970) metoduna göre SDS-PAGE kullanılarak belirlenmiştir. Örneklerdeki proteinlerin poliakrilamid jelde yürütülmesi Mini Protean (Bio-Rad Laboratories, USA) dikey elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Santrifüj edilmiş örneklerden 20 µL alınıp jele yüklenmiştir. Ayırma ve yığın jelinin akrilamid konsantrasyonu, sırasıyla,

% 12 (11,73 mL su, 8,75 mL 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 tamponu, 0,35 mL % 10'luk g/mL SDS, 14 mL % 30'luk akrilamid/Bis, 175 µL % 10'luk amonyum persülfat ve 17,5 µL TEMED) ve % 4 (6,1 mL su, 2,5 mL 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 tamponu, 100 µL % 10'luk w/v SDS, 1,3 mL % 30'luk akrilamid/Bis, 50 µL % 10'luk amonyum persülfat ve 10 µL TEMED) olacak şekilde 1 mm kalınlığında dökülmüştür. Elektroforez için pH 8,3, 5X elektrot tamponu (37,5 g tris, 180 g glisin, 12,5 g SDS saf su içerisinde çözündürülüp hacim 2,5 L'ye tamamlanmıştır) hazırlanarak kullanım esnasında 1:4 oranında saf su ile seyreltilmiştir. Elektroforezde örnekler 70 volt (yığıma jeli) ve 100 volt (ayırma jeli) sabit akımda (EV231 Consort, Belgium) yaklaşık 2-3 saat süreyle yürütülmüştür. Elektroforez jelindeki proteinler Commassie brilliant blue G250 (% 0,1 Commassie brilliant blue G250, % 10 asetik asit, % 50 su, % 40 alkol) ile boyanmış ve boya içermeyen aynı oranlardaki çözelti ile boya uzaklaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Moleküler ağırlık standardı olarak her jelde 10-200 kDa aralığında 14 protein içeren standart (SM0661 Fermentas, EU) kullanılmıştır (Laemmli 1970).

Poliakrilamid jelde yürütülerek elde edilen protein bantları, jel görüntüleme sisteminde (Gel Logic 200 Imaging System Kodak, USA) görüntülenerek moleküler büyüklükleri hesaplanmıştır.

Protein bantlarının her bir örnekteki varlığı (1) ve yokluğuna (0) göre bir matriks oluşturulmuştur. Elde edilen bu matriks StatistiXL version 1.8 programında Unweighted Pair - Group Mean Average (UPGMA) yöntemiyle, Sorensen-Dice benzerlik katsayısı kullanılarak analiz edilmiş ve dendrogramları oluşturulmuştur.

### **3.2.3.2.2 16S rRNA dizi analizleri**

Suşların tanımlanması aşamasında klasik yöntemler ve test kitleri kesin sonuçlara ulaşmada yeterli bulunmamıştır. Bu testler ile elde edilen bazı sonuçlar moleküler tekniklerle karşılaştırıldığında benzer sonuçlara ulaşılamamış ve hata oranı yüksek olmuştur. Bunun temel sebebi laktik asit bakterilerinin temel özelliklerinin birbirine çok

benzemesidir. Özellikle, genetik olarak aynı grupta yer alan türlerde klasik yöntemler yetersiz kalmıştır.

**DNA izolasyonu:** Bakteri hücrelerinden DNA izolasyonu, “Qiagen DNeasy Tissue&Blood Kit”inde önerilen protokol izlenerek gerçekleştirilmiştir.

**16S rRNA'nın amplifikasyonu ve dizi analizi:** İzole edilen DNA üzerindeki tekrarlanan 16S rRNA dizi bölgeleri, F27 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) ve R1492 (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) primerleri kullanılarak, PCR'da çoğaltılmıştır. Bu amaçla; hedef DNA, 1X buffer, 25 mM MgCl, 0,2 mM dNTP, 0,4 pmol primer ve 1,25 U Taq polimeraz (Fermentas) içeren 50 µL hacimdeki reaksiyon ortamında çoğaltılmıştır (Lane 1991).

Amplifikasyon işlemi sırasında kullanılan PCR programı; 94 °C'de 5 dk başlangıç denatürasyon aşaması, 30 döngüden oluşan 94 °C'de 1 dk denatürasyon, 55 °C'de 1 dk bağlanma ve 72 °C'de 1 dk uzama aşamasından oluşmaktadır.

Elde edilen PCR ürünleri, 1X TBE tamponu ile hazırlanmış ve etidium bromid eklenmiş % 0,8 (w/v)'lik agaroz jelinde elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektroforez işleminden sonra jel ultraviyole ışığı altında jel görüntüleme ve analiz sistemi (Gel Logic 200 Imaging System Kodak, USA) ile görüntülenmiş ve DNA bantları analiz edilmiştir. DNA bantlarının boyutlarını hesaplamada standart olarak 100 baz çiftlik DNA marker (Fermentas) kullanılmıştır.

DNA dizi analizi, REFGEN Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti.'nde hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. DNA dizi analizi, Bigdye Cycle Sequencing (v.3.1.) kitinde önerilen protokol izlenerek, ABI 3130 XL Genetic Analyzer cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

DNA baz sırası belirlendikten sonra bu dizi bilgisayar tabanlı BLAST programı kullanılarak veri tabanı ile karşılaştırılmıştır. Tarama sonucu, aranan dizi sırasının hangi mikroorganizmaya ve suşa ait olabileceği, benzerlik yüzdesi ile birlikte belirlenmiştir. Ayrıca; elde edilen 16S rRNA dizi sonuçları, “Mega 5” isimli bilgisayar programı aracılığıyla, filogenetik dendrogramları oluşturularak genetik akrabalıkları ortaya konmuştur.

### **3.2.4 Laktik asit bakterilerinin teknolojik ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi**

#### **3.2.4.1 LAB'nin farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme özelliklerinin belirlenmesi**

Laktik asit bakterilerinin farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme özelliklerinin belirlenmesi amacı ile uygun besiyerinde 24 saat süre ile aktifleştirilmiş taze kültürlerden % 0,1 oranında % 0, % 3, % 6,5, % 10, % 12 tuz (NaCl) içeren 5 mL steril MRS sıvı besiyerlerine aşılanarak, 30 °C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası kültürlerin 600 nm dalga boyunda absorbansları (UV-1208 Shimadzu, Japan) ölçülerek, gelişme özellikleri optik yoğunluk (OD<sub>600</sub>) olarak ifade edilmiştir. Spektrofotometre, aynı şartlardaki besiyerine karşı sıfırlanmıştır (Chao vd. 2009).

#### **3.2.4.2 LAB'nin farklı pH değerlerinde gelişme özelliklerinin belirlenmesi**

Laktik asit bakterilerinin farklı pH değerlerinde gelişme özelliklerinin belirlenmesi amacı ile uygun besiyerinde 24 saat süre ile aktifleştirilmiş taze kültürlerden % 0,1 oranında, pH değerleri 2 N NaOH ve 2 N HCl ile sterilizasyon işleminden sonra pH 2,0, pH 3,0, pH 4,0, pH 5,0, pH 6,5, pH 9,6 olarak ayarlanmış 5 mL steril MRS sıvı besiyerlerine aşılanarak, 30 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası kültürlerin 600 nm dalga boyunda absorbansları ölçülerek, gelişme özellikleri OD<sub>600</sub> cinsinden ifade edilmiştir. Spektrofotometre aynı şartlardaki besiyerine karşı sıfırlanmıştır (Vinderola ve Reinheimer 2003).

### 3.2.4.3 LAB'nin asit üretim miktarlarının ve hızlarının belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin asit üretim miktarlarının ve hızlarının belirlenmesi amacı ile MRS sıvı besiyerinde 30 °C'de 24 saat süre ile aktifleştirilmiş taze kültürlerden 2 tekerrürlü olarak % 0,1 oranında 10 mL steril MRS sıvı besiyerlerine aşılansarak, 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 12., 24., 48. saatlerinde ve 14. gününde 0,5 mL örnek alınarak, 2 paralelli olarak, titrimetrik yöntemle toplam % laktik asit miktarı hesaplanmıştır. Ayrıca, inkübasyonun 14. gününde sıvı kültürlerin pH ölçümleri yapılarak kaydedilmiştir. Sıvı kültür örneklerinde toplam asitliğin belirlenmesi için 0,5 mL örnek alınarak, üzerine belli miktar (40 mL) saf su ilave edilmiş ve 2-3 damla % 1'lik fenolftaleyn (Merck, Germany) indikatörü eşliğinde, ayarlı 0,01 N NaOH (Merck, Germany) çözeltisiyle hafif pembe renk oluşuncaya kadar titre edilmiş ve harcanan alkali miktarı kaydedilmiştir (V<sub>1</sub>). Ayrıca, aynı şartlar altında inkübe edilmemiş sıvı kültür (şahit) titre edilerek harcanan alkali miktarı kaydedilmiştir (V<sub>2</sub>). Sonuçlar aşağıda verilen formüle göre hesaplanarak her bir tekerrürün 2 paralelinin ortalaması alınmış ve toplam asitlik, % laktik asit cinsinden ifade edilmiştir (Anonim 1993).

$$\% \text{Asitlik} = \frac{V \cdot F \cdot E}{m} \cdot 100$$

V: Titrasyonda harcanan (V<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>) NaOH miktarı (mL)

F: Titrasyonda kullanılan bazın normalitesi

E: 1 mL NaOH'ın eşdeğeri asit miktarı (g)

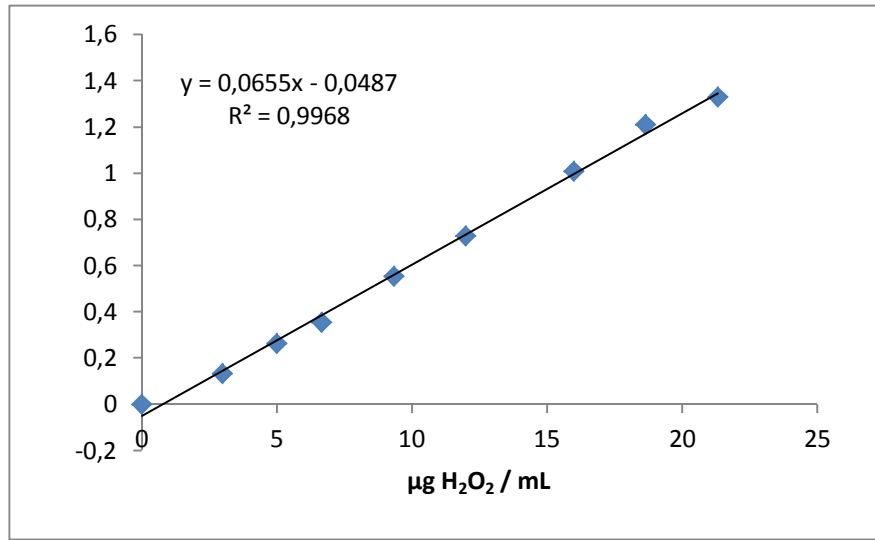
Laktik asit için E: 0,09g

m: Örnek miktarı (mL)

### 3.2.4.4 LAB'nin hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) üretim miktarlarının belirlenmesi

LAB kültürlerinin sıvı besiyerinde ürettiği H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının belirlenmesi için, uygun besiyerinde aktifleştirilen kültürlerden, 10 mL MRS sıvı besiyerine % 0,1 oranında aşılansarak, 30 °C'de 48 saat inkübe edilmiş ve sıvı kültürlerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı

belirlenmiştir. Hidrojen peroksit miktarının belirlenmesinde standart kurvenin çizilmesi için; 100 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (% 30) alınıp 50 mL'ye steril MRS sıvı besiyeri ile tamamlanarak stok hidrojen peroksit çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiden belirli hacimlerde alınarak MRS sıvı besiyeri ile artan konsantrasyonlarda seri çözeltiler elde edilmiştir. Daha sonra her bir konsantrasyondan 2,5 mL alınarak üzerine 0,5 mL peroksidaz çözeltisi (% 0,001), 0,05 mL o-dianisidin çözeltisi (% 1) ilave edilerek 30 °C'de 10 dk inkübe edilmiş, reaksiyon 0,1 mL 4 N HCl ile durdurulmuştur. 5 dk bekletilen standartların 400 nm'deki absorpsanları okunarak standart kurve çizilmiştir (Şekil 3.1). Aynı işlemler inkübe edilen sıvı bakteri kültürlerinde paralelli olarak yapılmış ve üretilen hidrojen peroksit miktarı hesaplanmıştır (Gilliland 1969, Yap ve Gilliland 2000, Sunil ve Narayana 2008).



Şekil 3.1 Hidrojen peroksit standart kurve grafiği

#### 3.2.4.5 LAB'nin antimikrobiyal aktivitesinin ve bakteriyosin üretiminin belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivite testleri agar yüzeyine nokta ekim (spot on lawn) yöntemi ile yapılmıştır. Bu testler önce aktif kültür kullanılarak yapılmış, daha sonra antimikrobiyal aktivite gösteren suşlarda süpernetant ile tekrar edilmiştir. Bu amaç için önce katı MRS besiyeri üzerine 24 saatlik aktif kültürlerden yaklaşık 1 µL ekim yapılarak



mikroorganizmalar geliştirilmiştir. Sonra % 1 indikatör mikroorganizma kültürü içeren 7 mL, % 0,7'lik yumuşak agarlı TSBY (triptik soy broth-yeast) besiyeri ikinci tabaka olarak petri kutusuna dökülerek yayılmıştır. Petriler her bir indikatör mikroorganizma için uygun koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Buna göre test sonucu, nokta koloni etrafında oluşan berrak zonun ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Aktif kültür kullanılarak gerçekleştirilen antimikrobiyal aktivite testleri sonucunda berrak zon oluşturan kültürlerin süpernetantları elde edilerek testler indikatörlere karşı denenmiştir. Bunun için 18-24 saatlik aktif kültürlerin asitliği nötralize edilmiş ve 10000 g'de 10 dk santrifüj edilmiş, süpernetant 0,25 µm'lik membran filtreden geçirilerek indikatör mikroorganizma ilave edilmiş TSBY (% 0,7 agar) üzerinde açılan kuyucukların içerisine ilave edilerek 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Schillinger ve Lücke 1989, Jacobsen 1999, Sanni 1999).

Çalışmamızda genel antimikrobiyal aktivite belirlenmesi aşamasında 7 adet indikatör mikroorganizma seçilmiştir. Laktik asit bakterilerinin bu indikatör mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri test edilerek, oluşturdukları inhibisyon zon çapları ölçülmüştür. İndikatör mikroorganizma olarak *Candida albicans* SLM, *Aspergillus parasiticus*, *Lb. brevis* no:57, *Bacillus cereus* FM1, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria innocua* LMG2813 kullanılmıştır. Zon çapları değerlendirilirken 0,5 cm ve bundan küçük inhibisyon zonu veren örneklerde antimikrobiyal aktivite yok olarak değerlendirilmiştir.

Genel antimikrobiyal aktiviteleri belirlenen tüm LAB türlerinin aktivitelerinin bakteriyosin veya diğer bileşiklerden kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirlemek amacıyla, daha sonraki çalışmalarda, inkübe edilen kültürlerin asitliği nötralize edilerek santrifüj edilmiş ve membran filtreden (Millipore Millex-HV Hydrophilic PVDF) geçirilerek nötral süpernetantın antimikrobiyal aktivitesi agar kuyu difüzyon yöntemiyle test edilmiştir (Tagg ve McGiven 1971). Bu aşamada indikatör mikroorganizma olarak, *Listeria innocua* LMG2813, *Staphylococcus carnosus* MC1B, *Lb. brevis* no:57 ve bakteriyosin duyarlılığı yüksek olan *Micrococcus luteus* NCIMMBB8166 suşları kullanılmıştır. Referans suş olarak ise, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji

Bölümü'nden temin edilen ve bakteriyosin üreten *L. lactis* 27 (LL27) suşu kullanılmıştır.

#### **3.2.4.6 LAB'nin proteolitik aktivitesinin belirlenmesi**

Kromojenik metot ile yapılan çalışmanın prensibi LAB proteinazlarının kromojenik peptidten açığa çıkardıkları p-nitroanilide (pNA) miktarının 410 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde; LAB kültürleri 100 mL MRS-Ca (10 mM CaCl<sub>2</sub>) besiyerinde 24 saat 30 °C'de geliştirilerek santrifüj edilerek (10000 g, 10 dk, 4 °C) elde edilen bakteri çökeltisi 2 kez 10 mM CaCl<sub>2</sub>-tuz çözeltisiyle yıkanmıştır. Daha sonra çökelti üzerine 5 mL Tris buffer (50 mM, pH 7,8) ilave edilerek hücreler resüspanse (enzim çözeltisi) edilmiştir. Hazırlanan enzim çözeltisinden 200 µL alınarak üzerine, sırasıyla, 287,5 µL fosfat buffer (0,2 M, pH 7,0), 225 µL 5 M NaCl ve 20 µL S-Ala (N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide, 20mM, Sigma) konarak 30 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası reaksiyonu durdurmak için 175 µL % 80'lik asetik asit ilave edilerek 13000 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Sıvı fazın absorbansı, spektrofotometrede 410 nm'de okunarak açığa çıkan pNA konsantrasyonu OD<sub>410</sub> olarak ifade edilmiştir (Berdal vd. 1983, Savoy ve Hebert 2001).

#### **3.2.4.7 LAB'nin enzim profillerinin belirlenmesi (API ZYM)**

Analiz aşamasında MRS besiyerinde 24 saat geliştirilen kültürler 15000 g'de 10 dk santrifüj edilerek sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra, 1 mL kit (Biomérieux – France) içerisindeki steril API NaCl (% 0,85) solusyonu ile süspanse edilen bakteri kültürlerinden 5-6 McFarland bulanıklığında bakteri süspanسیونları hazırlanmıştır. Daha sonra kuyucukların içerisine bu süspanسیونdan 65 µL ilave edilerek kitler 30 °C'de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası kuyucukların içerisine, sırasıyla, 1 damla ZYM A ve ZYM B reaktifi damlatılarak 5 dk beklenmiş ve 10 sn 1000 W ışık kaynağı altında tutulan striplerdeki renk değişimleri ve yoğunlukları kullanma kılavuzunda belirtilen şekilde değerlendirilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 API-ZYM ile test edilen enzimler

<i>Test</i>	<i>Enzyme assayed for:</i>	<i>Test</i>	<i>Enzyme assayed for:</i>
1	Control	11	Phosphatase acid
2	Phosphatase alkaline	12	Phosphoamidase
3	Esterase (C 4)	13	$\alpha$ Galactosidase
4	Esterase lipase (C 8)	14	$\beta$ Galactosidase
5	Lipase (C 14)	15	$\beta$ Glucuronidase
6	Leucine aminopeptidase	16	$\alpha$ Glucosidase
7	Valine aminopeptidase	17	$\beta$ Glucosidase
8	Cystine aminopeptidase	18	$\beta$ Glucosaminidase
9	Trypsin	19	$\alpha$ Mannosidase
10	Chymotrypsin	20	$\alpha$ Fucosidase

### 3.2.4.8 LAB'nin biyojen amin üretim özelliklerinin belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin biyojen amin üretim özelliklerinin belirlenmesi amacı ile; Decarboxylase Broth Moeller besiyeri (Difco) içerisine % 0,5 yeast extract, % 0,25 NaCl, % 0,1 tween80, % 0,02 MgSO<sub>4</sub>, % 0,005 MnSO<sub>4</sub>, % 0,004 FeSO<sub>4</sub>, % 0,2 di-amonyum sitrat, % 0,2 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,01 CaCO<sub>3</sub> ilave edilerek hazırlanan modifiye besiyeri içerisine % 1 oranında histidin monohidroklorit, lizin monohidroklorit, tirozin ve arjinin monohidroklorit (Merck) aminoasitleri eklenerek (pH 5,3) 121 °C'de 10 dk sterilize edilmiştir. Kontrol olarak ise aminoasit ilave edilmemiş besiyeri kullanılmıştır. Analiz aşamasında MRS sıvı besiyerinde 30 °C'de 24 saat süre ile aktifleştirilmiş taze kültürlerden % 0,1 oranında dekarboksilaz sıvı besiyerine aşılanarak 30 °C'de 4 gün inkübe edilmiştir. Gelişme ortamında rengin sarıdan mor-eflatun'a dönüşmesi (biyojen amin oluşumu) pozitif olarak değerlendirilmiştir (Bover-Cid ve Holzapfel 1999)

### 3.2.5 Laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliklerinin belirlenmesi

#### 3.2.5.1 LAB'nin pH 2,5'de canlı hücre oranının belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin mide asitliğine karşı dayanımlarının belirlenmesi amacıyla, bakteri kültürleri öncelikle MRS sıvı besiyerine % 1 oranında aşılanarak 30 °C'de 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonrası santrifüj edilen (6000 g, 15 dk) örneklerin çökeltileri pH'sı 2,5 olan PBS (phosphate-buffered saline; 9 g/L NaCl, 9 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 1,5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) içerisinde süspanse edilerek ilk

hacimlerine tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan hücre süspansiyonlarından mikrobiyolojik ekim için başlangıç örnekleri alınmış ve 37 °C'de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. 0. ve 4. saatlerde alınan örneklerden uygun dilüsyonlar hazırlanarak, MRS Agar besiyerinde yayma kültürel sayım yöntemine göre ekimler yapılmıştır. 0. ve 4. saatlerdeki sayım sonuçları dikkate alınarak suşların pH 2,5'de canlılık düzeyleri belirlenmiştir (Conway vd. 1987).

### **3.2.5.2 LAB'nin safra tuzuna dayanım düzeylerinin belirlenmesi**

Laktik asit bakterilerinin safra tuzlarına karşı dayanımlarının belirlenmesi amacıyla, bakteri kültürleri öncelikle MRS sıvı besiyerine % 1 oranında aşılansak 30 °C'de 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. Taze kültürlerden % 1 oranında % 0,3 safra tuzu (Oxgall) içeren MRS sıvı besiyerine inoküle edilerek 37 °C'de 4 saat inkübe edilmiştir. Laktik asit bakterilerinin canlılık düzeylerinin belirlenmesi amacı ile, inoküle edilen (0. saat) taze kültürlerde ve 4 saat inkübasyon sonucu safra tuzu içeren besiyerinde yayma plak yöntemi ile canlı hücre sayımı yapılmıştır (Yavuzdurmaz 2007).

### **3.2.5.3 LAB'nin pepsin ve pankreatin varlığında canlı hücre oranının belirlenmesi**

Laktik asit bakterilerinin pepsin ve pankreatin enzimlerine karşı dayanımlarının belirlenmesi amacıyla, bakteri kültürleri öncelikle MRS sıvı besiyerine % 1 oranında aşılansak 30 °C'de 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmış ve bu yolla oluşan taze kültürler, analizde kullanılmıştır. LAB'nin pepsin varlığında canlılık düzeylerinin belirlenmesi için, taze kültürlerden % 1 oranında, membran filtrasyonu ile sterilize edilmiş FTS (% 0,85 NaCl, 3 mg/mL pepsin, pH 2,5) çözeltilisine aşılansak, 37 °C'de 4 saat inkübe edilmiştir. Pankreatin varlığında canlılık düzeylerinin belirlemek için de, taze kültürlerden % 1 oranında FTS (% 0,85 NaCl, % 0,3 safra tuzu, 1 mg/mL pankreatin, pH 8) çözeltilisine aşılansak 37 °C'de 6 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon öncesi ve sonrası yayma plak yöntemi ile sayım yapılarak kültürlerin canlılık düzeyleri belirlenmiştir (Kimura vd. 2006, Musikasang vd. 2009).

#### **3.2.5.4 LAB'nin safra tuzlarını dekonjüge etme özelliklerinin belirlenmesi**

LAB'nin safra tuzlarını dekonjüge etme özelliklerinin belirlenmesinde Agar plak yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, MRS Agar besiyeri içerisine 1 mM veya % 0,3 olacak şekilde (Sigma) sodium taurodeoxycholate hydrate (TDCA), taurocholic acid sodium salt hydrate (TCA), sodium tauroolithocholate (TLCA), sodium glycocholate hydrate (GCA), sodium taurochenodeoxycholate (TCDCA) ayrı ayrı ve birebir karışımları ilave edilerek, 121 °C'de 15 dk sterilize edilmiştir. Petrilere dökülen agarlı besiyerleri 1 gün süre ile dinlendirilerek, taze bakteri kültürlerinden her bir petriye yaklaşık 10 µL aktararak 37 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası koloniler etrafında oluşan prespitat ve berrak zonların çapı ölçülmüştür (Ahn vd. 2003).

#### **3.2.5.5 LAB'nin bazı antibiyotiklere karşı dirençlerinin belirlenmesi**

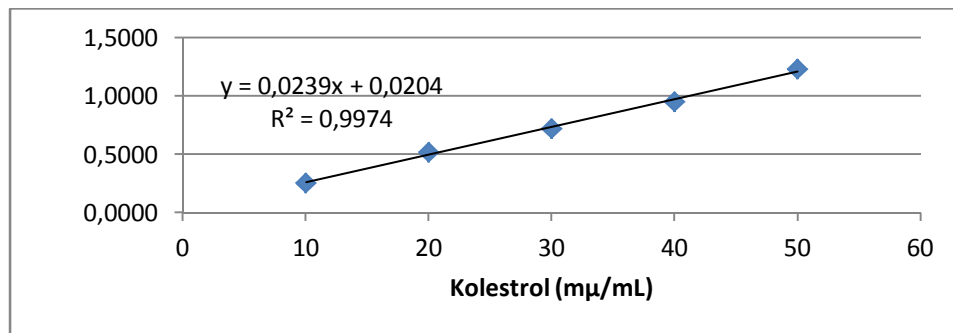
Laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesinde, disk difüzyon metodu kullanılarak, 30 µg chloramphenicol (C30), 10 µg ampicillin (AM10), 15 µg erythromycin (E15), 30 µg tetramycin (TE30), 30 µg kanamycin (K30) antibiyotiklerine karşı test edilmiştir. Disk difüzyon metodunda, MRS sıvı besiyerinde 48 saat aktifleştirilen kültürlerden MRS Agar besiyerine 100 µL aktararak yayma işlemi gerçekleştirilmiş ve her bir petriye antibiyotik disklerinden yerleştirilerek 48-72 saat inkübe edilmiştir. Çalışmada patojen bakteri olarak ise *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *E. coli* ATCC 25922 ve *Listeria innocua* LMG2813 kültürleri kullanılmıştır. İnkübasyon sonrası antibiyotik diskler etrafında oluşan berrak zon çapları ölçülerek antibiyotiklere olan direnç belirlenmiştir (Thirabunyuan vd. 2009, Yüksekdağ ve Aslım 2010, Tambekar ve Bhutada 2010).

#### **3.2.5.6 LAB'nin kolesterol asimilasyon özelliklerinin belirlenmesi**

Laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyon özelliklerinin belirlenmesi için; MRS sıvı besiyerinde aktifleştirilen taze kültürlerden % 1 oranında, 50 µg/mL

konsantrasyonunda olacak şekilde suda çözünür kolestrol (PEG600, Sigma) ilave edilmiş MRS sıvı besiyerine aşılanarak, 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiş ve daha sonra bakterileri uzaklaştırmak için santrifüj işlemine tabi tutularak sıvı faz ayrılmıştır. Aynı işlemler inoküle edilmemiş besiyerine de uygulanarak, kontrol örnek olarak analize alınmıştır (Gilliland vd. 1985, Pereira ve Gibson 2002, Al-Awwad vd. 2009).

Elde edilen sıvı fazda, OPA (*o*-phtalaldehit) metodu kullanılarak kolestrol miktarı belirlenmiştir. OPA metodu ile kolestrol miktarının belirlenmesi aşamasında, 0,5 mL sıvı fazdan alınarak üzerine 3 mL % 95’lik etil alkol ve 2 mL % 5’lik KOH ilave edilerek 60 °C’de 10 dk bekletilmiştir. Daha sonra soğutulan çözelti üzerine 5 mL hekzan, 3 mL saf su ilave edilerek 15 dk oda sıcaklığında bekletilerek faz ayrımı sağlanmıştır. Hekzan tabakasından 2,5 mL alınarak 60 °C’de azot gazı altında hekzanın uzaklaşması sağlanarak üzerine 4 mL *o*-phtalaldehit (0,5 mg/mL) ilave edilmiştir. Daha sonra 10 dk bekletilen örneklerin üzerine 2 mL sülfirik asit eklenerek 550 nm’de spektrofotometrede absorbansları ölçülmüştür. Hesaplamalarda ve standart kurvenin çizilmesinde aynı şartlarda hazırlanmış olan 10, 20, 30, 40 ve 50 µg kolestrol/mL konsantrasyonlarında kademeli çözeltiler kullanılmıştır. Ölçülen absorbans değerleri üzerinden standart kurve yardımı (Şekil 3.2) ile sıvı fazdaki, yani bakteriler tarafından asimile edilmeyen kolestrol miktarı hesap edilmiştir. Benzer şekilde % kolestrol asimilasyon değeri ise, sıvı fazdaki kolestrol oranı ile kontrol örneğinde (45,72 ±0,65 µg/mL) hesap edilen değer üzerinden hesaplanmıştır (Rudel ve Morris 1973).



Şekil 3.2 Kolestrol miktarının belirlenmesinde kullanılan standart kurve (OPA metodu)

### 3.2.5.7 LAB'nin hücre yüzey hidrofobisite özelliğinin belirlenmesi

Mikroorganizmaların hidrokarbonlara tutunma özellikleri hidrofobisite olarak ifade edilmektedir. Bu özelliğinin ölçülmesi aşamasında; laktik asit bakterileri MRS sıvı besiyerinde aktifleştirilip, 6000 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek elde edilen hücre çökeltisi 2 kez 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen yıkanmış çökelti, aynı tampon çözelti ile absorbansı (560 nm) yaklaşık 1 (A<sub>0</sub>) olacak şekilde tekrar çözündürülerek, 3 mL bakteri süspansiyondan 0,6 mL n-hexadecane içeren tüp içerisine aktararak 2 dk karıştırılmış ve 37 °C'de 1 saat bekletilmiştir. Faz ayrımı gerçekleştirildikten sonra alt faz (n-hexadecane fazı) alınarak 560 nm'de absorbansı (A) ölçülmüştür. Aşağıdaki formül kullanılarak mikroorganizmaların % hidrofobisitesi (% H) hesap edilmiştir (Perez vd. 1998, Frizzo vd. 2010).

$$\% H = \left[ \frac{A_0 - A}{A_0} \right] * 100$$

### 3.2.6 Seçilmiş starter kültürler ile hıyar turşusu üretimi

#### 3.2.6.1 Fermantasyonun izlenmesi

Teknolojik ve fonksiyonel özellikleri açısından önemli bulunan laktik asit bakterileri (No: 269, 270, 148, 125), starter kültür olarak seçilerek turşu denemeleri kurulmuştur. Bu amaçla, Çubuk Bölgesinden temin edilen hıyarlar kullanılmıştır. Salamura hazırlamada ise Hıyar turşusu standardı TS11112'ye (Anonim 1993) uygun tuz, su, CaCl<sub>2</sub> (Merck), glasiyel asetik asit (Merck) ve glikoz (Merck) kullanılmıştır. Fermantasyon denemeleri, kapağı açılmadan örnek almaya olanak sağlayan, özel örnek alma düzeneğine sahip 3 L hacimli cam kavanozlarda gerçekleştirilmiştir.

Hasadı izleyen 8-10 saat içerisinde laboratuvara getirilen turşuluk hıyarlar, öncelikle musluk suyu ile yıkanarak toz, çamur gibi kirliliklerinden arındırılmış ve klor çözeltisi içerisinde 15 dakika bekletildikten sonra, steril kaynak suyu ile yıkanarak klor

uzaklaştırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan 1,5 kg'lık hıyar, 1,5 kg salamura (% 8 tuz, % 0,4 asetik asit, % 2 glikoz) ile birlikte 3 L'lik fermantasyon kaplarına doldurulmuştur.

Fermantasyon denemeleri; *L. plantarum* (No 269), *L. plantarum* (No 270), *L. plantarum* (No 148) ve *L. plantarum* (No 269) ile *Pediococcus ethanolidurans* (No 125)'in karışık kültürü ile % 5 oranında aşılınmış ve kontrol amacıyla bakteri aşılınmamış örnekler olmak üzere 5 farklı parametre kullanılarak, 28 °C'de sıcaklık kontrollü karanlık bir odada 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Üç günde bir aseptik koşullarda alınan salamura örneklerinde pH, titrasyon asitliği, tuz (%), toplam indirgen şeker (%) ve mikrobiyolojik analizleri (toplam mezofilik aerobik bakteri, toplam LAB, toplam maya-küf, toplam *Enterobacteriaceae* sayımı) yapılarak 20 günlük fermantasyon süresince ortaya çıkan kimyasal ve mikrobiyolojik değişiklikler izlenmiştir. Fermantasyon bitiminde kimyasal ve mikrobiyolojik analizlere ek olarak, hıyar turşularında duyu analizi ve starter kültür stabilite testleri yapılmıştır.

### **3.2.7 Hıyar turşularında kimyasal ve mikrobiyolojik analizler**

#### **3.2.7.1 pH**

Salamuraların pH değeri, potansiyometrik olarak, pH-metre (Mettler Toledo, S-20K, İsviçre) ile 20 °C'de ölçülmüştür.

#### **3.2.7.2 Toplam titrasyon asitliği**

Salamura örneklerinde titrasyon asitliğinin belirlenmesi için 1 mL örnek alınarak, üzerine belli miktar (40 mL) saf su ilave edilmiş ve 2-3 damla % 1'lik fenolftaleyn (Merck, Germany) indikatörü eşliğinde, ayarlı 0,01 N NaOH (Merck, Germany) çözeltisiyle hafif pembe renk oluşuncaya kadar titre edilmiş ve harcanan alkali miktarı kaydedilmiştir ( $V_1$ ). Ayrıca, aynı şartlar altında örnek içermeyen şahit titre edilerek harcanan alkali miktarı kaydedilmiştir ( $V_2$ ). Sonuçlar aşağıda verilen formüle göre



hesaplanarak 2 paralelin ortalaması alınmış ve toplam asitlik, % laktik asit cinsinden ifade edilmiştir (Anonim 1993, Aktan ve Kalkan 2000).

$$\% \text{Asitlik} = \frac{V.F.E}{m} \cdot 100$$

V: Titrasyonda harcanan ( $V_1-V_2$ ) NaOH miktarı (mL)

F: Titrasyonda kullanılan bazın normalitesi

E: 1 mL NaOH'ın eşdeğeri asit miktarı (g)

Laktik asit için E: 0,09g

m: Örnek miktarı (mL)

### 3.2.7.3 Tuz tayini

Salamura örneklerinde tuz miktarı, Mohr yöntemi esas alınarak belirlenmiştir. Bu amaçla, salamura örneklerinden 1 mL alınarak yaklaşık 40 mL saf su ile seyreltilerek, üzerine 1 mL % 5'lik potasyum dikromat ( $K_2CrO_4$ ) (Merck, Germany) çözeltisinden ilave edilmiş ve ayarlı 0,1 N  $AgNO_3$  (Merck, Germany) çözeltisiyle kremit kırmızısı renk oluşuncaya kadar titre edilmiştir, harcanan  $AgNO_3$  çözeltisinin miktarı ( $V_1$ ) kaydedilmiştir. Şahit deneme olarak, aynı şartlarda örnek içermeyen numune titre edilerek harcanan  $AgNO_3$  miktarı ( $V_2$ ) kaydedilmiştir. Sonuçlar aşağıda verilen formüle göre hesaplanarak 2 paralelin ortalaması alınmış ve toplam tuz miktarı % tuz cinsinden ifade edilmiştir (Anonim 1993, Aktan ve Kalkan 2000).

$$\% \text{Tuz} = \frac{V.N.(0.0585)}{m} \cdot 100$$

V: Titrasyonda harcanan ( $V_1-V_2$ )  $AgNO_3$  miktarı (mL)

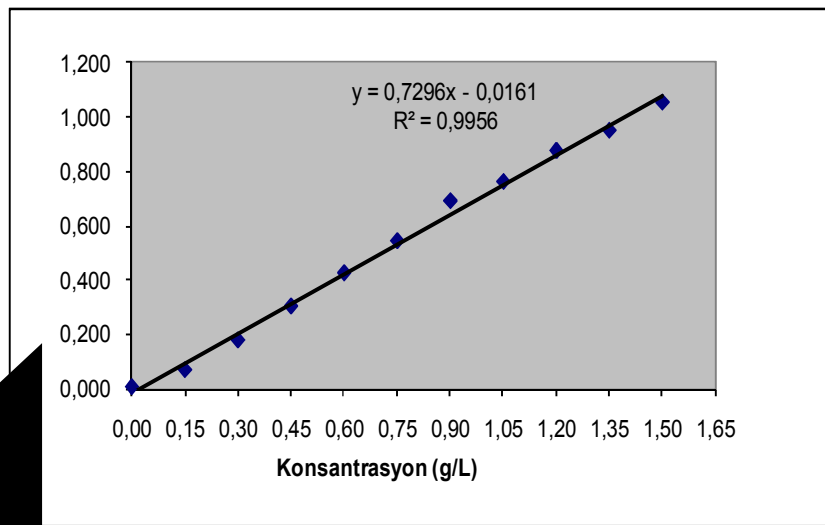
N: Titrasyonda kullanılan  $AgNO_3$  normalitesi

m: Örnek miktarı (mL)

### 3.2.7.4 Toplam indirgen şeker

Salamura örneklerinde indirgen şeker tayini DNS (3,5-Dinitrosalisilik asit) kullanılarak, değiştirilmiş Miller yöntemine göre yapılmıştır (Forouchi ve Gunn 1983). Analizden önce örnekler santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatant 0,45 µm gözenek çapındaki PVDF (polyvinylidene fluoride) filtreden (Millipore, Bedford, MA, A.B.D.) süzülerek berraklaştırılmıştır.

Gerekli oranda seyreltilmiş örnekten 1 mL alınıp, üzerine 2 mL DNS çözeltisi ilave edilerek karıştırılmıştır. Kaynar su banyosunda 15 dk bekletildikten sonra, oluşan sarı-kahverengi rengin stabilizasyonu için üzerine 1 mL Rachelle tuzu ilave edilip tekrar karıştırılmıştır. Laboratuvar sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra üzerine 5 mL damıtık su ilave edilip tekrar karıştırılmış ve Shimadzu UV-1208 spektrofotometrede, 575 nm dalga boyunda tanığa karşı absorbans değerleri ölçülmüştür. Tanık, uygulanan tüm işlemlerde örnek yerine damıtık su kullanılarak hazırlanmıştır. Hesaplama, 0,15-1,5 g/L glikoz içeren çözeltiler yardımıyla önceden çizilen standart eğri kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 İndirgen şeker analizi için standart kurve

### **3.2.7.5 Toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı**

Fermentasyon süresince ve depolanan turşu salamuralarından aseptik koşullarda alınan örnekler, % 0,85 tuz içeren steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ile seyreltilmiş ve toplam mezofilik aerobik bakteri, toplam LAB, toplam maya-küf, toplam *Enterobacteriaceae* sayımı için seri dilüsyonları kullanılmıştır.

Toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı, Plate Count Agar (PCA) besiyerinde yayma kültürel sayım yöntemine göre yapılmıştır. Örnekler 30 °C'de 48 saat inkübe edilerek canlı hücre sayımı yapılmıştır (Gürgün ve Halkman 1988).

### **3.2.7.6 Toplam LAB sayımı**

Toplam LAB sayımı, yayma kültürel sayım yöntemi kullanılarak MRS Agar besiyerinde yapılmıştır. Ekim yapılan petriyerler 30 °C'deki inkübatörde (Binder, USA) 3 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda canlı hücre sayımı yapılarak, sonuçlar log kob/mL olarak belirlenmiştir (Halkman 2005).

### **3.2.7.7 Toplam Maya-Küf sayımı**

Maya-küf sayımı, Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (YGC) besiyerinde yayma kültürel sayım yöntemine göre yapılmıştır. Örnekler 30 °C'de 48 saat inkübe edilerek canlı hücre sayımı yapılmıştır (Halkman 2005).

### **3.2.7.8 Toplam *Enterobacteriaceae* sayımı**

Toplam enterobakter sayımı % 1 oranında glikoz ilave edilmiş Violet Red Bile Agar (VRBA) besiyerinde yayma kültürel sayım yöntemine göre yapılmıştır (Gürgün ve Halkman 1988). 30 °C'de 18-24 saat inkübasyon sonunda oluşan koloni sayısı log kob/mL olarak belirlenmiştir.

### **3.2.8 Hıyar turşu örneklerinin duyuşal analizi**

Fermantasyon sonunda hıyar turşularında, 18-20 panelist tarafından görünüş, renk, koku, lezzet, sertlik ve genel beğeni parametreleri esas alınarak, 1-5 aralığındaki skala kullanılarak duyuşal değerlendirmeleri yapılmıştır (Shinagawa vd. 1997).

### **3.2.9 Turşu örneklerinde starter kültürlerin stabilitelerinin belirlenmesi**

269, 270, 148 ve 269-125 (karışık) numaralı starter kültürler kullanılarak gerçekleştirilen 3 tekerrürlü fermantasyon denemeleri sonucunda, fermantasyonun bitiminden sonra salamura örneklerinden yayma plak yöntemine göre MRS katı besiyerine ekim yapılmıştır. Katı besiyeri üzerinde oluşan kolonilerden rastgele 20 adet saf kültür seçilerek, bu bakterilerin salamuraya ilave edilen starter kültür olup olmadıkları, yöntem 3.2.3.2.1’de belirtildiği şekilde hücre protein profilleri (SDS PAGE elektroforez) incelenerek belirlenmiştir.

### **3.2.10 İstatistiksel değerlendirme**

Tekerrürlü olarak elde edilen analiz sonuçlarının ortalamaları alınarak standart sapmaları ile birlikte verilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi ve karşılaştırılması Minitab programında (Minitab release 12.1, Minitab inc., 1998) two sample T-test, one-way (ANOVA) ve balanced (ANOVA) analizleri kullanılarak yapılmıştır.

## **4 BULGULAR ve TARTIŞMA**

### **4.1 Çubuk Turşu Örneklerinin Temini**

Laktik asit bakterilerinin izole edilebilmesi için gerekli turşu örnekleri, 16.09.2008 - 01.12.2008 tarihleri arasında, 3 farklı dönemde, Ankara İli Çubuk ilçesinden temin edilmiştir. Bu amaçla; Çubuk ilçesinin farklı bölgelerinde faaliyette bulunan 14 ayrı ticari işletme, 2 ev üreticisi ve Ankara'da 1 satış marketi olmak üzere toplam 17 yer ziyaret edilerek (Çizelge 3.1), farklı hammaddelerden üretilmiş ve fermantasyonun değişik sürelerindeki 38 adet turşu ve salamura örneği alınmıştır. Örnekler +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Çubuk ilçesinde bulunan 14 ticari işletmeden 29 örnek, Çubuk'ta evlerde (E<sub>1</sub> ve E<sub>2</sub>) kurulan turşulardan 5 ayrı örnek toplanmış; 01.12.2008 tarihinde ise, 4 örnek Ankara'daki Çubuk turşusu satan marketlerden (MT), satış ambalajları içerisinde temin edilmiştir. Çalışma kapsamındaki turşu ve salamura örneklerinin temin edildikleri yerler, örnek alım tarihi, fermantasyon süresi, hammadde ve örnek miktarları çizelge 3.2'de verilmiştir. Örnekler, ağırlıklı olarak hıyar materyali üzerinden üretimi gerçekleştirilen turşular olmakla birlikte, patlıcan, domates, havuç, lahana, biber, fasulye ve karışık tip turşular da temin edilen örnekler arasında yer almaktadır.

Örneklerin temin edildiği sıradaki fermantasyon süreleri ise 10-60 gün arasında değişmekte, fermantasyon süreleri özellikle izole edilecek laktik asit bakterilerinin türleri üzerine önemli bir etkiye sahip olabilmektedir.

### **4.2 Turşu ve Salamura Örneklerinin Kimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri**

Özellikle homofermantatif LAB tarafından gerçekleştirilen asit üretimi, salamuranın laktik asit cinsinden toplam asitliğini arttırmakta ve turşuda koruyucu görevi üstlenmesini sağlamaktadır. pH değerindeki azalma, asitlik oluşumunun ortaya çıkardığı bir sonuç olarak kendini göstermektedir (Daeschel ve Fleming 1984).

Mikroorganizmaların izole edildiği turşu ve salamura örneklerinde (38 adet), paralelli olarak, pH ölçümü, titrasyon asitliği (% laktik asit) ve tuz (%) analizleri yapılmış olup; sonuçlar, toplam laktik asit bakterisi sayımları ile birlikte, çizelge 4.1’de verilmiştir.

Laktik asit bakterilerinin izole edildikleri turşu veya salamura örneklerinde; titrasyon asitliği değerleri, laktik asit cinsinden, 0,11-1,11 g/100 mL (ortalama 0,48 g/100 mL) arasında değişmektedir. Fermantasyonun başlangıç evrelerindeki salamuralardan alınan örneklerde, genellikle, titrasyon asitliği değerleri daha düşük tespit edilmiştir. Ancak; en düşük titrasyon asitliği değerinin (% 0,11) belirlendiği 3T numaralı örneğin, 1 litrelik orijinal kavanozu içerisinde alınan, tüketime hazır hıyar turşusu olması dikkat çekmektedir. En yüksek titrasyon asitliği değerinin (% 1,11) ise marketten temin edilen 35T numaralı biber turşusunda belirlenmesi ise, genellikle, işletmelerde biber turşusu üretiminde sarartma amacıyla dışarıdan sitrik asit ilave edilmesinin bir sonucu olarak yorumlanabilir.

Örneklerdeki pH değerleri 3,08-3,70 arasında (ortalama 3,39) belirlenmiştir. Doğu Himalaya bölgesinde ev ölçeğinde üretilen geleneksel fermente sebze ürünleri üzerinde çalışan Schillinger vd. (2005) araştırmaları sonucunda, ürünlerin pH değerlerini 3,50-5,00 arasında bulmuştur. Örneklerin pH ve titrasyon asitliği değerleri arasında ciddi bir korelasyon gözlenmemesi, muhtemelen, turşunun hazırlandığı sebzelerin ve salamuralarının tamponlama özelliklerinin farklılığından kaynaklanmaktadır.

Örnek salamuralarındaki tuz konsantrasyonları 1,34-6,94 g/100 mL (ortalama 3,77) arasında belirlenmiştir. En düşük tuz konsantrasyonu 13 nolu hıyar turşusunda, en yüksek tuz konsantrasyonu marketten temin edilen 35 nolu biber turşusunda tespit edilmiştir. İlgili turşu örneklerine ait tuz konsantrasyonlarının TSE 11112’ye uygun değerlere sahip olduğu yorumu yapılabilmektedir. Sebze fermantasyonlarındaki tuz, laktik olmayan (non-laktik) fermantasyonları engelleyebilme etkisiyle mikrobiyal gelişimi ve mikroorganizma tipini belirlemekle birlikte, konsantrasyonunun iyi ayarlanması doğal fermantasyonun seyri açısından önem taşımaktadır. Yeterli tuz oranı ile LAB gelişimini desteklemek ve aşırı tuz oranı ile gelişimi inhibe etmemek amacıyla

sebze fermentasyonlarındaki tuz oranının % 1-8 arasında olması gerektiği, fermentasyon için uygun tuz oranının ise % 5 civarında olduğu ifade edilmektedir (Daeschel ve Fleming 1984, Nout ve Rombouts 1992).

Çizelge 4.1 Salamura örneklerine ait kimyasal ve mikrobiyolojik analiz sonuçları

Turşu Örnek Kod	pH	Toplam Asitlik (g laktik asit/100mL)	NaCl (g/100mL)	Toplam Laktik Asit Bakterisi (log kob/mL)	
				MRS	M17
1T	3,50	0,34 ± 0,00	3,90 ±0,04	7,30	3,85
2T	3,33	0,22 ± 0,01	4,78 ±0,04	6,33	5,00
3T	3,62	0,11 ± 0,01	5,03 ±0,04	7,23	6,00
4T	3,34	0,48 ± 0,01	3,61 ±0,00	6,74	5,21
5T	3,29	0,14 ± 0,01	3,30 ±0,07	6,69	4,90
6T	3,47	0,40 ± 0,01	3,67 ±0,07	6,37	6,40
7T	3,45	0,44 ± 0,01	4,21 ±0,11	5,75	2,80
8T	3,43	0,65 ± 0,01	2,17 ±0,00	6,87	4,00
9T	3,26	0,45 ± 0,01	3,87 ±0,00	4,30	6,35
10T	3,31	0,53 ± 0,01	3,46 ±0,00	4,43	3,57
11T	3,42	0,47 ± 0,00	3,72 ±0,07	5,10	5,22
12T	3,48	0,51 ± 0,01	3,36 ±0,00	2,30	6,35
13T	3,30	0,60 ± 0,01	1,34 ±0,07	6,70	3,13
14T	3,08	0,26 ± 0,01	3,25 ±0,07	5,43	5,50
15T	3,20	0,57 ± 0,00	3,05 ±0,07	3,80	3,00
16T	3,11	0,59 ± 0,00	4,93 ±0,04	4,21	3,00
17T	3,39	0,54 ± 0,01	3,92 ±0,00	6,10	5,90
18T	3,37	0,66 ± 0,01	3,54 ±0,04	6,32	7,02
19T	3,54	0,48 ± 0,01	3,51 ±0,00	6,85	6,97
20T	3,63	0,34 ± 0,00	3,69 ±0,04	7,75	7,94
21T	3,25	0,52 ± 0,01	3,38 ±0,11	6,00	6,44
22T	3,59	0,35 ± 0,00	3,25 ±0,00	6,97	6,87
23T	3,44	0,40 ± 0,01	3,64 ±0,04	6,90	5,14
24T	3,42	0,42 ± 0,01	4,13 ±0,07	6,79	5,41
25T	3,36	0,48 ± 0,00	2,99 ±0,00	6,35	4,94
26T	3,54	0,54 ± 0,01	2,40 ±0,04	7,27	7,09
27T	3,30	0,65 ± 0,00	4,00 ±0,04	4,74	4,44
28T	3,32	0,52 ± 0,01	3,77 ±0,00	6,70	3,42
29T	3,41	0,26 ± 0,01	3,87 ±0,00	6,75	6,30
30T	3,62	0,33 ± 0,01	3,77 ±0,00	7,20	7,10
31T	3,40	0,41 ± 0,00	5,06 ±0,15	6,83	6,80
32T	3,70	0,27 ± 0,00	4,23 ±0,00	7,15	7,25
33T	3,60	0,39 ± 0,01	3,43 ±0,11	7,26	7,12
34T	3,30	0,67 ± 0,01	5,32 ±0,07	<1,00	3,36
35T	3,18	1,11 ± 0,01	6,94 ±0,11	6,62	3,50
36T	3,32	0,81 ± 0,02	2,48 ±0,00	3,70	3,86
37T	3,18	0,64 ± 0,00	3,95 ±0,04	7,53	4,77
38T	3,22	0,61 ± 0,00	4,21 ±0,04	7,50	4,00

Örneklerin kimyasal analiz sonuçlarındaki farklılıkların en önemli nedeni, örneklerdeki hammaddelerin farklılığı ve örnek alma zamanının fermantasyonun çok farklı evrelerinde olmasıdır.

Denemeye alınan tüm örneklerin salamuralarında toplam laktik asit bakterisi sayımları, MRS Agar ve M17 Agar besiyerleri üzerinde, ayrı ayrı, yayma plak yöntemine göre ekim yapılarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar çizelge 4.1'de verilmiştir. İki ayrı besiyerinde ayrı ayrı sayım yapılmasının gerekçesi, MRS Agar besiyerinde laktobasillerin laktokokların gelişmesini baskılayabilmesi olasılığıdır. Toplam laktik asit bakterisi sayıları; MRS Agar besiyerinde yapılan sayımlarda  $<1,00-7,75 \log \text{ kob/mL}$  ( $<10 - 5,6.10^7 \text{ kob/mL}$ ), M17 Agar besiyerinde yapılan sayımlarda ise  $2,80-7,94 \log \text{ kob/mL}$  ( $5,8.10^2 - 8,7.10^7 \text{ kob/mL}$ ) arasında belirlenmiştir.

Örneklere ilişkin asitlik ve tuz değerleriyle toplam laktik asit bakteri sayıları arasında orantılı ve düzenli bir ilişki görülmemektedir. Sebze fermantasyonlarında fiziksel ve kimyasal ortama bağlı olarak sıcaklık derecesi, tuz konsantrasyonu, asitlik düzeyi, pH gibi çeşitli parametreler ortama hakim mikroorganizma grubunu belirlemektedir. Buna bağlı olarak fermantasyon sürecinde, laktik asit bakterilerinin ortama hakim mikroorganizma konumunda olması asitliğin zamanla geliştiğine ve pH değişimlerine neden olduğuna kanıt olarak gösterilebilir (Daeschel ve Fleming 1984).

#### **4.3 Turşu Örneklerinden Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Tanımlanmaları**

Laktik Asit Bakterilerinin tanımlanmalarında geleneksel olarak kullanılan taksonomik sınıflandırmanın temeli; fizyolojik, morfolojik, farklı sıcaklıklarda, pH değerlerinde, tuz konsantrasyonlarında gelişim, arjinin degradasyonu ve karbonhidrat katabolizması gibi metabolik/biyokimyasal özelliklerin incelenmesini içeren fenotipik özelliklere dayanmaktadır (Lyhs 2002).

Toplam laktik asit bakterisi sayımları için MRS ve M17 Agar besiyerine ekim yapılan petrilerden, tek düşen ve farklı morfolojik özellik gösteren tüm koloniler alınmıştır. Bu



ilk aşamada; örnek alınan kolonilerin morfolojik yapı özellikleri incelenmemiş, farklı görülen kolonilerden örnekler alınarak koloni oluşturdıkları sıvı besiyeri içerisinde yeniden geliştirilmişlerdir. Bakteri olup olmadığı tanımı yapılmadan alınan bu ilk örneklerin bir kısmı (özellikle M17 Agar'dan alınanlar) gelişme göstermemiş, gelişme gösterenler, yeniden Agar'lı besiyeri üzerine ekim yapılarak saf kolonileri oluşturulmuştur. Oluşan saf koloniler ortamdaki uygun sıvı besiyerinde geliştirildikten sonra Gram boyama testi uygulanmış; bu aşamada, mikroskop altında yapılan incelemede saflıkları kontrol edilmiş, gelişen bazı mikroorganizmaların maya oldukları gözlenmiştir. Saf olmadıklarından şüphe duyulan izolatların Agar'lı besiyeri üzerinde tekrar koloni oluşturmaları sağlanarak, saf kolonileri temin edilmeye çalışılmıştır.

Laktik asit bakteri izolatlarının hangi besiyerinden izole edildikleri, koloni morfolojileri ve izolatlar üzerinde gerçekleştirilen Gram boyama, hücre morfolojileri (basil, kok), katalaz testi, oksidaz testi, gaz oluşturma ve farklı sıcaklıklarda (10, 15 ve 45 °C) gelişme özellikleri, arjinin hidroliz analiz sonuçları, Ek 1'de verilmiştir.

İlk aşamada turşu salamura örneklerinden, izolasyon amacıyla MRS ve M17 katı besiyerine yapılan ekim sonucu koloni morfolojileri belirlenen toplam 384 koloni seçilerek morfolojik ve biyokimyasal tanımlama işlemleri yapılmıştır. Saflaştırılarak izole edilen 384 mikroorganizmanın 196 adedi MRS ve 188 adedi M17 katı besiyerinden elde edilmiştir. Ancak saflaştırılan 384 izolatın 49 adedi uygun besiyerlerinde gelişme göstermedikleri için biyokimyasal analizlere 335 izolat ile devam edilmiştir. İzole edildikleri besiyerinde (MRS veya M17) gelişme gösteren 335 izolatın Gram reaksiyonları ve hücre morfolojileri mikroskop altında değerlendirilerek, 93 tanesinin maya olduğu anlaşılmıştır. Gram boyama sonucunda izolatlardan; 184 tanesi Gram pozitif, 58 tanesi Gram negatif olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak; toplam 151 örnek Gram negatif ve maya olarak tanımlandıkları için elemine edilerek, sonraki çalışmalar 184 Gram pozitif bakteri üzerinde sürdürülmüştür. Gram pozitif olarak belirlenen bakterilerin, mikroskopta hücre morfolojilerinin incelenmesi sonucu, 122 tanesinin Basil (çubuk), 62 tanesinin Kok (yuvarlak) olduğu belirlenmiştir.

Katalaz testi sırasında gerçekleşen kimyasal reaksiyon;  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$  şeklindedir. Katalaz enzimi varlığında kabarcık ve köpük halinde görülen  $\text{O}_2$  gazı ile bakteriler Katalaz pozitif olarak, herhangi bir reaksiyon oluşmadığında ise katalaz negatif olarak değerlendirilir. Laktik asit bakterileri katalaz negatif olarak bilindiğinden katalaz reaksiyonu pozitif olan örnekler elemine edilmiştir. 184 adet Gram pozitif bakterilerde test edilen katalaz enziminin varlığı sonucunda, 142 tanesinin katalaz negatif, 42 tanesinin katalaz pozitif olduğu belirlenmiştir.

Gram pozitif, katalaz negatif oldukları belirlenen 142 adet izolatın muhtemel laktik asit bakterisi oldukları düşünülerek, bundan sonraki çalışmaların bu 142 adet izolat üzerinden yürütülmesine karar verilmiş; bakteri izolatları % 30 gliserol içeren uygun besiyerlerinde,  $-65\text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafazaya alınmıştır. Bu aşamadan sonra, izolatlara fenotipik tanımlama testleri uygulanmıştır. Bu amaçla glikozdan gaz oluşturma, farklı sıcaklık derecelerinde gelişme ( $10, 15, 45\text{ }^\circ\text{C}$ 'de) özellikleri, oksidaz testi, arjinin hidroliz testi belirlenerek, sonuçlar Ek 1'de verilmiştir.

Glikoz kullanımına bağlı olarak yapılan testte, 7 günlük inkübasyon süresince Durham tüplerindeki gaz oluşumu kontrol edilmiş ve gaz oluşumunun varlığı tespit edilen kültürler pozitif olarak nitelendirilmiştir. LAB'nin fermantasyonu homofermantatif ve heterofermantatif yollarla gerçekleştirmeleri bilgisiyle gaz oluşturma testinin sonucu, izolatların homofermantatif ve heterofermantatif türler olarak ayrılmasına yardımcı olmuştur. Gaz oluşturma testi sonucunda; 100 izolatın glikozdan gaz oluşturmadığı, 42 izolatın ise gaz oluşturduğu belirlenerek; muhtemelen, 100 izolat homofermantatif, 42 izolat ise heterofermantatif olarak sınıflandırılmıştır (Ek 1). Hıyar fermantasyonlarında, hıyarlarda şişme problemine yol açtığından, mümkün olduğunca az seviyede  $\text{CO}_2$  oluşumu istenmektedir. Bu nedenle homofermantatif LAB'nin gelişimi, heterofermantatif olanlara göre daha çok tercih edilmektedir (Daeschel ve Fleming 1984).

$10\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $15\text{ }^\circ\text{C}$  ve  $45\text{ }^\circ\text{C}$  olmak üzere farklı sıcaklık derecelerinde inkübasyona bırakılan kültürlerin, inkübasyon süresi sonunda tüplerdeki tortu veya bulanıklık oluşumu

şeklinde görülen gelişimi pozitif test sonucu olarak yorumlanmıştır. Farklı sıcaklıklarda gelişme testi sonucunda; 10 °C’de MRS’den izole edilen 1 izolatın, 15 °C’de 87 izolatın, 45 °C’de ise 28 izolatın gelişme gösterdiği belirlenmiştir. Farklı sıcaklıklarda gelişme testi sonucunda elde edilen veriler, bakterilerin tanımlanmasına yardımcı olmak üzere değerlendirilmiştir (Ek 1). Laktik asit bakterilerinin, özellikle hıyar fermantasyonlarında, 16-32 °C gibi oldukça geniş bir sıcaklık aralığında optimum olarak gelişebildiği belirlenmiş, bazı *Pediococcus* türlerinde ise daha yüksek sıcaklıklarda gelişme saptanmıştır (Daeschel ve Fleming 1984).

Arjinin hidrolizi test sonuçlarına göre analize alınan 142 izolatın 87 adedi negatif (-), 45 adedi pozitif (+) sonuç verirken, 10 izolatın analizinde kontrol ve test tüplerinde renk değişimi gözlenmediği için sonuç alınamamıştır (Ek 1). Muhtemelen, sonuç alınamayan izolatlar düşük gelişme göstermeleri veya zamanla aktivitelerini kaybetmelerinden dolayı herhangi bir reaksiyon vermemiştir. Arjinin test sonuçları çizelgeden incelendiğinde *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum* ve *Pediococcus* gibi temel türlerin arjinin sonuçlarının negatif olduğu görülmektedir.

Schillinger vd. (2005), dört farklı sebze fermantasyonundan izole ettikleri toplam 269 adet laktik asit bakterisinden 96 adetinin arjinini hidrolize edebildiğini belirlemiştir. Carr vd. (2002), laktik asit bakterilerinin arjinin hidrolizasyon yeteneğini cinslere göre çizelge 4.2’deki gibi ifade etmiştir.

Çizelge 4.2 LAB’ nin arjinin hidroliz özellikleri (Carr vd. 2002)

Cins	Arjinin Hidrolizasyonu
<i>Lactobacillus</i> (Homofermantatif)	-
<i>Lactobacillus</i> (Heterofermantatif)	+
<i>Lactococcus</i>	değişken
<i>Leuconostoc</i>	-
<i>Pediococcus</i>	değişken
<i>Streptococcus</i>	değişken

Gram pozitif, katalaz negatif oldukları belirlenen 142 adet izolat üzerinde devam eden çalışmalarda oksidaz test kitlerinin temin edilmesindeki gecikmeden dolayı bu izolatların oksidaz testleri, glikozdan gaz oluşturma, farklı sıcaklıklarda gelişme (10 °C, 15 °C ve 45 °C) özellikleri ve arjinin hidroliz testi belirlendikten sonra, ancak yapılabildiği. Oksidaz test sonuçlarına göre analizi yapılan 142 izolatın 135 adedi oksidaz negatif olarak belirlenmiş olup, oksidaz pozitif olan 6 izolat ve gelişme yeteneğini kaybeden 1 izolat laktik asit bakterisi sınıflandırmasından çıkarılarak analizlere 135 izolat ile devam edilmiştir (Ek 1). Bu aşamadan sonra izolatların karbonhidrat fermantasyon profilleri API 50 CH test kitleri (BioMerieux) kullanılarak bilgisayar programı (API Lab Plus Program, BioMerieux) yardımıyla tür düzeyinde belirlenmiştir.

#### **4.4 Mikroorganizmaların Karbonhidrat Fermantasyon Profilleri ile Tanımlanmaları**

Örneklerin gerekli inkübasyon süreleri sonunda, besiyerinde bulunan karbonhidratları kullanabilmesine bağlı olarak ortamda oluşturduğu asit, kit besiyerindeki indikatörde renk değişimi meydana getirerek fermantasyon karakterlerinin belirlenmesini sağlamıştır. Renk değişimi gözlenerek, kit besiyerindeki indikatör rengin (bromkresol moru) mordan sarıya dönmesi pozitif (+), mor rengin değişmemesi negatif (-), ara renkler ise şüpheli (?) olarak kaydedilmiştir.

135 izolatın API 50 CH test kitleri ile tanımlamaları aşamasında 7 izolat, testin yapılabilmesi için 18-24 saat inkübasyon sonucunda gerekli düzeyde gelişme göstermedikleri için API testleri yapılamamıştır. Ayrıca 3 izolatın API test sonuçlarından herhangi bir veri elde edilememiştir. Sonuç olarak, toplam 125 izolata ait API sonuçlarına Ek 1'de yer verilmiştir. API ile tanımlanan bazı izolatlarda yüksek bir yüzde ile tek bir tür elde edilirken, bazılarında bu oran düşmekte ve ancak birkaç tür düzeyinde yüzdesel olarak verilebilmektedir.

Çizelge 4.3 API sonuçlarına göre izolatların tür düzeyindeki dağılımları

Tür ve alt türler	Adet	Dağılım (%)
<i>Lb. brevis-1 ve 3*</i>	42	33,6
<i>Lb. plantarum-1</i>	31	24,8
<i>Lb. acidophilus-1</i>	13	10,4
<i>Lb. pentosus</i>	9	7,2
<i>Pediococcus damnosus-1,2</i>	9	7,2
<i>Lb. buchneri</i>	8	6,4
<i>Pediococcus spp.</i>	4	3,2
<i>Lb. del. ssp. lactis 2</i>	4	3,2
<i>Weissella confusa</i>	2	1,6
<i>Lb. paracasei ssp paracasei-3</i>	1	0,8
<i>Tetragenococcus halophilus</i>	1	0,8
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	1	0,8

\*1,2,3 API sonuçlarına göre alt türler

API test sonuçlarına göre analizi yapılan 125 izolatın cins düzeyindeki dağılımları; *Lactobacillus* (108), *Pediococcus* (13), *Weissella* (2), *Carnobacterium* (1), *Tetragenococcus* (1) şeklinde bulunmuştur. İzolatların tür düzeyindeki dağılımları ise çizelge 4.3’de verilmiştir. *Lactobacillus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinslerinin sebze fermantasyonlarından çoğunlukla izole edilen cinsleri oluşturduğu bildirilmektedir (Daeschel vd 1987). Hıyar fermantasyonlarında, *L. plantarum* baskın mikroorganizma olmakla birlikte, genellikle *P. pentosaceus* ve *Leu. mesenteroides* türleri de yer almaktadır (Mäki 2004).

API kitleri ile tür ve alt tür düzeyinde tanımlanan mikroorganizmaların izole edildikleri örnekler üzerindeki dağılımı ise çizelge 4.4’de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde, fenotipik elemelerden dolayı bazı turşu örneklerine ait hiç bir izolatın kalmadığı görülmektedir. İzole edilen bakterilerin türleri örnek bazında incelendiğinde, bazı örneklerden tek tür bakteri izole edilirken bazılarında tür sayısı fazla olabilmektedir. Örneklerden en fazla izole edilen bakteri türlerinin *Lb. brevis* (42), *Lb. plantarum* (31) ve *Lb. acidophilus* (13) olduğu görülmektedir. Bu durum; örneklerdeki hakim organizmaların bu 3 tür olduğu hakkında bize bilgi vermektedir. *L. brevis*’in baskın tür olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4 API ile tanımlanan LAB'nin izole edildikleri örneklere göre dağılımı

Örnek NO	<i>C. maltaromaticum</i>	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. buchneri</i>	<i>Lb. del. ssp lactis</i>	<i>Lb. para. ssp para.</i>	<i>Lb. pentosus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>P. damnosus</i>	<i>P. spp</i>	<i>T. halophilus</i>	<i>W. confusa</i>	Toplam
1T			3					1	1				5
2T			2										2
3T			1									1	2
4T			1		1			1					3
5T		4		1									5
6T			2		1							1	4
7T			1										1
8T							4	1					5
9T													0
10T			1	4									5
11T													0
12T													0
13T			5										5
14T													0
15T		1							1				2
16T		1							1				2
17T			1	1				1					3
18T			1	2	1								4
19T		1	2					2					5
20T			3				1	5					9
21T			2		1			3					6
22T			2				1	1	1				5
23T								1			1		2
24T		1				1		4		2			8
25T	1		1						1				3
26T		1	1				1	3					6
27T			2										2
28T			1						1				2
29T		1	1					1	2				5
30T							1						1
31T		1	1					1					3
32T							1	1					2
33T		1	2					2					5
34T													0
35T		1	1						1				3
36T			1					2					3
37T			3							1			4
38T			1					1		1			3
<b>Toplam</b>	<b>1</b>	<b>13</b>	<b>42</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>9</b>	<b>31</b>	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>125</b>

*Weissella confusa*, *Lb. del. ssp. lactis* türlerinin turşulardan elde edilmesi ilginç bir sonuç olarak karşımıza çıkmıştır. *Leu. mesenteroides* ssp. ile *Lb. casei*, genellikle, turşulardan yoğun olarak izole edilen bakteriler arasında yer alırken, API sonuçlarına

göre izole edilememeleri, ilgili turşu örneklerine açısından önemli bir sonuç olarak yorumlanmıştır.

Ancak; API test kitleri ile yapılan fenotipik tanımlamalar her ne kadar yüksek oranda doğruluk payına sahip olsa da, analizin doğası gereği kesin sonuçlar alınmayabilmektedir. Çünkü analiz sırasında şüpheli olarak değerlendirilen kuyucuklar analizi yapan kişinin yorumuna göre değişebilmekte ve bazı tek bir şekerdeki oynamalar analizin sonucunu tamamen değiştirebilmektedir. Bu sebeple, API sonuçlarına ait çizelgeler incelendiğinde, tür düzeyinde belirlenen izolatların bazılarının, kendilerine ait diğer fenotipik testler ile uyuşmadığı görülmektedir. Bu yüzden, tür düzeyindeki tanımlamalar kesin olarak 16S rRNA dizi analizleri ile ortaya konularak diğer fenotipik testlerle olan uyumu incelenebilecektir. API Lab Plus System ile ortaya çıkan sonuçların güvenilir olabilmesi için, % olarak bildirilen tanımlama sonuçlarının daha yüksek değerlere sahip olması gerektiği vurgulanmaktadır (Palop vd. 2000).

Fermantasyonun 10. günü ile 30. günü arasında Çubuk turşularından alınan örneklerden izole edilen LAB türleri incelendiğinde; çoğunlukla, *Lb. plantarum* fermantasyonun hemen her aşamasından; *Pediococcus* türleri, *Lb. acidophilus* 1 ve 3 ile *Lb. brevis* 1 ve 3 biyotipleri fermantasyonun ilk 15 günü hariç diğer aşamalardan; *Lb. pentosaceus* ile *Lb. buchneri* türleri ise fermantasyonun 20. gününden sonra izole edilmiştir (Çizelge 4.4). Fleming vd. (1992), fermantasyonun birincil aşamasında *Streptococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus cerevisiae*, *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus plantarum* türlerinin en aktif bakteriler olduğunu bildirmişlerdir.

Palop vd. (2000); patlıcan ile gerçekleştirilen fermantasyonunun ilk aşaması hariç, fermantasyon süresince baskın tür olarak *Lb. plantarum* 1 biyotipini belirlemişlerdir. *Lb. brevis* türüne ait 2 ve 3 biyotiplerini fermantasyonun başlangıç aşamasında izole etmişlerdir.

API test sonuçlarına göre belirlenen türlerin cins özelliklerine ait hücre morfolojileri ile Ek 1'de belirlenmiş hücre morfolojileri arasında bazı uyumsuzluklar olduğu

görülmektedir. Özellikle, *Lactobacillus acidophilus* türüne ait 1 ve 3 biyotipleri ve *Lactobacillus del. ssp. lactis* 2 suşlarının büyük bir çoğunluğu hücre morfolojik incelemelerinde kok olarak belirlenmiş olup, tür bazında uyumsuzluklar söz konusu olmaktadır.

Gaz oluşturma özelliklerine göre homofermantatif ve heterofermantatif olarak belirlenen izolatlar, API test sonuçları ile karşılaştırıldığında *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus del. ssp. lactis*, *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, *Pediococcus* spp. suşlarının tamamı API ile uyumlu olarak zorunlu homofermantatif olarak; *Lb. buchneri* suşlarının tamamı ise zorunlu heterofermantatif olarak belirlenmiştir (Axelsson 2004) (Çizelge 4.5). *Lb. plantarum* suşları ise bir izolat hariç (No: 105) hepsi homofermantatif olarak belirlenirken, *Lb. brevis* suşlarının ise hem heterofermantatif hem de homofermantatif karakterde olduğu gözlenmiştir (Ek 1).

Orla-Jensen (1919), Laktobasillerden Streptobacterium grubunda yer alan *Lb. plantarum* türünün 10-40 °C sıcaklık aralığında gelişebildiğini bildirmiştir. Kandler ve Weiss (1986), çoğu *Lb. plantarum* bakterisinin 45 °C’de gelişebildiğini ifade etmişlerdir. API test sonuçlarına göre *Lb. plantarum* olarak tanımlanan suşların tamamı 10 °C’ de gelişme göstermez iken, 15 °C ve 45 °C’de ise ancak bir kısmı gelişme gösterebilmişlerdir (Ek 1). Thermobacterium grubundan *Lb. del. ssp. lactis* 2 biyotipi 15 °C’de gelişip, 45 °C ve 10 °C’de gelişemeyerek farklı bir sonuç göstermiştir.

Çizelge 4.5 *Lactobacillus* cinslerinin gaz oluşturma yeteneğine göre sınıflandırılmaları (Axelsson 2004)

<b>Zorunlu Homofermantatif</b>	<b>Fakültatif Heterofermantatif</b>	<b>Zorunlu Heterofermantatif</b>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>



*L. brevis* türü gibi *L. buchneri* türü de 15 °C’de gelişemeyen bir Betabacterium grubu üyesidir (Carr vd. 2002). Çubuk turşu örneklerinden izole edilen ve tanımlanan *Lb. buchneri* türlerinin hepsi (No:136 hariç) 15 °C’de gelişme gösterirken, hiçbirinin 45 ve 10 °C’de gelişme göstermedikleri belirlenmiştir (Ek 1).

Palop vd. (2000), 148 adet *Lactobacillus* cinsine ait izolattan 96 tanesinin amonyak oluşturamamaya arjinin negatif sonuç verdiğini bildirmişlerdir. *Lb. del. ssp. lactis* türü geç oluşan bir reaksiyon gösterse de arjinini hidrolize edebilmektedir (Carr vd. 2002). *Lb. del. ssp. lactis* 2 biyotipi ise arjinin negatif sonucunu vermiştir. *Lb. brevis* arjininden amonyak oluşturabilen bir bakteri türü iken (Carr vd. 2002), *L. brevis* 3 olarak tanımlanan 181, 147, 137 ve 156 nolu bazı türler arjinin hidroliz testinde negatif sonuç vermiştir (Ek 1). Ancak *Lb. brevis* türlerinin büyük bir çoğunluğu arjinin pozitif olarak belirlenmiş olup bu farklılığın temel sebebi; muhtemelen API ile gerçekleştirilen tanımlama testlerinin yüksek doğruluğa sahip olmamasından kaynaklanmaktadır.

Tüm bu ifadelerle ilişkin olarak, tür ve alt tür düzeyinde tanımlama yapan API testinin sonuçları ile API testi öncesinde uygulanan klasik tanımlama testlerinin sonuçları arasında bazı uyumsuzluklar olduğu görülmektedir. Bu durum, API testinin % orana bağlı olarak gerçekleştirdiği tanımlamanın doğruluğuna yönelik şüpheli bir yaklaşımı ortaya koymaktadır. Tanımlama amacıyla temel olarak gerçekleştirilen fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal analizlerin, laktik asit bakterilerinin sınıflandırma çalışmalarında yeterli sonuç sağlayamadığı anlaşılmaktadır. İleri derecede tanımlama ile taksonomik sınıflandırma gerçekleştirebilen ve kesin sonuçlar sağlayabilen analizlere ihtiyaç duyulmaktadır.

#### **4.5 İzolatların Toplam Hücre Protein Profilleri**

Proteinlerin DNA’nın doğrudan bir ürünü olması, birbirine yakın özellik gösteren mikroorganizma gruplarının birbirinden homojen olarak ayrılmasında, mikrobiyal hücrelerdeki proteinlerin tanımlanmasını dikkate değer kılmaktadır. Birçok gıda ürününden izole edilen LAB için başarılı bir şekilde SDS-PAGE uygulaması

gerçekleştirilmektedir. Tanımlama testlerini tamamlamasının ve destek sağlamanın yanı sıra, DNA/DNA hibridizasyon veya 16S rRNA analizleri ile iyi bir korelasyon göstermesi SDS-PAGE uygulamasının önemini ortaya çıkarmaktadır (Vandamme vd. 1996).

Laktik asit bakterilerinin toplam hücre protein profillerinin belirlenmesi aşamasında toplam 122 örneğin SDS-PAGE analizleri yapılmıştır. Örneklere ait hücre proteinleri yürütme hatları şeklinde API 50CH test sonuçları ile birlikte Ek 2’de verilmiştir. Örneklerin elektroforez çalışmalarında en iyi görünür protein profillerinin elde edilmesi amacıyla her bir örnek için birden fazla yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Tekrarlar ile birlikte yaklaşık 250-300 yürütme işlemi yapılarak elde edilen hücre protein profillerinin görsel olarak değerlendirilebilmesi amacıyla, API test sonuçlarına göre tür düzeyinde gruplanan örneklerin elektroforez hatları sıralı bir şekilde kesilerek çizelge içerisine yerleştirilmiştir. Örneklere ait protein bantlarının moleküler ağırlıkları jel görüntüleme sistemi ile çalışan bilgisayar programı yardımıyla belirlenmiştir. Ancak; çok sayıda veri olması sebebiyle her bir örneğe ait proteinlerin moleküler ağırlıkları verilememiştir.

Çalışmada, laktik asit bakterilerine ait API testi ile tanımlanmış *Lb. brevis* (42), *Lb. plantarum* (30), *Lb. acidophilus* (11), *Lb. buchneri* (8), *P. damnosus* (8), *Lb. pentosus* (6), *Pediococcus* spp. (4), *Lb. del. ssp. lactis* (4), *Lb. paracasei* (1), *W. confusa* (2), *C. maltaromaticum* (1), *T. halophilus* (1), tanımlanamayan (4) olmak üzere 12 farklı türe ait 122 suşun protein içeriklerinin elektroforetik görünüşleri incelenerek birbirleri ile olan benzerlikleri karşılaştırılmıştır. Çalışmada, aynı türe ait suşların çoğunun birbirine benzer elektroforetik bir yapı göstermelerine rağmen, türler arasında farklılıkların olduğu gözlenmektedir. Ancak; aynı türdeki bazı bakteriler arasında da farklı protein profilleri (Ek 2) gözlenmekte olup, bu durum, muhtemelen API test sonuçlarındaki düşük tanımlanma yüzdelerinden veya hatalı API sonuçlarından kaynaklanmaktadır.

Laktik asit bakterilerinde yapılan toplam hücre protein izolasyonu ve SDS-PAGE jel elektroforezi analizleri sonucunda; moleküler ağırlıkları 7-250 kDa arasında değişen 1-

21 adet protein bandı elde edilmiştir. *Lb. acidophilus* türlerinde 100-22 kDa aralığında proteinlerde ortak bantlara rastlanırken, özellikle 15 kDa ağırlığındaki bantlar bu türler için spesifik olabilmektedir. Ancak, *Lb. acidophilus* türlerinde rastlanan protein profillerinin *Pediococcus* cinslerinde de benzer dizilim gösterdiği gözlenmektedir. Benzer şekilde, aynı protein profillerine sahip *Pediococcus* cinsi bakteriler içinde de 192 nolu örnek farklı profil sergilemektedir. *Pediococcus* cinsleri içerisinde *P. damnosus* türü olarak belirlenenler ise diğerleri ile benzer bant profilleri vermektedir. *Lb. acidophilus* türleri ile *Pediococcus* cinsleri arasındaki bu benzerlik dikkate değer görülmektedir. Çünkü, bu suşlar arasındaki benzerlik muhtemelen bu bakterilerin aynı cins içerisinde yer alabilme ihtimalinden kaynaklanmaktadır. Bu türlere ait morfolojik ve biyokimyasal özellikler incelendiğinde, API testi ile *Lb. acidophilus* olarak tanımlanan çoğu türün hücre morfolojileri (kok) ve biyokimyasal test sonuçlarının *Pediococcus*'lara benzer olduğu görülmektedir. Burada, API testlerinin *Pediococcus*'ları tanımlamada yeterli olmadığını gösteren önemli bir bulgu ortaya çıkmaktadır.

*Lb. brevis* türlerine ait protein profilleri incelendiğinde, 50 ve 100 kDa luk proteinlerin çoğu türde ortak olduğu görülmektedir. Ayrıca 30-25 kDa aralığında bazı türlerde ortak üçlü bant profilleri gözlenmektedir.

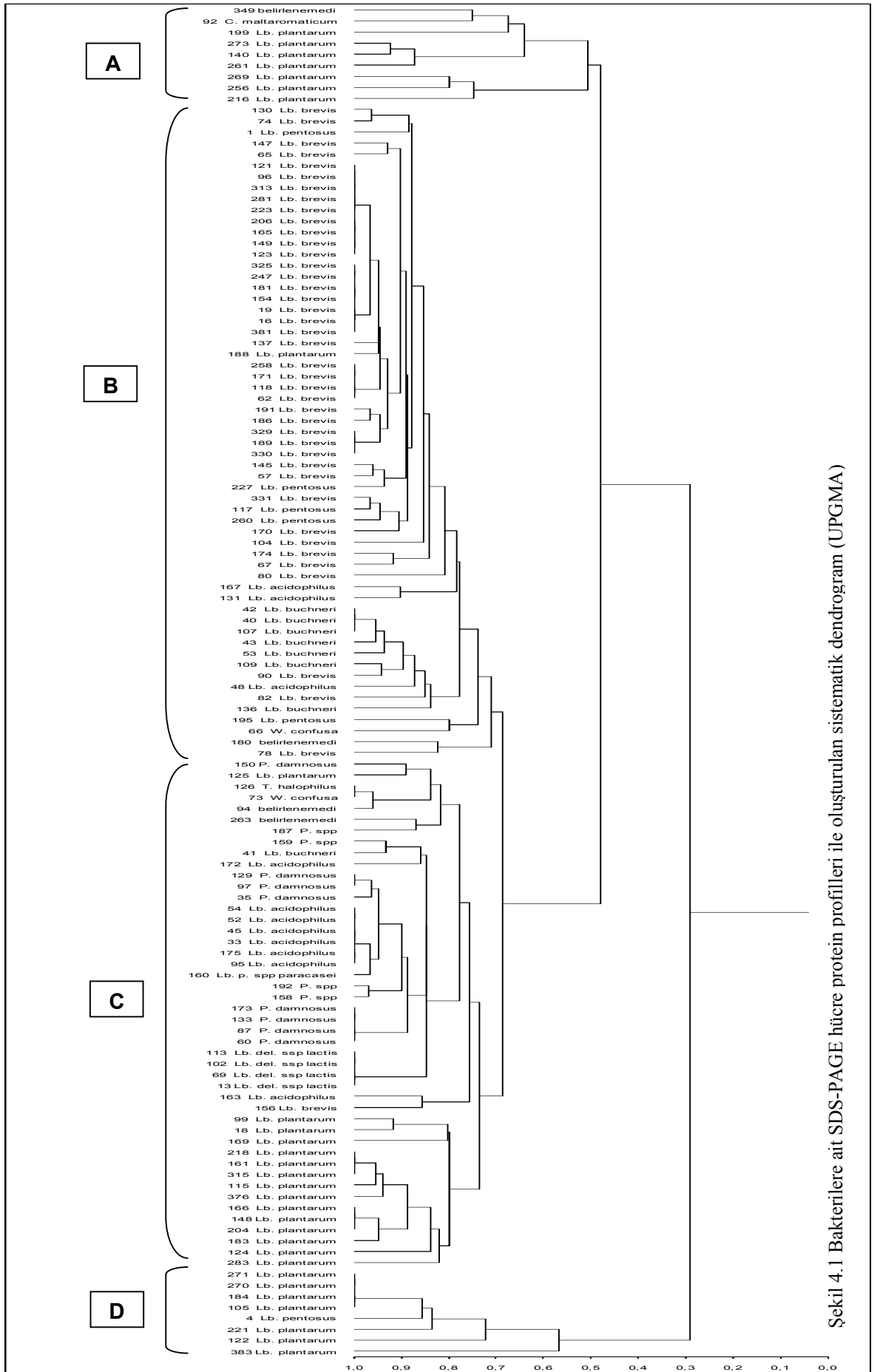
*Lb. buchneri* türlerinde gözlenen protein profillerinde 100 ve 65 kDa aralığındaki 2 protein bandının çoğu türde ortak olduğu, diğer profillerin ise *Lb. brevis* türleri ile benzer profil verdikleri gözlenmektedir.

Örneklerin büyük bir kısmını oluşturan *Lb. plantarum* türlerine ait protein profilleri incelendiğinde; bunların az sayıda protein bandı verdiklerinden dolayı değerlendirmede bazı güçlüklerle karşılaşmıştır. Genellikle, bu türe ait protein profilleri az sayıdaki bant özelliği ile diğer türlerden kolaylıkla ayrılabilir (Ek 2).

API ve diğer testlerle tanımlanan bazı türlerin, çıkarılan matrikse göre de benzerlik özellikleri dendogram oluşturularak incelendiğinde, temelde proteinlerin moleküler

ağırlıkları üzerinden yapılan yukarıdaki değerlendirme ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. 1-21 protein bandı üzerinden oluşturulan matriksin UPGMA yöntemiyle analizi ile elde edilen dendogram sonucunda türlerin API test sonuçları ile karşılaştırıldığında 4 kümeye ayrıldığı (benzerlik katsayısı >0,5) görülmektedir. Özellikle; *Lb. brevis*, *Lb. buchneri* türlerinin çoğunun aynı küme (B) içerisinde yer aldığı görülmektedir. *Lb. plantarum* türleri ise farklı üç küme içerisinde (A, C, D) yer almakta ve bu durumun; yukarıda anlatıldığı gibi, bu türlerin keskin bantlar vermemesi ve bantların homojen dağılmamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. *Pediococcus* türleri ve *Lb. acidophilus* türleri ise C kümesinde benzer kümelenme göstermektedir. Bu durum, *Lb. acidophilus* 'ların API test sonuçlarının hatalı olabileceği şüphesini uyandırmaktadır (Şekil 4.1).

Türlerin tanımlanmasında, protein profilleri diğer testleri destekleyici olarak kullanılmıştır. Türlerin asıl tanımlamaları bu testlerin yanı sıra doğruluğu daha keskin olan 16S rRNA gen dizi analizleri gibi moleküler yöntemlerle mümkün olabilecektir.



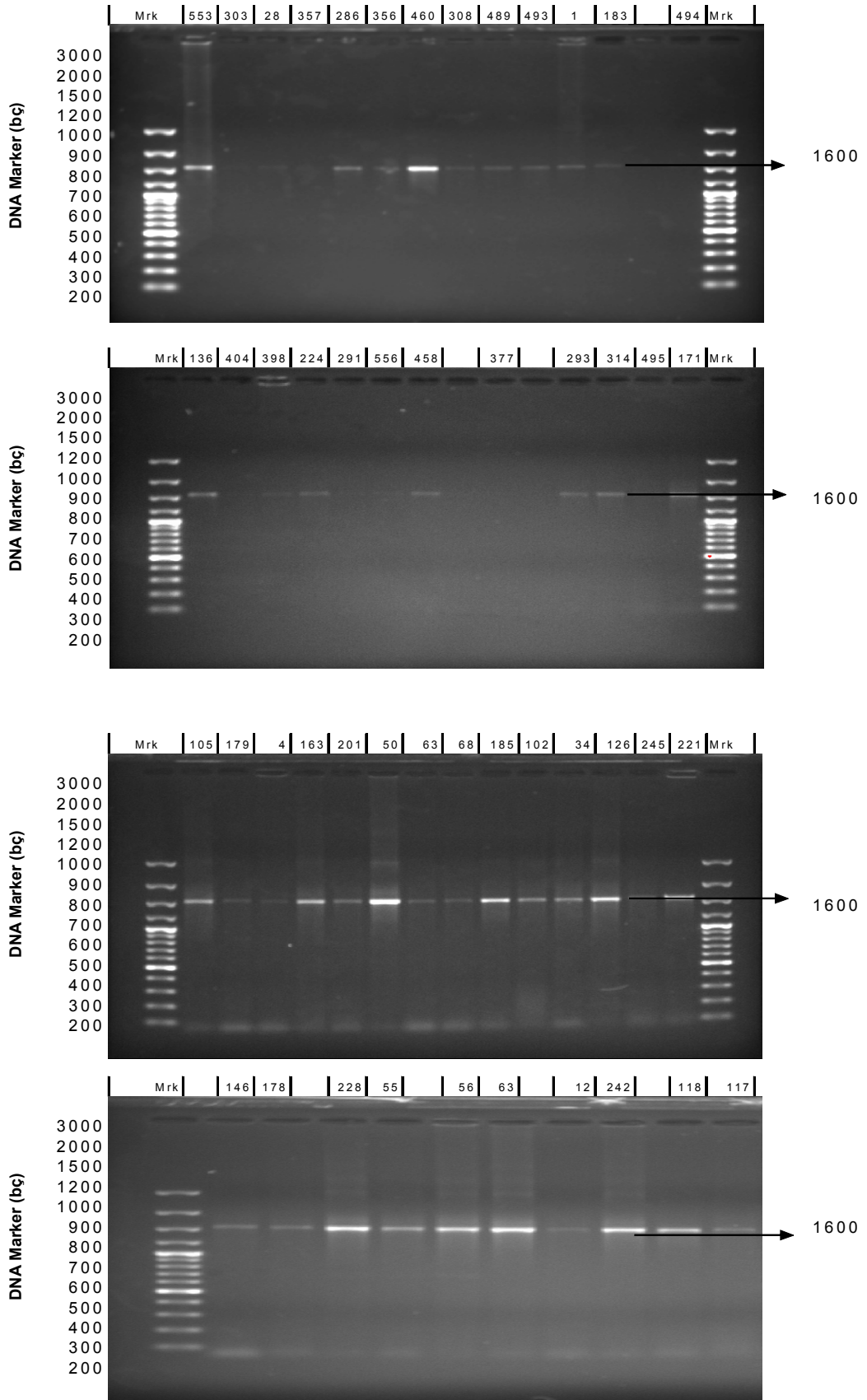
Şekil 4.1 Bakterilere ait SDS-PAGE hücre protein profilleri ile oluşturulan sistematik dendrogram (UPGMA)

#### 4.6 16S rRNA Dizi Analizleri

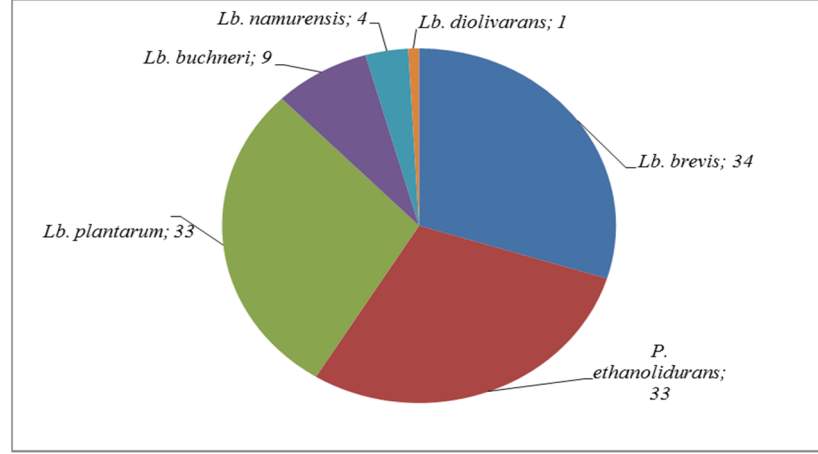
Suşların tanımlanması aşamasında klasik yöntemler ve test kitleri kesin sonuçlara ulaşmada yeterli bulunmamıştır. Bu testler ile elde edilen bazı sonuçlar moleküler tekniklerle elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında benzer sonuçlara ulaşılammış ve hata oranı yüksek olmuştur. Bunun temel sebebi laktik asit bakterilerinin temel özelliklerinin birbirine çok benzemesidir. Özellikle, genetik olarak aynı grupta yer alan türlerde klasik yöntemler yetersiz kalmıştır.

Bu çalışmada toplam 117 adet izolatın genetik yöntemlerle tanımlaması yapılmıştır. 16S rRNA dizi analiz çalışmalarında 16S primerleri kullanılarak hedef bölge PCR'da çoğaltıldıktan sonra, elde edilen ürünlerin boyutunun yaklaşık 1600 bp olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2).

117 örneğe ait DNA dizi sonuçlarının BLAST veri tabanında tanımlanması sonucunda; *Lb. brevis* (34), *P. ethanolidurans* (33), *Lb. plantarum* (33), *Lb. buchneri* (9), *P. parvulus* (3), *Lb. namurensis* (4), *Lb. diolivarans* (1) olarak belirlenmiştir (Ek 1 ve Şekil 4.3). Elde edilen bu sonuçlar fenotipik tanımlama sonuçları ile karşılaştırıldığında, özellikle bazı türler ile uyuşmadığı görülmektedir. Örneğin; API testi ile *Lb. acidophilus* ve *Lb. del. ssp. lactis* olarak belirlenen çoğu türlerin 16S rRNA dizi analizinde *Pediococcus* olarak tanımlandığı dikkat çekmektedir. Ancak, bu türlere ait diğer biyokimyasal testler ise DNA dizi sonuçlarını doğrular niteliktedir. Bu durum muhtemelen API test kitlerinin *Pediococcus*'ları belirlemede çok seçici olmadığını göstermektedir. Benzer şekilde, *Lb. pentosus* türlerinin de DNA dizi analizleri sonucunda *Lb. plantarum* oldukları anlaşılmaktadır.



Şekil 4.2 Bazı bakterilerin 16S rRNA PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görünümüleri



Şekil 4.3 16S rRNA dizi analiz sonuçlarına göre LAB'nin tür düzeyindeki dağılımı

117 laktik asit bakterisinin 16S rRNA dizi analiz sonuçları ile oluşturulan filogenetik ağaç incelendiğinde, türlerin birbirleri ile olan akrabalıkları görülmektedir (Ek 3).

Yapılan bazı çalışmalarda; İtalyan peynirinden izole edilen 123 izolattan fenotipik testler ile % 11'i tanımlanamamıştır. Buna karşı alternatif metot olarak PCR işlemi, DNA üzerinde 16S rDNA bölgesine bağlanabilecek spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Angelis vd. 2001). Benzer çalışmalar Leisner vd. (2001) tarafından da yapılmış, bu yöntemle farklı moleküler teknikler de eklenerek, Malezya'ya özgü fermente gıda içeceklerinden elde ettikleri 43 laktik asit bakterisini SDS-PAGE'de hücre duvarı protein profillerinin yanı sıra farklı bir metot olan 16S rRNA gen bölgelerine göre de sınıflandırmışlardır.

#### 4.7 Laktik Asit Bakterilerinin Teknolojik ve Fonksiyonel Özellikleri

##### 4.7.1 Laktik asit bakterilerinin farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme özellikleri

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



gerçekleşir veya hiç gerçekleşmez. Tuz konsantrasyonunun fermantasyonda rol alan mikroorganizmaların faaliyetleri üzerine etkisi seçici özellik göstermektedir. Bu bakımdan ürüne ve prosese göre ayarlanması önemlidir. Tuzlama işlemi doğrudan ya da salamura şeklinde uygulanmaktadır (Aktan 1998).

Laktik asit bakterileri yüksek tuz konsantrasyonlarını tolere edebilmektedirler. Tuz toleransı, LAB'nde laktik asit fermantasyonunun kolaylıkla başlamasına ve asit üretmesine izin vermekte ve diğer toleransı az olan mikroorganizmalar üzerinde baskılayıcı etki göstermektedir. *Leuconostoc*, yüksek tuz konsantrasyonunu iyi tolere ettiği için, çoğunlukla laktik asit fermantasyonunun başlatıcısı olarak kabul edilir (Dikici 2009).

Kültürlerin (117 suş) farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme özellikleri (Ek 4) incelendiğinde % 3 tuz konsantrasyonunda *Lb. plantarum* türlerinin hepsinin çok iyi gelişme gösterdikleri ve en yüksek gelişmenin sırasıyla 271, 283, 349, 169, 218 (OD<sub>600</sub>: 2,53-2,48-2,48-2,47-2,47) nolu *Lb. plantarum* türlerinde meydana geldiği belirlenmiştir (p<0,05). Benzer şekilde, % 6,5 tuz konsantrasyonunda en yüksek gelişmeyi 92, 315, 273, 183 (OD<sub>600</sub>:2,36-2,34-2,28-2,28-2,26) nolu *Lb. plantarum* türleri; % 10 tuz konsantrasyonunda en yüksek gelişmeyi 4, 270, 148, 383 (OD<sub>600</sub>:1,69-1,54-1,50-1,43-1,35) nolu *Lb. plantarum* türleri göstermişlerdir. % 6,5 tuz konsantrasyonunda *Lb. plantarum* türlerinden sonra, sırasıyla, en iyi gelişmeyi *Lb. brevis*, *Pediococcus* ve *Lb. buchneri* türleri göstermiştir (p<0,05). Ancak 109 numaralı *Lb. buchneri* suşu % 6,5 tuz konsantrasyonunda yüksek düzeyde gelişme göstermiştir. % 10 tuz konsantrasyonunda ise *Pediococcus* türlerinin *Lb. plantarum* türleri ile benzer gelişme gösterdikleri belirlenmiştir. Ancak, % 12 tuz konsantrasyonunda ise çok yüksek olmamakla birlikte en iyi gelişmeyi sadece 13, 131, 113, 174, 45 (OD<sub>600</sub>:0,26-0,24-0,20-0,18-0,17) nolu *P. ethanolidurans* türleri göstermiştir.

*Lb. plantarum* türlerinin çoğu % 3 ve % 6,5 tuz konsantrasyonlarında en iyi gelişme gösteren türler arasında yer alırken % 10 tuz konsantrasyonunda *Pediococcus* türleri ile benzer gelişme göstermişler ve özellikle 283, 105, 199, 223, 204 numaralı *Lb.*

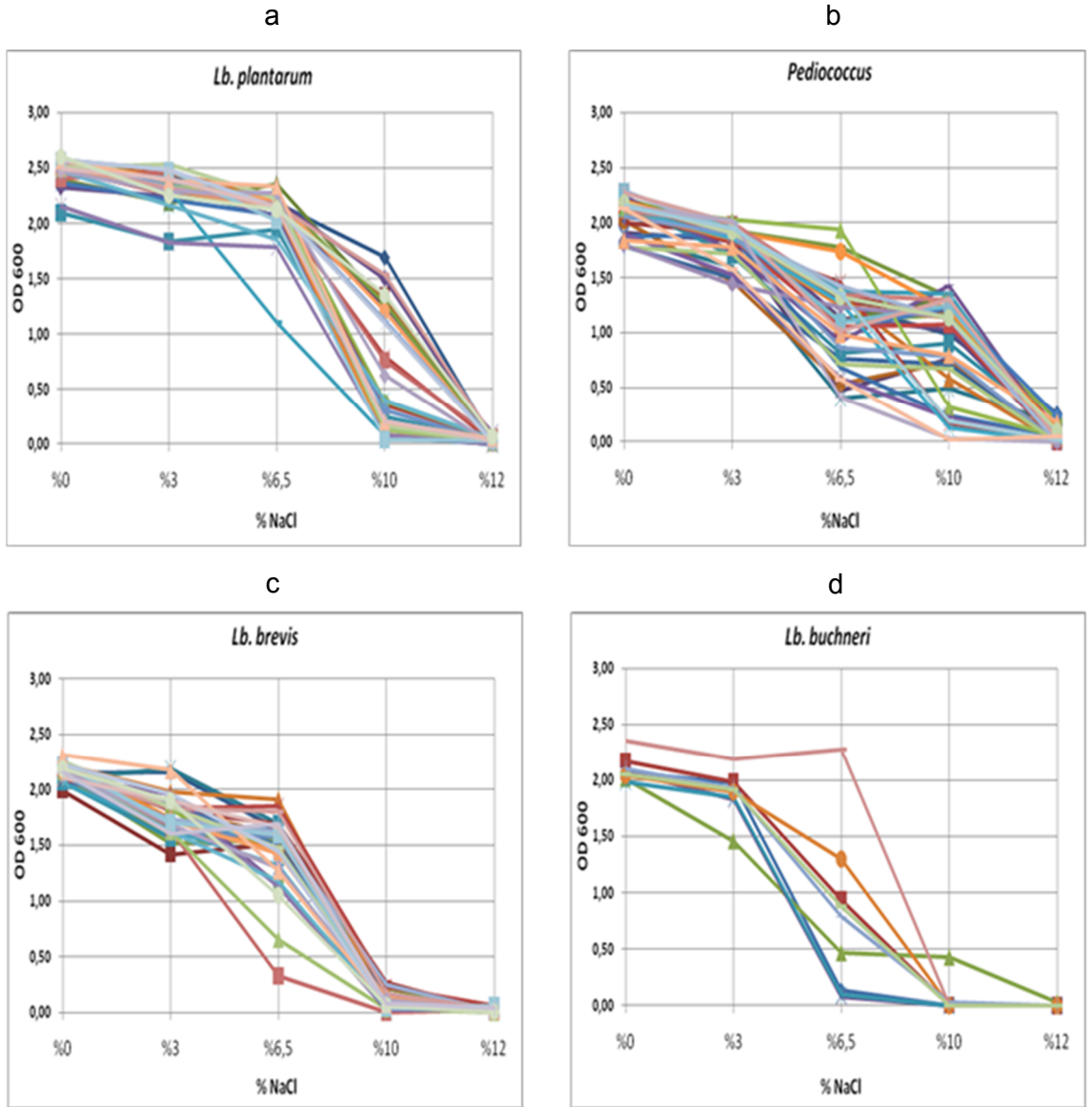
*plantarum* türlerindeki gelişme düzeyi çok düşük kalmıştır (<OD<sub>600</sub>: 0,10). % 12 tuz konsantrasyonunda ise önemli bir gelişme gösteren tür bulunmamaktadır (Şekil 4.4a).

*Pediococcus* türleri özellikle % 6,5 tuz konsantrasyonundan sonra gelişmelerini korumuşlar, % 10 tuz konsantrasyonunda *Lb. plantarum* türlerine benzer bir gelişme aktivitesinde yer almışlardır. *P. ethanolidurans* türlerinin bir kısmı (No: 13, 131, 113, 174, 45, 33) % 12 tuz konsantrasyonunda az bir düzeyde de olsa gelişme gösterebilmişlerdir (Şekil 4.4b).

*Lb. brevis* türlerinde ise % 12 tuzda gelişme gözlenmezken, % 6,5 tuz oranında *Lb. plantarum* türlerinden sonra tuza en iyi toleranslı türler (No: 117, 121, 258, 62, 78) arasında yer almaktadır. % 10 tuzda ise az gelişme gösteren 78, 247, 121, 80 numaralı *Lb. brevis* türleri *Lb. plantarum* ve *Pediococcus* türlerinden sonra gelmekte ve tuza toleransları azalmaktadır (Şekil 4.4c).

*Lb. buchneri* türlerinde % 12 ve % 10 tuz konsantrasyonlarında gelişme gözlenmemiştir. % 6,5 ve % 3 tuzda ise gelişme gösteren türler diğer türlere oranla daha düşük bir aktivite göstermişlerdir. 109 ve 90 numaralı örnekler % 6,5 tuzda en iyi gelişme gösteren *Lb. buchneri* türleri arasında yer almaktadır (Şekil 4.4d).

Kıran (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, hazır gıdalardan izole edilen, ayrıca çeşitli kültür koleksiyonlarından temin edilen laktik asit bakterileri arasında, % 4 tuzda tüm bakterilerin geliştiği, % 6,5 tuzda 5 adedi hariç diğerlerinin geliştiği, % 12 tuzda 4 tanesinin zayıf gelişme gösterdiği, diğerlerinin gelişemediği, % 18 tuz konsantrasyonunda ise hiçbirinin gelişemediği bildirilmektedir. Bulut (2003) tarafından yapılan çalışmada, 9 adet *Lactobacillus* türünün % 6,5 tuz konsantrasyonunda gelişebildiği belirtilmiştir. Randazzo vd. (2004) ise, *Lb. brevis* türlerinin % 8 tuzda geliştiklerini, fakat % 10 tuzda ise gelişme gösteremediklerini belirtmişlerdir.



Şekil 4.4 a. *Lb. plantarum*, b. *Pediococcus* spp., c. *Lb. brevis*, d. *Lb. buchneri* türlerinin farklı tuz konsantrasyonlarında (% 3, % 6,5, % 10, % 12) gelişme grafiği

Sánchez ve Palop (2000), bir çeşit patlıcan turşusu olan Almagro'dan izole ettikleri, *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. brevis* ve *Lb. fermentum* türlerinin % 4 tuz konsantrasyonunda geliştiğini, % 6,5 tuz konsantrasyonunda belirli oranlarda bütün türlerde gelişme görülebildiğini, % 8 tuz oranında *Lb. fermentum* haricinde diğer türlerde gelişme olduğunu bildirmişlerdir.

Adnan ve Tan (2007), iki geleneksel üründen ve kırmızı biber püresinden izole ettikleri laktik asit bakterileri arasında, % 1,5, % 2,5 ve % 5 tuz konsantrasyonlarında tüm *Lb. brevis* ve *Lb. plantarum* türlerinin geliştiğini, % 7,5 ve % 10 tuzda *Lb. brevis* ve *Lb. plantarum* türlerinin gelişemediğini bildirmişlerdir. *Lb. plantarum* türlerinin % 10 tuz konsantrasyonunda gelişemediğini bildirmiş olmalarına karşın, bizim çalışmamızda % 10 tuz konsantrasyonunda *Lb. plantarum* türlerinin bazılarının gelişebildiği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmanın bulguları Kıran (2006) ve Bulut (2003) tarafından alınan sonuçlar ile uyumludur.

Turşu, sebze ve meyvelerin belirli tuz konsantrasyonlarında laktik asit bakterileri tarafından fermentasyona uğratılmasıyla elde edilen bir ürün olması nedeniyle, laktik asit bakterileri belirli tuz konsantrasyonlarına dayanıklı olması beklenir. Bu çalışmada ise, % 6,5 ve % 10 tuz konsantrasyonlarına en dayanıklı tür *Lb. plantarum* ve *Pediococcus* spp. olarak tespit edilmiştir.

#### **4.7.2 Laktik asit bakterilerinin farklı pH değerlerinde gelişme özellikleri**

Gıda kaynaklı bakteriler, gıdalarda organik veya inorganik asitler ile karşılaşmaktadırlar. Bakteriler, asit stresine karşılık DNA'yı tamir eden enzimlerin uyarılması, amino asit katabolizmasının arttırılması, proton pompalanmasının (proton efflux) arttırılması ve hücre membranındaki kompozisyon değişikliklerini içeren pek çok yolla karşılık vermekteler. Pek çok bakteri subletal bir pH'da uyarılan (koruyucu proteinlerin sentezlenmesi) ve düşük pH'larda yaşamı sağlayan asit tolerans yanıtı (Acid Tolerance Response – ATR) olarak adlandırılan bir fenomene sahiptir. ATR, bakteri türleri arasında çok farklı düzeylerde olduğu gibi, aynı bakterinin fizyolojik fazları (gelişim-istasyon faz) arasında bile farklılık bulunmaktadır. Asit şoku ile indüklenen yanıt, hücre içi veya hücre dışı pH'nın değişimiyle uyarılabilir (Dikici 2009).

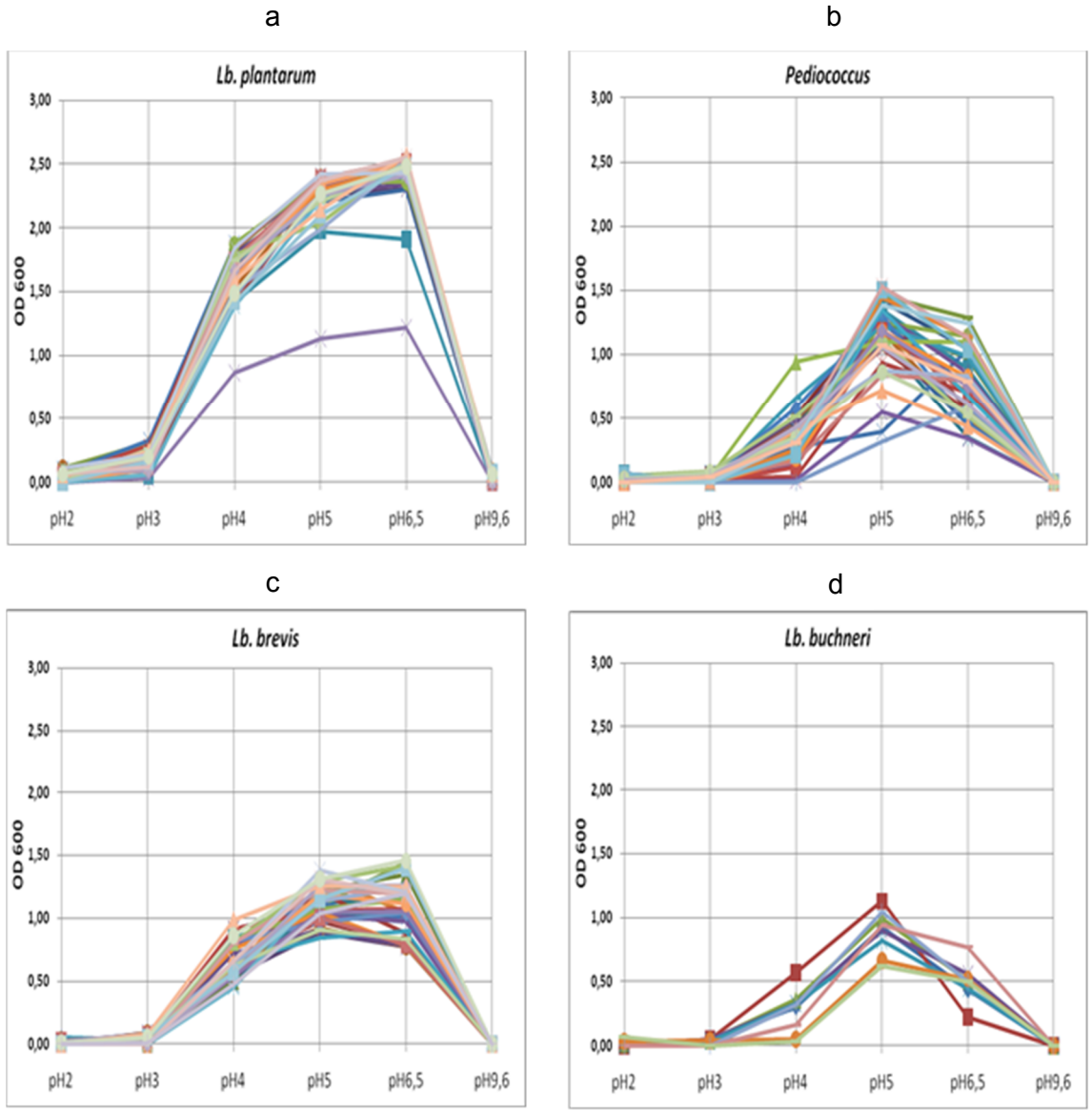
Ek 4 incelendiğinde, pH 2 ve pH 9,6 değerlerinde, laktik asit bakterileri gelişme göstermemekle birlikte, pH 2'de 349, 140, 115 numaralı *Lb. plantarum* türlerinin zayıf

gelişme (OD<sub>600</sub>:0,11-0,11-0,11) gösterdikleri ve benzer şekilde de pH 9,6'da 261, 183, 4 numaralı *Lb. plantarum* türlerinin (OD<sub>600</sub>: 0,09-0,08-0,08) düşük bir gelişme gösterdikleri gözlenmektedir.

İzole edilerek tanımlanan 33 adet *Lb. plantarum* türlerinin tamamının pH 4'de en iyi gelişmeyi gösterirken, pH 5 ve pH 6,5'de 32 tanesinin iyi geliştiği görülmüştür (No: 223 hariç). pH 3'de ise tüm türler çok düşük gelişme gösterirken, sadece 166, 140, 161 numaralı *Lb. plantarum* örnekleri yaklaşık OD<sub>600</sub>: 0,30 bir gelişme gösterebilmişlerdir. Diğer türler incelendiğinde, pH 4'de *Lb. brevis* türlerinin çoğu *Lb. plantarum* türlerinden sonra en iyi gelişme değerine sahiptir ( $p < 0,05$ ). Tüm pH değerlerinde *Lb. buchneri* türleri en düşük gelişme göstermekle birlikte, *Pediococcus* türleri ise pH 4'de *Lb. buchneri* türleri ile birlikte ( $p > 0,05$ ) düşük gelişme göstermişlerdir (Şekil 4.5).

Adnan ve Tan (2007), iki geleneksel üründen ve kırmızı biber püresinden izole edilen laktik asit bakterileri arasında pH 4,5, pH 7,0 ve pH 9,0'da *Lb. brevis* ve *Lb. plantarum* türlerinin iyi geliştiğini belirtmişlerdir.

Kıran (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, hazır gıdalardan izole edilen, ayrıca çeşitli kültür koleksiyonlarından temin edilen laktik asit bakterilerinden hiçbirinin pH 2,0 ve pH 3,0'da gelişmediği; pH 4,0, pH 5,0 ve pH 6,0 değerlerinde hepsinin geliştiği; pH 9,6'da *P. pentocaceus* türlerinin bir kısmının geliştiği, bazılarının zayıf gelişme gösterdiği; *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* ve *Lb. fermentum* türlerinin geliştiği, *Leuconostoc* cinslerinin zayıf gelişme gösterdiği belirtilmiştir.



Şekil 4.5 a. *Lb. plantarum*, b. *Pediococcus* spp., c. *Lb. brevis*, d. *Lb. buchneri* türlerinin farklı pH değerlerinde (pH2, pH3, pH4, pH5, pH6,5, pH9,6) gelişme grafiği

Adnan ve Tan (2007) pH 9,0'da *Lb. brevis* ve *Lb. plantarum* türlerinin geliştiği, Kıran (2006) pH 9,6'da bazı *Lactobacillus* ve *Pediococcus* cinslerinin geliştiğini belirtmişlerdir. Tangüler (2010)'in sonuçları ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Aktan vd. (1998) tarafından *Lb. plantarum*'un aside en dayanıklı tür olduğu ve hıyar turşusu fermantasyonunun bu bakterinin etkinliğiyle sonlandığı belirtilmektedir. Bu çalışmada da pH 2,0 da çok zayıf, pH 3,0'da zayıf ve pH 4,0'da en iyi gelişme gösteren türün *Lb. plantarum* olması, bu türün aside en dayanıklı tür olduğunu desteklemektedir.

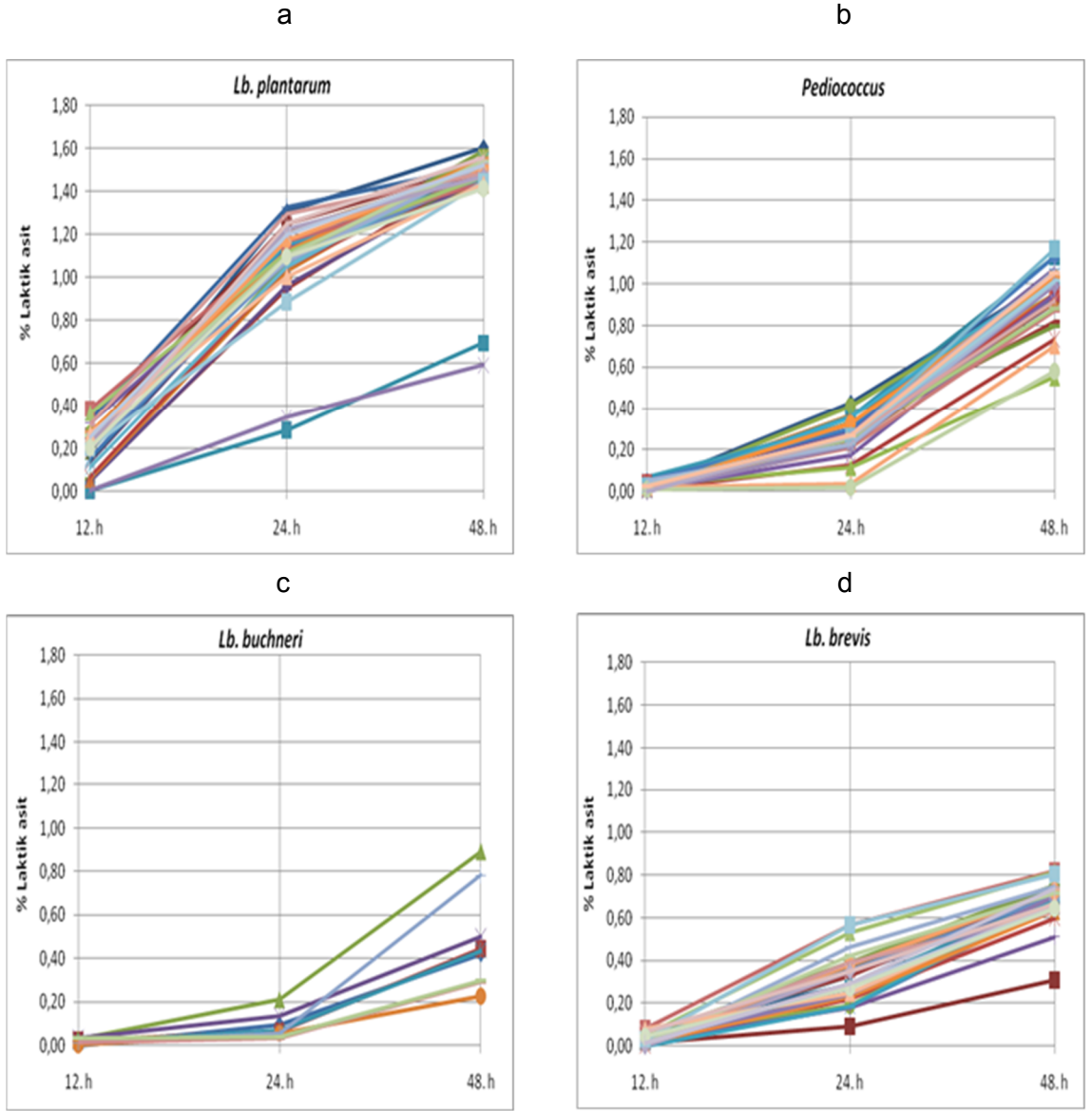
Tangüler (2010), şalgam suyundan izole ettiği *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* cinslerinin pH 4,4'de gelişme gösterdiğini, fakat pH 9,6'da hiçbir bakterinin gelişme gösteremediği belirtmiştir. Aynı çalışmada kontrol olarak kullanılan *Lb. buchneri*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. delbrueckii* türlerinden *Lb. buchneri* hariç diğer 4 bakterinin pH 4,4'de gelişebildiği, fakat 5 bakteriden hiçbirinin pH 9,6'da gelişemediğini belirtmiştir.

#### 4.7.3 Laktik asit bakterilerinin asit üretim miktarları

Laktik asit bakterileri tarafından karbonhidratlar fermente edilerek laktik asit oluşturulmaktadır. Laktik asit fermantasyonunun gıda, eczacılık ve tekstil endüstrisi gibi birçok alanda uygulaması bulunmaktadır (Rodríguez-Couto ve Sanromán 2006).

Kültürlerin asit üretim hızları incelendiğinde; özellikle *Lb. plantarum* türlerinin 48 saatlik inkübasyon süresinde asit üretim hızlarının diğer türlerden belirgin bir şekilde yüksek olduğu görülmekte ve bunu *Pediococcus* türleri takip etmektedir ( $p<0,05$ ). Ancak *Pediococcus* türleri, daha uzun inkübasyon sonunda, *Lb. plantarum* türlerinin ürettikleri asit miktarına yakın değerlere ulaşabilmektedirler. *Lb. buchneri* ve *Lb. brevis* olarak tanımlanan türlerin ise asit üretim hızlarının diğerlerine göre düşük olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.6).

Laktik asit bakterilerine ait laktik asit üretim miktarları incelendiğinde (Ek 4), 48 saat inkübasyon sonrası en yüksek asit üretiminin 4 numaralı (% 1,60) ve 140 numaralı (% 1,59) *Lb. plantarum* suşuna, en düşük asit üretiminin ise 90 numaralı (% 0,23) *Lb. buchneri* suşuna ait olduğu görülmektedir. Tür düzeyindeki laktik asit üretim miktarlarına bakılacak olursa; en fazla asit üretimi, sırasıyla, *Lb. plantarum* (ort. % 1,45), *Pediococcus* spp. (ort. %0,94), *Lb. brevis* (ort. % 0,68) ve *Lb. buchneri* (ort. % 0,48) olarak gerçekleşmiştir ( $p<0,05$ ).



Şekil 4.6 a. *Lb. plantarum*, b. *Pediococcus* spp., c. *Lb. buchneri*, d. *Lb. brevis* türlerinin farklı inkübasyon sürelerinde asit üretim miktarları (g laktik asit / 100 mL)

Yapılan diğer çalışmalarda ise *Lb. plantarum* suşların asit üretim miktarı % 0,61- % 0,88 arasında belirlenmiştir (Toksoy vd. 1999). Beyatlı ve Tunail (1982), laktik asit bakterilerinin tür ve suş düzeyinde farklı miktarlarda asit üretebileceğini bildirmişlerdir. Vignola vd. (1989), *Lb. plantarum*'un olgunlaşmamış fermente sosislerde 12 saatte, pH'yı 6,65'den 3,96'ya kadar düşürebildiğini ve asitliği de % 0,02'den % 0,18'e kadar yükseltebildiğini belirlemişlerdir. Bir başka çalışmada (Vignola vd. 1988), starter kültür kullanılarak üretilen sosislerden izole edilen *Lb. plantarum* suşlarının yüzde asit üretimleri incelenmiş, suşlar tarafından üretilen % laktik asit miktarları 3 grup altında



toplanmıştır. Birinci gruptaki suşların % 1,7'nin üzerinde, ikinci gruptaki suşların % 1,4 ve üçüncü gruptaki suşların ise % 0,7'nin altında asit ürettikleri tespit edilmiştir.

Bulut (2003) tarafından peynirden izole edilen, *Lactococcus* ve *Enterococcus* cinslerinin 24 saat sonunda 0,595 g/100 mL, *Lactobacillus* cinslerinin 0,6247 g/100 mL laktik asit ürettiği belirtilmiştir.

Cheriguene vd. (2006), keçi sütünden izole ettikleri, *Lb. paracasei* türlerinin 24 saat sonunda 0,39-0,76 g/100 mL, *Lb. rhamnosus* türlerinin 0,75-0,80 g/100 mL, *Lb. plantarum* türleri tarafından 24 saat sonunda 0,55-0,68 g/100 mL, *E. faecium* türlerinin ise 0,59-0,60 g/100 mL laktik asit üretildiğini saptamıştır.

Çon ve Karasu (2009) tarafından turşudan ve fermente yeşil zeytinden izole edilen *Lb. plantarum* ve *Lb. pentosus* suşlarının 24 saat sonunda 1,60-1,95 g/100 mL laktik asit ürettikleri belirlenmiştir.

Herreros vd. (2003), İspanyol keçi peynirinden izole ettikleri *L. mesenteroides* türleri tarafından 24 saat sonunda 0,22-0,26 g/100 mL, *Lb. plantarum* türleri tarafından 24 saat sonunda 0,19-0,21 g/100 mL, *Lb. brevis* türleri tarafından 24 saat sonunda 0,19-0,23 g/100 mL, *Lb. casei* suşları tarafından 24 saat sonunda 0,18-0,22 g/100 mL laktik asit üretildiğini belirtmişlerdir.

Erdoğrul vd. (2002), fermente sucuklardan izole ettikleri *Pediococcus pentosaceus* türlerinin 24 saat sonunda 0,11-0,32 g/100 mL laktik asit ürettiğini bildirmişlerdir.

#### **4.7.4 Laktik asit bakterilerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretim miktarları**

Heksoz şekerlerinden laktik asit üretme yeteneğine sahip laktik asit bakterileri, birçok fermente gıdanın üretiminde kullanılmaktadır. Bu bakterilerin; ürettikleri bazı antimikrobiyal maddeler nedeniyle insanlarda hastalıklara neden olan patojenleri ve

gıdalarda bozulmaya neden olan mikroorganizmaları inhibe ettikleri bilinmektedir. Laktik asit bakterilerinin geliştiği ortamda oluşan düşük pH, düşük oksidasyon-redüksiyon potansiyeli, üretilen etanol, değişik bakteriyosinler ve organik asitler konusunda bu güne kadar pek çok kaynakta değişik bilgiler yer almıştır. Tüm bu antimikrobiyal maddelere ve oluşan antimikrobiyal ortama ilaveten fermente gıdalarda ortamda mevcut mikroorganizmalar üzerindeki diğer bir antimikrobiyal etki laktik asit bakterileri tarafından üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hidrojen peroksit)'tir. Ortamda mevcut diğer mikroorganizmaların inhibe edilebilmeleri açısından fermantasyonun en kritik dönemi olan başlangıç aşamasında, mevcut çözünmüş oksijenin kullanılmasıyla sınırlı miktarda üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seçici bir ortam yaratmaktadır.

Hidrojen peroksit, oksijen varlığında flavoprotein oksidazlar ve nikotinamid adenin hidroksi dinükleotid peroksidazların etkisiyle, laktik asit bakterileri tarafından üretilmektedir. Oksitleyici bir bileşik olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin mikroorganizmalar üzerine inhibisyon etkisi, metabolik işlemlerde esansiyel olan enzimlerin sülfidril gruplarını etkileyerek, disülfid köprüleri oluşturmasına bağlanmaktadır.

Laktik asit bakterilerinin ürettikleri H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konusunda, diğer antimikrobiyal maddelerin aksine, çok eski tarihli çalışmaların haricinde literatürde pek fazla bilgi bulunmamaktadır. Değişik *Lactobacillus* türlerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimi ile ilgili literatürde, 1945-1960 yılları arasında yapılan bazı araştırmalara rastlanmaktadır. Bu çalışmalarda 5 °C'de *Lb. bulgaricus* ve *L. lactis* türlerinin *Staphylococcus aureus*'u inhibe edebilecek düzeyde (6-12 µg/mL), yine *Lb. plantarum*'un ise *Pseudomonas* türlerinin adaptasyon periyodunu (lag faz) uzatacak düzeyde (3-13 µg/mL) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ürettiği, ayrıca laktik *Streptococcus* türlerinin de buzdolabında depolanan sütlerde psikrotrofik bakterilerin gelişmesini önleyecek düzeyde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ürettiği saptanmıştır. Yapılan diğer çalışmalarda laktik asit bakterilerinin hidrojen peroksit üretimleri 1,80-3,45 µg/mL olarak bulunmuştur (Toksoy vd. 1999). Çalışmamızda kullanılan suşların hidrojen peroksit üretim miktarları (Çizelge 4.6) literatürde belirtilen değerler ile uyumlu olup, laktik asit bakterilerinin farklı miktarlarda peroksit üretimleri oksijen oksidoreduktaz aktivitelerindeki farklılıktan kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4.6 incelendiğinde, çoğu *Lb. plantarum* türlerinin hidrojen peroksit üretim düzeylerinin düşük düzeyde kaldığı görülmektedir. En yüksek peroksit üretimi ise 187, 313, 260 numaralı örneklerde gerçekleşmiştir ( $5,57\pm 0,37$  -  $5,23\pm 1,40$  -  $5,09\pm 0,46$   $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{mL}$ ).

Zalán vd. (2005) yaptıkları çalışmada, kullanılan 4 adet *Lactobacillus* suşunun MRS sıvı besiyerinde 72 saat sonunda 2-6  $\mu\text{g/mL}$  hidrojen peroksit ürettiğini belirtmişlerdir. *Lb. plantarum* 2142 suşunun 24 saat sonunda (2,45  $\mu\text{g/mL}$ )  $\text{H}_2\text{O}_2$  ürettiğini; böylece, *L. monocytogenes* ve *B. cereus* gelişimini inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

Adeniyi vd. (2006), fermente süt ürünlerinden izole ettikleri *Lb. plantarum*  $N_2$  suşunun 5.44  $\mu\text{g/L}$  hidrojen peroksit ürettiğini bildirmişlerdir.

Erdoğrul vd. (2002), fermente sucuklardan izole ettikleri *P. pentosaceus* suşlarının 0,41 -0,81  $\mu\text{g/mL}$  hidrojen peroksit ürettiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada besi ortamının asitliği nötralize edilerek santrifüj edilen ve membran filtreden geçirilen sıvı fazın hiçbirinde *Listeria innocua*, *Staphylococcus carnosus*, *Lb. brevis*, *Micrococcus luteus* türlerine karşı inhibisyon zonuna rastlanmamıştır. Genel inhibisyonun asitlikten kaynaklandığı sonucuna varıldığından, bu türlere karşı  $\text{H}_2\text{O}_2$  kaynaklı bir inhibisyon olmadığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.6 Laktik asit bakterilerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretim miktarları (µg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /mL)

No	Tür	µg H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /mL	No	Tür	µg H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /mL
187	<i>P. ethanolidurans</i>	5,57 ± 0,37	160	<i>P. ethanolidurans</i>	2,04 ± 0,00
313	<i>Lb. brevis</i>	5,23 ± 1,40	137	<i>Lb. namurensis</i>	2,00 ± 0,27
260	<i>Lb. brevis</i>	5,09 ± 0,46	45	<i>P. ethanolidurans</i>	1,99 ± 0,15
125	<i>P. ethanolidurans</i>	4,70 ± 0,45	163	<i>P. ethanolidurans</i>	1,97 ± 0,16
270	<i>Lb. plantarum</i>	4,54 ± 0,32	109	<i>Lb. buchneri</i>	1,90 ± 0,35
188	<i>P. ethanolidurans</i>	4,24 ± 0,84	16	<i>Lb. brevis</i>	1,85 ± 0,16
206	<i>Lb. brevis</i>	4,20 ± 0,51	122	<i>Lb. plantarum</i>	1,80 ± 0,01
271	<i>Lb. plantarum</i>	4,09 ± 0,01	97	<i>P. ethanolidurans</i>	1,79 ± 0,29
381	<i>Lb. brevis</i>	4,04 ± 0,60	223	<i>Lb. plantarum</i>	1,78 ± 0,41
186	<i>Lb. brevis</i>	4,03 ± 0,16	172	<i>P. ethanolidurans</i>	1,74 ± 0,25
331	<i>Lb. brevis</i>	3,99 ± 0,28	73	<i>P. ethanolidurans</i>	1,71 ± 0,12
330	<i>Lb. brevis</i>	3,99 ± 0,94	105	<i>Lb. plantarum</i>	1,67 ± 0,10
53	<i>Lb. buchneri</i>	3,86 ± 0,67	42	<i>Lb. buchneri</i>	1,62 ± 0,16
329	<i>Lb. brevis</i>	3,80 ± 0,55	158	<i>P. ethanolidurans</i>	1,59 ± 0,21
150	<i>P. ethanolidurans</i>	3,73 ± 0,72	269	<i>Lb. plantarum</i>	1,57 ± 0,52
199	<i>Lb. plantarum</i>	3,67 ± 1,65	33	<i>P. ethanolidurans</i>	1,50 ± 0,14
115	<i>Lb. plantarum</i>	3,63 ± 0,00	159	<i>P. ethanolidurans</i>	1,49 ± 0,19
129	<i>P. ethanolidurans</i>	3,61 ± 0,31	147	<i>Lb. diolivorans</i>	1,46 ± 0,17
174	<i>P. ethanolidurans</i>	3,57 ± 0,12	104	<i>Lb. brevis</i>	1,44 ± 0,33
126	<i>P. ethanolidurans</i>	3,31 ± 0,97	204	<i>Lb. plantarum</i>	1,43 ± 0,52
171	<i>Lb. brevis</i>	3,28 ± 0,01	170	<i>Lb. brevis</i>	1,43 ± 0,37
192	<i>P. parvulus</i>	3,27 ± 0,44	41	<i>P. ethanolidurans</i>	1,41 ± 0,30
80	<i>Lb. brevis</i>	2,88 ± 0,32	133	<i>P. ethanolidurans</i>	1,41 ± 0,13
107	<i>Lb. buchneri</i>	2,88 ± 0,00	60	<i>P. parvulus</i>	1,40 ± 0,19
376	<i>Lb. plantarum</i>	2,88 ± 1,77	18	<i>Lb. plantarum</i>	1,38 ± 0,03
96	<i>Lb. brevis</i>	2,85 ± 0,13	78	<i>Lb. brevis</i>	1,36 ± 0,33
149	<i>P. ethanolidurans</i>	2,85 ± 0,43	283	<i>Lb. plantarum</i>	1,35 ± 0,05
136	<i>Lb. buchneri</i>	2,82 ± 0,39	13	<i>P. ethanolidurans</i>	1,29 ± 0,13
90	<i>Lb. buchneri</i>	2,77 ± 0,38	57	<i>Lb. brevis</i>	1,27 ± 0,21
95	<i>P. ethanolidurans</i>	2,70 ± 0,50	40	<i>Lb. buchneri</i>	1,19 ± 0,14
82	<i>Lb. buchneri</i>	2,66 ± 0,29	227	<i>Lb. brevis</i>	1,16 ± 0,11
189	<i>Lb. brevis</i>	2,64 ± 0,03	258	<i>Lb. brevis</i>	1,15 ± 0,01
35	<i>P. ethanolidurans</i>	2,54 ± 0,15	247	<i>Lb. brevis</i>	1,14 ± 0,11
184	<i>Lb. plantarum</i>	2,54 ± 0,15	102	<i>P. ethanolidurans</i>	1,13 ± 0,23
54	<i>P. ethanolidurans</i>	2,48 ± 0,00	65	<i>Lb. brevis</i>	1,12 ± 0,54
69	<i>P. ethanolidurans</i>	2,45 ± 0,00	281	<i>Lb. brevis</i>	1,09 ± 0,05
123	<i>Lb. brevis</i>	2,43 ± 0,27	140	<i>Lb. plantarum</i>	1,01 ± 0,12
173	<i>P. ethanolidurans</i>	2,37 ± 0,38	66	<i>P. ethanolidurans</i>	1,00 ± 0,11
261	<i>Lb. plantarum</i>	2,33 ± 0,00	131	<i>P. ethanolidurans</i>	1,00 ± 0,36
349	<i>Lb. plantarum</i>	2,32 ± 0,06	167	<i>P. ethanolidurans</i>	0,96 ± 0,31
87	<i>P. ethanolidurans</i>	2,29 ± 0,66	315	<i>Lb. plantarum</i>	0,95 ± 0,08
74	<i>Lb. namurensis</i>	2,25 ± 0,46	383	<i>Lb. plantarum</i>	0,95 ± 0,03
175	<i>P. ethanolidurans</i>	2,25 ± 1,31	117	<i>Lb. Brevis</i>	0,93 ± 0,27
19	<i>Lb. brevis</i>	2,21 ± 0,09	165	<i>Lb. brevis</i>	0,92 ± 0,25
191	<i>Lb. brevis</i>	2,20 ± 0,12	325	<i>Lb. brevis</i>	0,91 ± 0,02
156	<i>P. parvulus</i>	2,16 ± 0,04	148	<i>Lb. plantarum</i>	0,87 ± 0,18
118	<i>Lb. brevis</i>	2,16 ± 0,05	161	<i>Lb. plantarum</i>	0,83 ± 0,13
154	<i>Lb. plantarum</i>	2,16 ± 0,23	1	<i>Lb. brevis</i>	0,74 ± 0,00
62	<i>Lb. brevis</i>	2,15 ± 0,52	4	<i>Lb. plantarum</i>	0,74 ± 0,00
130	<i>Lb. namurensis</i>	2,15 ± 0,22	99	<i>Lb. plantarum</i>	0,74 ± 0,00
48	<i>Lb. buchneri</i>	2,15 ± 0,04	124	<i>Lb. plantarum</i>	0,74 ± 0,00
273	<i>Lb. plantarum</i>	2,14 ± 0,55	166	<i>Lb. plantarum</i>	0,74 ± 0,00
145	<i>Lb. namurensis</i>	2,12 ± 0,12	169	<i>Lb. plantarum</i>	0,74 ± 0,00
67	<i>Lb. brevis</i>	2,10 ± 0,02	195	<i>Lb. brevis</i>	0,74 ± 0,00

Çizelge 4.6 Laktik asit bakterilerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretim miktarları (µg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /mL) (devam)

No	Tür	µg H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /mL	No	Tür	µg H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /mL
121	<i>Lb. brevis</i>	2,10 ± 0,37	216	<i>Lb. plantarum</i>	0,74 ± 0,00
52	<i>P. ethanolidurans</i>	2,09 ± 0,38	218	<i>Lb. plantarum</i>	0,74 ± 0,00
92	<i>Lb. plantarum</i>	2,09 ± 0,01	221	<i>Lb. plantarum</i>	0,74 ± 0,00
113	<i>P. ethanolidurans</i>	2,09 ± 0,00	256	<i>Lb. plantarum</i>	0,74 ± 0,00
183	<i>Lb. plantarum</i>	2,05 ± 0,38			

#### 4.7.5 Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktiviteleri ve bakteriyosin üretim özellikleri

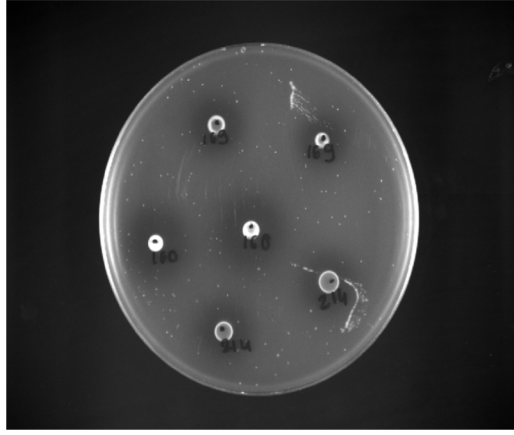
LAB'nin, bazı bakterilerin gelişmeleri ve toksin üretmeleri üzerine güçlü bir inhibitör etkiye sahip oldukları belirtilmektedir. Bu antagonistik aktivite mevcut besinler için rekabet, redoks potansiyelinde azalma, laktik ve asetik asit üretimi ile pH'nın azalması, hidrojen peroksit, karbondioksit veya diasetil gibi inhibitör özelliğe sahip birincil metabolitlerin üretimi, bakteriyosinler ve antibiyotikler gibi antimikrobiyal bileşiklerin üretilmelerinin sonucu olabilmektedir. Bu özellikler, tek başlarına ya da birlikte, gıdanın raf ömrünü uzatmaya ve güvenilirliğine yardımcı olmaktadır (Adams ve Nicolaides 1997).

Çalışmamızda genel antimikrobiyal aktivite belirlenmesi aşamasında 7 adet indikatör mikroorganizma seçilmiştir. Laktik asit bakterilerinin bu indikatör mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri test edilerek oluşturdukları inhibisyon zon çapları ölçülmüştür (Şekil 4.7). İndikatör mikroorganizma olarak maya (*Candida albicans* SLM), küf (*Aspergillus parasiticus*), turşularda sünme hastalığına sebep olan *Lb. brevis* (No:57), *Bacillus cereus* FM1, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria innocua* LMG2813 kullanılmıştır. Zon çapları değerlendirilirken 0,5 cm ve bundan küçük inhibisyon zonu veren örneklerde antimikrobiyal aktivite yok olarak değerlendirilmiştir. Ek 5 incelendiğinde tüm LAB türlerinin küf ve mayaya karşı herhangi bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadıkları, fakat 281, 221, 270 numaralı türlerin çok düşük düzeyde antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları görülmektedir. Kültürler, özellikle *L. innocua*, *E. coli* ve *Salmonella* üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermişlerdir. *Lb. plantarum* suşları ise aynı zamanda *B. cereus*'a karşı da daha iyi bir

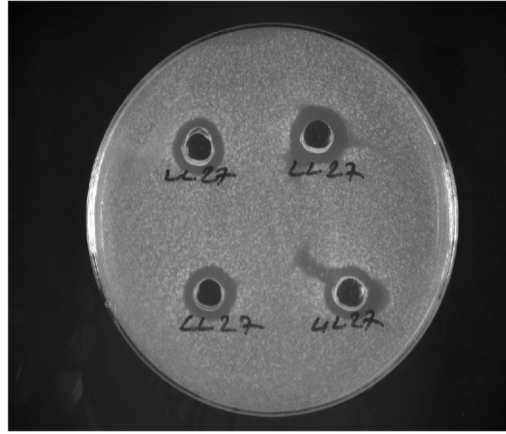
antimikrobiyal aktivite göstermektedirler. Sonuçlar incelendiğinde, özellikle *Lb. plantarum* suşlarının patojen mikroorganizmalara karşı oluşturdukları inhibisyon zonlarının diğer LAB türlerine göre daha iyi olduğu görülmektedir. Ancak; bu etkinin daha çok laktik asit üretiminden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. LAB'nin asit üretim miktarları ile genel antimikrobiyal aktiviteleri incelendiğinde; özellikle yüksek asit üretim yeteneğine sahip suşların aktivitelerinin daha fazla olduğu görülmektedir. Küf ve mayaların yüksek asitliğe dayanıklı olması bu indikatörler üzerinde LAB'nin inhibisyon zonu oluşturmamasında temel bir etken olmaktadır. Benzer şekilde, *Lb. brevis* indikatörü üzerinde gözlenen düşük zon çapları da bu şekilde açıklanabilir.

Genel antimikrobiyal aktiviteleri belirlenen tüm LAB türlerinin aktivitelerinin bakteriyosin veya diğer bileşiklerden kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirlemek amacıyla; daha sonraki çalışmalarda inkübe edilen kültürlerin asitliği nötralize edilerek santrifüj edilmiş ve membran filtreden geçirilerek nötral süpernetantın antimikrobiyal aktivitesi agar kuyu difüzyon yöntemiyle test edilmiştir. Bu aşamada indikatör mikroorganizma olarak, *Listeria innocua* LMG2813, *Staphylococcus carnosus* MC1B, *Lb. brevis* No:57 ve bakteriyosin duyarlılığı yüksek olan *Micrococcus luteus* NCIMBB8166 suşları kullanılmıştır. Referans suş olarak ise, Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilen ve bakteriyosin üreten *L. lactis* 27 (LL27) suşu kullanılmıştır (Şekil 4.8). Yapılan bu çalışmada ise, tüm LAB'inde herhangi bir antimikrobiyal aktivite gözlenmemiştir. Genel inhibisyonun asitlikten kaynaklandığı ve seçilen kültürlerin bakteriyosin ve benzeri maddeler üretmediği sonucuna ulaşılmıştır.

Erdoğrul vd. (2002), fermente sucuklardan izole ettikleri 4 adet *P. pentosaceus* türünün *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatus*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* üzerine olan genel inhibisyon etkisini incelemiş ve sadece bir suşun *S. aureus*'a karşı 1 cm'lik zon oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise *Pediococcus* türlerinin *L. innocua*, *E. coli* ve *Salmonella*'ya karşı 1 cm ve 1 cm'den büyük zon oluşturduğu; *B. cereus*, *Lb. brevis*'e karşı 1 cm'den küçük zon oluşturduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.7 *L. innocua*'ya karşı antimikrobiyal aktivite (nokta ekim)



Şekil.4.8 *M. luteus*'a karşı antimikrobiyal aktivite (kuyu)

Çon ve Karasu (2009), turşudan ve fermente yeşil zeytinden izole ettikleri, *Lb. plantarum* türlerinin *Lb. sake*, *L. monocytogenes*'e karşı iyi, *E. feacium* ve *E. coli*'ye karşı orta düzeyde, *P. vulgaris* ve *A. hydrophila*'ya karşı zayıf, *Y. lipolitica*'ya karşı ise negatif antimikrobiyal etki gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Toksoy vd. (1999), sucuk ve sosislerden izole ettikleri 39 adet *Lb. plantarum* suşunun *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* üzerinde genel inhibisyon etkilerinin belirtilen sırada olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmanın bu aşamasından sonra, LAB suşlarının farklı sıcaklıklarda gelişme özellikleri, farklı pH ve tuz derecelerinde gelişme özellikleri, asit üretim miktarları ve hızları incelenerek, turşu üretiminde starter kültür olarak uygun teknolojik özelliklere sahip suşlar (39 suş) seçilmiş, çalışmalara bu seçilen türler üzerinde devam edilmiştir.

#### **4.7.6 Laktik asit bakterilerinin proteolitik aktiviteleri**

Laktik asit bakterileri, diğer mikroorganizma grupları ile karşılaştırıldığında (*Bacillus*, *Pseudomonas*) daha zayıf proteolitik aktivite göstermektedirler. Bununla birlikte birçok laktik asit bakterisi, kendilerinin gelişmesini düzenleyen ve proteince zengin substratlardan esansiyel aminoasitlerin ve küçük peptidlerin açığa çıkmasını sağlayan kompleks proteolitik sistemlere sahip olabilmektedir. Laktik asit bakterilerinin proteolitik sistemleri ekstraselular ve intraselular proteinazlardan meydana gelmektedir (Savoy ve Hebert 2001).

Çizelge 4.7 'de LAB'nin 410 nm'de okunan proteolitik aktivite değerlerinin çok düşük miktarda olduğu görülmektedir. Daeschel vd. (1987) tarafından bitkisel kökenli laktik asit bakterilerinin proteolitik aktivitesinin ya çok az olduğu ya da olmadığı belirtilmektedir.



Çizelge 4.7 Laktik asit bakterilerinin proteolitik aktiviteleri (OD<sub>410</sub>)

No	Tür	OD <sub>410</sub>	No	Tür	OD <sub>410</sub>
4	<i>Lb. plantarum</i>	0,113	169	<i>Lb. plantarum</i>	0,121
18	<i>Lb. plantarum</i>	0,070	173	<i>P. ethanolidurans</i>	0,081
33	<i>P. ethanolidurans</i>	0,049	183	<i>Lb. plantarum</i>	0,044
35	<i>P. ethanolidurans</i>	0,047	187	<i>P. ethanolidurans</i>	0,047
67	<i>Lb. brevis</i>	0,061	216	<i>Lb. plantarum</i>	0,051
69	<i>P. ethanolidurans</i>	0,036	218	<i>Lb. plantarum</i>	0,061
92	<i>Lb. plantarum</i>	0,066	227	<i>Lb. brevis</i>	0,064
99	<i>Lb. plantarum</i>	0,000	247	<i>Lb. brevis</i>	0,029
104	<i>Lb. brevis</i>	0,074	256	<i>Lb. plantarum</i>	0,068
113	<i>P. ethanolidurans</i>	0,091	258	<i>Lb. brevis</i>	0,078
115	<i>Lb. plantarum</i>	0,057	261	<i>Lb. plantarum</i>	0,088
124	<i>Lb. plantarum</i>	0,101	269	<i>Lb. plantarum</i>	0,091
125	<i>P. ethanolidurans</i>	0,093	270	<i>Lb. plantarum</i>	0,052
126	<i>P. ethanolidurans</i>	0,061	273	<i>Lb. plantarum</i>	0,149
129	<i>P. ethanolidurans</i>	0,044	329	<i>Lb. brevis</i>	0,033
131	<i>P. ethanolidurans</i>	0,042	330	<i>Lb. brevis</i>	0,097
140	<i>Lb. plantarum</i>	0,111	349	<i>Lb. plantarum</i>	0,071
148	<i>Lb. plantarum</i>	0,071	376	<i>Lb. plantarum</i>	0,060
149	<i>P. ethanolidurans</i>	0,101	383	<i>Lb. plantarum</i>	0,031
154	<i>Lb. plantarum</i>	0,046			

#### 4.7.7 Laktik asit bakterilerinin enzim profillerinin belirlenmesi (API - ZYM)

Laktik asit bakterilerinin enzim profillerinin belirlenebilmesi amacıyla, yaygın olarak kullanılan API-ZYM (Biomerieux) test kitlerinden yararlanılmıştır. API-ZYM enzimatik aktivite çalışmaları için tasarlanmış yarı kantitatif bir mikrometottur. Teknik tüm numunelere (mikroorganizma, hücre süspansiyonları, dokular vb.) kolaylıkla uygulanabilmektedir. Çok düşük numune miktarları kullanılarak 19 enzimatik reaksiyonun hızlı ve sistematik çalışmasına izin vermektedir. Bu test kitleri, tabanında enzimatik substrat ve tamponu içeren 1 tanesi kontrol olmak üzere 20 kuyucuktan oluşmaktadır (Çizelge 4.8). Stribin temeli sentetik substratlar içeren, örülmemiş fiberden yapıldır. Bu taban yapısı, substratlar erimese bile, enzimatik reaksiyona izin vermektedir (Şekil 4.9).

Çizelge 4.8 API-ZYM enzim kodları

API-ZYM Test Kitinde Bulunan Enzimlerin Numara Karşılıkları			
1	Kontrol	11	Fosftaz asit
2	Fosfatazalkalin	12	Fosfoamidaz
3	Esteraz(C4)	13	$\alpha$ Galaktozidaz
4	Esteraz lipaz( C8)	14	$\beta$ Galaktozidaz
5	Lipaz (C14)	15	$\beta$ Glukoronidaz
6	Lösin aminopeptidaz	16	$\alpha$ Glukozidaz
7	Valin aminopeptidaz	17	$\beta$ Glukozidaz
8	Sistin aminopeptidaz	18	$\beta$ Glukozaminidaz
9	Tripsin	19	$\alpha$ Mannodiaz
10	Kimotripsin	20	$\alpha$ Fukozidaz

Laktik asit bakterilerinde API-ZYM test kitleriyle analizi gerçekleştirilen enzimlerin punlama tablosu incelendiğinde (Çizelge 4.9); *Lb. brevis* türlerinin çoğunda 2, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 19, 20 numaralı enzim aktivitelerinin düşük düzeyde bulunduğu; 3,11 nolu enzimlerin orta düzeyde 6, 7, 13, 14, 16, 17 nolu enzimlerin ise iyi düzeyde aktivite gösterdikleri görülmektedir. *Lb. plantarum* türlerinde 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 13, 15, 19, 20 nolu enzimlerin aktivite göstermedikleri 11,12,16 nolu enzimlerin orta düzeyde; 6,14,17,18 nolu enzimlerin ise aktif oldukları görülmektedir. *Pediococcus* spp. türlerinde ise 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20 nolu enzim aktivitesi izlenmemiş ve 6,7,16,17 nolu enzimlerde aktivite izlenmiştir. Deneme kapsamındaki tüm laktik asit bakterilerinde tripsin, kimotripsin, mannozidaz, fukozidaz enzim aktivitesine rastlanmamıştır.

Tamang vd. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, fermente sebzelerden izole edilen *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *P. pentosaceus*, *P. acidilactici* türlerinin API-ZYM sistemi ile enzim profilleri belirlenmiştir. Alkalin fosfataz, esteraz (C4), esteraz lipaz (C8), lipaz (C14) aktivitesinin bazı türlerde düşük seviyede bulunduğu belirlenmiştir. Tüm türlerin asit fosfataz,  $\beta$  galaktozidaz ve  $\beta$  gulukozidaz aktivitesine sahip olduğu;  $\alpha$  galaktozidaz aktivitesinin *Lb. brevis* ve bazı *Lb. plantarum* türlerinde,  $\beta$  glukoronidaz aktivitesinin *Lb. brevis* türlerinde,  $\alpha$  glukozidaz aktivitesinin *Lb. plantarum* ve *Lb. brevis* türlerinde görüldüğü belirtilmiştir.



Şekil 4.9 Bazı örneklere ait API ZYM test stripleri

Papamonoli vd. (2003) tarafından fermente sosisten izole edilen *Lb. curvatus*, *Lb. sakei*, *Lb. plantarum* türlerinin API-ZYM sistemi ile enzim aktiviteleri incelenmiştir. *Lb. plantarum* türlerinin lösin aminopeptidaz, valin aminopeptidaz, sistin aminopeptidaz, asit fosfotaz, alkalın fosfataz,  $\alpha$  galaktozidaz,  $\beta$  galaktozidaz,  $\alpha$  glukozidaz,  $\beta$  gulukozidaz,  $\alpha$  mannodiaz enzim aktivitelerine farklı derecelerde sahip olduğu; esteraz, esteraz lipaz,  $\beta$  glukoronidaz aktivitesine sahip olmadığı belirlenmiştir.

Herreros vd. (2003) İspanyol keçi peynirinden izole ettikleri *Lb. plantarum* ve *Lb. brevis* türlerinin çoğunda lösin aminopeptidaz, valin aminopeptidaz, asit fosfataz,  $\beta$  galaktozidaz,  $\alpha$  glukozidaz,  $\beta$  gulukozidaz aktivitesi olduğunu; alkalın fosfataz, esteraz (C4), esteraz lipaz (C8), lipaz (C14), tripsin, kimotripsin,  $\alpha$  galaktozidaz,  $\beta$  glukoronidaz aktivitesi olmadığını bildirmişlerdir.

Çizelge 4.9 Laktik asit bakteri türlerinin API ZYM test sonuçları

No	Tür	Test enzimleri (0 – 5 puan)																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
67	<i>Lb. brevis</i>	0	0	3	2	0	4	4	1	0	0	3	2	4	5	2	4	4	0	0	0
104	<i>Lb. brevis</i>	0	1	3	2	0	4	5	2	0	0	3	2	4	5	0	4	3	1	0	0
227	<i>Lb. brevis</i>	0	0	2	1	0	4	4	1	0	0	1	1	2	4	0	4	3	0	0	0
247	<i>Lb. brevis</i>	0	0	3	1	0	5	5	2	0	0	2	1	3	5	0	3	3	0	0	0
258	<i>Lb. brevis</i>	0	0	3	2	0	4	3	0	0	0	2	1	0	4	0	3	4	0	0	0
329	<i>Lb. brevis</i>	0	0	4	3	0	5	4	2	0	0	3	1	0	5	2	3	4	0	0	0
330	<i>Lb. brevis</i>	0	0	3	2	0	5	4	2	0	0	2	1	0	5	2	3	5	0	0	0
4	<i>Lb. plantarum</i>	0	0	0	1	0	5	5	1	0	0	1	2	0	3	0	1	2	2	0	0
18	<i>Lb. plantarum</i>	0	1	1	0	1	4	3	0	0	0	3	1	3	5	0	5	4	5	0	0
92	<i>Lb. plantarum</i>	0	2	2	1	0	4	3	2	0	0	2	3	0	5	0	2	4	4	1	0
99	<i>Lb. plantarum</i>	0	0	1	1	0	4	4	1	0	0	3	2	1	3	0	5	4	5	1	1
115	<i>Lb. plantarum</i>	0	1	1	1	1	4	4	2	1	0	2	2	0	5	0	3	4	4	0	0
124	<i>Lb. plantarum</i>	0	1	0	1	0	4	3	2	0	0	2	1	0	2	0	3	4	4	0	0
140	<i>Lb. plantarum</i>	0	1	0	1	0	3	3	2	0	0	2	2	0	4	0	3	3	1	0	0
148	<i>Lb. plantarum</i>	0	1	1	2	1	4	3	2	0	0	2	2	0	4	0	4	3	4	0	0
154	<i>Lb. plantarum</i>	0	0	2	1	0	5	3	1	0	0	2	1	0	5	0	1	2	0	0	0
169	<i>Lb. plantarum</i>	0	1	0	2	1	3	2	0	1	0	1	2	0	1	0	1	4	2	0	0
183	<i>Lb. plantarum</i>	0	1	1	1	0	4	2	1	0	0	2	2	0	3	0	3	4	4	0	0
216	<i>Lb. plantarum</i>	0	1	1	1	0	4	3	2	0	0	1	1	1	5	0	4	3	5	0	0
218	<i>Lb. plantarum</i>	0	0	0	0	0	4	4	1	0	0	2	1	0	3	0	2	3	3	0	0
256	<i>Lb. plantarum</i>	0	0	1	1	0	4	3	1	0	0	1	1	0	3	0	2	2	3	0	1
261	<i>Lb. plantarum</i>	0	0	0	1	0	4	3	0	0	0	2	1	1	3	0	3	4	3	0	0
269	<i>Lb. plantarum</i>	0	1	1	1	1	3	3	1	0	0	2	1	0	4	0	3	3	4	0	0
270	<i>Lb. plantarum</i>	0	1	1	1	0	5	4	1	0	0	1	2	0	4	0	3	3	2	0	0
273	<i>Lb. plantarum</i>	0	0	1	1	0	4	4	1	0	0	2	2	1	4	0	4	4	5	0	0
349	<i>Lb. plantarum</i>	0	0	0	0	0	4	3	1	0	0	2	1	0	3	0	3	3	4	0	0
376	<i>Lb. plantarum</i>	0	0	1	1	0	4	4	2	0	0	1	2	0	2	0	2	3	4	0	0
383	<i>Lb. plantarum</i>	0	1	1	1	1	4	2	1	0	0	2	2	0	4	0	4	3	4	0	1
33	<i>P. ethanolidurans</i>	0	1	0	1	1	5	3	0	0	0	2	2	2	2	0	5	5	3	0	0
35	<i>P. ethanolidurans</i>	0	0	0	0	1	5	5	1	0	0	1	2	0	0	0	0	3	2	0	0
69	<i>P. ethanolidurans</i>	0	0	0	1	0	4	4	1	0	0	2	1	0	0	0	4	4	3	0	0
113	<i>P. ethanolidurans</i>	0	0	2	1	1	4	4	1	0	0	1	1	0	0	0	3	4	1	0	0
125	<i>P. ethanolidurans</i>	0	0	1	1	1	5	4	1	0	0	1	1	0	0	0	3	2	1	0	0
126	<i>P. ethanolidurans</i>	0	0	2	0	0	5	4	1	0	0	1	2	0	0	0	0	3	1	0	0
129	<i>P. ethanolidurans</i>	0	0	0	0	1	5	5	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
131	<i>P. ethanolidurans</i>	0	0	1	1	1	5	5	1	0	0	1	1	0	0	0	2	3	2	0	0
149	<i>P. ethanolidurans</i>	0	0	2	2	1	3	4	0	0	0	2	1	1	4	0	3	2	0	1	1
173	<i>P. ethanolidurans</i>	0	0	0	1	0	5	3	0	0	0	1	2	0	0	0	0	3	0	0	0
187	<i>P. ethanolidurans</i>	0	0	1	1	1	4	4	1	0	0	2	3	0	0	0	1	4	2	0	0

#### 4.7.8 Laktik asit bakterilerinin biyojen amin üretim özellikleri

Biyojen aminler (BA) balık ürünleri, peynir, şarap, bira ve diğer fermente gıdalarda oluşabilen organik bileşiklerdir. Biyojen amin oluşumu bazı toksikolojik sorunlara neden olabilmektedir. Histamin ve tiramin, önemli toksikolojik özelliklerinden dolayı

üzerinde çok çalışılan biyojen aminler arasında yer almaktadır. Biyojen aminler, gıdalarda bulunan bazı mikroorganizmaların substrat spesifik enzimlerinin aminoasitleri dekarboksile etmesi ile oluşmaktadır. Birçok mikroorganizma (enterobakteriler, *Pseudomonas* spp., enterokoklar ve bazı LAB) biyojen amin oluşturma yeteneğine sahiptirler (Bover-Cid ve Holzapfel, 1999).

Lisin, histidin ve arjinin ilave edilerek gerçekleştirilen biyojen amin denemelerinde sadece arjinin içeren besiyerinde bazı kültürlerin biyojen amin oluşturabildikleri belirlenmiştir. Arjinin dekarboksilaz aktivitesi; 154, 149, 104, 67, 247, 227, 258, 376, 330, 329 numaralı suşlarda tespit edilmiştir.

Süt ürünleri, şarap ve lahana turşularında yaygın olarak kullanılan bazı starter kültürlerin yüksek düzeyde biyojen amin oluşturdukları, bu nedenle starter kültür seçiminde bu özelliklerin dikkate alınması gerektiği vurgulanmaktadır. Straub vd. (1995), çeşitli gıdalardan izole ettikleri 523 adet Laktik asit bakterisinin biyojen amin oluşturma özelliklerini araştırmışlar; *L. buchneri*, *L. carvatus* ve *L. reiteri* türlerine ait suşların yüksek düzeyde biyojen amin oluşturduklarını belirlemişlerdir. Halasz vd. (1999), starter kültür seçiminin sauerkraut fermantasyonu üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, iki farklı starter kültürün biyojen amin üretim düzeyini incelemişler; starter kültür kullanılmasının biyojen amin oluşumunu önemli ölçüde azalttığını belirtmişlerdir.

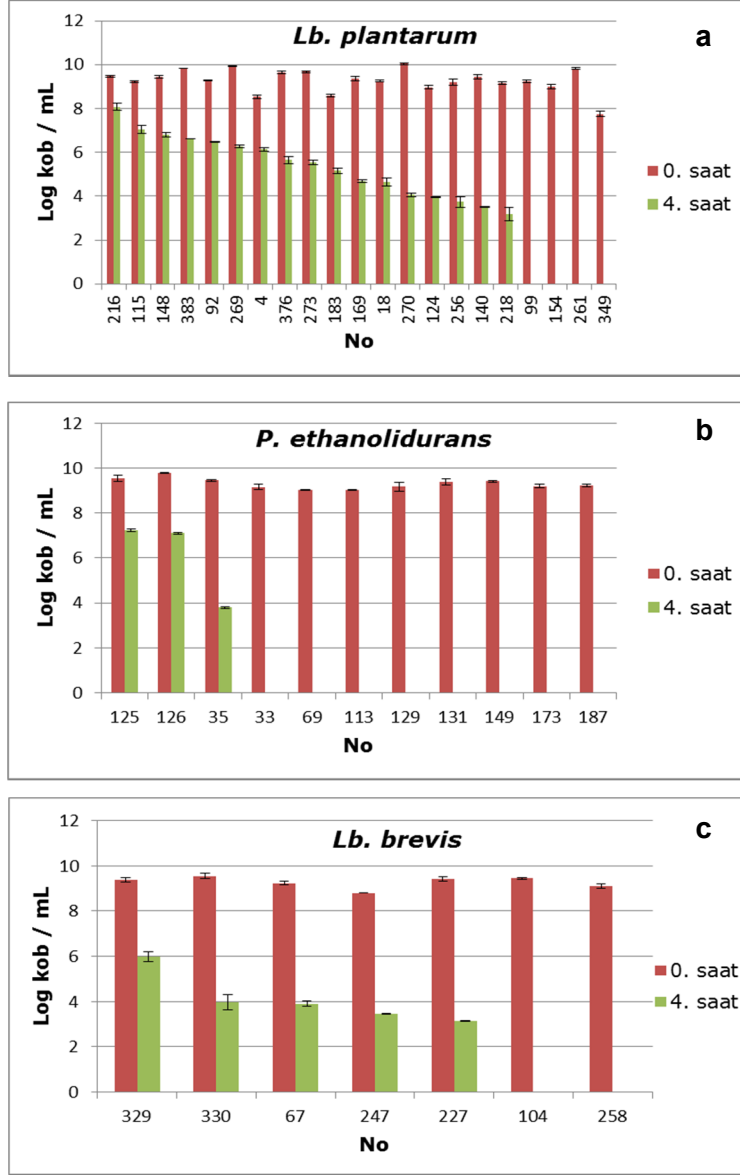
Turgut (2006), hem doğal fermantasyon yoluyla, hem de *L. plantarum* 11B starter kültürü kullanarak hıyar turşusu üretimi gerçekleştirdiği çalışmada, fermantasyon süresince oluşan biyojen aminlerin miktarını HPLC ile belirlemiştir. Doğal fermantasyon ile üretilen kontrol örneklerinde oluşan biyojen amin düzeylerinin starter kültür kullanılarak üretilenlere kıyasla daha yüksek olduğunu ve kontrol örneklerindeki bazı biyojen amin düzeylerinin (örneğin fenil etilamin) toksik limitlerin üzerinde olduğunu ifade etmiş; hıyar turşusu üretiminde *L. plantarum* 11B suşunun biyojen amin oluşumunu baskıladığını ve starter kültür olarak kullanılmasının yararlı olacağını vurgulamıştır.

## 4.8 Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Özellikleri

### 4.8.1 Laktik asit bakterilerinin pH 2,5’de canlılık düzeyleri

Bir mikroorganizmanın probiyotik özelliklerini gösterebilmesi için intestinal sistemde ve endüstriyel prosesler esnasında canlı kalması gerekmektedir. Ağız yolu ile alınan probiyotikler intestinal bölgelere ulaşmadan önce midenin gastrik asit ortamından (pH 1,5-3,0) canlı olarak geçmesi gerekmektedir. Bu nedenle probiyotik mikroorganizma seçiminde ilk aranması gereken kriter suşların asit dirençleridir (Dunne vd. 1999). *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinden bazılarının düşük pH’ya karşı dirençli oldukları, ancak bifidobakterlerin laktobasillere kıyasla daha az dirençli oldukları bilinmektedir. Tez kapsamında, suşların insan bünyesinde ne derecede canlı kalıp kalmayacaklarının belirlenmesine çalışılmıştır. Mikroorganizmaların mide sindiriminden kurtularak bağırsaklara canlı varması ve işlevini orada devam ettirmesi gerekmektedir. Laktik asit bakterilerinin yararlı işlevlerinin pek çoğunu, ancak bağırsakta kolonize olduktan sonra gerçekleştirebildikleri belirtilmiştir (Çakır 2003).

Normal bir insan florasında bağırsaklarda bulunan laktik asit bakteri sayısı  $10^8$ - $10^9$  (kob/cm<sup>2</sup>) arasında değişmektedir (Lichtenstein ve Goldin 2004). İnsan bünyesine ağız yoluyla alınan tüm mikroorganizmalar sindirim sisteminden geçerler ve yararlı işlevlerini büyük ölçüde bağırsaklarda gösterirler. Sindirim sisteminin vücutta mikroorganizmaların canlı kalabilmesini engelleyen en önemli bölgesi midedir (Mishra ve Prasad 2005).



Şekil 4.10 a. *Lb. plantarum*, b. *Pediococcus ethanolidurans*, c. *Lb. brevis* suşlarının pH 2,5’de 0. ve 4. saat canlılık düzeyleri grafiği (log kob/mL)

Tez kapsamında seçilen izolatların düşük pH ortamında göstermiş oldukları direnç şekil 4.10 ve çizelge 4.10’da verilmiştir. LAB’nin pH 2,5’de canlılık düzeylerinin belirlenmesi çalışmasında, denemeye alınan 39 adet suşun 14 adedi pH 2,5’de canlılık düzeylerini kaybetmişlerdir. 25 suş ise farklı düzeylerde canlılıklarını korumuşlardır. 10 örneğin canlılık düzeyleri log 6 kob/mL’nin üzerinde gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.10 LAB türlerinin pH 2,5’de 0. ve 4. saat canlılık düzeyleri (log kob/mL)

No	Tür	0. saat	4. saat	fark
329	<i>Lb. brevis</i>	9,37 ± 0,09	5,99 ± 0,21	3,38
67	<i>Lb. brevis</i>	9,22 ± 0,08	3,90 ± 0,12	5,33
247	<i>Lb. brevis</i>	8,80 ± 0,01	3,45 ± 0,01	5,35
330	<i>Lb. brevis</i>	9,54 ± 0,12	3,96 ± 0,33	5,58
227	<i>Lb. brevis</i>	9,41 ± 0,12	3,13 ± 0,02	6,28
258	<i>Lb. brevis</i>	9,10 ± 0,08	<1,00 ± 0,00	9,10
104	<i>Lb. Brevis</i>	9,44 ± 0,04	<1,00 ± 0,00	9,44
216	<i>Lb. plantarum</i>	9,47 ± 0,04	8,08 ± 0,16	1,39
115	<i>Lb. plantarum</i>	9,22 ± 0,05	7,05 ± 0,17	2,18
4	<i>Lb. plantarum</i>	8,54 ± 0,07	6,14 ± 0,07	2,40
148	<i>Lb. plantarum</i>	9,45 ± 0,05	6,79 ± 0,10	2,66
92	<i>Lb. plantarum</i>	9,28 ± 0,01	6,49 ± 0,01	2,79
383	<i>Lb. plantarum</i>	9,85 ± 0,00	6,60 ± 0,00	3,25
183	<i>Lb. plantarum</i>	8,58 ± 0,06	5,16 ± 0,11	3,43
269	<i>Lb. plantarum</i>	9,94 ± 0,02	6,28 ± 0,05	3,66
376	<i>Lb. plantarum</i>	9,65 ± 0,07	5,65 ± 0,16	4,00
273	<i>Lb. plantarum</i>	9,68 ± 0,05	5,54 ± 0,09	4,14
18	<i>Lb. plantarum</i>	9,25 ± 0,04	4,66 ± 0,19	4,60
169	<i>Lb. plantarum</i>	9,37 ± 0,10	4,68 ± 0,07	4,69
124	<i>Lb. plantarum</i>	8,96 ± 0,08	3,96 ± 0,03	5,01
256	<i>Lb. plantarum</i>	9,21 ± 0,14	3,74 ± 0,26	5,48
140	<i>Lb. plantarum</i>	9,45 ± 0,11	3,49 ± 0,02	5,96
270	<i>Lb. plantarum</i>	10,04 ± 0,05	4,06 ± 0,07	5,98
218	<i>Lb. plantarum</i>	9,17 ± 0,07	3,18 ± 0,31	5,99
349	<i>Lb. plantarum</i>	7,75 ± 0,11	<1,00 ± 0,00	7,75
154	<i>Lb. plantarum</i>	9,01 ± 0,11	<1,00 ± 0,00	9,01
99	<i>Lb. plantarum</i>	9,23 ± 0,05	<1,00 ± 0,00	9,23
261	<i>Lb. plantarum</i>	9,83 ± 0,06	<1,00 ± 0,00	9,83
125	<i>P. ethanolidurans</i>	9,54 ± 0,15	7,23 ± 0,06	2,31
126	<i>P. ethanolidurans</i>	9,79 ± 0,01	7,09 ± 0,04	2,70
35	<i>P. ethanolidurans</i>	9,45 ± 0,04	3,79 ± 0,05	5,66
69	<i>P. ethanolidurans</i>	9,01 ± 0,01	<1,00 ± 0,00	9,01
113	<i>P. ethanolidurans</i>	9,02 ± 0,01	<1,00 ± 0,00	9,02
33	<i>P. ethanolidurans</i>	9,15 ± 0,11	<1,00 ± 0,00	9,15
129	<i>P. ethanolidurans</i>	9,16 ± 0,19	<1,00 ± 0,00	9,16
173	<i>P. ethanolidurans</i>	9,19 ± 0,07	<1,00 ± 0,00	9,19
187	<i>P. ethanolidurans</i>	9,21 ± 0,07	<1,00 ± 0,00	9,21
131	<i>P. ethanolidurans</i>	9,37 ± 0,14	<1,00 ± 0,00	9,37
149	<i>P. ethanolidurans</i>	9,41 ± 0,04	<1,00 ± 0,00	9,41

Tür düzeyinde bakteriler incelendiğinde, özellikle *Lb. plantarum* ve *Lb. brevis* türlerinin pH 2,5’de canlılıklarını daha iyi koruyabildiği görülmektedir. 216, 125, 126, 115, 148, 383, 92 nolu örnekler pH 2,5’de canlılıklarını en iyi koruyan suşlar arasında yer almaktadır.



*Lb. plantarum* türleri (21 suş) pH 2,5'e en dayanıklı türler olmakla birlikte 99, 154, 261 ve 349 numaralı kültürler canlılıklarını tamamen kaybetmişlerdir. *Lb. brevis* türlerinin 5 tanesi ise pH 2,5'de canlılıklarını korumakla birlikte, 4 saat sonunda canlılık düzeylerindeki azalma miktarı diğer türlere kıyasla daha fazla olmuştur. *P. ethanolidurans* türlerinde ise, bir kısmı ( 8 suş) canlılıklarını tamamen kaybederken, pH 2,5'de canlılığını koruyabilen 2 suş ( 125, 126 numaralı örnekler) canlılıklarını koruyabilen en iyi örnekler arasında yer almaktadır (Şekil 4.10). *Lactobacillus* türlerinin tavuk yemi rasyonlarında kullanılabilirliğinin araştırıldığı bir çalışmada 296 izolatın düşük pH (3,0) ve safra tuzlarına direnç özellikleri tespit edilmiştir. Araştırılan suşlardan *Lb. salivarius* CTC2183 ve CTC 2197'nin en dirençli suşlar olduğu ve yem rasyonlarında kullanılabileceği bildirilmiştir (Garriga vd. 1998). Çalışmamızın bu aşamasından sonra pH 2,5'de canlılıklarını tamamen kaybeden 14 adet laktik asit bakteri türü elenerek, canlılıklarını farklı düzeylerde koruyabilen örneklerin (25 suş) diğer probiyotik özellikleri incelenmiştir.

#### **4.8.2 Laktik asit bakterilerinin safra tuzu dayanım düzeyleri**

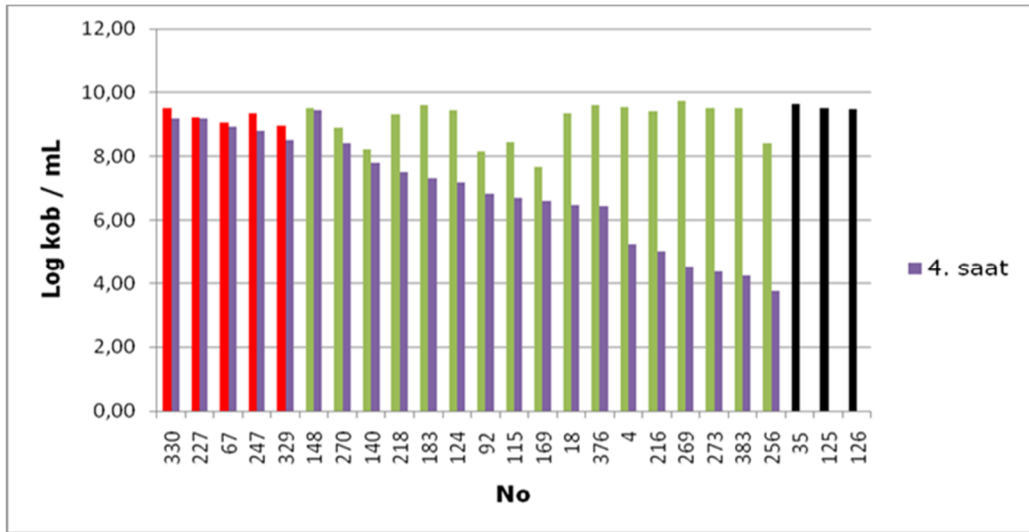
Safra asitleri karaciğerde kolesterolden sentezlenerek, safra kesesine gönderilmekte ve buradan da konjuge formda (günde 500-700 mL) duodenuma salgılanmaktadır. Kalın bağırsakta bu asitler mikrobiyal aktivite sonucu bazı kimyasal değişikliklere (dekonjugasyon, dehidroksilasyon, dehidrogenasyon ve deglukoronidasyon) maruz kalmaktadır. Konjuge ve dekonjüge safra asitleri, özellikle *E. coli* ssp, *Klebsiella* spp, *Enterococcus* spp üzerine antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Dekonjüge asit formları daha çok Gram Pozitif bakteriler üzerinde etkili olmaktadır (Dunne vd. 1999).

*Lb. acidophilus* süt ürünleri gibi ürünlerde en çok kullanılan probiyotik türdür. Chou ve Weimer (1999), asit ve safra tuzlarına dayanıklı *L. acidophilus* türlerini izole etmek için çalışmalar yapmışlardır. Bu suşların bazıları % 0,2 karışık safra tuzları içeren ortamda gelişme yeteneği göstermişlerdir. Başka bir çalışmada, süt kökenli 29 *Lactobacillus* suşlarının probiyotik potansiyeli in vitro olarak test edilmiştir. Bakterilerin safra tuzu

toleransları % 0,3 oxgall ile test edilmiştir. Test sonucu suşların tümü % 0,3 safra konsantrasyonunda 4 saat sonunda canlı kalabilmişlerdir (Martín vd. 2004).

Tez kapsamında seçilen izolatların % 0,3 safra tuzunda 4 saatlik inkübasyon sonucu göstermiş oldukları direnç çizelge 4.11’de verilmiştir. LAB’nin % 0,3 safra tuzunda canlılık düzeylerinin belirlenmesi çalışmasında denemeye alınan 25 adet suşun 3 adedi (No: 35, 125, 126) safra tuzu bulunan ortamda canlılık düzeylerini tamamen kaybetmişlerdir. 22 suş ise farklı düzeylerde canlılıklarını korumuşlardır. 16 örneğin canlılık düzeyleri 6 log kob/mL’nin üzerinde gerçekleşmiştir.

Tür düzeyinde bakteriler incelendiğinde, özellikle *Lb. brevis* türlerinin tamamının (5 suş) % 0,3 safra tuzunda canlılıklarını daha iyi koruyabildiği görülmektedir. 227, 148, 67 ve 330 nolu örnekler safra tuzuna karşı canlılıklarını en iyi koruyan suşlar arasında yer almaktadır. *P. ethanolidurans* türlerinin tamamı (No: 35, 125, 126) safra tuzuna karşı dayanım gösterememiştir (Şekil 4.11 ve Çizelge 4.11).



Şekil 4.11 LAB türlerinin safra tuzu (% 0,3) içeren MRS besiyerinde 0. ve 4. saat canlılık düzeyleri (log kob / mL)

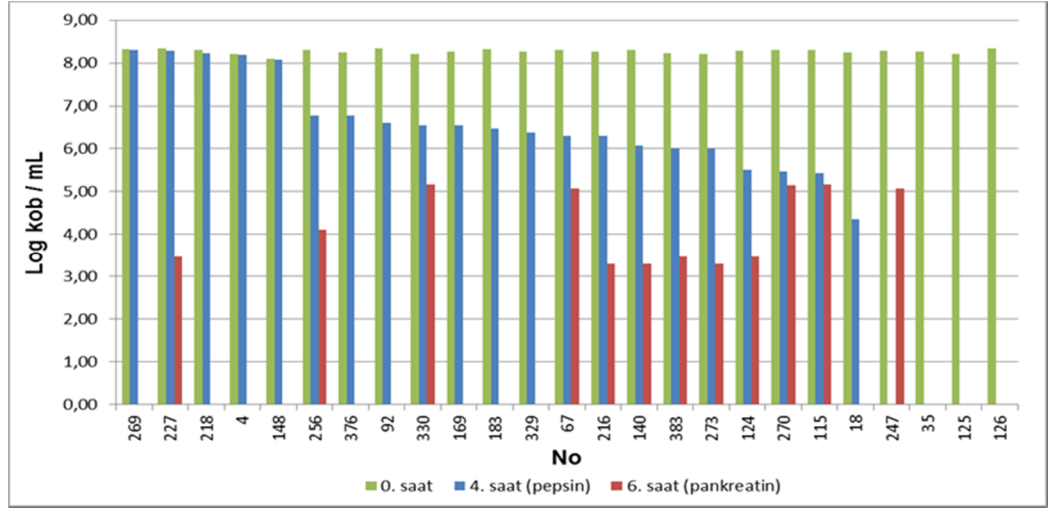
Çizelge 4.11 LAB türlerinin safra tuzu (% 0,3) içeren MRS besiyerinde 0. ve 4. saat canlılık düzeyleri (log kob / mL)

No	Tür	0. saat	4. saat	fark
227	<i>Lb. brevis</i>	9,23 ±0,09	9,18 ±0,01	0,05
67	<i>Lb. brevis</i>	9,06 ±0,03	8,93 ±0,18	0,13
330	<i>Lb. brevis</i>	9,52 ±0,08	9,19 ±0,17	0,33
329	<i>Lb. brevis</i>	8,96 ±0,11	8,50 ±0,12	0,46
247	<i>Lb. brevis</i>	9,36 ±0,15	8,81 ±0,16	0,55
148	<i>Lb. plantarum</i>	9,52 ±0,07	9,44 ±0,07	0,07
140	<i>Lb. plantarum</i>	8,22 ±0,10	7,79 ±0,12	0,43
270	<i>Lb. plantarum</i>	8,91 ±0,00	8,41 ±0,02	0,50
169	<i>Lb. plantarum</i>	7,68 ±0,10	6,59 ±0,16	1,09
92	<i>Lb. plantarum</i>	8,14 ±0,07	6,84 ±0,09	1,30
115	<i>Lb. plantarum</i>	8,45 ±0,16	6,69 ±0,30	1,76
218	<i>Lb. plantarum</i>	9,32 ±0,07	7,51 ±0,09	1,81
124	<i>Lb. plantarum</i>	9,45 ±0,04	7,17 ±0,02	2,28
183	<i>Lb. plantarum</i>	9,62 ±0,06	7,30 ±0,05	2,32
18	<i>Lb. plantarum</i>	9,35 ±0,03	6,46 ±0,12	2,88
376	<i>Lb. plantarum</i>	9,60 ±0,00	6,43 ±0,07	3,17
4	<i>Lb. plantarum</i>	9,54 ±0,02	5,23 ±0,03	4,31
216	<i>Lb. plantarum</i>	9,41 ±0,03	5,02 ±0,03	4,39
256	<i>Lb. plantarum</i>	8,43 ±0,05	3,77 ±0,10	4,66
273	<i>Lb. plantarum</i>	9,50 ±0,05	4,37 ±0,01	5,13
269	<i>Lb. plantarum</i>	9,73 ±0,00	4,54 ±0,05	5,19
383	<i>Lb. plantarum</i>	9,50 ±0,18	4,25 ±0,07	5,25
126	<i>P. ethanolidurans</i>	9,48 ±0,00	<1,00 ±0,00	9,48
125	<i>P. ethanolidurans</i>	9,51 ±0,04	<1,00 ±0,00	9,51
35	<i>P. ethanolidurans</i>	9,63 ±0,01	<1,00 ±0,00	9,63

#### 4.8.3 Laktik asit bakterilerinin pepsin ve pankreatin varlığında canlılık düzeyleri

Laktik asit bakteri kültürlerinin pepsin varlığında canlılıkları incelendiğinde, toplam 21 suş, farklı oranlarda canlılık gösterirken, 17 suşun 4 saatlik inkübasyon sonucunda canlılık düzeyleri log 6 kob / mL' nin üzerinde gerçekleşmiştir. Pepsin varlığında 4 suş ise (No: 247, 35, 125, 126) canlılıklarını tamamen kaybetmişlerdir. Özellikle *P. ethanolidurans* türlerinin pepsine karşı duyarlı oldukları görülmektedir. 269, 4, 148, 227 ve 218 nolu örneklerin pepsin varlığından çok az etkilendikleri ve inkübasyon sonrası canlı hücre sayısının 0. saate göre önemli bir değişim göstermediği belirlenmiştir (Şekil 4.12 ve Çizelge 4.12).

Pankreatin varlığında LAB kültürlerinden 13 tanesi canlılıklarını tamamen kaybederken, 12 tanesi farklı oranlarda canlılıklarını korumakla birlikte, önemli ölçüde düşüş meydana gelmiştir. Bu durum LAB kültürlerinin pankreatine karşı fazla duyarlı olduğunu göstermektedir (Şekil 4.12 ve Çizelge 4. 12).



Şekil 4.12 LAB türlerinin pepsin ve pankreatin varlığında canlılık düzeyleri (log kob/mL)

Çizelge 4.12 LAB türlerinin pepsin ve pankreatin varlığında canlılık düzeyleri (log kob/mL)

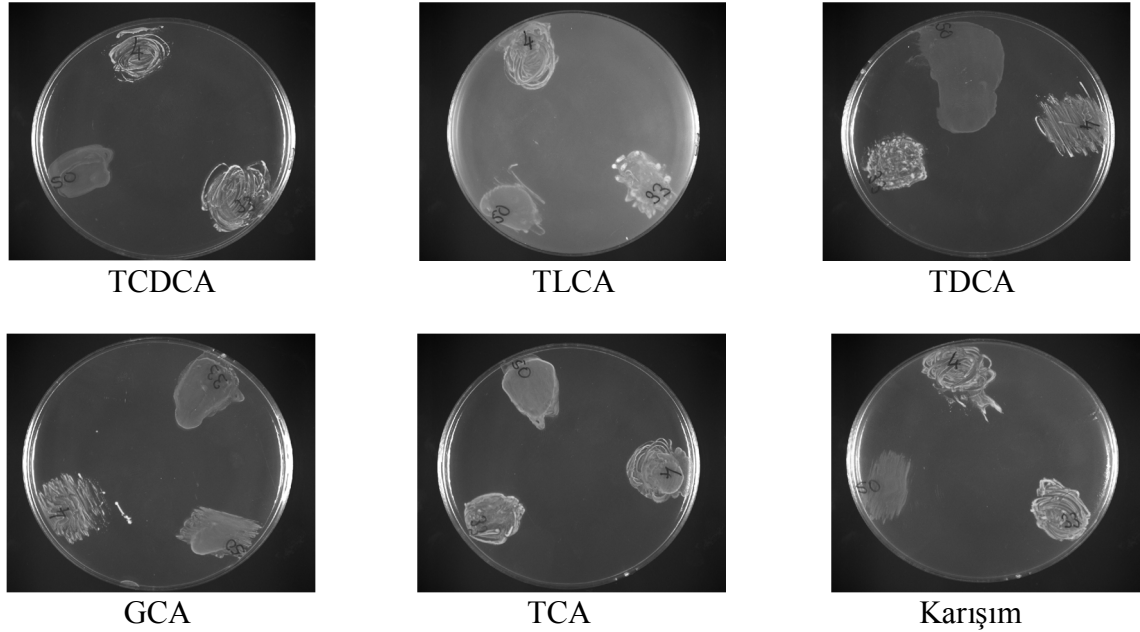
No	Tür	0. saat	Pepsin (4. saat)	fark pepsin	Pankreatin (6. saat)	fark pankreatin
269	<i>Lb. plantarum</i>	8,32	8,30	0,02	<1,00	8,32
148	<i>Lb. plantarum</i>	8,10	8,08	0,02	<1,00	8,10
4	<i>Lb. plantarum</i>	8,20	8,18	0,02	<1,00	8,20
227	<i>Lb. brevis</i>	8,34	8,28	0,06	3,48	4,87
218	<i>Lb. plantarum</i>	8,30	8,23	0,07	<1,00	8,30
376	<i>Lb. plantarum</i>	8,25	6,78	1,47	<1,00	8,25
256	<i>Lb. plantarum</i>	8,30	6,78	1,52	4,11	4,18
330	<i>Lb. brevis</i>	8,20	6,54	1,66	5,18	3,03
169	<i>Lb. plantarum</i>	8,26	6,54	1,72	<1,00	8,26
92	<i>Lb. plantarum</i>	8,34	6,60	1,74	<1,00	8,34
183	<i>Lb. plantarum</i>	8,32	6,48	1,85	<1,00	8,32
329	<i>Lb. brevis</i>	8,27	6,38	1,89	<1,00	8,27
216	<i>Lb. plantarum</i>	8,26	6,30	1,96	3,30	4,96
67	<i>Lb. brevis</i>	8,31	6,30	2,00	5,08	3,23
273	<i>Lb. plantarum</i>	8,22	6,00	2,22	3,30	4,92
140	<i>Lb. plantarum</i>	8,31	6,08	2,23	3,30	5,01
383	<i>Lb. plantarum</i>	8,24	6,00	2,24	3,48	4,76
124	<i>Lb. plantarum</i>	8,29	5,51	2,78	3,48	4,81
270	<i>Lb. plantarum</i>	8,30	5,48	2,82	5,15	3,15
115	<i>Lb. plantarum</i>	8,30	5,43	2,87	5,16	3,14
18	<i>Lb. plantarum</i>	8,24	4,36	3,88	<1,00	8,24
125	<i>P. ethanolidurans</i>	8,22	<1,00	8,22	<1,00	8,22
35	<i>P. ethanolidurans</i>	8,26	<1,00	8,26	<1,00	8,26
247	<i>Lb. brevis</i>	8,29	<1,00	8,29	5,07	3,21
126	<i>P. ethanolidurans</i>	8,34	<1,00	8,34	<1,00	8,34

#### 4.8.4 Laktik asit bakterilerinin safra tuzu dekonjüğe etme özellikleri

Safra tuzları safra olarak glisin veya taurin ile konjüge olmuş N-açıl bileşikler formunda duodenuma salgılanır. Bu şekilde lipidlerin emülsifikasyonu artar ve lipid bileşenlerinin absorpsiyonu sağlanır. Kolesterol metabolizmasının önemli bir fonksiyonu olarak vücuttan kolesterolün uzaklaştırılmasında safra salınımı önemli yollardan biridir. Salgılanan konjüğe safra tuzlarının önemli bir kısmı (% 97) ince bağırsakta tekrar absorbe edilir ve karaciğere tekrar döner. Konjüğe safra tuzları hidrolize (dekonjugasyon) olduğunda, çözünürlüğü ve emülsiyon kapasitesi azalmaktadır. Serbest safra tuzları, konjüğe safra tuzlarından daha az çözünür ve bağırsakta daha az absorbe olur. Dekonjüğe safra tuzları pH 5,5'in altında kolesterol bağlayıcı olarak

bilinmekte ve bakteri hücrelerine ve diyet liflere bağlanarak fekal atımı arttırmaktadır. Sonuç olarak, safra tuzlarının dekonjugasyonu kolesterolün çözünürlüğünü azaltmaktadır (Ahn vd. 2003).

Analize alınan 25 adet laktik asit bakteri kültürlerinin, 5 farklı safra tuzunu ve bunların karışımını içeren MRS Agar besiyerinde herhangi bir zon oluşturma yeteneğine sahip olmadıkları gözlemlenmiştir. Bu yüzden kültürlerin hiç birinin safra tuzlarını dekonjuge etme yeteneğine sahip olmadığı söylenebilir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 Safra tuzu-MRS agar besiyerinde bazı suşlara ait dekonjugasyon denemeleri “taurodeoxycholate hydrate (TDCA), taurocholic acid sodium salt hydrate (TCA), sodium tauroolithocholate (TLCA), sodium glycocholate hydrate (GCA), sodium taurochenodeoxycholate (TCDCA)”

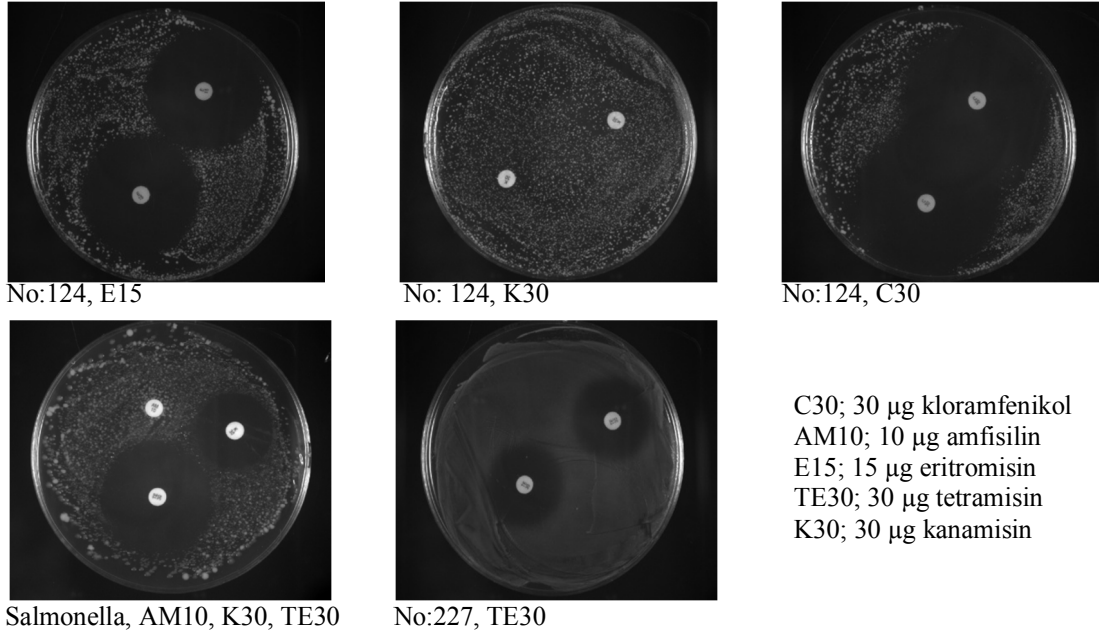
#### 4.8.5 Laktik asit bakterilerinin bazı antibiyotiklere karşı dirençleri

Antibiyotik alımı insanların sağlığında olumsuz etkilere sebep olabilmekte ve özellikle de bağırsaklarda bulunan mikrobiyal florayı olumsuz yönde bozabilmektedir. Antibiyotiklere dirençli suşların probiyotik olarak seçimi veya antibiyotik

tedavilerinden sonra kullanımı bağırsaklardaki normal floranın kurunması ve iyileştirilmesi açısından önemlidir (Yüksekdağ ve Aslım 2010).

Laktik asit bakterilerinin antibiyotiklere karşı duyarlılıkları çizelge 4.13'de gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan 25 adet LAB kültürlerinin hepsinin Kanamycin (K30) antibiyotiğine karşı dayanıklı olduğu ve direnç gösterdiği görülmektedir. Kültürlerin tümünde, petri kaplarında bu antibiyotiğe karşı herhangi bir zon gözlemlenmemiş olup, diğer antibiyotik disklerinde ise farklı çaplarda zon gözlenmiştir (Şekil 4.14).

Yapılan çalışmalarda; tetrasiklin, eritromisin, klindamisin, linkomisin ve kloramfenikol'ün protein sentezini inhibe eden antibiyotikler arasında yer aldığı ve suşların en çok bu tür antibiyotiklerden etkilendiği belirtilmektedir. Thirabunyanon vd. (2009), probiyotik laktik asit bakterileri üzerinde yaptıkları bir çalışmada suşların kanamisin (K) karşı dirençli olduklarını, ancak kloramfenikol (C), amfisilin (AM), eritromisin (E) ve tetramisin (TE) gibi antibiyotiklere ise daha duyarlı olduklarını bulmuşlardır. Bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4.14 Bazı suşlara ait antibiyotik zonları

Çizelge 4.13 LAB'nin antibiyotik (C30, E15, AM10, TE30, K30) dirençlilikleri (zon çapı, cm)

No	Tür	C30	E15	AM10	TE30	K30
67	<i>Lb. brevis</i>	3,0	2,0	2,0	1,5	-
227	<i>Lb. brevis</i>	2,0	1,5	2,0	1,5	-
247	<i>Lb. brevis</i>	2,0	2,0	2,0	2,0	-
329	<i>Lb. brevis</i>	3,0	2,0	2,0	2,0	-
330	<i>Lb. brevis</i>	2,5	2,0	2,0	2,0	-
4	<i>Lb. plantarum</i>	2,5	2,0	3,0	2,0	-
18	<i>Lb. plantarum</i>	3,0	2,0	2,5	2,0	-
92	<i>Lb. plantarum</i>	2,5	2,0	2,5	2,0	-
115	<i>Lb. plantarum</i>	3,0	2,5	4,5	2,5	-
124	<i>Lb. plantarum</i>	2,5	2,0	2,5	2,5	-
140	<i>Lb. plantarum</i>	3,5	3,0	3,5	2,5	-
148	<i>Lb. plantarum</i>	3,0	3,0	3,0	2,5	-
169	<i>Lb. plantarum</i>	2,5	2,0	3,5	2,0	-
183	<i>Lb. plantarum</i>	3,0	2,5	3,5	2,5	-
216	<i>Lb. plantarum</i>	3,5	3,5	4,5	2,0	-
218	<i>Lb. plantarum</i>	2,5	2,0	4,5	2,0	-
256	<i>Lb. plantarum</i>	2,5	2,5	2,0	2,5	-
269	<i>Lb. plantarum</i>	2,5	2,0	2,0	2,0	-
270	<i>Lb. plantarum</i>	3,0	2,0	2,0	2,0	-
273	<i>Lb. plantarum</i>	2,5	2,0	2,5	2,5	-
376	<i>Lb. plantarum</i>	2,5	2,5	3,0	2,5	-
383	<i>Lb. plantarum</i>	2,5	2,0	3,0	2,0	-
35	<i>P. ethanolidurans</i>	2,5	2,5	2,5	2,5	-
125	<i>P. ethanolidurans</i>	2,0	2,0	2,5	2,0	-
126	<i>P. ethanolidurans</i>	2,0	2,0	2,5	2,0	-
	<i>E. coli</i> ATCC25922	1,5	1,0	1,5	1,5	1,0
	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2,0	1,0	-	2,0	1,0
	<i>Listeria</i> inocua LMG2813	2,5	1,0	3,0	2,5	1,0

\*-: zon gözlenmemiştir

C30; 30 µg kloramfenikol

AM10; 10 µg amfisilin

E15; 15 µg eritromisin

TE30; 30 µg tetramisin

K30; 30 µg kanamisin

#### 4.8.6 Laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyon özellikleri

Lipidlerin ayrı ve özelleşmiş bir tipi olan kolesterol, yaşam için mutlaka gerekli olan bir maddedir. Kolesterolün insanlardaki en yaygın steroidür ve vücutta belirli sayıda, bir grup işleve sahiptir. Örneğin; kolesterol, bütün hücre zarlarının bir bileşenidir ve safra tuzları, steroid hormonlar ve D vitamininin öncül maddesidir. Kandaki kolesterol ya



yiyeceklerden alınır ya da vücut tarafından sentezlenir. Son yıllarda, kandaki yüksek kolesterol seviyelerinin düşürülmesi için perhiz uygulamalarında yeni yaklaşımlar söz konusudur. Bu uygulamalar arasında, probiyotik bakterilerin kullanımı da önemli bir yere sahiptir. Probiyotik bakteriler ile fermente edilmiş süt ürünlerinin kan lipidleri üzerine olan etkileri ile ilgili ilk kayıt, günümüzden yaklaşık olarak 30 yıl öncesine dayanmaktadır. Bu tarihten günümüze kadar bu konu üzerinde birçok in vitro ve in vivo çalışma yapılmış ve özellikle belirli *Lactobacillus* veya *Bifidobacterium* türlerini içeren probiyotik ürünlerin kandaki yüksek kolesterol seviyelerini azalttığı gösterilmiştir. Dolayısıyla, probiyotiklerin bu alanda kullanımına karşı olan ilgi gün geçtikçe artmaya devam etmektedir. Laktik asit bakterilerinin kolesterol düşürücü fonksiyonunun mekanizmasını açıklayabilmek için çeşitli araştırmalar yapılmış ve aşağıdaki iki temel olası mekanizmalar öne sürülmüştür; Laktobasiller diyetle alınan kolesterolün bağırsaklardan emilimini azaltırlar ya da safra tuzlarının dekonjugasyonunda rol oynarlar (Tok ve Aslım 2007).

Kolestrol asimilasyon özellikleri incelenen 25 adet laktik asit bakterisine ait sonuçlar çizelge 4.14'de gösterilmiştir. Bakterilerin % kolestrol asimilasyon oranları incelendiğinde, sırasıyla 383, 92, 115 ve 18 (% 48,56 - % 47,69 - % 44,26 - % 43,57 ) numaralı örneklerin en yüksek kolestrol asimilasyon yeteneğine sahip olduğu görülmektedir. Yüksek asimilasyon oranlarına sahip bu örneklerin, daha önce yaptığımız çalışmalar sonucunda belirlediğimiz ekzopolisakkarit üretme yeteneğine sahip kültürler arasında yer aldığı görülmüştür.

*L. acidophilus* ATTC 43121 suşu tarafından kolesterol asimilasyonunu kanıtlamak için yapılan başka bir çalışma ise Noh vd. (1997) tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar bu suş tarafından asimile edilen kolesterolün metabolik olarak parçalanmadığını, besiyerinden alınan kolesterolün büyük kısmının, hücrelerden tekrar geri kazanılabildiğini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.14 LAB'nin kolesterol asimilasyon düzeyleri (%)

No	Tür	Kolesterol (µg/mL)	Kolesterol asimilasyon (%)
383	<i>Lb. plantarum</i>	23,52 ± 0,80	48,56
92	<i>Lb. plantarum</i>	23,92 ± 0,24	47,69
115	<i>Lb. plantarum</i>	25,49 ± 0,27	44,26
18	<i>Lb. plantarum</i>	25,80 ± 0,89	43,57
67	<i>Lb. brevis</i>	38,12 ± 1,86	16,62
218	<i>Lb. plantarum</i>	39,29 ± 0,44	14,06
124	<i>Lb. plantarum</i>	40,23 ± 1,60	12,00
4	<i>Lb. plantarum</i>	40,36 ± 0,59	11,72
256	<i>Lb. plantarum</i>	41,20 ± 0,30	9,89
169	<i>Lb. plantarum</i>	41,24 ± 1,07	9,80
216	<i>Lb. plantarum</i>	41,26 ± 0,50	9,76
125	<i>P. ethanolidurans</i>	41,49 ± 0,53	9,25
247	<i>Lb. brevis</i>	41,87 ± 0,53	8,43
270	<i>Lb. plantarum</i>	42,01 ± 0,09	8,11
35	<i>P. ethanolidurans</i>	42,18 ± 0,44	7,74
273	<i>Lb. plantarum</i>	42,37 ± 0,41	7,33
126	<i>P. ethanolidurans</i>	43,18 ± 0,44	5,55
269	<i>Lb. plantarum</i>	43,77 ± 0,68	4,27
140	<i>Lb. plantarum</i>	43,96 ± 0,53	3,85
183	<i>Lb. plantarum</i>	44,67 ± 0,71	2,30
148	<i>Lb. plantarum</i>	44,86 ± 0,56	1,89
227	<i>Lb. brevis</i>	44,90 ± 0,09	1,79
330	<i>Lb. brevis</i>	44,98 ± 0,03	1,61
376	<i>Lb. plantarum</i>	45,00 ± 0,24	1,57
329	<i>Lb. brevis</i>	45,34 ± 0,06	0,83

\*Toplam kolesterol miktarı kontrol örneğinde 45,72 ± 0,65 µg/mL olarak bulunmuştur

Usman (1999) tarafından, 28 *Lactobacillus gasseri* suşu kullanılarak yapılan bir çalışmada, hücrelerin kolesterolü bağlama yeteneği üzerine yoğunlaşmıştır. Araştırmacılar 28 suşun tamamının kolesterolü bağlama yeteneğine sahip olduğunu, ancak kolesterol bağlama kabiliyetinin suşlara bağlı olarak değişiklik gösterdiğini saptamışlardır. Bu farklılığın, bakteri hücre duvarındaki peptidoglikanların kimyasal ve yapısal farklılığı ile ilgili olabileceği öne sürülmüştür. Nakajima vd. (1992) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, ekzopolisakkarit (EPS) üreten ve üretmeyen iki *Lb. lactis* subsp. *cremoris* suşunun kolesterolü bağlama özellikleri incelenmiş ve sonuçta ekzopolisakkarit üreten suşun, üretmeyen diğer suşa kıyasla daha fazla kolesterolü bağlayabildiği gösterilmiştir. Araştırmacılar, hücreler tarafından üretilen EPS miktarının yüksek olması durumunda, bu polisakkaritlerin diyetle alınan lifli gıdalara benzer bir etki gösterebileceğini ve bu suretle kolesterolün, bakteriler tarafından üretilen EPS'ye

bağlanarak atılan kolesterol miktarının artabileceğini ve böylece bağırsaklardan emilerek kana karışan kolesterol miktarında azalma meydana gelebileceğini öne sürmüşlerdir.

#### 4.8.7 Laktik asit bakterilerinin hücre yüzey hidrofobisite özellikleri

Probiyotik bakterilerin bağırsak yüzeyine tutunma özellikleri onların önemli bir özelliği olmaktadır. Bu özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan bir yöntemde onların yüzey hidrofobik karakterinin ortaya konması şeklinde olabilmektedir. Hidrofobisite belirlenen 25 adet laktik asit bakterilerine ait % hidrofobisite sonuçları çizelge 4.15’de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde 67 (% 97,96), 183 (% 82,41), 330 (% 67,29) ve 329 (% 62,36) numaralı örneklerin yüksek hidrofobisite gösterdikleri görülmektedir.

Çizelge 4.15 LAB’ nin yüzey hidrofobisite özellikleri (%)

No	Tür	Hidrofobisite (%)
67	<i>Lb. brevis</i>	97,96 ± 0,14
183	<i>Lb. plantarum</i>	82,41 ± 0,84
330	<i>Lb. brevis</i>	67,29 ± 0,22
329	<i>Lb. brevis</i>	62,36 ± 3,66
169	<i>Lb. plantarum</i>	52,02 ± 0,81
269	<i>Lb. plantarum</i>	43,72 ± 0,69
92	<i>Lb. plantarum</i>	39,62 ± 1,70
124	<i>Lb. plantarum</i>	32,70 ± 0,79
218	<i>Lb. plantarum</i>	17,72 ± 0,14
383	<i>Lb. plantarum</i>	9,98 ± 2,26
227	<i>Lb. brevis</i>	8,53 ± 1,76
256	<i>Lb. plantarum</i>	8,07 ± 0,39
376	<i>Lb. plantarum</i>	6,25 ± 0,59
35	<i>P. ethanolidurans</i>	3,95 ± 1,81
126	<i>P. ethanolidurans</i>	3,56 ± 1,88
140	<i>Lb. plantarum</i>	3,37 ± 2,72
148	<i>Lb. plantarum</i>	3,18 ± 3,21
18	<i>Lb. plantarum</i>	3,14 ± 1,64
125	<i>P. ethanolidurans</i>	2,48 ± 1,32
4	<i>Lb. plantarum</i>	2,39 ± 2,22
270	<i>Lb. plantarum</i>	2,01 ± 1,09
115	<i>Lb. plantarum</i>	1,35 ± 2,10
216	<i>Lb. plantarum</i>	0,91 ± 0,38
273	<i>Lb. plantarum</i>	0,66 ± 0,31
247	<i>Lb. brevis</i>	0,17 ± 0,24

Probiyotik özelliklerden pH 2,5’de canlı kalma özellikleri incelenen 39 adet laktik asit bakterisinden, canlılıklarını koruyabilen 25 adet bakterinin diğer probiyotik özellikleri belirlenmiştir. Belirlenen tüm probiyotik özelliklerden hepsine sahip olan bakteri bulunmama ile birlikte, kültürlerin probiyotik özelliklerden bazılarında sahip olduğu görülmektedir. Belirlenen bu özellikler, kültürler ile yapılacak olan başka çalışmalarda kaynak oluşturabilecek ve yön verecek veriler olması açısından önemlidir.

#### **4.9 Seçilmiş Starter Kültürler ile Turşu Üretimi ve Fermantasyon Denemesine Ait Bulgular**

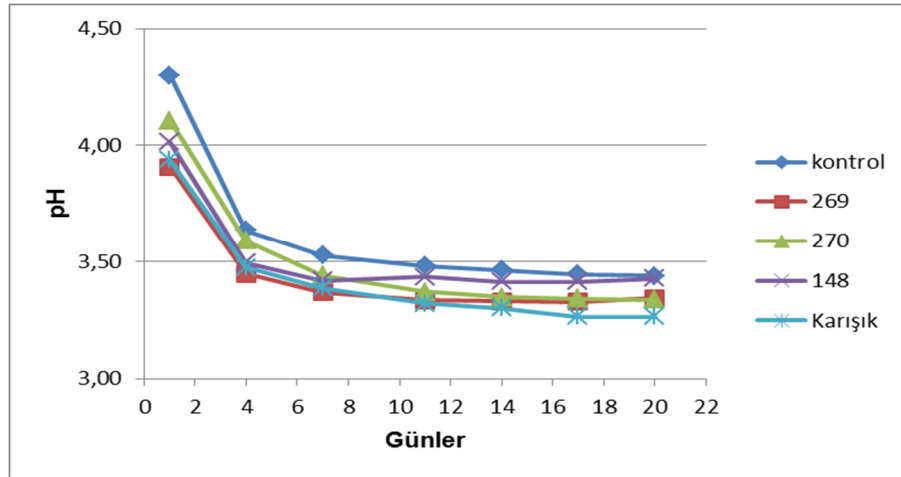
Bilindiği gibi hıyarların salamuraya konması ile birlikte kimyasal ve fiziksel değişimler başlamaktadır. Sebze bulunan, suda çözünebilir maddeler salamuraya, salamurada bulunan tuz, glikoz, CaCl<sub>2</sub> ve asetik asit ise sebzenin bünyesine geçerek bir süre sonra denge durumuna ulaşmaktadır. Fermantasyon sırasında meydana gelen kimyasal değişimler gelişen mikrobiyal aktivite ile ilişkilidir. Toplam titrasyon asitliği ve pH değeri fermantasyonun seyrinin izlenmesi açısından önemli rol oynamaktadırlar.

Starter kültür kullanarak fermantasyon denemelerinin hazırlanmasında, turşu üretimi için teknolojik özellikler açısından önemli bulunan laktik asit bakterileri (No: 269, 270, 148, 125) starter kültür olarak seçilerek turşu denemeleri kurulmuştur. Bu amaçla, Çubuk Bölgesinden temin edilen hıyarlar kullanılmıştır. Salamura hazırlamada ise Hıyar turşusu standardı TS11112’ye (Anonim 1993) uygun tuz, su, CaCl<sub>2</sub> (Merck), glasiyel asetik asit (Merck) ve glikoz (Merck) kullanılmıştır. Fermantasyon denemeleri, kapağı açılmadan örnek almaya olanak sağlayan, özel örnek alma düzeneğine sahip 3 L hacimli cam kavanozlarda gerçekleştirilmiştir. Hasadı izleyen 8-10 saat içerisinde laboratuvara getirilen turşuluk hıyarlar, öncelikle musluk suyu ile yıkanarak toz, çamur gibi kirliliklerinden arındırılmış ve klor çözeltisi içerisinde 15 dakika bekletildikten sonra salamura hazırlamada kullanılan kaynak suyu ile yıkanarak klor uzaklaştırılmıştır. Böylece, hıyar üzerindeki doğal mikrobiyal yük azaltılmaya çalışılmıştır. Bu şekilde hazırlanan 1.5 kg’lık hıyar, 1.5 kg salamura (% 8 tuz, % 0,4, % 0,4 asetik asit, % 2 glikoz) ile birlikte 3L’lik fermantasyon kaplarına doldurulmuştur.

Fermantasyon denemeleri *L. plantarum* (No 269), *L. plantarum* (No 270), *L. plantarum* (No 148) ve *L. plantarum* (no 269) ile *Pediococcus ethanolidurans* (No 125)'in karışık kültürü ve starter kültür ilave edilmemiş kontrol olmak üzere 5 farklı deneme planı hazırlanarak, 28 °C'de sıcaklık kontrollü karanlık bir odada 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Üç günde bir aseptik koşullarda alınan salamura örneklerinde pH, titrasyon asitliği, tuz, indirgen şeker ve mikrobiyolojik analizler (toplam mezofilik aerobik bakteri, toplam LAB, toplam maya-küf, toplam *Enterobacteriaceae* sayımı) yapılarak 20 günlük fermantasyon süresince ortaya çıkan kimyasal ve mikrobiyolojik değişiklikler izlenmiştir. Fermantasyon bitiminde kimyasal ve mikrobiyolojik analizlere ek olarak, hıyar turşularında duyu analizi, starter kültür stabilite testleri yapılmıştır.

#### 4.9.1 Turşu örneklerinde fermantasyon sürecinde meydana gelen kimyasal değişimler

Fermantasyonun ilk günlerinde salamuranın pH değerlerinde düşüş, starter kültür kullanılmayan kontrol örneğinde daha yavaş gerçekleşirken, daha sonra mikrobiyal aktivitedeki artışa bağlı olarak hız kazanmıştır (Şekil 4.15).



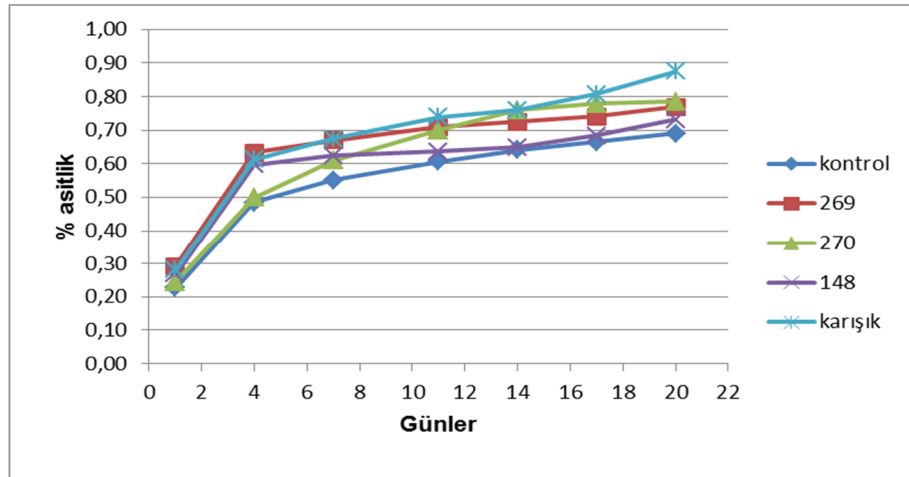
Şekil 4.15 Fermantasyon süresince salamura örneklerinde pH değişimi

Starter kültür kullanılan tüm örnekler fermantasyonun 7. gününden itibaren sabit pH değerlerine ulaşmış, daha sonraki günlerde pH'da çok önemli bir değişim

gözlenmemiştir. Kontrol örneğindeki pH düşüşü diğer örneklerle kıyasla daha yavaş seyretmiştir. 20 günlük fermantasyon süresince en düşük pH değeri (pH 3,26 ±0,06) karışık kültürün kullanıldığı (269-125 nolu bakteriler) örnekte ölçülmüştür. 269 ve 270 nolu kültürlerin fermantasyon sonunda ulaştıkları pH değeri ise (3,34) aynı gerçekleşmiştir. Kontrol ve 148 nolu kültür ise benzer şekilde en yüksek pH değerlerinde fermantasyonu tamamlamışlardır (Çizelge 4.16).

Ogabi ve Pamir (1973), turşu fermantasyonu sonunda pH'yı 3,9, Fleming vd.(1989) 30 gün sonunda 3,68, Guillou vd. (1992) 2 hafta sonra pH'yı 3,1 - 4,9 olarak bulmuşlardır.

Fermantasyon sırasında salamura örneklerinin titrasyon asitlikleri çizelge 4.16'da verilmiş ve günlük değişimler şekil 4.16'de belirtilmiştir.



Şekil 4.16 Fermantasyon süresince salamura örneklerinin titrasyon asitliği (% laktik asit) değerleri

Çizelge 4.16 Fermantasyon süresince salamura örneklerinin % asitlik, pH, % tuz ve indirgen şeker miktarları (g/L)

	Günler	Turu örnekleri				
		kontrol	No 269	No 270	No 148	karışık
% Asit	1	0,23 ±0,00 <sup>Ef</sup>	0,29 ±0,00 <sup>Ae</sup>	0,24 ±0,01 <sup>De</sup>	0,27 ±0,01 <sup>Ce</sup>	0,28 ±0,01 <sup>Bf</sup>
	4	0,48 ±0,00 <sup>Ce</sup>	0,63 ±0,02 <sup>Ad</sup>	0,50 ±0,01 <sup>Cd</sup>	0,60 ±0,02 <sup>Bd</sup>	0,61 ±0,01 <sup>ABe</sup>
	7	0,55 ±0,01 <sup>Cd</sup>	0,67 ±0,01 <sup>Accd</sup>	0,61 ±0,03 <sup>Bc</sup>	0,62 ±0,01 <sup>Bcd</sup>	0,67 ±0,00 <sup>Ad</sup>
	11	0,61 ±0,03 <sup>Bc</sup>	0,71 ±0,04 <sup>Abc</sup>	0,70 ±0,03 <sup>Ab</sup>	0,64 ±0,01 <sup>Bc</sup>	0,74 ±0,02 <sup>Accd</sup>
	14	0,64 ±0,04 <sup>Bbc</sup>	0,73 ±0,04 <sup>Aab</sup>	0,76 ±0,02 <sup>Aa</sup>	0,65 ±0,01 <sup>Bbc</sup>	0,76 ±0,02 <sup>Abc</sup>
	17	0,66 ±0,03 <sup>Cab</sup>	0,74 ±0,04 <sup>Bab</sup>	0,78 ±0,00 <sup>ABa</sup>	0,68 ±0,04 <sup>Cb</sup>	0,81 ±0,04 <sup>Ab</sup>
	20	0,69 ±0,01 <sup>Ca</sup>	0,77 ±0,05 <sup>Ba</sup>	0,78 ±0,00 <sup>Ba</sup>	0,73 ±0,04 <sup>BCa</sup>	0,87 ±0,08 <sup>Aa</sup>

pH	1	4,30 ±0,00 <sup>Aa</sup>	3,91 ±0,02 <sup>Da</sup>	4,11 ±0,04 <sup>Ba</sup>	4,01 ±0,02 <sup>Ca</sup>	3,94 ±0,02 <sup>Da</sup>
	4	3,63 ±0,01 <sup>Ab</sup>	3,45 ±0,03 <sup>Bb</sup>	3,59 ±0,02 <sup>Ab</sup>	3,49 ±0,04 <sup>Bb</sup>	3,47 ±0,01 <sup>Bb</sup>
	7	3,53 ±0,03 <sup>Ac</sup>	3,37 ±0,04 <sup>Bc</sup>	3,44 ±0,04 <sup>Bc</sup>	3,42 ±0,03 <sup>Bc</sup>	3,39 ±0,01 <sup>Bbc</sup>
	11	3,48 ±0,03 <sup>Accd</sup>	3,33 ±0,03 <sup>Cc</sup>	3,37 ±0,04 <sup>BCcd</sup>	3,43 ±0,02 <sup>ABc</sup>	3,32 ±0,01 <sup>Cc</sup>
	14	3,46 ±0,04 <sup>Accd</sup>	3,33 ±0,03 <sup>Cc</sup>	3,35 ±0,03 <sup>BCd</sup>	3,41 ±0,02 <sup>ABc</sup>	3,30 ±0,01 <sup>Cc</sup>
	17	3,44 ±0,03 <sup>Ad</sup>	3,33 ±0,02 <sup>Bc</sup>	3,34 ±0,03 <sup>Bd</sup>	3,41 ±0,02 <sup>ABc</sup>	3,26 ±0,06 <sup>Bc</sup>
	20	3,44 ±0,03 <sup>Ad</sup>	3,34 ±0,02 <sup>BCc</sup>	3,34 ±0,03 <sup>Cd</sup>	3,43 ±0,03 <sup>ABc</sup>	3,26 ±0,06 <sup>Cc</sup>

İndirgen şeker (g/L)	1	25,89 ±0,27 <sup>Aa</sup>	24,05 ±0,24 <sup>Ca</sup>	25,73 ±0,73 <sup>Aa</sup>	24,26 ±0,43 <sup>BCa</sup>	25,31 ±0,39 <sup>ABa</sup>
	4	19,41 ±1,04 <sup>Bb</sup>	21,72 ±0,63 <sup>ABab</sup>	23,48 ±1,70 <sup>Aa</sup>	21,12 ±0,13 <sup>ABb</sup>	21,12 ±0,08 <sup>ABb</sup>
	7	14,14 ±1,48 <sup>Ac</sup>	18,39 ±2,03 <sup>Abc</sup>	18,00 ±2,10 <sup>Ab</sup>	18,59 ±1,97 <sup>Ab</sup>	15,09 ±0,82 <sup>Ac</sup>
	11	4,96 ±0,25 <sup>BCd</sup>	16,54 ±2,25 <sup>Ac</sup>	3,10 ±1,85 <sup>Cc</sup>	8,06 ±1,05 <sup>Bc</sup>	3,63 ±0,45 <sup>Cd</sup>
	14	1,85 ±0,22 <sup>Bc</sup>	15,17 ±3,40 <sup>Accd</sup>	1,87 ±1,08 <sup>Bc</sup>	2,04 ±0,73 <sup>Bd</sup>	1,39 ±0,35 <sup>Bc</sup>
	17	0,99 ±0,38 <sup>Be</sup>	11,39 ±1,46 <sup>Ade</sup>	0,94 ±0,25 <sup>Bc</sup>	1,11 ±0,34 <sup>Bd</sup>	1,07 ±0,22 <sup>Bc</sup>
	20	0,79 ±0,14 <sup>Bc</sup>	8,89 ±0,11 <sup>Ae</sup>	0,71 ±0,16 <sup>Bc</sup>	0,89 ±0,17 <sup>Bd</sup>	0,92 ±0,15 <sup>Bc</sup>

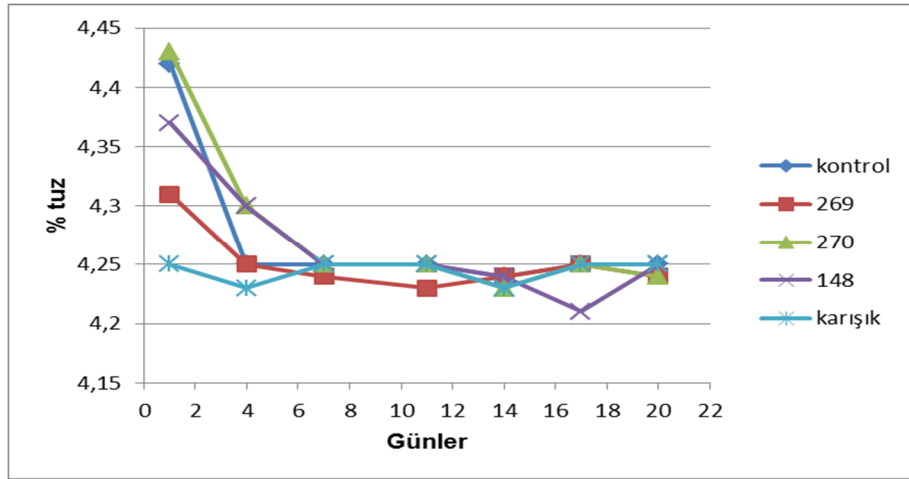
% Tuz	1	4,42 ±0,07 <sup>Aa</sup>	4,31 ±0,18 <sup>Aa</sup>	4,43 ±0,15 <sup>Aa</sup>	4,37 ±0,12 <sup>Aa</sup>	4,25 ±0,08 <sup>Aa</sup>
	4	4,25 ±0,04 <sup>Ab</sup>	4,25 ±0,09 <sup>Aa</sup>	4,30 ±0,10 <sup>Aa</sup>	4,30 ±0,06 <sup>Aa</sup>	4,23 ±0,04 <sup>Aa</sup>
	7	4,25 ±0,02 <sup>Abc</sup>	4,24 ±0,05 <sup>Aa</sup>	4,25 ±0,04 <sup>Aa</sup>	4,25 ±0,04 <sup>Aa</sup>	4,25 ±0,06 <sup>Aa</sup>
	11	4,25 ±0,00 <sup>Ac</sup>	4,23 ±0,07 <sup>Aa</sup>	4,25 ±0,00 <sup>Aa</sup>	4,25 ±0,00 <sup>Aa</sup>	4,25 ±0,04 <sup>Aa</sup>
	14	4,24 ±0,04 <sup>Ac</sup>	4,24 ±0,03 <sup>Aa</sup>	4,23 ±0,06 <sup>Aa</sup>	4,24 ±0,03 <sup>Aa</sup>	4,23 ±0,08 <sup>Aa</sup>
	17	4,25 ±0,01 <sup>Ac</sup>	4,25 ±0,00 <sup>Aa</sup>	4,25 ±0,01 <sup>Aa</sup>	4,21 ±0,07 <sup>Aa</sup>	4,25 ±0,00 <sup>Aa</sup>
	20	4,25 ±0,02 <sup>Ac</sup>	4,24 ±0,02 <sup>Aa</sup>	4,24 ±0,00 <sup>Aa</sup>	4,25 ±0,00 <sup>Aa</sup>	4,25 ±0,00 <sup>Aa</sup>

\*ABC...; istatistiksel olarak aynı satırdaki veriler arasındaki benzerlik

\*\*abc...; istatistiksel olarak aynı sütündeki veriler arasındaki benzerlik

Fermantasyonun 1. gününde örneklerin titrasyon asitlikleri, % laktik asit cinsinden % 0,23-0,29 arasında değişmiştir. Starter kültür kullanılmayan kontrol örneğinde asitlik gelişiminin daha yavaş olduğu, 7. günden itibaren diğer örneklerle yakın asitlik değerlerine ulaştığı görülmektedir. Starter kültür kullanılan örnekler fermantasyonun ilk günlerinde (1-7. gün) hızlı asit oluşturmuşlardır. Fermantasyon sırasında en yüksek titrasyon asitliği (% 0,87  $\pm$ 0,08) değerine karışık kültür kullanılan (No 269-125) örneğin ulaştığı belirlenmiştir.

Denge noktasında % 4 NaCl içecek şekilde hazırlanan salamuralarda tuz konsantrasyonu, fermantasyonun ilk günlerinde alınan örneklerde % 4,43  $\pm$ 0,15 - 4,25  $\pm$ 0,08 aralığında bulunmuştur. Kontrol ve 269 numaralı örnekler 1. günden sonra, 270 ve 148 numaralı örnekler ise 4. günden itibaren dengeye ulaşmışlardır. Sonuç olarak, tüm örneklerin fermantasyon süresince ulaştıkları denge noktası birbirine benzer (% 4,25) olarak bulunmuş ve fermantasyon bu tuz konsantrasyonunda tamamlanmıştır (Çizelge 4.16 ve Şekil 4.17).

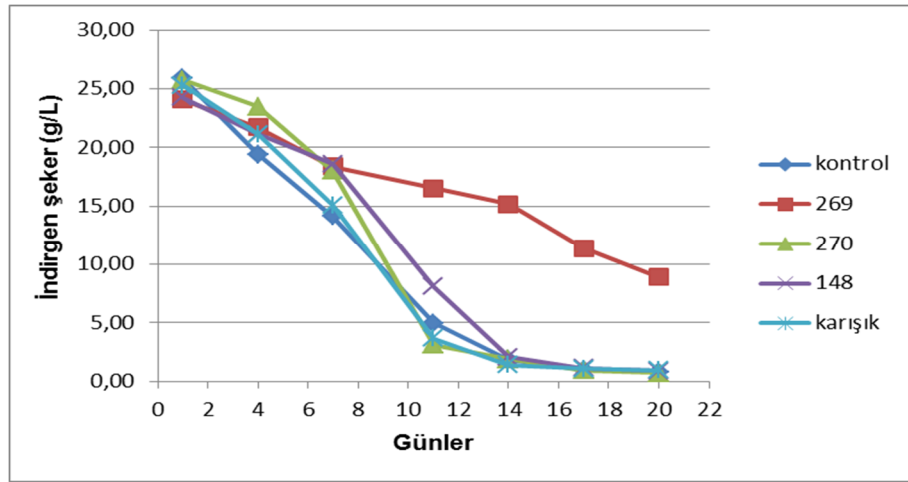


Şekil 4.17 Fermantasyon süresince salamura örneklerinin tuz konsantrasyonları (%)

Salamuralarda bulunan indirgen şeker miktarı da, mikrobiyal popülasyonun hızla çoğalmasına paralel şekilde 1. günden itibaren hızla azalmıştır. 1. gün salamura örneklerinde belirlenen indirgen şeker miktarlarındaki farklılığın ise aynı olgunluk



derecesindeki hammaddenin kavanozlara eşit olarak dağılmamasından ve her kavanoz içerisindeki ilk 1 gün içerisinde farklı yoğunlukta bir mikrobiyal gelişme ortaya çıkmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Fermantasyonun ilk gününde indirgen şeker miktarı  $24,05 \pm 0,24 - 25,89 \pm 0,27$  g/L aralığında saptanmıştır. Fermantasyonun 11. gününe kadar kontrol, karışık, 270, 148 numaralı örneklerde hızlı bir şekilde azalan şeker miktarı, bu günden sonra çok yavaş tüketilmiştir. Fermantasyon sonunda kontrol, 270, 148 ve karışık kültürlü örneklerde düşük miktarda ( $0,71 \pm 0,16 - 0,92 \pm 0,15$  g/L) indirgen şeker kaldığı görülmektedir. Fermantasyon sonunda salamuralarda çok düşük seviyede indirgen şeker belirlenmesi, bu örneklerde fermantasyonun 17 günde tamamlandığını göstermektedir (Şekil 4.18)



Şekil 4.18 Fermantasyon süresince salamura örneklerinin indirgen şeker miktarı (g/L)

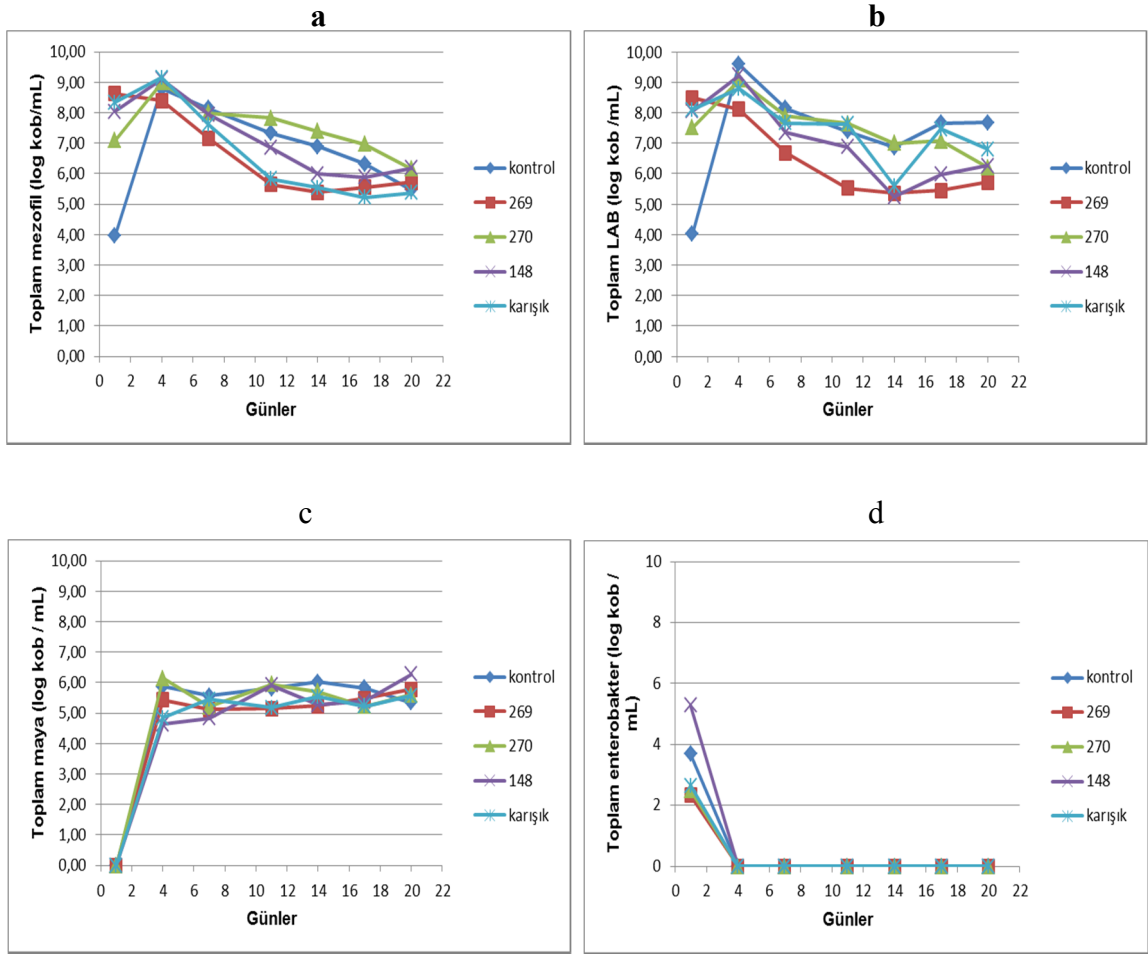
Fermantasyon sonunda en yüksek indirgen şeker içeriği 269 nolu örnekte ( $8,36 \pm 0,11$  g/L) belirlenmiştir (Çizelge 4.16). Fleming (1982), Daeschel ve Fleming (1987) fermantasyon sırasında fermente olabilen tüm şekerlerin aside dönüştürülmesini önermekte, eğer bu şekerler tüketilmeden salamurada kalırsa pastörize olmamış ürünlerde özellikle mayalar tarafından kontrolsüz ikinci bir mikrobiyal gelişmeye neden olacakları belirtilmektedir.

#### 4.9.2 Turşu örneklerinde fermantasyon sürecinde meydana gelen mikrobiyolojik değişimler

Doğal laktik asit fermantasyonu çok karmaşık bir mikrobiyal aktiviteye sahiptir. Çünkü hıyar üzerinde az sayıda bulunan laktik asit bakterileri zamanla baskın mikroflora haline gelmekte ve salamurada bulunan en önemli mikrobiyal popülasyonu oluşturmaktadır. Etchells vd. (1973) yaptıkları çalışmada, hıyar üzerinde bulunan, asit üreten bakterilerin sayısının  $5,1 \times 10^4$  adet/mL olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışma sırasında da beklenildiği gibi, hıyarların salamuraya konmasıyla birlikte örneklere ilave edilen starter kültürler ilk günlerde ortamda bulunan fermente olabilir şekerleri kullanarak hızla çoğalmışlardır. Diğer taraftan, başlangıçta % 0,4 oranında katılan asetik asitin de bakterilerin gelişmesi için uygun pH değerine ulaşmasında büyük rolü olmuştur.

Starter kültür kullanılan 269, 270, 148, karışık örneklerde, fermantasyonun ilk gününde yüksek oranda laktik asit bakterisi ve toplam mezofil bakteri tespit edilmiş, en yüksek laktik asit bakterisi, sırasıyla 269, karışık, 148, 270 nolu örneklerde ( $8,48 \pm 0,33 - 8,09 \pm 0,15 - 8,06 \pm 0,19 - 7,51 \pm 0,07$  log kob/mL) olarak bulunmuştur. Kontrol örneğinde ise toplam LAB sayısı  $4,01 \pm 0,76$  log kob/mL olarak bulunmuştur. Benzer şekilde toplam mezofil bakteri sayısı da, sırasıyla 269, karışık, 148, 270 nolu örneklerde yüksek değerlerde bulunmuştur. Toplam mezofil bakteri sayısı ve toplam LAB sayısı tüm örneklerde 4. günde en yüksek değerine ulaşmış, daha sonraki günlerde giderek azalmıştır (Şekil 4.19). Fermantasyonun 4. gününden itibaren salamuralarda maya gelişmesi tespit edilmeye başlanmış ve sonra fermantasyon süresince çok önemli değişimler olmadan ortamda kalmışlardır.



Şekil 4.19 Fermantasyon süresince salamuradaki mikrobiyolojik sayım sonuçları (log kob/mL) a. Toplam mezofil b. Toplam LAB c. Toplam maya-küf d. Toplam enterobakteri

Fermantasyonun 1. günü tüm örneklerde rastlanan enterobakterler ise 4. günden itibaren sayılamamıştır. Bu durum asitlik gelişimine paralel olarak enterobakterlerin daha fazla gelişemedikleri şeklinde yorumlanmıştır (Çizelge 4.17). Bu görüşü doğrulayacak şekilde Fleming vd. (1988), fermantasyonun 3. gününden itibaren enterobakter sayısının çok azaldığını; Mc Donalds vd. (1991), fermantasyon başında tespit edilen enterobakterlerin fermantasyonun 5. gününde tespit edilemediğini bildirmektedirler.

Çizelge 4.17 Fermantasyon süresince salamuradaki mikrobiyolojik sayım sonuçları (log kob/mL)

	Gün	Turşu örnekleri				
		kontrol	269	270	148	karışık
Toplam mezofil (log kob / mL)	1	3,95 ± 0,68 <sup>C</sup>	8,63 ± 0,17 <sup>A</sup>	7,09 ± 0,11 <sup>B</sup>	8,03 ± 0,10 <sup>A</sup>	8,34 ± 0,05 <sup>A</sup>
	4	8,79 ± 0,26 <sup>A</sup>	8,40 ± 0,11 <sup>A</sup>	8,99 ± 0,55 <sup>A</sup>	9,11 ± 0,24 <sup>A</sup>	9,15 ± 0,76 <sup>A</sup>
	7	8,15 ± 0,08 <sup>A</sup>	7,17 ± 0,12 <sup>B</sup>	8,00 ± 0,09 <sup>A</sup>	7,96 ± 0,51 <sup>AB</sup>	7,62 ± 0,09 <sup>AB</sup>
	11	7,33 ± 0,15 <sup>B</sup>	5,65 ± 0,11 <sup>C</sup>	7,83 ± 0,19 <sup>A</sup>	6,85 ± 0,14 <sup>B</sup>	5,82 ± 0,26 <sup>C</sup>
	14	6,90 ± 0,20 <sup>A</sup>	5,38 ± 0,45 <sup>C</sup>	7,39 ± 0,08 <sup>A</sup>	5,99 ± 0,02 <sup>B</sup>	5,53 ± 0,28 <sup>BC</sup>
	17	6,33 ± 0,11 <sup>B</sup>	5,56 ± 0,10 <sup>CD</sup>	6,97 ± 0,15 <sup>A</sup>	5,88 ± 0,26 <sup>C</sup>	5,22 ± 0,14 <sup>D</sup>
	20	5,47 ± 0,62 <sup>A</sup>	5,72 ± 0,28 <sup>A</sup>	6,16 ± 0,37 <sup>A</sup>	6,19 ± 0,75 <sup>A</sup>	5,37 ± 0,20 <sup>A</sup>
LAB (log kob / mL)	1	4,01 ± 0,76 <sup>B</sup>	8,48 ± 0,33 <sup>A</sup>	7,51 ± 0,07 <sup>A</sup>	8,06 ± 0,19 <sup>A</sup>	8,09 ± 0,15 <sup>A</sup>
	4	9,58 ± 0,85 <sup>A</sup>	8,12 ± 0,13 <sup>A</sup>	9,08 ± 0,52 <sup>A</sup>	9,22 ± 0,32 <sup>A</sup>	8,80 ± 0,53 <sup>A</sup>
	7	8,15 ± 0,09 <sup>A</sup>	6,68 ± 0,20 <sup>D</sup>	7,88 ± 0,15 <sup>AB</sup>	7,35 ± 0,13 <sup>C</sup>	7,66 ± 0,08 <sup>BC</sup>
	11	7,39 ± 0,15 <sup>A</sup>	5,52 ± 0,20 <sup>C</sup>	7,64 ± 0,07 <sup>A</sup>	6,87 ± 0,12 <sup>B</sup>	7,63 ± 0,10 <sup>A</sup>
	14	6,86 ± 0,92 <sup>A</sup>	5,36 ± 0,21 <sup>A</sup>	7,00 ± 0,99 <sup>A</sup>	5,23 ± 0,18 <sup>A</sup>	5,60 ± 0,28 <sup>A</sup>
	17	7,67 ± 0,77 <sup>A</sup>	5,44 ± 0,21 <sup>B</sup>	7,08 ± 0,12 <sup>A</sup>	5,98 ± 0,15 <sup>B</sup>	7,47 ± 0,18 <sup>A</sup>
	20	7,67 ± 1,26 <sup>A</sup>	5,72 ± 0,37 <sup>A</sup>	6,20 ± 0,38 <sup>A</sup>	6,26 ± 0,78 <sup>A</sup>	6,80 ± 0,26 <sup>A</sup>
Maya (log kob / mL)	1	<1,00 ± 0,00 <sup>A</sup>	<1,00 ± 0,00 <sup>A</sup>	<1,00 ± 0,00 <sup>A</sup>	<1,00 ± 0,00 <sup>A</sup>	<1,00 ± 0,00 <sup>A</sup>
	4	5,86 ± 0,04 <sup>A</sup>	5,43 ± 0,00 <sup>A</sup>	6,14 ± 0,46 <sup>A</sup>	4,64 ± 0,00 <sup>A</sup>	4,84 ± 0,64 <sup>A</sup>
	7	5,56 ± 0,35 <sup>A</sup>	5,12 ± 0,56 <sup>A</sup>	5,20 ± 0,42 <sup>A</sup>	4,83 ± 0,66 <sup>A</sup>	5,45 ± 0,15 <sup>A</sup>
	11	5,81 ± 0,71 <sup>A</sup>	5,15 ± 0,56 <sup>A</sup>	5,94 ± 0,73 <sup>A</sup>	5,91 ± 0,53 <sup>A</sup>	5,18 ± 0,15 <sup>A</sup>
	14	6,02 ± 0,46 <sup>A</sup>	5,24 ± 0,32 <sup>A</sup>	5,70 ± 0,17 <sup>A</sup>	5,27 ± 0,17 <sup>A</sup>	5,54 ± 0,34 <sup>A</sup>
	17	5,82 ± 0,41 <sup>A</sup>	5,48 ± 0,11 <sup>A</sup>	5,22 ± 0,29 <sup>A</sup>	5,39 ± 0,46 <sup>A</sup>	5,22 ± 0,18 <sup>A</sup>
	20	5,34 ± 0,62 <sup>A</sup>	5,78 ± 0,41 <sup>A</sup>	5,60 ± 0,24 <sup>A</sup>	6,28 ± 0,81 <sup>A</sup>	5,56 ± 0,25 <sup>A</sup>
Enterobakter (log kob / mL)	1	3,68 ± 0,07	2,33 ± 0,92	2,50 ± 0,56	5,28 ± 1,87	2,65 ± 0,88
	4	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00
	7	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00
	11	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00
	14	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00
	17	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00
	20	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00

\*ABC...;istatistiksel olarak aynı satırdaki veriler arasındaki benzerlik

#### 4.9.3 Fermantasyon sonunda turşu örneklerine ait duyuşsal analiz sonuçları

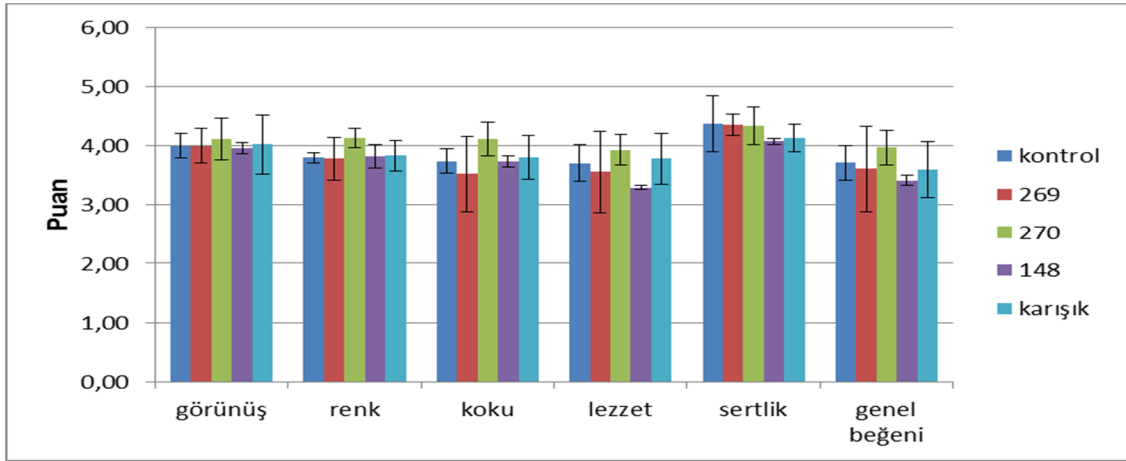
Fermantasyon sonunda hıyar turşularında, 18 panelist tarafından görünüş, renk, koku, lezzet, sertlik ve genel beğeni parametreleri esas alınarak, 1-5 aralığındaki skala ile duyuşsal değerlendirme yapılmıştır.

Çizelge 4.18 ve şekil 4.20’de görüldüğü gibi, 270 nolu örnek görünüş, renk, koku, lezzet ve genel beğeni olarak, sırasıyla, en yüksek puanları (4,11 ± 0,35 - 4,13 ± 0,17 -

4,11  $\pm$ 0,29 - 3,93  $\pm$ 0,26 - 3,97  $\pm$ 0,29) alan örnek olmuştur. Duyusal değerlendirme sonuçları genel olarak değerlendirilecek olursa; starter kültür kullanılarak üretilen turşuların beğenilme oranı, starter kültür kullanılmadan doğal fermantasyon ile üretilen kontrol örneklerine kıyasla belirgin bir farklılık ortaya koymamaktadır.

Çizelge 4.18 Fermantasyon sonunda turşuların duyusal değerlendirme sonuçları

	görünüş	renk	koku	lezzet	sertlik	genel beğeni
kontrol	4,00 $\pm$ 0,20	3,80 $\pm$ 0,08	3,74 $\pm$ 0,21	3,70 $\pm$ 0,31	4,37 $\pm$ 0,47	3,71 $\pm$ 0,29
269	4,00 $\pm$ 0,29	3,78 $\pm$ 0,36	3,53 $\pm$ 0,64	3,56 $\pm$ 0,68	4,35 $\pm$ 0,18	3,61 $\pm$ 0,72
270	4,11 $\pm$ 0,35	4,13 $\pm$ 0,17	4,11 $\pm$ 0,29	3,93 $\pm$ 0,26	4,33 $\pm$ 0,32	3,97 $\pm$ 0,29
148	3,96 $\pm$ 0,10	3,81 $\pm$ 0,20	3,74 $\pm$ 0,10	3,30 $\pm$ 0,03	4,07 $\pm$ 0,06	3,42 $\pm$ 0,08
karışık	4,02 $\pm$ 0,50	3,83 $\pm$ 0,25	3,80 $\pm$ 0,37	3,78 $\pm$ 0,43	4,13 $\pm$ 0,22	3,60 $\pm$ 0,47



Şekil 4.20 Fermantasyon sonunda turşuların duyusal değerlendirme sonuçları

#### 4.9.4 Fermantasyon sonunda starter kültürlerin stabiliteleeri

269, 270, 148 ve 269-125 (karışık) numaralı starter kültürler kullanılarak gerçekleştirilen 3 tekerrürlü fermantasyon denemeleri sonucunda, fermantasyonun bitiminden sonra salamura örneklerinden yayma plak yöntemine göre katı besiyerine ekim yapılmıştır. Katı besiyeri üzerinde oluşan kolonilerden rastgele 20 adet saf kültür

seçilerek, bu bakterilerin salamuraya ilave edilen starter kültür olup olmadıkları, hücre protein profilleri (SDS PAGE elektroforez) incelenerek belirlenmiştir. 269, 270 ve 148 numaralı salamuralardan izole edilen bakterilere ait protein profilleri bu örneklere ilave edilen starter kültürüne ait hücre protein profilleri ile uyum içerisinde. Ancak, *Lb. plantarum* (No:269) ve *P. ethanolidurans* (No:125) karışık kültürleri kullanılarak üretilen turşu örneklerinden (No: 269-125) fermantasyon sonunda, 125 numaralı starter kültüre ait bakteri protein profiline sahip sadece 3 bakteri izole edilirken, diğer 17 izolat 269 numaralı kültüre ait protein profiline sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum, *P. ethanolidurans* (No:125) suşunun fermantasyon sonuna kadar stabilitesini çok iyi koruyamadığı sonucunu göstermektedir. Daha önce yapılan teknolojik özelliklerin incelenmesi çalışmalarında, bu suşun yüksek asitlik ve tuz şartlarında 269 numaralı suşa göre daha zayıf bir gelişme göstermesi bu görüşü desteklemektedir.

## 5. SONUÇ

Çubuk ilçesinin farklı bölgelerinde faaliyette bulunan 14 ayrı ticari işletme, 2 ev üreticisi ve Ankara'da 1 satış marketi olmak üzere toplam 17 yer ziyaret edilerek, farklı hammaddelerden üretilmiş ve fermantasyonun değişik sürelerindeki 38 adet turşu ve salamura örneği alınmıştır. Toplanan örneklerin salamuralarında pH, laktik asit cinsinden toplam asitlik, tuz tayinleri ve mikrobiyolojik analizleri gerçekleştirilmiş; pH değerleri 3,08-3,70 (ortalama 3,39); toplam asitlik değerleri 0,11-1,11 g/100 mL (ortalama 0,48 g/100 mL); tuz değerleri ise 1,34-6,94 g/100 mL (ortalama 3,77) arasında belirlenmiştir.

Çubuk turşularından izole edilen bakteriler (335 izolat) tanımlama testlerine tabi tutularak, klasik tanımlama testleri sonucunda 135 izolatin laktik asit bakterisi olabileceği belirlenmiş, API 50 CH testi sonucunda ise 125 adet suşun cins düzeyinde ön tanımlamaları *Lactobacillus* (108), *Pediococcus* (13), *Weissella* (2), *Carnobacterium* (1), *Tetragenococcus* (1) şeklinde gerçekleştirilmiştir. Örneklerden en fazla izole edilen bakteri türlerinin *Lb. brevis* (42), *Lb. plantarum* (31) ve *Lb. acidophilus* (13) olduğu belirlenmiştir.

Laktik asit bakterilerinde yapılan toplam hücre protein izolasyonu ve SDS-PAGE jel elektroforezi analizleri sonucunda; moleküler ağırlıkları 7-250 kDa arasında değişen 1-21 adet protein bandı elde edilmiştir. 1-21 protein bandı üzerinden oluşturulan matrisin UPGMA yöntemiyle analizi ile elde edilen dendogram sonucunda türlerin API test sonuçları ile karşılaştırılarak, temelde 4 kümeye ayrıldığı (benzerlik katsayısı >0,5) saptanmıştır.

117 örneğe ait 16S rRNA dizi sonuçlarının BLAST veri tabanında tanımlanması sonucunda; *Lb. brevis* (34), *P. ethanolidurans* (33), *Lb. plantarum* (33), *Lb. buchneri* (9), *P. parvulus* (3), *Lb. namurensis* (4), *Lb. diolivarans* (1) olarak belirlenmiştir.

Tüm bu ifadeler ışığında, klasik tanımlama testleri ile tür ve alt tür düzeyinde tanımlama yapan API 50 CH testinin sonuçlarının bakterilerin tanımlanmasında yeterli olmadığı, bu testlerin sonuçlarının moleküler tanımlama testleri ile desteklenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Tür düzeyinde tanısı yapılmış bakterilere ait laktik asit üretim miktarları incelendiğinde, 48 saat inkübasyon sonrası en yüksek asit üretiminin 4 numaralı (% 1,60 ±0,01) ve 140 numaralı (% 1,59 ±0,03) *Lb. plantarum* suşları ile elde edildiği; en yüksek asit üretimine sahip türlerin ise, sırasıyla, *Lb. plantarum* (ort. % 1,45), *Pediococcus* spp. (ort. % 0,94), *Lb. brevis* (ort. % 0,68) ve *Lb. buchneri* (ort. % 0,48) olarak belirlendiği saptanmıştır.

pH 2 ve pH 9,6 değerinde, tüm laktik asit bakterilerinin gelişme gösteremedikleri, *Lb. plantarum* türlerinin tamamının (33 adet) pH 4 değerinde yüksek oranda geliştiği, pH 6,5'de tüm suşların yüksek oranda geliştiği gözlenmiştir.

Kültürlerin (117 suş) farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme özellikleri incelendiğinde, % 3 tuz konsantrasyonunda *Lb. plantarum* türlerinin hepsinin çok iyi gelişme gösterdikleri ve en yüksek gelişmenin, sırasıyla, 271, 283, 349, 169, 218 (OD<sub>600</sub>: 2,53 - 2,48 - 2,48 - 2,47 - 2,47) nolu *Lb. plantarum* türlerinde meydana geldiği belirlenmiştir.

LAB suşlarının küf ve mayaya karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadıkları, ancak 281, 221, 270 numaralı suşların çok düşük düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdikleri görülmektedir. Kültürler, özellikle *L. inocua*, *E. coli* ve *Salmonella* üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermişlerdir. *Lb. plantarum* suşları ise aynı zamanda *B. cereus*'a karşı da daha iyi bir antimikrobiyal aktivite göstermektedirler. Sonuçlar incelendiğinde, özellikle *Lb. plantarum* suşlarının patojen mikroorganizmalara karşı oluşturdukları inhibisyon zonlarının, diğer LAB türlerine göre daha iyi olduğu görülmektedir. Ancak; bu etkinin daha çok laktik asit üretiminden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.



Çalışmada kullanılan LAB'ın bakteriyosin ve benzeri metabolit üretim özellikleri incelenmiş, genel inhibisyonun asitlikten kaynaklandığı ve seçilen kültürler tarafından bakteriyosin ve benzeri maddeler üretilmediği sonucuna ulaşılmıştır.

*Lb. plantarum* suşlarının hidrojen peroksit üretim düzeylerinin düşük düzeyde kaldığı görülmektedir. En yüksek peroksit üretimi ise 187, 313, 260 numaralı örneklerde gerçekleşmiştir ( $5,57 \pm 0,37$  -  $5,23 \pm 1,40$  -  $5,09 \pm 0,46$   $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{mL}$ ).

Deneme kapsamındaki tüm laktik asit bakterilerinde tripsin, kimotripsin, mannozidaz, fukozidaz enzim aktivitesine rastlanmamıştır.

Lisin, histidin ve arjinin ilave edilerek gerçekleştirilen biyojen amin denemelerinde, sadece arjinin içeren besiyerinde bazı kültürlerin biyojen amin oluşturabildikleri belirlenmiştir. Arjinin dekarboksilaz aktivitesi; 154, 149, 104, 67, 247, 227, 258, 376, 330, 329 numaralı suşlarda tespit edilmiştir.

LAB'nin pH 2,5'de canlılık düzeylerinin belirlenmesi çalışmasında denemeye alınan 39 adet suşun 14 adedi pH 2,5'de canlılık düzeylerini kaybetmişlerdir. 25 suş ise farklı düzeylerde canlılıklarını korumuşlardır. 10 örneğin canlılık düzeyleri  $\log 6 \text{ kob}/\text{mL}$ ' nin üzerinde gerçekleşmiştir. *Lb. plantarum* suşları pH 2,5'e en dayanıklı suşlar olmuştur.

Analize alınan 25 adet laktik asit bakteri kültürlerinin, 5 farklı safra tuzunu ve bunların karışımını içeren MRS Agar besiyerinde herhangi bir zon oluşturma yeteneğine sahip olmadıkları gözlemlenmiş, kültürlerin hiç birinin safra tuzlarını dekonjuge etme yeteneğine sahip olmadığı belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan 25 adet LAB kültürlerinin hepsinin Kanamycin (K30) antibiyotiğine karşı dayanıklı olduğu ve direnç gösterdiği görülmektedir. Kültürlerin tümünde, petri kaplarında bu antibiyotiğe karşı herhangi bir zon gözlemlenmemiş olup, diğer antibiyotik disklerinde ise farklı çaplarda zon gözlenmiştir.

Bakterilerin % kolestrol asimilasyon oranları incelendiğinde; sırasıyla 383, 92, 115 ve 18 (% 48,56 - % 47,69 - % 44,26 - % 43,57 ) numaralı kültürlerin en yüksek kolestrol asimilasyon yeteneğine sahip olduğu görülmektedir. Yüksek asimilasyon oranlarına sahip bu örneklerin, daha önce yaptığımız çalışmalar sonucunda belirlediğimiz ekzopolisakkarit üretme yeteneğine sahip kültürler arasında yer aldığı görülmüştür.

Starter kültür kullanarak hazırlanan fermantasyon denemelerinde, turşu üretimi için teknolojik özellikler açısından önemli bulunan laktik asit bakterileri (No: 269, 270, 148, 125) starter kültür olarak seçilerek turşu denemeleri kurulmuştur. Fermantasyon denemeleri *L. plantarum* (No 269), *L. plantarum* (No 270), *L. plantarum* (No 148) ve *L. plantarum* (No 269) ile *Pediococcus ethanolidurans* (No 125)'in karışık kültürü ve starter kültür ilave edilmemiş kontrol olmak üzere 5 farklı deneme planı hazırlanarak 28 °C'de sıcaklık kontrollü karanlık bir odada 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Starter kültür kullanılarak üretilen turşularda hızlı bir asitlik artışı ve buna bağlı olarak pH da düşme gözlenmiş, bu örnekler bir hafta içinde fermantasyonu tamamlamışlardır (pH 3.26 ±0,06 - 3.43 ±0,03, titrasyon asitliği 0.73 ±0,04 - 0.87 ±0,08 g/100 mL). En yüksek titrasyon asitliği (0.87 ±0,08 g/100 mL) değeri 269-125 nolu kültürlerin oluşturduğu karışık starter kültürlerin kullanıldığı turşuda elde edilmiştir. Starter kültür kullanılmayan kontrol örneğinde ise, asitlik daha yavaş artarak daha düşük seviyede (0.69 ±0,01 g/100 mL) kalmış ve fermantasyon daha uzun sürmüştür.

Starter kültür kullanılarak üretilen turşuların salamuralarında toplam LAB sayısı ilk günlerden itibaren hızla artmış (7.51 ±0,07 - 8.48 ±0,33 log kob/ mL), starter kültür kullanılmayan kontrol örneğinde ise, benzer değerlere ancak fermantasyonun 4. gününden sonra ulaşılabilmiştir.

269, 270, 148 ve 269-125 (karışık) numaralı starter kültürler kullanılarak gerçekleştirilen 3 tekerrürlü fermantasyon denemeleri sonucunda, fermantasyonun bitiminden sonra salamura örneklerinden yayma plak yöntemine göre katı besiyerine ekim yapılmıştır. Katı besiyeri üzerinde oluşan kolonilerden rastgele 20 adet saf kültür seçilerek, bu bakterilerin salamuraya ilave edilen starter kültür olup olmadıkları, hücre

protein profilleri (SDS PAGE elektroforez) incelenerek belirlenmiştir. 269, 270 ve 148 numaralı salamuralardan izole edilen bakterilere ait protein profilleri bu örneklere ilave edilen starter kültürlerine ait hücre protein profilleri ile uyum içerisindedir.

Fermantasyon sonunda hıyar turşularında duyuşal değerlendirme yapılmış; 270 nolu kültür ile üretilen örnek görünüş, renk, koku, lezzet ve genel beğeni olarak, en yüksek puanları alan örnek olmuştur. Duyusal değerlendirme sonuçları genel olarak değerlendirilecek olursa; starter kültür kullanılarak üretilen turşuların beğenilme oranı, starter kültür kullanılmadan doğal fermantasyon ile üretilen kontrol örneklerine kıyasla belirgin bir farklılık ortaya koymamaktadır.

Sonuç olarak; starter kültür kullanılarak üretilen turşularda duyuşal olarak belirgin bir üstünlük belirlenememesine karşın, laktik asit fermantasyonunu kısa sürede tamamlamış olmaları nedeniyle, starter kullanımının fermantasyonun seyrine önemli bir katkıda bulunduğu anlaşılmaktadır. Turşu üretiminde starter kullanımı, fermantasyonun güvenle tamamlanmasına ve standart özelliklere sahip ürün oluşumuna verdiği katkı nedeniyle, üreticilere tavsiye edilebilir.

## KAYNAKLAR

- Adams, M.R. and Nicolaidis, L. 1997. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control*, vol. 8; pp. 227-239.
- Adeniyi, B.A., Ayeni, F.A. and Ogunbanwo, S.T. 2006. Antagonistic activities of lactic acid bacteria isolated from Nigerian fermented dairy food against organism implicated in urinary tract infection. *Biotechnology*, vol. 5 (2); pp. 183-188.
- Adnan, A.F.M. and Tan, I.K.P. 2007. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource Technology*, vol. 98; pp. 1380-1385.
- Ahn, Y.T., Kim, G.B., Lim K.S., Baek, Y.J. and Kim, H.U. 2003. Deconjugation of bile salts by *Lactobacillus acidophilus* isolates. *International Dairy Journal*, vol. 13; pp. 303–311.
- Akçelik, M. ve Şanlıbaba, P. 2000. Laktokoklarda kazein metabolizması. *Gıda Dergisi*, cilt: 25 (5); s. 325-329.
- Akkoç, N., Şanlıbaba, P. ve Akçelik, M. 2009. Bakteriosinler: Alternatif gıda koruyucuları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, cilt: 25 (1); s. 59–70.
- Aktan, N. ve Kalkan, H. 2000. Şarap teknolojisi. *Kavaklıdere Eğitim Yayınları*, 4, 614 s., Ankara.
- Aktan, N., Yücel, U. ve Kalkan, H. 1998. Turşu teknolojisi. *Ege Üniversitesi Ege Meslek Yüksek Okulu Yayınları*, 23, 138 s., İzmir.
- Al-Awwad, N.J., Haddadin, M.S. and Tahriri, H.R. 2009. The characteristics of locally isolated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* isolates as probiotics strains. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, vol. 5 (2); pp. 192-206.
- Andrews, F. W. and Horder, T. J. 1906. A study of the streptococci pathogenic for man. *Lancet*, vol. 2; pp. 708-713.
- Angelis, M., Corsetti, A., Tosti, N., Rossi, J., Corbo, M.R. and Gorbetti, M. 2001. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67 (5); pp. 2011-2020.
- Anonim. 1993. Hıyar turşusu standardı, TS 11112. *Türk Standartları Enstitüsü*, Ankara.

- Anonim. 2010. Konserve meyve sebze, T.C. Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı İGEM, 8s., Ankara.
- Anonim. 2011. Fulya turantaş web sitesi. [www.fulyaturantas.com/Bilimsel/H2O2.doc](http://www.fulyaturantas.com/Bilimsel/H2O2.doc) Erişim Tarihi: 13.01.2011.
- Anonim. 2012. Çubuk Belediyesi web sitesi. [http://www.cubuk.bel.tr/cubuk\\_detay](http://www.cubuk.bel.tr/cubuk_detay). Erişim Tarihi: 2012.
- Anonim. 2005. Merck gıda mikrobiyolojisi uygulamaları. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., 358 s., Ankara.
- Arda, M. 2000. Temel mikrobiyoloji klavuzu, [www.mikrobiyoloji.org](http://www.mikrobiyoloji.org). Erişim Tarihi: 2010.
- Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria: Classification and physiolog, lactic acid bacteria microbiological and functional aspects. Salminen, S., Wright, A., Ouwehand, A., Marcel Dekker Inc., 1-66 s., U.S.A.
- Balcázar, J. L., Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Cunnigham, D., Vendrell, D. and Múzquiz, J. L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, vol. 114; pp. 173-186.
- Berdal, B.P., Bovre, K., Olsvik, O. and Omland, T. 1983. Patterns of extracellular proline-specific endopeptidase in *Legionella* and *Flavobacterium* spp. demonstrated by use of chromogenic peptides. *J. of Clinic Mic.*, vol. 17 (6); pp. 970-974.
- Beukes, E. M., Bester, B.H. and Mostert, F. 2001. The microbiology of South African traditional fermented milks. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 63; pp. 189-197.
- Beyatlı, Y. ve Tunail, N. 1982. Yoğurtlardan izole edilen kimi bakterilerin starter olarak seçilme olanakları üzerine bir araştırma. Tübitak yayını, TOVAG-414.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M.E., Pandiella, S.S., Cantero, D. and Webb, C. 2003. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, vol. 36; pp. 527-543.
- Board, R.G., Jones, D. and Jarvis, B. 1995. Microbial fermentation: Beverages, foods and feeds. *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 79; pp. 505.
- Borgstorm, G. 1986. Principal of food science. *Food Microbiology and Biochemistry*, New York, Macmillian, vol. 2; pp. 625, USA.
- Botina, S.G., Tsygankov, Yu. D. and Sukhodolets, V.V. 2006. Identification of industrial strains of lactic acid bacteria by methods of molecular genetic typing. *Russian Journal of Genetics R.*, vol. 42; pp. 1367-1379.

- Bover-Cid, S. and Holzapfel, W.H. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol*, vol. 53; pp. 33-41.
- Breidt, F. Jr., McFeeters, R.F. and Diaz-Muñiz, I. 2007. *Food microbiology fundamentals and frontiers* 3rd Ed. ASM Press, 783-793, Washington D.C.
- Bulut, Ç. 2003. Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from cheese. Yüksek Lisans Tezi. İzmir Teknoloji Enstitüsü, 102s., İzmir.
- Campbell-Platt, G. 1987. *Fermented foods of the world: a dictionary and guide*. Butterworths, pp. 290, London
- Carr, F.J., Chill, D. and Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: A Literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 28; pp. 281-370.
- Chao, S.H., Wu, R.J., Watanabe, K. and Tsaia, Y.C. 2009. Diversity of lactic acid bacteria in suan-tsai and fu-tsai, traditional fermented mustard products of Taiwan. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 135; pp. 203–210.
- Cheriguene, A., Chougrani, F. and Bensoltane, A. 2006. Identification and characterization of lactic acid bacteria from Algerian goat's milk. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, vol. 9 (7); pp. 1242-1249.
- Chou, L.S. and Weimer, B. 1999. Isolation and characterisation of acid- and bile tolerance isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.*, vol. 82; pp. 23-31.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. and Chikindas, M.L. 2001. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 71; pp. 1–20.
- Conway, P.L., Gorbach, S.L. and Goldin, B.R. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy sci.*, vol. 70; pp. 1-12.
- Çakır, İ. 2003. Laktobasillus ve bifidobakterlerde bazı probiyotik özelliklerin belirlenmesi. Doktora Tezi. Ankara Üni. Fen Bil. Enst. 98s., Ankara.
- Çon, A.H. ve Gökalp, H.Y. 2000. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal metabolitleri ve etki şekilleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, cilt: 30; s. 180-190.
- Çon, A.H. and Karasu, N. 2009. Determination of antagonistic starter cultures for pickle and olive fermentation processes. *Czech J. Food. Sci.*, vol. 27 (3); pp. 185-193.
- Daeschel, M.A. and Fleming, H.P. 1984. Selection of lactic acid bacteria for use in vegetable fermentations. Academic Press Inc. Limited, pp. 303-313, London.

- Daeschel, M.A. and Fleming, H.P. 1987. Achieving pure culture cucumber fermentations. Review, A. Development in Industrial Microbiology Pierce. G.E. Society for Industrial Microbiology Arlington, V.A., vol. 28; pp. 141-148.
- Daeschel, M.A., Anderson, R.E. and Fleming, H.P. 1987. Microbial ecology of fermenting plant materials. FEMS Microbiol. Rev., vol. 46; pp. 357-367.
- De Martinis, E.C.P., Alves, V.F. and Franco, B.D.G.M. 2002. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. Food Reviews International, vol. 18 (2); pp. 191-208.
- Dikici, A. 2009. Çevresel stres faktörlerine karşı bakteriyel adaptasyonlar ve mekanizmaları. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, cilt: 4 (3); s. 59-68.
- Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E.M. M., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F. and Collins, J.K. 1999. Probiotics: From myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials, Antonie van Leeuwenhoek, vol. 76; pp. 279-292.
- Erdoğan, Ö.T., Çetin, Ö. ve Ergün, Ö. 2002. Fermente sucuklardan izole edilen *pediococcus pentosaceus* suşlarının bazı metabolik ve antimikrobiyal aktiviteleri üzerine çalışmalar. İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, cilt: 28 (1); s. 249-254.
- Etchells, J.L., Bell, T.A., Fleming, H.P., Kelling, R.E. and Thompson, R.L. 1973. Suggested procedure of the controlled fermentation of commercially brined pickling cucumbers-The use of starter cultures and reduction of carbon dioxide accumulation. Pickle Pak. Science, vol. 3; pp. 4-14.
- Etchells, J.L., Costilow, R.N., Anderson, T.E. and Bell, T.A. 1964. Pure culture fermentation of brined cucumbers. Applied Microbiology, vol. 12 (6); pp. 523-535.
- Etchells, J.L., Fleming, H.P. and Bell, T.A. 1975. Factor influencing the growth of lactic acid bacteria during brine fermentation of cucumbers. In: J.G. Carr, C.V. Cutting and G.C. Whiting Ed., Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food, Academic Press, pp. 281-305, New York.
- Evren, İ. ve Şahin, İ. 1993. Turşudan laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve bunlardan starter kültür üretiminin araştırılması. Doğa, cilt: 17; s. 881-890.
- Fitzgerald, G.F. and Caplice, E. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology, vol. 50; pp. 131-149.
- Fleming, H.P., Daeschel, M.A., McFeeters, R.F. and Pierson, M.D. 1989. Butyric acid spoilage of fermented cucumbers. J. Food Sci., vol. 54 (3); pp. 636-639.

- Fleming, H.P., Andersson, R.E. and Daeschel, M.A. 1987. Microbial ecology of fermenting plant materials. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 46; pp. 357-367.
- Fleming, H.P., McFeeters, R.F. and Daeschel, M.A. 1992. Fermented and acidified vegetables. In: C. Vanderzant and D. F. Splittstoesser. Ed. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (3rd Ed.), American Public Health Association, pp. 929-952, Washington D. C.
- Fleming, H.P. 1982. Fermented vegetables, economic microbiology - Fermented foods, ed: A.H. Rose, 7, Academic Pres, pp. 228-258, London.
- Fleming, H.P., McFeeters, R.F. and Thompson, R.L. 1987. Effects of sodium chloride concentration on firmness retention of cucumbers fermented and stored with calcium chloride. *J Food Sci.*, vol. 52 (3); pp. 653-657.
- Fleming, H.P., Thompson, R.L., Bell, T.A. and Hontz, L.H. 1978. Controlled fermentation of sliced cucumbers. *J. Food Sci.*, vol. 43; pp. 888-891.
- Forouchi, E. and Gunn, D.J. 1983. Some effects of metal ions on the estimation of reducing sugars in biological media. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 25; pp. 1905-1911.
- Garriga, M., Pascual, M., Monfort, J. M. and Hugas, M. 1998. Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjunct. *J. Appl. Microbiol.*, vol. 84; pp. 125-132.
- Gilliland, S.E., 1969. Enzymatic determination of residual hydrogen peroxide. *J. Dairy Science*, vol. 52 (3); pp. 321-324.
- Gilliland, S.E., Nelson, C.R. and Maxwell, C. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol*, vol. 49; pp. 377-381.
- Gobbetti, M., Angelis, M., Corsetti, A. and Cagno, R. 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, vol. 16; pp. 57-69.
- Guillou, A.A., Floros, J.D. and Cousin, M.A. 1992. Calcium chloride and potassium sorbate reduce sodium chloride used during natural cucumber fermentation and storage. *J. Food Sci.*, vol. 57; pp. 1364-1368.
- Gürkün, V. ve Halkman, A.K. 1988. Mikrobiyolojide sayım yöntemleri. *Gıda teknolojisi derneği*, cilt: 7; s. 146, Ankara.
- Halasz, A., Barath, A. and Holzapfel, W.H. 1999. The influence of starter culture selection on sauerkraut fermentation. *Z. Lebensm Unter Frosch. A.*, vol. 208; pp. 434-438.



- Halkman, A. K. 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları, Başak Matbaacılık Ltd. Şti., 358 s., Ankara.
- Hébert, E.M., Raya, R.R. and Giori, G.S. 2000. Use of SDS-Page of cell wall proteins for rapid differentiation of *L. delbruechii* subsp. *lactis* and *L. helveticus*. Biotechnology Letters, vol. 22; pp. 1003-1006.
- Herrerros, M.A., Fresno, J.M., González-Prieto, M.J. and Tornadijo, M.E. 2003. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from armada cheese ( Spanish goat's milk cheese). International Dairy Journal, vol. 13; pp. 469-479.
- Higashikawa, F., Noda, M., Awaya, T., Nomura, K., Oku, H. and Sugiyama, M. 2009. Improvement of constipation and liver function by plant-derived lactic acid bacteria: A double-blind, randomized trial. Nutrition, vol. 26 (4); pp. 367-372.
- Hitchener, B.J., Egan, A.F. and Rogers, P.J. 1982. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged beef. J. Appl. Bacteriol., vol. 52; pp. 31-37.
- Holzapfel, W.H. and Stiles, M.E. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology, vol. 36; pp. 1-29.
- Hucker, G.J. and Pederson, C.S. 1930. Studies on the coccaceae. The genus *Leuconostoc*. N. Y. State Agr. Expt. Sta., Tech. Bull., vol. 167; pp. 1-80.
- Hucker, G.J. and Pederson, C.S. 1957. Genus *iv leuconostoc*, in Bergey's manual of determinative bacteriology. Breed, R. S., Murray, E. G. D. and Smith, N. R., 7th Ed., Williams and Wilkins Co. Baltimore, pp. 531-533, Maryland.
- Hutkins, R.W. 2006. Microbiology and technology of fermented foods. Blackwell Publishing, Oxford, 473p, UK.
- İç, E. 2000. Hıyar turşusu salamurasında kalsiyum klorür kullanarak tuz konsantrasyonunun azaltılma olanağı üzerine araştırma. Doktora tezi. Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 117s., Ankara.
- İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., Yıldırım, M. 2008. Yöresel peynirden antimikrobiyal aktiviteye sahip laktik asit bakterisinin izolasyonu ve tanısı. GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi, cilt: 25 (1); s. 1-6.
- Jacobsen, C.N., Nielsen, V.R., Hayford, A.E., Møller, P.L., Michaelsen, K.F., Pærregaard, A., Sandtröm, B., Tvede, M and Jacobsen, M. 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in human. Appl. Environ. Microbiol., vol. 65 (11); pp. 4949-4956.

- Jay, M.J. 2005. Modern food microbiology, 7th Ed. Springer Science+Business Media, Inc. Publisher, 715p., N. Y. USA.
- Johnson, M.E. and Steele, J.L. 2001. Fermented dairy products in: food microbiology, fundamentals and frontiers. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J., Eds., Second Ed., American Society for Microbiology, pp. 651–664, Washington, DC.
- Kandler, O. and Weiss, N. 1986. Regular, nonsporing Gram positive rods. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. C. (Eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.2, Williams and Wilkins, MD, pp. 1208-1234, Baltimore.
- Karapınar, M. and Hancıoğlu, Ö. 1997. Microflora of Boza, a traditional fermented Turkish beverage. International Journal of Microbiology, vol. 35; pp. 271-274.
- Karasu, N. 2006. Turşu ve zeytinden antagonistik ve probiyotik özellikte laktik starter kültür eldesi. Yüksek lisans tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Pamukkale Üniversitesi, 88s., Denizli.
- Kıran, F. 2006. Hücre duvarı protein profilleri ve pilazmid içeriklerine göre laktik asit bakterilerinin moleküler tanısı. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, 130s., Ankara.
- Kim, J., Chun, J. and Han, H.U. 2000. *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from kimchii. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., vol. 50; pp. 1915-1919.
- Kim, Y. and Adachi, Y. 2007. Biological and genetic classification of canine intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria. Mic. Immunol., vol. 51; pp. 919-928.
- Kimura, M., Danno, K. and Yasui, H. 2006. Immunomodulatory function and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Mongolian fermented milk. Bioscience and Microflora, vol. 25; pp. 147–155.
- Kitchell, A.G. and Shaw, B.G. 1975. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their protein patterns. Journal of General Microbiology, vol. 87; pp. 333-342.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. and Reuter, G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, vol. 41; pp. 103-125.
- Kok, J. 1990. Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews, vol. 87; pp. 15-42.
- Konings, W.N., Kok, J., Kuipers, O.P. and Poolman, B. 2000. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. Current Opinion in Microbiology, vol. 3; pp. 276-282.

- Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C. and Kilk, A. 2002. Two antioxidative Lactobacilli strains as promising probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 72; pp. 215-224.
- Kurt, Ş. ve Zorba, Ö. 2005. Bakteriyosinler ve gıdalarda kullanım olanakları. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, cilt: 16 (1); s. 77-83.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, vol. 227; pp. 680-685.
- Lages, F., Silva-Graça, M. and Lucas, C. 1999. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. *Society of General Microbiology*, vol. 145; pp. 2577-2585.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. E. Stackebrandt and M. Goodfellow, eds. New York, NY, John Wiley and Sons: pp. 115-175, New York.
- Leisner, J.J., Vancanneyt, M., Rusul, G., Pot B., Lefebvre, K., Fresi A. and Tee, L.K. 2001. Identification of lactic acid bacteria constituting the predominating microflora in an acid-fermented condiment (tempoyak) popular in Malaysia. *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 63, pp. 149-157.
- Leroy, F. and De Vuyst, L. 2004. Functional lactic acid bacteria starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol*, vol. 15; pp. 67-78.
- Lindgren, S.E. and Dobrogosz, W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol.Rev*, vol. 87; pp. 149-164.
- López-Díaz, T.M., Alonso, C., Román, C., Garcia-López, M.L. and Moreno, B. 2000. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiology*, vol. 17; pp. 23-32.
- Luckow, T. and Delahunty, C. 2004. Consumer acceptance of orange juice containing functional ingredients. *Food Research International*, vol. 37; pp. 805-814.
- Lyhs, U. 2002. Lactic acid bacteria associated with spoilage of fish products. *Academic Dissertation*, University of Helsinki, pp.200, Finland.
- Mäki, M. 2004. Lactic acid bacteria in vegetable fermentation, lactic acid bacteria microbiological and functional aspects. Salminen, S., Wrigth, A. and Ouwehand, A., 3<sup>th</sup> Ed., Marcel Dekker Inc., pp. 419-430, USA.
- Man, J.D., Rogasa, M. and Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 23; pp. 130-135.
- Mavhungu, J. 2005. Isolation and identification of lactic acid bacteria from ‘Ting’ in the

Nothern Province of South Africa. Department of Microbiology and Plant Pathology, University of Pretoria, 74 p., South Africa.

- McDonald, L.C., Fleming, H.P. and Daeschel, M.A. 1991. Acidification effects on microbial populations during initiation of cucumber fermentations. *J. Food Sci.*, vol. 56; pp. 1353-1359.
- Mishra, V. and Prasad, D. 2005. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *Int J. Food Microbiol.*, vol. 103; pp. 109-115.
- Montville, T.J., Lewus, C.B. and Kaiser, A. 1991. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 6; pp. 1683-1688.
- Montville, T.J., Winkowski, K. and Chikindas, M.L. (2001). Biologically based preservation systems. in *food microbiology: fundamentals and frontiers*, 2nd edn, pp. 629–647. Edited by M.P. Doyle, L.R. Beuchat, T.J. Montville. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Moulay, M., Aggad, H., Benmechernene, Z., Guessas, B., Henni, D.E. and Kihal, M. 2006. Cultivable lactic acid bacteria isolated from algerian raw goat's milk and their proteolytic activity. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, vol. 1 (1); pp. 12-18.
- Muñoz, R., Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J.M., Rivas, B., Felipe, F.L., Gómez-Cordovés, C. and Mancheño, J.M. 2009. Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 132; pp. 79-90.
- Musikasang, H., Tani, A., H-kittikun, A. and Maneerat, S. 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 25; pp. 1337-1345.
- Nahaisi, D.M.H. 1986. *L. acidophilus*: Therapeutic properties product and enumeration; in *developments in food microbiology*, Ed. R.K. Robinson. Elsevier App. Sc. Pub., pp. 153-178, London.
- Nakajima, H., Suzuki, Y. and Hirota, T. 1992. Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk. *Food Science*, vol. 57; pp. 1327.
- Noh, D.O., Kim, S.H. and Gilliland, S. E. 1997. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *J Dairy Sci*, vol. 80; pp. 3107-3113.
- Nout, M.J.R. and Rombouts, F.M. 1992. Fermentative preservation of plant foods. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, vol. 73; pp. 13-147.

- Ogabi, F. ve Pamir, M.H. 1973. Türk turşuları üzerinde araştırmalar, I. Çeşitli turşuların mikroflorasında bulunan laktik asit bakterileri. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yıllığı, cilt: 23; s. 248-268.
- Orla-Jensen, S. 1919. The lactic acid bacteria. Dairy bacteriology, host and son. Copenhagen, 118 pp.
- Özçelik, F. ve İç, E. 1996. Hıyar turşusu üretiminde kontrollü fermantasyon. Gıda, cilt: 21 (1); s. 49-53.
- Palop, L., Sánchez, I. and Ballestenos, C. 2000. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of 'Almagro' eggplants. International Journal of Food Microbiology, vol. 59; pp. 9-17.
- Palop, L., Sánchez, I. and Seseña, S. 2003. Identification of lactic acid bacteria from spontaneous fermentation of 'Almagro' eggplants by SDS-Page whole cell protein fingerprinting. International Journal of Food Microbiology, vol. 82; pp. 181-189.
- Papamonoli, E., Tzanetakis, N., Tzanetaki-Lipotoulou, E. and Kotzekidou, P. 2003. Characterization of lactic acid bacteria from a grek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. Meat Science, vol. 65; pp. 859-867.
- Pederson, C.S. 1949. The Genus *Pediococcus*. Bacteriology Reviews, vol. 13; pp. 225-232.
- Pederson, C.S. and Albury, M.N. 1950. Effect of temperature upon bacteriological and chemical changes in fermenting cucumbers. N. Y. Agr. Expt. Sta. Bull., pp. 744.
- Pereira, D.I.A. and Gibson, G.R. 2002. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. Applied and environmental microbiology, vol. 68 (9); pp. 4689-4693.
- Perez, P.F., Minnaard Y., Disalvo, E.A. and De Antoni, G.L. 1998. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. Applied and Environmental Microbiology, vol. 64; pp. 21-26.
- Plessis, H.W., Dicks, L.M.T., Pretorius, I.S., Lambrechts, M.G. ve Toit, M. 2004. Identification of lactic acid bacteria isolated from south african brandy base wines. Int. J. Food Microbiol., vol. 91; pp. 19-29.
- Pot, B., Hertel, C., Ludwig, W., Descheemaeker, P., Kersters, K. and Schleifer, K.H. 1993. Identification and classification of *L. acidophilus*, *L. gasseri* and *L. johnsoni*: strains by SDS-Page and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. Journal of General Microbiology, vol. 139; pp. 513-517.

- Radler, F. 1975. The metabolism of organic acids by lactic acid bacteria. In: J.G. Carr, C.V. Cutting and G.C. Whiting Ed., *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*, Academic Press, pp. 17-27. London.
- Randazzo, L.R., Restuccia, C., Romaro, D.A. and Caggia, C. 2004. *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 90; pp. 9-14.
- Rodríguez – Couto, S. and Sanromán, M. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry. *Journal of Food Engineering*, vol. 76; pp. 291-302.
- Rolfe, R.D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The Journal of Nutrition*, vol. 130; pp. 396-402.
- Rudel, L.L. and Morris, M.D. 1973. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. *Journal of Lipid Research*, vol. 14; pp. 364-366.
- Saginur, R., Clecner, B., Portnoy, J. and Mendelson, J. 1982. Superoxol (Catalase) test for identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology Mar.*, vol. 15 (3); pp. 475-477.
- Sakamoto, K. and Konings, W.N. 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 89; pp. 105-124.
- Sánchez, I. and Palop, L. 2000. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of 'almagro' eggplants. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 59; pp. 9-17.
- Sanni, A.I., Onilude, A.A., Ogunbanwo, S.T. and Smith, S.I. 1999. Antagonistic activity of bacteriocin produced by *Lactobacillus* species from ogi, and indigenous fermented food. *J. Basic Microbiol.*, vol. 39 (3); pp. 189-195.
- Savoy, G.G. and Hebert, E.M. 2001. Methods to determine proteolytic activity of lactic acid bacteria. *Methods in Biotech*, vol. 14; pp. 197-202.
- Schillinger, U. and Lücke, F.K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus* sake from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 55; pp. 1901-1906.
- Schillinger, U. and Lucke, F.K. 1989. Identification of *Lactobacilli* from meat and meat products. *Appl. Environ. Microbiol*, vol. 4; pp. 199-209.
- Schillinger, U., Tamang, J. P., Tamang, B., Franz, C.M.A.P., Gores, M. and Holzaphel, W.H. 2005. Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 105; pp. 347-356.

- Shinagawa, H., Nishiyama, R., Miyao, S. and Kozaki, M. 1997. Organic acid composition and quality of Japanese "shibazuke" pickles. *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, vol. 3 (2); pp. 170-172.
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. 1986. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams and Wilkins Co. Baltimore, pp. 1075-1079.
- Steinkraus, K.H. 1983. Lactic acid fermentation in the production of foods from vegetables, cereals and legumes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 49; pp. 337-348.
- Steinkraus, K.H. 1995. *Handbook of indigenous fermented foods*. Ed. Marcel Dekker, pp. 76, New York.
- Steinkraus, K.H. 1997. Classification of fermented foods: World-wide review of household fermentation techniques. *Food Control*, vol. 8; pp. 311-317.
- Stiles, M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 70; pp. 331-345.
- Straub, B.W., Kicherer, M., Schilcher, S.M. and Hammes, W.P. 1995. The formation of biogenic amines by fermentation organisms. *Zeitschrift-fuer-Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, vol. 201; pp. 79-82.
- Sunil, K. and Narayana, B., 2008. Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide in water and cream samples. *Bull Envir. Contam. Toxicol*, vol. 81; pp. 422-426.
- Swida, K.M. and Binek, M. 2005. Selection of potentially probiotic *Lactobacillus* strains towards their inhibitory activity against poultry enteropathogenic bacteria. *Polish J. of Mic.*, vol. 54; pp. 287-294.
- Tagg, J.R. and McGiven, A.R. 1971. Assay system for bacteriocins. *Applied Microbiology*, vol. 21 (5); pp. 943.
- Tamang, J.P., Tamang, B., Schillinger, U., Guigas, C. and Holzaphel, W.H. 2009. Functional properties of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented vegetables of the himalayas. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 135; pp. 28-33.
- Tambekar, D.H. and Bhutada, S.A. 2010. Acid and bile tolerance, antibacterial activity, antibiotic resistance and bacteriocins activity of probiotic *Lactobacillus* species. *Recent Research in Science and Technology*, vol. 2 (4); pp. 94-98.
- Tangüler, H. 2010. Şalgam suyu üretiminde etkili olan laktik asit bakterilerinin belirlenmesi ve şalgam suyu üretim tekniğinin geliştirilmesi. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 367 s., Adana.

- Temiz, A. 1999. Gıdalarda mikrobiyal gelişmeyi etkileyen faktörler. Gıda Mikrobiyolojisi. Ünlütürk, A., Turantaş, F. (Ed). 2.Baskı. s. 53-82, İzmir.
- Teuber, M. 1995. The genus *Lactococcus* in the lactic acid bacteria, the genera of lactic acid bacteria. Blackie Academics and Professionals, vol. 2; pp. 173-235.
- Thirabunyanon, M., Boonprasom, P. and Niamsup, P. 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. Biotechnology Section, Faculty of Science, Maejo University, Thailand, Biotechnol Lett., vol. 31 (4); pp. 571-576.
- Titsler, R.P. Pederson, C.S., Snell, E.E., Hendlin, D. and Niven, C.F. 1952. Symposium on the lactic acid bacteria. Bacteriological Reviews, vol. 16 (4); pp. 227-259.
- Tok, E. ve Aslım, B. 2007. Probiyotik olarak kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyonu ve safra tuzları dekonjugasyonundaki roller. Türk Mikrobiyol Cem Derg., cilt: 37 (1); s. 62-68.
- Toksoy, A., Beyatlı, Y. ve Aslım, B. 1999. Sucuk ve sosilerden izole edilen *Lactobacillus plantarum* suşlarının bazı metabolik ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi. Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences, cilt: 23; s. 533-540.
- Turgut, Z. 2006. Starter kültür kullanılarak üretilen hıyar turşularında biyojen amin oluşumu üzerine araştırma. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, 72 s, Ankara.
- Usman, H.A. 1999. Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. J. Dairy Sci., vol. 82; pp. 243.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., Vos, P., Kersters, K. and Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiological Reviews, vol. 6; pp. 407-438.
- Vinderola, C.G. and Reinheimer, J.A. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Research International, vol. 36 (9); pp. 895-904.
- Vignola, G.M., Ruiz, A.A. and Oliver, G. 1988. Acid production and proteolytic activity of *Lactobacillus* strain from dry sausage. J. Food Protect, vol. 51; pp. 481-488.
- Vignola, G.M., Ruiz, A.A. and Oliver, G. 1989. Use of bacterial cultures in the ripening of fermented sausage. J. Food Protect, vol. 52; pp. 787-791.
- William, A.S., Rouse, H., Champe, P. and Harvey, A.R. 2001. Lippincott's Illustrated Reviews Microbiology, Lippincott Williams&Wilkins, pp 432.
- Yang, Z. 2000. Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced



by lactic acid bacteria: structure and properties. Academic Dissertation. Department of Food Technology, University of Helsinki, 61 p., Helsinki.

- Yap, P.S. and Gilliland, S.E. 2000. Comparison of newly isolated strains of *lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* for hydrogen peroxide production at 5°C. J. Dairy Science, vol. 83; pp. 628-632.
- Yavuzdurmaz, H. 2007. Isolation, characterization, determination of probiotic properties of lactic acid bacteria from human milk. Master Thesis. İzmir Institute of Technology, 69 s., İzmir.
- Yüksekdağ, Z.N. and Aslim, B. 2010. Assessment of potential probiotic and starter properties of *pediococcus* spp. isolated from turkish-type fermented sausages (sucuk), Microbiol. Biotechnol., vol. 20 (1); pp. 161–168.
- Zalán, Z., Németh, E., Baráth, A. and Halász, A. 2005. Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *lactobacillus* strains. Food Technol. Biotechnol., vol. 43 (3); pp. 219-225.
- Zotta, T., Piraino, P., Parente, E., Salzano, G. and Ricciardi A., 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from sourdough for Corretto, a traditional bread produced in Basilicata (Southern Italy). World Journal Microbiology Biotechnology, vol. 24; pp. 1785-1795.

## **EKLER**

Ek 1 İzole edilen laktik asit bakterilerine ait bazı fenotipik test sonuçları ve 16S rRNA dizi analiz sonuçları

Ek 2 Bakterilerin SDS-PAGE hücre protein profilleri, API test ve 16S rRNA sonuçları

Ek 3 16S rRNA dizi analiz sonuçlarına göre bakterilerin dendogram üzerinde gösterimi (UPGMA)

Ek 4 LAB türlerinin farklı tuz, pH değerlerindeki gelişme özellikleri ve asit üretim miktarları

Ek 5 Laktik asit bakterilerinin indikatörlere karşı genel antimikrobiyal aktiviteleri (zon çapları, cm)

Ek 1 İzole edilen laktik asit bakterlerine ait bazı fenotipik test sonuçları ve 16S rRNA dizi analiz sonuçları

No	Turuş Örneği No	İzolasyon Besiyeri	Gram Boyama	Hücre Morfolojisi	Katalaz	Gaz Oluşturma	Farklı Sıcaklıklarda Gelişme			Oksidaz	Arjinin Hidroliz	API 50CH Test Sonuçları		16S rRNA
							10 °C	15 °C	45 °C			Cins ve Tür	%	
73	3	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>Weissella confusa</i> - <i>Lb. brevis</i> 1	62,80 - 32,50	<i>P. ethanolidurans</i>
66	6	MRS	+	B	-	-	-	+	-	-	-	<i>Weissella confusa</i>	99,40	<i>P. ethanolidurans</i>
126	23	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>Tetragenococcus halophilus</i> - <i>Lb. brevis</i> 1	56,00 - 31,00	<i>P. ethanolidurans</i>
192	37	MRS	+	K	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pediococcus spp</i> - <i>Tetragenococcus</i>	43,50 - 20,70	<i>P. parvulus</i>
159	24	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>Pediococcus spp</i> - <i>Lb. acidophilus</i> 1	82,60 - 13,60	<i>P. ethanolidurans</i>
187	38	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>Pediococcus spp</i> - <i>Lb. acidophilus</i> 1	82,60 - 13,60	<i>P. ethanolidurans</i>
158	24	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>Pediococcus spp</i>	99,50	<i>P. ethanolidurans</i>
60	1	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>P. damnosus</i> 2	99,20	<i>P. parvulus</i>
35	15	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>P. damnosus</i> 2	98,70	<i>P. ethanolidurans</i>
133	16	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>P. damnosus</i> 2	99,90	<i>P. ethanolidurans</i>
87	25	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>P. damnosus</i> 2	98,60	<i>P. ethanolidurans</i>
129	28	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>P. damnosus</i> 2	96,40	<i>P. ethanolidurans</i>
97	29	MRS	+	K	-	-	-	-	-	-	-	<i>P. damnosus</i> 2	96,90	<i>P. ethanolidurans</i>
173	35	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>P. damnosus</i> 2	99,50	<i>P. ethanolidurans</i>
150	22	MRS	+	B	-	-	-	-	-	-	-	<i>P. damnosus</i> 1	99,80	<i>P. ethanolidurans</i>
98	29	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>P. damnosus</i> 1	98,20	-
261	20	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1 - <i>Lb. pentosus</i>	68,90 - 30,30	<i>Lb. plantarum</i>
125	23	MRS	+	K	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,90	<i>P. ethanolidurans</i>
188	38	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	94,20	<i>P. ethanolidurans</i>
315	1	M17	+	B	-	-	-	+	-	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
18	4	MRS	+	B	-	-	-	+	+	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
283	8	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
140	17	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
271	19	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
273	19	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,30	<i>Lb. plantarum</i>
122	20	MRS	+	B	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
124	20	MRS	+	B	-	-	-	+	-	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	98,90	<i>Lb. plantarum</i>

Ek 1 İzole edilen laktik asit bakterlerine ait bazı fenotipik test sonuçları ve 16S rRNA dizi analiz sonuçları (devam)

No	Turşu Örnek No	İzolasyon Besiyeri	Gram Boyama	Hücre Morfolojisi	Katalaz	Gaz Oluşturma	Farklı Sıcaklıklarda Gelişme			Oksidaz	Arjinin Hidroliz	API 50CH Test Sonuçları		16S rRNA
							10 °C	15 °C	45 °C			Cins ve Tür	%	
							256	20	M17			+	B	
105	21	MRS	+	K	-	+	-	+	+	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,90	<i>Lb. plantarum</i>	
199	21	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,90	<i>Lb. plantarum</i>	
204	21	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,90	<i>Lb. plantarum</i>	
148	22	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	98,10	<i>Lb. plantarum</i>	
161	24	MRS	+	B	-	-	-	+	+	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,90	<i>Lb. plantarum</i>	
216	24	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,90	<i>Lb. plantarum</i>	
218	24	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,70	<i>Lb. plantarum</i>	
221	24	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,90	<i>Lb. plantarum</i>	
115	26	MRS	+	B	-	-	-	+	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,90	<i>Lb. plantarum</i>	
269	26	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,10	<i>Lb. plantarum</i>	
270	26	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,90	<i>Lb. plantarum</i>	
99	29	MRS	+	K	-	-	-	+	+	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	98,10	<i>Lb. plantarum</i>	
166	31	MRS	+	B	-	-	-	+	+	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,90	<i>Lb. plantarum</i>	
383	32	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,90	<i>Lb. plantarum</i>	
169	33	MRS	+	B	-	-	-	+	+	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,90	<i>Lb. plantarum</i>	
376	33	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,90	<i>Lb. plantarum</i>	
183	36	MRS	+	B	-	-	-	+	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,90	<i>Lb. plantarum</i>	
184	36	MRS	+	K	-	-	-	+	+	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,90	<i>Lb. plantarum</i>	
257	20	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. plantarum</i> 1	99,90	-	
117	26	MRS	+	B	-	+	-	+	+	-	<i>Lb. pentosus</i> - <i>Lb. brevis</i> 1	75,80 - 15,10	<i>Lb. Brevis</i>	
227	22	M17	+	B	-	-	-	+	-	-	<i>Lb. pentosus</i> - <i>Lb. brevis</i> 1	68,30 - 29,10	<i>Lb. brevis</i>	
4	8	MRS	+	B	-	-	-	+	+	-	<i>Lb. pentosus</i>	99,90	<i>Lb. plantarum</i>	
1	8	MRS	+	B	-	+	-	+	-	-	<i>Lb. pentosus</i>	98,30	<i>Lb. brevis</i>	
260	20	M17	+	B	-	-	-	-	-	+	<i>Lb. pentosus</i>	99,50	<i>Lb. brevis</i>	

Ek 1 İzole edilen laktik asit bakterlerine ait bazı fenotipik test sonuçları ve 16S rRNA dizi analiz sonuçları (devam)

No	Turşu Örnek No	İzolasyon Besiyeri	Gram Boyama	Hücre Morfolojisi	Katalaz	Gaz Oluşturma	Farklı Sıcaklıklarda Gelişme			Oksidaz	Arjinin Hidroliz	API 50CH Test Sonuçları		16S rRNA
							10 °C	15 °C	45 °C			Cins ve Tür	%	
							195	32	MRS			+	B	
2	8	MRS	+	B	-	-	-	+	+	-	<i>Lb. pentosus</i>	99,10	-	
5	8	MRS	+	B	-	-	-	+	+	-	<i>Lb. pentosus</i>	99,50	-	
177	30	MRS	+	K	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. pentosus</i>	99,90	-	
160	24	MRS	+	K	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. paracasei ssp paracasei 3</i>	96,90	<i>P. ethanolidurans</i>	
69	6	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	<i>Lb. delbrueckii ssp lactis 2 - Lb. acidophilus</i>	52,30 - 40,30	<i>P. ethanolidurans</i>	
13	4	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	<i>Lb. delbrueckii ssp lactis 2 - Lb. acidophilus</i>	52,30 - 40,30	<i>P. ethanolidurans</i>	
113	18	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	<i>Lb. delbrueckii ssp lactis 2 - Lb. acidophilus</i>	52,30 - 40,30	<i>P. ethanolidurans</i>	
102	21	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	<i>Lb. delbrueckii ssp lactis 2 - Lb. acidophilus</i>	49,90 - 40,50	<i>P. ethanolidurans</i>	
136	17	MRS	+	K	-	+	-	-	-	+	<i>Lb. buchneri - Lb. brevis 2</i>	89,20 - 10,70	<i>Lb. buchneri</i>	
41	10	MRS	+	B	-	+	-	+	-	+	<i>Lb. buchneri</i>	97,60	<i>P. ethanolidurans</i>	
53	5	MRS	+	B	-	+	-	+	-	+	<i>Lb. buchneri</i>	99,90	<i>Lb. buchneri</i>	
40	10	MRS	+	B	-	+	-	+	-	+	<i>Lb. buchneri</i>	99,80	<i>Lb. buchneri</i>	
42	10	MRS	+	B	-	+	-	+	+	-	<i>Lb. buchneri</i>	99,70	<i>Lb. buchneri</i>	
107	18	MRS	+	B	-	+	-	+	+	+	<i>Lb. buchneri</i>	91,70	<i>Lb. buchneri</i>	
109	18	MRS	+	B	-	+	-	+	+	+	<i>Lb. buchneri</i>	98,50	<i>Lb. buchneri</i>	
43	10	MRS	+	B	-	+	-	+	+	+	<i>Lb. buchneri</i>	99,80	-	
149	22	MRS	+	B	-	+	-	-	-	+	<i>Lb. brevis 3</i>	98,70	<i>P. ethanolidurans</i>	
154	19	MRS	+	B	-	+	-	+	-	+	<i>Lb. brevis 3</i>	91,60	<i>Lb. plantarum</i>	
223	22	M17	+	B	-	-	-	-	-	+	<i>Lb. brevis 3</i>	99,60	<i>Lb. plantarum</i>	
74	3	MRS	+	B	-	+	-	-	-	+	<i>Lb. brevis 3</i>	98,80	<i>Lb. namurensis</i>	
137	17	MRS	+	B	-	+	-	-	-	-	<i>Lb. brevis 3</i>	99,60	<i>Lb. namurensis</i>	
145	27	MRS	+	B	-	+	-	-	-	+	<i>Lb. brevis 3</i>	98,50	<i>Lb. namurensis</i>	
130	28	MRS	+	B	-	+	-	-	-	+	<i>Lb. brevis 3</i>	99,60	<i>Lb. namurensis</i>	
147	27	MRS	+	B	-	+	-	-	-	-	<i>Lb. brevis 3</i>	94,00	<i>Lb. diolivorans</i>	

Ek 1 İzole edilen laktik asit bakterlerine ait bazı fenotipik test sonuçları ve 16S rRNA dizi analiz sonuçları (devam)

No	Turşu Örnek No	İzolasyon Besiyeri	Gram Boyama	Hücre Morfolojisi	Katalaz	Gaz Oluşturma	Farklı Sıcaklıklarda Gelişme			Oksidaz	Arjinin Hidroliz	API 50CH Test Sonuçları		16S rRNA
							10 °C	15 °C	45 °C			Cins ve Tür	%	
							82	13	MRS			+	B	
90	25	MRS	+	B	-	-	-	-	-	-	+	<i>Lb. brevis</i> 3	99,70	<i>Lb. buchneri</i>
57	1	MRS	+	B	-	+	-	+	+	-	+	<i>Lb. brevis</i> 3	99,80	<i>Lb. brevis</i>
62	1	MRS	+	B	-	+	-	+	+	-	+	<i>Lb. brevis</i> 3	99,00	<i>Lb. brevis</i>
313	1	M17	+	B	-	-	-	+	-	-	-	<i>Lb. brevis</i> 3	99,90	<i>Lb. brevis</i>
78	2	MRS	+	B	-	+	-	+	+	-	+	<i>Lb. brevis</i> 3	99,20	<i>Lb. brevis</i>
80	2	MRS	+	B	-	+	-	+	-	-	-	<i>Lb. brevis</i> 3	99,60	<i>Lb. brevis</i>
16	4	MRS	+	B	-	+	-	+	+	-	+	<i>Lb. brevis</i> 3	99,70	<i>Lb. brevis</i>
65	6	MRS	+	B	-	+	-	+	-	-	-	<i>Lb. brevis</i> 3	99,60	<i>Lb. brevis</i>
67	6	MRS	+	K	-	+	-	+	-	-	+	<i>Lb. brevis</i> 3	99,80	<i>Lb. brevis</i>
19	7	MRS	+	B	-	+	-	+	+	-	+	<i>Lb. brevis</i> 3	99,60	<i>Lb. brevis</i>
281	10	M17	+	B	-	-	-	+	-	-	+	<i>Lb. brevis</i> 3	98,70	<i>Lb. brevis</i>
325	13	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	+	<i>Lb. brevis</i> 3	97,80	<i>Lb. brevis</i>
329	13	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	+	<i>Lb. brevis</i> 3	96,40	<i>Lb. brevis</i>
330	13	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	+	<i>Lb. brevis</i> 3	98,60	<i>Lb. brevis</i>
331	13	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	+	<i>Lb. brevis</i> 3	99,60	<i>Lb. brevis</i>
247	18	M17	+	B	-	-	-	+	-	-	+	<i>Lb. brevis</i> 3	99,40	<i>Lb. brevis</i>
121	20	MRS	+	B	-	+	-	+	+	-	+	<i>Lb. brevis</i> 3	98,30	<i>Lb. brevis</i>
123	20	MRS	+	B	-	+	-	+	+	-	-	<i>Lb. brevis</i> 3	97,60	<i>Lb. brevis</i>
258	20	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	+	<i>Lb. brevis</i> 3	95,40	<i>Lb. brevis</i>
104	21	MRS	+	B	-	+	-	+	+	-	+	<i>Lb. brevis</i> 3	99,50	<i>Lb. Brevis</i>
206	21	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	+	<i>Lb. brevis</i> 3	99,80	<i>Lb. brevis</i>
118	26	MRS	+	B	-	+	-	+	-	-	+	<i>Lb. brevis</i> 3	99,90	<i>Lb. brevis</i>
96	29	MRS	+	B	-	+	-	+	+	-	+	<i>Lb. brevis</i> 3	99,10	<i>Lb. brevis</i>
165	31	MRS	+	B	-	+	-	+	+	-	+	<i>Lb. brevis</i> 3	99,10	<i>Lb. brevis</i>

Ek 1 İzole edilen laktik asit bakterlerine ait bazı fenotipik test sonuçları ve 16S rRNA dizi analiz sonuçları (devam)

No	Turşu Örnek No	İzolasyon Besiyeri	Gram Boyama	Hücre Morfolojisi	Katalaz	Gaz Oluşturma	Farklı Sıcaklıklarda Gelişme			Oksidaz	Arjinin Hidroliz	API 50CH Test Sonuçları		16S rRNA
							10 °C	15 °C	45 °C			Cins ve Tür	%	
							170	33	MRS			+	B	
171	33	MRS	+	B	-	+	-	-	-	-	+	<i>Lb. brevis</i> 3	95,40	<i>Lb. brevis</i>
189	37	MRS	+	B	-	+	-	+	-	-	-	<i>Lb. brevis</i> 3	99,30	<i>Lb. brevis</i>
191	37	MRS	+	B	-	+	-	+	-	-	-	<i>Lb. brevis</i> 3	99,90	<i>Lb. brevis</i>
381	37	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. brevis</i> 3	99,90	<i>Lb. brevis</i>
186	38	MRS	+	B	-	+	-	+	-	-	+	<i>Lb. brevis</i> 3	99,70	<i>Lb. brevis</i>
181	36	MRS	+	K	-	+	-	-	-	-	-	<i>Lb. brevis</i> 3	94,70	-
156	19	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>Lb. brevis</i> 1 - <i>L. lactis ssp lactis</i> 1	36,80 - 29,00	<i>P. parvulus</i>
174	35	MRS	+	K	-	-	+	+	-	-	+	<i>Lb. brevis</i> 1	94,80	<i>P. ethanolidurans</i>
45	5	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>Lb. acidophilus</i> 1 - <i>P. damnosus</i> 2	61,20 - 34,90	<i>P. ethanolidurans</i>
52	5	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>Lb. acidophilus</i> 1 - <i>P. damnosus</i> 2	61,20 - 34,90	<i>P. ethanolidurans</i>
33	15	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>Lb. acidophilus</i> 1 - <i>P. damnosus</i> 2	80,20 - 18,70	<i>P. ethanolidurans</i>
131	16	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>Lb. acidophilus</i> 1 - <i>P. damnosus</i> 2	81,90 - 17,00	<i>P. ethanolidurans</i>
172	33	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>Lb. acidophilus</i> 1 - <i>P. damnosus</i> 2	87,20 - 9,70	<i>P. ethanolidurans</i>
48	5	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>Lb. acidophilus</i> 1 - <i>P. damnosus</i> 2	85,40 - 13,60	<i>Lb. buchneri</i>
163	24	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>Lb. acidophilus</i> 1 - <i>Lb. delbrueckii ssp lactis</i>	82,40 - 7,60	<i>P. ethanolidurans</i>
119	26	MRS	+	K	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. acidophilus</i> 1 - <i>Lb. delbrueckii ssp lactis</i>	39,90 - 39,30	-
54	5	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>Lb. acidophilus</i> 1	90,40	<i>P. ethanolidurans</i>
95	29	MRS	+	K	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. acidophilus</i> 1	91,50	<i>P. ethanolidurans</i>
167	31	MRS	+	K	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. acidophilus</i> 1	99,50	<i>P. ethanolidurans</i>
175	35	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>Lb. acidophilus</i> 1	92,50	<i>P. ethanolidurans</i>
155	19	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	<i>Lb. acidophilus</i> 1	92,90	-
92	25	MRS	+	B	-	-	-	+	-	-	-	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	92,10	<i>Lb. plantarum</i>
349	30	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. plantarum</i>
305	4	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Ek 1 İzole edilen laktik asit bakterlerine ait bazı fenotipik test sonuçları ve 16S rRNA dizi analiz sonuçları (devam)**

No	Turşu Örnek No	İzolasyon Besiyeri	Gram Boyama	Hücre Morfolojisi	Katalaz	Gaz Oluşturma	Farklı Sıcaklıklarda Gelişme			Oksidaz	Arjinin Hidroliz	API 50CH Test Sonuçları		16S rRNA
							10 °C	15 °C	45 °C			Cins ve Tür	%	
							288	9	M17			+	B	
224	22	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
127	23	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
220	24	M17	+	B	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
128	28	MRS	+	K	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
94	29	MRS	+	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
263	29	M17	+	B	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
180	30	MRS	+	B	-	+	-	+	-	-	+	-	-	



Ek 2 Bakterilerin SDS-PAGE hücre protein profilleri, API test ve 16S rRNA sonuçları

No	SDS PAGE Protein Hatları	API 50 CH Test Sonuçları		16S rRNA
		Cins ve Tür	%	
92		<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	92,10	<i>Lb. plantarum</i>
54		<i>Lb. acidophilus 1</i>	90,40	<i>P. ethanolidurans</i>
95		<i>Lb. acidophilus 1</i>	91,50	<i>P. ethanolidurans</i>
167		<i>Lb. acidophilus 1</i>	99,50	<i>P. ethanolidurans</i>
175		<i>Lb. acidophilus 1</i>	92,50	<i>P. ethanolidurans</i>
163		<i>Lb. acidophilus 1 - Lb. del. ssp lactis 2</i>	82,40 - 7,60	<i>P. ethanolidurans</i>
33		<i>Lb. acidophilus 1 - P. damnosus 2</i>	80,20 - 18,70	<i>P. ethanolidurans</i>
45		<i>Lb. acidophilus 1 - P. damnosus 2</i>	61,20 - 34,90	<i>P. ethanolidurans</i>
48		<i>Lb. acidophilus 1 - P. damnosus 2</i>	85,40 - 13,60	<i>Lb. buchneri</i>
131		<i>Lb. acidophilus 1 - P. damnosus 2</i>	81,90 - 17,00	<i>P. ethanolidurans</i>
172		<i>Lb. acidophilus 1 - P. damnosus 2</i>	87,20 - 9,70	<i>P. ethanolidurans</i>
52		<i>Lb. acidophilus 1 - P. damnosus 2</i>	61,20 - 34,90	<i>P. ethanolidurans</i>
174		<i>Lb. brevis 1</i>	94,80	<i>P. ethanolidurans</i>
156		<i>Lb. brevis 1 - Lc. l. ssp lactis 1</i>	36,80 - 29,00 - 21,70	<i>P. parvulus</i>
16		<i>Lb. brevis 3</i>	99,70	<i>Lb. brevis</i>
19		<i>Lb. brevis 3</i>	99,60	<i>Lb. brevis</i>
57		<i>Lb. brevis 3</i>	99,80	<i>Lb. brevis</i>
62		<i>Lb. brevis 3</i>	99,00	<i>Lb. brevis</i>
65		<i>Lb. brevis 3</i>	99,60	<i>Lb. brevis</i>
67		<i>Lb. brevis 3</i>	99,80	<i>Lb. brevis</i>
74		<i>Lb. brevis 3</i>	98,80	<i>Lb. namurensis</i>
78		<i>Lb. brevis 3</i>	99,20	<i>Lb. brevis</i>
80		<i>Lb. brevis 3</i>	99,60	<i>Lb. brevis</i>
82		<i>Lb. brevis 3</i>	99,70	<i>Lb. buchneri</i>
90		<i>Lb. brevis 3</i>	99,70	<i>Lb. buchneri</i>
96		<i>Lb. brevis 3</i>	99,10	<i>Lb. brevis</i>
104		<i>Lb. brevis 3</i>	99,50	<i>Lb. Brevis</i>
118		<i>Lb. brevis 3</i>	99,90	<i>Lb. brevis</i>
Std		kDa 200 150 120 100 85 70 60 50 40 30 25 20 15 10		

Ek 2 Bakterilerin SDS-PAGE hücre protein profilleri, API test ve 16S rRNA sonuçları

No	SDS PAGE Protein Hatları	API 50 CH Test Sonuçları		16S rRNA
		Cins ve Tür	%	
121		<i>Lb. brevis</i> 3	98,30	<i>Lb. brevis</i>
123		<i>Lb. brevis</i> 3	97,60	<i>Lb. brevis</i>
130		<i>Lb. brevis</i> 3	99,60	<i>Lb. namurensis</i>
137		<i>Lb. brevis</i> 3	99,60	<i>Lb. namurensis</i>
145		<i>Lb. brevis</i> 3	98,50	<i>Lb. namurensis</i>
147		<i>Lb. brevis</i> 3	94,00	<i>Lb. diolivorans</i>
149		<i>Lb. brevis</i> 3	98,70	<i>P. ethanolidurans</i>
154		<i>Lb. brevis</i> 3	91,60	<i>Lb. plantarum</i>
165		<i>Lb. brevis</i> 3	99,10	<i>Lb. brevis</i>
170		<i>Lb. brevis</i> 3	98,40	<i>Lb. brevis</i>
171		<i>Lb. brevis</i> 3	95,40	<i>Lb. brevis</i>
181		<i>Lb. brevis</i> 3	94,70	-
186		<i>Lb. brevis</i> 3	99,70	<i>Lb. brevis</i>
189		<i>Lb. brevis</i> 3	99,30	<i>Lb. brevis</i>
191		<i>Lb. brevis</i> 3	99,90	<i>Lb. brevis</i>
206		<i>Lb. brevis</i> 3	99,80	<i>Lb. brevis</i>
223		<i>Lb. brevis</i> 3	99,60	<i>Lb. plantarum</i>
247		<i>Lb. brevis</i> 3	99,40	<i>Lb. brevis</i>
258		<i>Lb. brevis</i> 3	95,40	<i>Lb. brevis</i>
281		<i>Lb. brevis</i> 3	98,70	<i>Lb. brevis</i>
313		<i>Lb. brevis</i> 3	99,90	<i>Lb. brevis</i>
325		<i>Lb. brevis</i> 3	97,80	<i>Lb. brevis</i>
329		<i>Lb. brevis</i> 3	96,40	<i>Lb. brevis</i>
330		<i>Lb. brevis</i> 3	98,60	<i>Lb. brevis</i>
331		<i>Lb. brevis</i> 3	99,60	<i>Lb. brevis</i>
381		<i>Lb. brevis</i> 3	99,90	<i>Lb. brevis</i>
40		<i>Lb. buchneri</i>	99,80	<i>Lb. buchneri</i>
41		<i>Lb. buchneri</i>	97,60	<i>P. ethanolidurans</i>
Std		kDa	200 150 120 100 85 70 60 50 40 30 25 20 15 10	

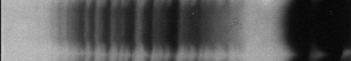
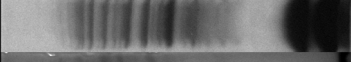

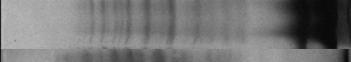
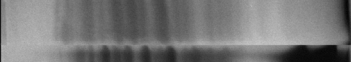
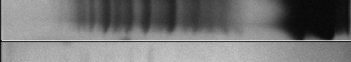
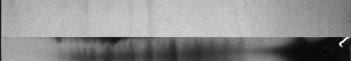
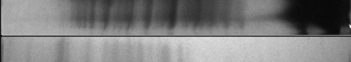

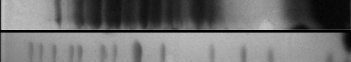

Ek 2 Bakterilerin SDS-PAGE hücre protein profilleri, API test ve 16S rRNA sonuçları

No	SDS PAGE Protein Hatları	API 50 CH Test Sonuçları		16S rRNA
		Cins ve Tür	%	
42		<i>Lb. buchneri</i>	99,70	<i>Lb. buchneri</i>
43		<i>Lb. buchneri</i>	99,80	-
53		<i>Lb. buchneri</i>	99,90	<i>Lb. buchneri</i>
107		<i>Lb. buchneri</i>	91,70	<i>Lb. buchneri</i>
109		<i>Lb. buchneri</i>	98,50	<i>Lb. buchneri</i>
136		<i>Lb. buchneri - Lb. brevis 2</i>	89,20 - 10,70	<i>Lb. buchneri</i>
13		<i>Lb. del. ssp lactis 2 - Lb. acidophilus 1</i>	52,30 - 40,30	<i>P. ethanolidurans</i>
69		<i>Lb. del. ssp lactis 2 - Lb. acidophilus 1</i>	52,30 - 40,30	<i>P. ethanolidurans</i>
102		<i>Lb. del. ssp lactis 2 - Lb. acidophilus 1</i>	49,90 - 40,50	<i>P. ethanolidurans</i>
113		<i>Lb. del. ssp lactis 2 - Lb. acidophilus 1</i>	52,30 - 40,30	<i>P. ethanolidurans</i>
160		<i>Lb. p. ssp paracasei 3</i>	96,90	<i>P. ethanolidurans</i>
1		<i>Lb. pentosus</i>	98,30	<i>Lb. brevis</i>
4		<i>Lb. pentosus</i>	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
195		<i>Lb. pentosus</i>	91,00	<i>Lb. brevis</i>
260		<i>Lb. pentosus</i>	99,50	<i>Lb. brevis</i>
227		<i>Lb. pentosus - Lb. brevis 1</i>	68,30 - 29,10	<i>Lb. brevis</i>
117		<i>Lb. pentosus - Lb. brevis 1</i>	75,80 - 15,10	<i>Lb. Brevis</i>
18		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
99		<i>Lb. plantarum 1</i>	98,10	<i>Lb. plantarum</i>
105		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
115		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
122		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
124		<i>Lb. plantarum 1</i>	98,90	<i>Lb. plantarum</i>
125		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,90	<i>P. ethanolidurans</i>
140		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
148		<i>Lb. plantarum 1</i>	98,10	<i>Lb. plantarum</i>
161		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
166		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
Std		kDa	200 150 120 100 85 70 60 50 40 30 25 20 15 10	

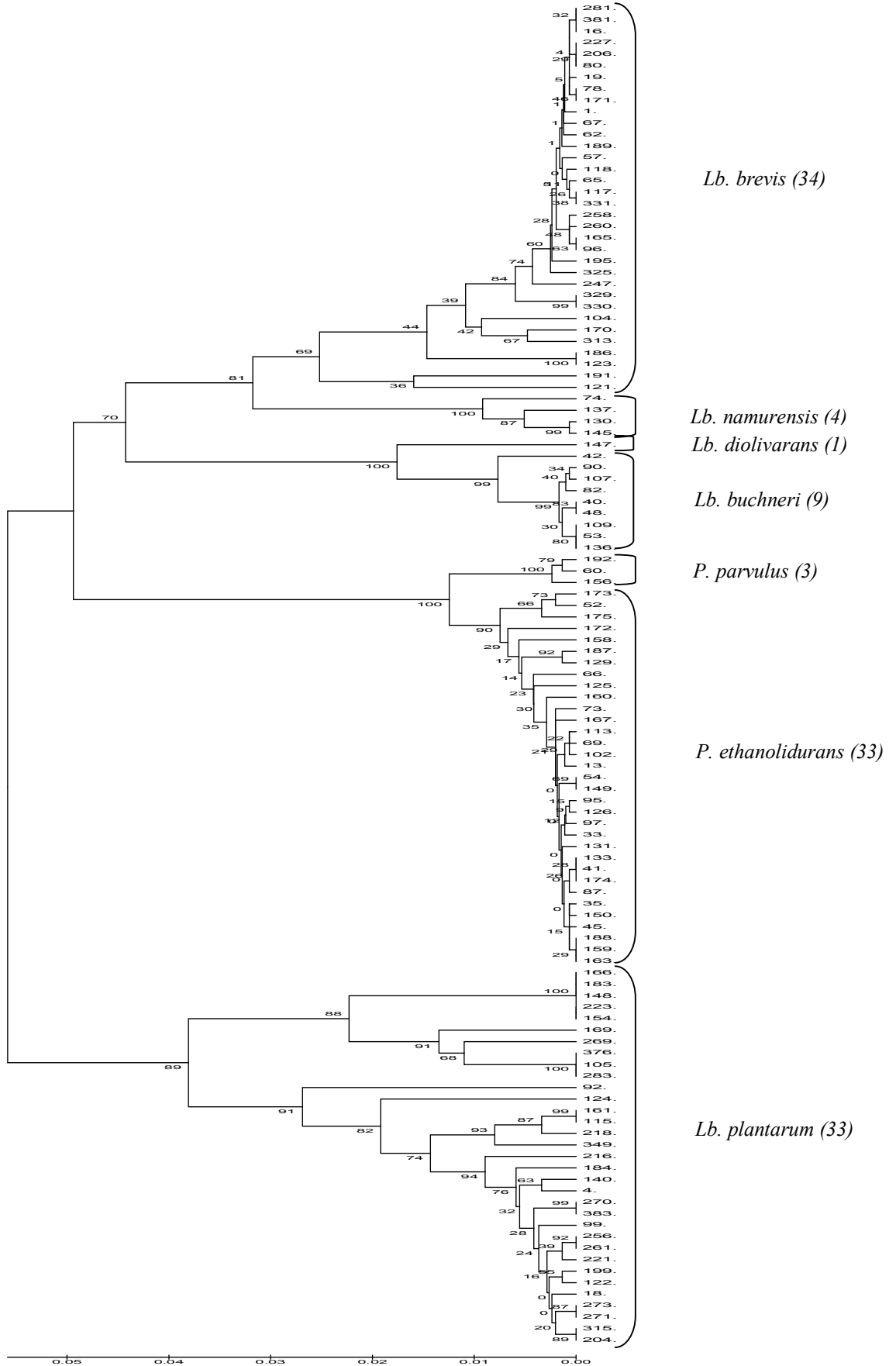
**Ek 2 Bakterilerin SDS-PAGE hücre protein profilleri, API test ve 16S rRNA sonuçları**

No	SDS PAGE Protein Hatları	API 50 CH Test Sonuçları		16S rRNA
		Cins ve Tür	%	
169		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
183		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
184		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
188		<i>Lb. plantarum 1</i>	94,20	<i>P. ethanolidurans</i>
199		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
204		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
216		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
218		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,70	<i>Lb. plantarum</i>
221		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
256		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
269		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,10	<i>Lb. plantarum</i>
270		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
271		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
273		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,30	<i>Lb. plantarum</i>
283		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
315		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
376		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
383		<i>Lb. plantarum 1</i>	99,90	<i>Lb. plantarum</i>
261		<i>Lb. plantarum 1 - Lb pentosus</i>	68,90 - 30,30	<i>Lb. plantarum</i>
150		<i>P. damnosus 1</i>	99,80	<i>P. ethanolidurans</i>
35		<i>P. damnosus 2</i>	98,70	<i>P. ethanolidurans</i>
60		<i>P. damnosus 2</i>	99,20	<i>P. parvulus</i>
87		<i>P. damnosus 2</i>	98,60	<i>P. ethanolidurans</i>
97		<i>P. damnosus 2</i>	96,90	<i>P. ethanolidurans</i>
129		<i>P. damnosus 2</i>	96,40	<i>P. ethanolidurans</i>
133		<i>P. damnosus 2</i>	99,90	<i>P. ethanolidurans</i>
173		<i>P. damnosus 2</i>	99,50	<i>P. ethanolidurans</i>
158		<i>Pediococcus spp</i>	99,50	<i>P. ethanolidurans</i>
Std		kDa 200 150 120 100 85 70 60 50 40 30 25 20 15 10		

**Ek 2 Bakterilerin SDS-PAGE hücre protein profilleri, API test ve 16S rRNA sonuçları**

No	SDS PAGE Protein Hatları	API 50 CH Test Sonuçları		16S rRNA
		Cins ve Tür	%	
159		<i>Pediococcus spp - Lb. acidophilus 1</i>	82,60 - 13,60	<i>P. ethanolidurans</i>
187		<i>Pediococcus spp - Lb. acidophilus 1</i>	82,60 - 13,60	<i>P. ethanolidurans</i>
192		<i>Pediococcus spp - T. Halophilus</i>	43,50 - 20,70 - 18,90	<i>P. parvulus</i>
126		<i>T. halophilus - Lb. brevis 1</i>	56,00 - 31,00 - 10,10	<i>P. ethanolidurans</i>
66		<i>Weissella confusa</i>	99,40	<i>P. ethanolidurans</i>
73		<i>Weissella confusa - Lb. brevis 1</i>	62,80 - 32,50	<i>P. ethanolidurans</i>
349		Tanımlanamadı	-	<i>Lb. plantarum</i>
94		Tanımlanamadı	-	-
180		Tanımlanamadı	-	-
263		Tanımlanamadı	-	-
Std		kDa 200 150 120 100 85 70 60 50 40 30 25 20 15 10		

Ek 3 16S rRNA dizi analiz sonuçlarına göre bakterilerin dendogram üzerinde gösterimi



**Ek 4 LAB türlerinin farklı tuz, pH değerlerindeki gelişme özellikleri ve asit üretim miktarları**

No	Tür	OD 600										% Laktik asit			
		% 0 tuz	% 3 tuz	% 6,5 tuz	% 10 tuz	% 12 tuz	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6,5	pH 9,6	12. h	24. h	48. h
1	<i>Lb. brevis</i>	2,15 ± 0,02	2,16 ± 0,04	1,65 ± 0,35	0,08 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,02	0,53 ± 0,02	1,02 ± 0,02	1,02 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,67 ± 0,02
16	<i>Lb. brevis</i>	1,99 ± 0,01	1,42 ± 0,00	1,51 ± 0,03	0,17 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,65 ± 0,01	0,98 ± 0,05	0,80 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,03	0,31 ± 0,01
19	<i>Lb. brevis</i>	2,09 ± 0,00	1,60 ± 0,00	1,50 ± 0,05	0,09 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,50 ± 0,01	1,22 ± 0,00	1,35 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,28 ± 0,01	0,66 ± 0,02
57	<i>Lb. brevis</i>	2,08 ± 0,00	1,66 ± 0,03	1,31 ± 0,04	0,06 ± 0,03	0,02 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,55 ± 0,06	0,89 ± 0,06	0,77 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,37 ± 0,03	0,68 ± 0,02
62	<i>Lb. brevis</i>	2,10 ± 0,05	2,19 ± 0,00	1,70 ± 0,12	0,07 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,47 ± 0,03	1,13 ± 0,00	1,15 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,75 ± 0,02
65	<i>Lb. brevis</i>	2,15 ± 0,02	1,82 ± 0,00	1,60 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,02	0,63 ± 0,02	0,92 ± 0,01	0,77 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,02	0,37 ± 0,02	0,72 ± 0,05
67	<i>Lb. brevis</i>	2,10 ± 0,00	1,73 ± 0,02	1,59 ± 0,00	0,14 ± 0,03	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,80 ± 0,00	1,02 ± 0,04	0,97 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,67 ± 0,02
78	<i>Lb. brevis</i>	2,21 ± 0,00	1,82 ± 0,05	1,70 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,02	0,78 ± 0,01	1,21 ± 0,02	0,88 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,33 ± 0,02	0,73 ± 0,03
80	<i>Lb. brevis</i>	2,12 ± 0,00	1,51 ± 0,00	1,56 ± 0,00	0,22 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,04	0,04 ± 0,01	0,61 ± 0,01	1,10 ± 0,01	1,45 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,39 ± 0,02	0,75 ± 0,02
96	<i>Lb. brevis</i>	2,18 ± 0,00	1,70 ± 0,05	1,65 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,72 ± 0,00	0,91 ± 0,03	0,78 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,24 ± 0,02	0,70 ± 0,01
104	<i>Lb. brevis</i>	2,07 ± 0,03	1,56 ± 0,02	1,69 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,85 ± 0,02	1,06 ± 0,01	1,02 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,70 ± 0,02
117	<i>Lb. brevis</i>	2,23 ± 0,00	1,98 ± 0,01	1,92 ± 0,00	0,07 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,59 ± 0,02	1,33 ± 0,01	1,04 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,63 ± 0,01
118	<i>Lb. brevis</i>	2,08 ± 0,04	1,87 ± 0,02	1,50 ± 0,29	0,10 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,90 ± 0,02	1,12 ± 0,01	1,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,67 ± 0,02
121	<i>Lb. brevis</i>	2,09 ± 0,01	1,84 ± 0,02	1,85 ± 0,02	0,23 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,92 ± 0,00	1,06 ± 0,07	1,07 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,01	0,22 ± 0,04	0,60 ± 0,02
123	<i>Lb. brevis</i>	2,15 ± 0,01	1,83 ± 0,02	1,16 ± 0,03	0,07 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,02	0,05 ± 0,00	0,83 ± 0,00	1,07 ± 0,00	1,15 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,02	0,19 ± 0,10	0,69 ± 0,03
165	<i>Lb. brevis</i>	2,11 ± 0,00	1,96 ± 0,19	1,14 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,80 ± 0,05	1,02 ± 0,03	0,97 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,51 ± 0,02
170	<i>Lb. brevis</i>	2,06 ± 0,01	1,65 ± 0,06	1,32 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,65 ± 0,03	0,84 ± 0,02	0,90 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,69 ± 0,02
171	<i>Lb. brevis</i>	2,24 ± 0,03	1,74 ± 0,02	1,44 ± 0,06	0,11 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,02	0,05 ± 0,00	0,75 ± 0,03	1,05 ± 0,00	0,78 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,63 ± 0,02
186	<i>Lb. brevis</i>	2,13 ± 0,00	1,62 ± 0,02	1,58 ± 0,08	0,08 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,81 ± 0,02	0,97 ± 0,05	1,04 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,36 ± 0,03	0,70 ± 0,01
189	<i>Lb. brevis</i>	2,21 ± 0,01	1,63 ± 0,00	0,33 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,04	0,07 ± 0,00	0,56 ± 0,00	1,00 ± 0,05	0,79 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,57 ± 0,02	0,82 ± 0,04
191	<i>Lb. brevis</i>	2,17 ± 0,00	1,63 ± 0,00	0,66 ± 0,07	0,03 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,03	0,01 ± 0,02	0,81 ± 0,04	1,29 ± 0,05	1,42 ± 0,07	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,81 ± 0,07
195	<i>Lb. brevis</i>	2,15 ± 0,00	1,90 ± 0,01	1,13 ± 0,06	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,03	0,54 ± 0,02	1,04 ± 0,00	1,06 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,24 ± 0,02	0,70 ± 0,03
206	<i>Lb. brevis</i>	2,15 ± 0,02	1,63 ± 0,03	1,18 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,45 ± 0,03	1,21 ± 0,01	1,23 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,38 ± 0,02	0,73 ± 0,02
227	<i>Lb. brevis</i>	2,17 ± 0,00	1,72 ± 0,00	1,42 ± 0,11	0,13 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,63 ± 0,01	1,19 ± 0,02	1,12 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,73 ± 0,02
247	<i>Lb. brevis</i>	2,14 ± 0,00	1,74 ± 0,01	1,63 ± 0,00	0,25 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,64 ± 0,01	1,14 ± 0,01	1,25 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,46 ± 0,04	0,75 ± 0,03
258	<i>Lb. brevis</i>	2,16 ± 0,01	1,84 ± 0,01	1,80 ± 0,00	0,17 ± 0,06	0,03 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,80 ± 0,05	1,22 ± 0,02	1,20 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,39 ± 0,03	0,63 ± 0,01
260	<i>Lb. brevis</i>	2,26 ± 0,00	1,84 ± 0,00	1,48 ± 0,01	0,09 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,62 ± 0,00	0,91 ± 0,00	0,84 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,42 ± 0,01	0,71 ± 0,02
281	<i>Lb. brevis</i>	2,19 ± 0,01	1,68 ± 0,01	1,30 ± 0,13	0,11 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,56 ± 0,02	1,27 ± 0,02	1,25 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,35 ± 0,00	0,66 ± 0,02
313	<i>Lb. brevis</i>	2,23 ± 0,00	1,70 ± 0,01	1,59 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,57 ± 0,04	1,15 ± 0,00	1,40 ± 0,11	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,57 ± 0,02	0,81 ± 0,02
325	<i>Lb. brevis</i>	2,31 ± 0,00	2,17 ± 0,02	1,27 ± 0,07	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,99 ± 0,03	1,26 ± 0,00	1,25 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,67 ± 0,02
329	<i>Lb. brevis</i>	2,23 ± 0,00	1,96 ± 0,01	1,44 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,66 ± 0,02	1,39 ± 0,02	1,21 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,65 ± 0,00
330	<i>Lb. brevis</i>	2,11 ± 0,01	1,90 ± 0,01	1,66 ± 0,56	0,08 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,66 ± 0,01	1,31 ± 0,01	1,19 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,35 ± 0,03	0,67 ± 0,01
331	<i>Lb. brevis</i>	2,19 ± 0,00	1,90 ± 0,02	1,05 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,05 ± 0,03	0,86 ± 0,04	1,31 ± 0,00	1,46 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,64 ± 0,02
381	<i>Lb. brevis</i>	2,16 ± 0,00	1,61 ± 0,01	1,69 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,48 ± 0,00	1,04 ± 0,03	1,19 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,73 ± 0,03
40	<i>Lb. buchneri</i>	2,08 ± 0,02	1,98 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,31 ± 0,00	0,92 ± 0,00	0,44 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,02	0,42 ± 0,04

**Ek 4 LAB türlerinin farklı tuz, pH değerlerindeki gelişme özellikleri ve asit üretim miktarları**

No	Tür	OD 600										% Laktik asit			
		% 0 tuz	% 3 tuz	% 6,5 tuz	% 10 tuz	% 12 tuz	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6,5	pH 9,6	12. h	24. h	48. h
42	<i>Lb. buchneri</i>	2,17 ± 0,06	1,98 ± 0,00	0,94 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,57 ± 0,02	1,13 ± 0,00	0,22 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,44 ± 0,01
48	<i>Lb. buchneri</i>	2,01 ± 0,00	1,46 ± 0,05	0,47 ± 0,00	0,43 ± 0,03	0,03 ± 0,00	0,01 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,99 ± 0,04	0,51 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,89 ± 0,01
53	<i>Lb. buchneri</i>	2,08 ± 0,01	1,83 ± 0,01	0,08 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,33 ± 0,01	0,90 ± 0,04	0,56 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,50 ± 0,03
82	<i>Lb. buchneri</i>	1,98 ± 0,00	1,85 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,82 ± 0,02	0,45 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,07 ± 0,03	0,44 ± 0,06
90	<i>Lb. buchneri</i>	2,04 ± 0,00	1,90 ± 0,00	1,30 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,66 ± 0,02	0,52 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,23 ± 0,03
107	<i>Lb. buchneri</i>	2,10 ± 0,01	1,93 ± 0,01	0,79 ± 0,13	0,03 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,32 ± 0,00	1,05 ± 0,01	0,50 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,78 ± 0,26
109	<i>Lb. buchneri</i>	2,35 ± 0,03	2,19 ± 0,03	2,28 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,16 ± 0,01	0,94 ± 0,07	0,77 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,29 ± 0,02
136	<i>Lb. buchneri</i>	2,06 ± 0,00	1,92 ± 0,01	0,88 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,62 ± 0,07	0,50 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,30 ± 0,02
147	<i>Lb. diolivorans</i>	2,14 ± 0,00	2,06 ± 0,01	0,06 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,02	0,59 ± 0,01	1,46 ± 0,07	1,56 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,71 ± 0,03
74	<i>Lb. namurensis</i>	2,08 ± 0,00	1,83 ± 0,00	1,47 ± 0,01	0,47 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,05 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,52 ± 0,03	0,86 ± 0,00	0,83 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,18 ± 0,03	0,61 ± 0,03
130	<i>Lb. namurensis</i>	2,00 ± 0,00	1,78 ± 0,01	0,57 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,04	0,13 ± 0,13	0,58 ± 0,04	0,88 ± 0,02	0,63 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,04	0,18 ± 0,01	0,39 ± 0,02
137	<i>Lb. namurensis</i>	1,71 ± 0,01	0,68 ± 0,00	0,84 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,02	0,48 ± 0,01	0,95 ± 0,03	0,35 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,03	0,18 ± 0,01	0,44 ± 0,02
145	<i>Lb. namurensis</i>	2,03 ± 0,01	1,53 ± 0,14	0,86 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,69 ± 0,00	0,96 ± 0,01	0,83 ± 0,18	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,05	0,16 ± 0,02	0,59 ± 0,04
4	<i>Lb. plantarum</i>	2,49 ± 0,01	2,30 ± 0,00	2,19 ± 0,02	1,69 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,00	1,63 ± 0,00	2,35 ± 0,01	2,47 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,19 ± 0,02	1,31 ± 0,02	1,60 ± 0,01
18	<i>Lb. plantarum</i>	2,51 ± 0,01	2,29 ± 0,00	2,15 ± 0,01	1,35 ± 0,05	0,05 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,11 ± 0,02	1,73 ± 0,02	2,34 ± 0,02	2,44 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,26 ± 0,03	1,25 ± 0,02	1,52 ± 0,02
92	<i>Lb. plantarum</i>	2,40 ± 0,02	2,19 ± 0,02	2,36 ± 0,00	1,27 ± 0,18	0,03 ± 0,04	0,10 ± 0,02	0,22 ± 0,03	1,82 ± 0,04	2,41 ± 0,02	2,44 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,19 ± 0,01	1,11 ± 0,10	1,43 ± 0,02
99	<i>Lb. plantarum</i>	2,46 ± 0,01	2,42 ± 0,01	2,15 ± 0,01	1,26 ± 0,05	0,10 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,25 ± 0,02	1,70 ± 0,00	2,26 ± 0,00	2,31 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,13 ± 0,03	1,13 ± 0,03	1,54 ± 0,01
105	<i>Lb. plantarum</i>	2,50 ± 0,00	2,32 ± 0,01	2,06 ± 0,10	0,07 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,26 ± 0,02	1,69 ± 0,07	2,22 ± 0,04	2,41 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,15 ± 0,02	1,14 ± 0,01	1,49 ± 0,02
115	<i>Lb. plantarum</i>	2,46 ± 0,01	2,42 ± 0,00	2,16 ± 0,02	1,30 ± 0,18	0,02 ± 0,00	0,11 ± 0,02	0,20 ± 0,02	1,53 ± 0,07	2,35 ± 0,00	2,36 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,23 ± 0,02	1,21 ± 0,01	1,50 ± 0,02
122	<i>Lb. plantarum</i>	2,48 ± 0,00	2,42 ± 0,01	2,22 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,27 ± 0,00	1,71 ± 0,00	2,21 ± 0,01	2,30 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,00	1,33 ± 0,02	1,52 ± 0,02
124	<i>Lb. plantarum</i>	2,50 ± 0,02	2,27 ± 0,01	2,21 ± 0,01	0,36 ± 0,26	0,05 ± 0,00	0,08 ± 0,02	0,09 ± 0,00	1,41 ± 0,02	2,32 ± 0,00	2,48 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,02	0,95 ± 0,06	1,52 ± 0,03
140	<i>Lb. plantarum</i>	2,55 ± 0,03	2,46 ± 0,01	2,23 ± 0,00	1,28 ± 0,07	0,04 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,31 ± 0,01	1,83 ± 0,01	2,40 ± 0,00	2,40 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,06 ± 0,03	1,07 ± 0,02	1,59 ± 0,03
148	<i>Lb. plantarum</i>	2,32 ± 0,00	2,25 ± 0,02	2,21 ± 0,02	1,50 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,29 ± 0,00	1,79 ± 0,00	2,28 ± 0,01	2,35 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,96 ± 0,01	1,47 ± 0,02
154	<i>Lb. plantarum</i>	2,10 ± 0,00	1,84 ± 0,01	1,95 ± 0,00	0,25 ± 0,06	0,03 ± 0,02	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,00	1,42 ± 0,02	1,97 ± 0,01	1,91 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,01	0,29 ± 0,00	0,69 ± 0,03
161	<i>Lb. plantarum</i>	2,50 ± 0,00	2,46 ± 0,01	2,25 ± 0,01	0,19 ± 0,08	0,03 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,30 ± 0,01	1,86 ± 0,00	2,36 ± 0,00	2,40 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,07	1,03 ± 0,01	1,56 ± 0,03
166	<i>Lb. plantarum</i>	2,36 ± 0,01	2,22 ± 0,02	2,08 ± 0,01	0,13 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,33 ± 0,01	1,87 ± 0,03	2,32 ± 0,02	2,38 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,15 ± 0,02	1,14 ± 0,02	1,54 ± 0,03
169	<i>Lb. plantarum</i>	2,57 ± 0,00	2,47 ± 0,01	2,14 ± 0,04	0,79 ± 0,19	0,02 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,28 ± 0,07	1,83 ± 0,00	2,40 ± 0,01	2,46 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,05	1,05 ± 0,01	1,50 ± 0,02
183	<i>Lb. plantarum</i>	2,49 ± 0,01	2,32 ± 0,01	2,26 ± 0,00	0,38 ± 0,07	0,05 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,19 ± 0,00	1,87 ± 0,00	2,37 ± 0,02	2,36 ± 0,00	0,08 ± 0,02	0,27 ± 0,06	1,12 ± 0,02	1,56 ± 0,05
184	<i>Lb. plantarum</i>	2,57 ± 0,00	2,37 ± 0,00	2,06 ± 0,00	0,18 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,13 ± 0,01	1,65 ± 0,02	2,32 ± 0,00	2,44 ± 0,03	0,05 ± 0,06	0,32 ± 0,05	1,14 ± 0,02	1,51 ± 0,02
199	<i>Lb. plantarum</i>	2,49 ± 0,01	2,30 ± 0,00	1,10 ± 0,07	0,08 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,02	0,18 ± 0,01	1,73 ± 0,02	2,26 ± 0,01	2,48 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,25 ± 0,02	1,16 ± 0,02	1,46 ± 0,02
204	<i>Lb. plantarum</i>	2,48 ± 0,00	2,30 ± 0,00	2,13 ± 0,10	0,08 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,16 ± 0,01	1,67 ± 0,00	2,30 ± 0,01	2,48 ± 0,02	0,05 ± 0,00	0,27 ± 0,01	1,12 ± 0,01	1,55 ± 0,04
216	<i>Lb. plantarum</i>	2,55 ± 0,00	2,36 ± 0,00	2,17 ± 0,04	0,31 ± 0,04	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,04	0,14 ± 0,01	1,47 ± 0,03	2,26 ± 0,01	2,44 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,19 ± 0,01	1,08 ± 0,02	1,47 ± 0,03
218	<i>Lb. plantarum</i>	2,41 ± 0,00	2,47 ± 0,00	2,17 ± 0,03	0,76 ± 0,17	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,04	0,12 ± 0,02	1,75 ± 0,01	2,39 ± 0,03	2,52 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,39 ± 0,05	1,17 ± 0,01	1,44 ± 0,05
221	<i>Lb. plantarum</i>	2,50 ± 0,00	2,33 ± 0,02	2,26 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,04 ± 0,05	0,19 ± 0,02	1,79 ± 0,01	2,04 ± 0,06	2,53 ± 0,03	0,05 ± 0,01	0,37 ± 0,07	1,12 ± 0,02	1,47 ± 0,02
223	<i>Lb. plantarum</i>	2,16 ± 0,00	1,82 ± 0,02	1,78 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,02	0,86 ± 0,02	1,13 ± 0,02	1,22 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,01	0,35 ± 0,03	0,59 ± 0,02



**Ek 4 LAB türlerinin farklı tuz, pH değerlerindeki gelişme özellikleri ve asit üretim miktarları**

No	Tür	OD 600										% Laktik asit			
		% 0 tuz	% 3 tuz	% 6,5 tuz	% 10 tuz	% 12 tuz	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6,5	pH 9,6	12. h	24. h	48. h
256	<i>Lb. plantarum</i>	2,47 ± 0,01	2,17 ± 0,00	1,85 ± 0,03	0,40 ± 0,02	0,04 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,01	1,39 ± 0,01	2,22 ± 0,00	2,44 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,11 ± 0,03	1,05 ± 0,01	1,54 ± 0,02
261	<i>Lb. plantarum</i>	2,50 ± 0,00	2,31 ± 0,00	2,21 ± 0,01	1,21 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,03	0,11 ± 0,01	1,61 ± 0,02	2,35 ± 0,00	2,52 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,23 ± 0,03	1,17 ± 0,01	1,51 ± 0,02
269	<i>Lb. plantarum</i>	2,55 ± 0,00	2,32 ± 0,00	2,17 ± 0,00	1,12 ± 0,10	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,03	0,20 ± 0,00	1,51 ± 0,01	1,99 ± 0,04	2,53 ± 0,03	0,06 ± 0,00	0,26 ± 0,01	1,08 ± 0,02	1,53 ± 0,02
270	<i>Lb. plantarum</i>	2,53 ± 0,00	2,31 ± 0,00	2,16 ± 0,02	1,54 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,04	0,18 ± 0,00	1,72 ± 0,02	2,38 ± 0,00	2,53 ± 0,00	0,04 ± 0,05	0,31 ± 0,05	1,29 ± 0,03	1,48 ± 0,02
271	<i>Lb. plantarum</i>	2,51 ± 0,01	2,53 ± 0,00	2,22 ± 0,01	0,16 ± 0,12	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,25 ± 0,00	1,74 ± 0,03	2,21 ± 0,00	2,50 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,26 ± 0,01	1,10 ± 0,03	1,54 ± 0,04
273	<i>Lb. plantarum</i>	2,47 ± 0,01	2,29 ± 0,01	2,28 ± 0,00	0,63 ± 0,14	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,09 ± 0,03	1,67 ± 0,02	2,26 ± 0,03	2,41 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,23 ± 0,02	1,22 ± 0,01	1,47 ± 0,02
283	<i>Lb. plantarum</i>	2,57 ± 0,00	2,48 ± 0,00	2,03 ± 0,10	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,16 ± 0,05	1,42 ± 0,01	2,10 ± 0,00	2,48 ± 0,02	0,08 ± 0,00	0,20 ± 0,03	0,89 ± 0,02	1,45 ± 0,03
315	<i>Lb. plantarum</i>	2,57 ± 0,00	2,38 ± 0,02	2,34 ± 0,01	0,20 ± 0,13	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,02	0,24 ± 0,02	1,59 ± 0,04	2,15 ± 0,06	2,57 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,27 ± 0,01	1,00 ± 0,02	1,44 ± 0,01
349	<i>Lb. plantarum</i>	2,57 ± 0,00	2,48 ± 0,00	2,15 ± 0,02	1,10 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,21 ± 0,02	1,85 ± 0,02	2,42 ± 0,00	2,43 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,25 ± 0,05	1,20 ± 0,06	1,52 ± 0,01
376	<i>Lb. plantarum</i>	2,50 ± 0,00	2,41 ± 0,00	2,14 ± 0,01	0,20 ± 0,03	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,03	0,12 ± 0,00	1,66 ± 0,02	2,37 ± 0,00	2,55 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,19 ± 0,02	1,25 ± 0,05	1,56 ± 0,03
383	<i>Lb. plantarum</i>	2,60 ± 0,02	2,25 ± 0,03	2,12 ± 0,00	1,35 ± 0,02	0,07 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,20 ± 0,01	1,49 ± 0,02	2,27 ± 0,01	2,48 ± 0,02	0,06 ± 0,00	0,20 ± 0,02	1,10 ± 0,01	1,41 ± 0,03
13	<i>P. ethanolidurans</i>	2,08 ± 0,00	1,83 ± 0,00	1,27 ± 0,09	0,99 ± 0,02	0,26 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,03	0,49 ± 0,00	1,41 ± 0,00	1,05 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,43 ± 0,03	1,03 ± 0,02
33	<i>P. ethanolidurans</i>	2,05 ± 0,01	1,98 ± 0,05	1,29 ± 0,00	1,16 ± 0,00	0,14 ± 0,02	0,02 ± 0,03	0,06 ± 0,04	0,51 ± 0,02	1,37 ± 0,05	0,57 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,33 ± 0,01	1,00 ± 0,02
35	<i>P. ethanolidurans</i>	2,13 ± 0,01	1,85 ± 0,01	1,11 ± 0,02	1,31 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,19 ± 0,01	1,26 ± 0,00	0,97 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,36 ± 0,02	0,95 ± 0,03
41	<i>P. ethanolidurans</i>	1,91 ± 0,00	1,84 ± 0,00	0,47 ± 0,01	0,77 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,02	0,37 ± 0,02	1,11 ± 0,01	0,48 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,03	0,27 ± 0,03	0,91 ± 0,01
45	<i>P. ethanolidurans</i>	1,89 ± 0,00	1,59 ± 0,00	0,40 ± 0,01	0,49 ± 0,11	0,17 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,49 ± 0,02	1,12 ± 0,01	0,35 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,03	0,26 ± 0,01	0,93 ± 0,02
52	<i>P. ethanolidurans</i>	2,02 ± 0,01	1,47 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,73 ± 0,10	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,02	0,01 ± 0,02	0,47 ± 0,01	1,18 ± 0,01	0,50 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,02	0,23 ± 0,03	0,92 ± 0,02
54	<i>P. ethanolidurans</i>	1,79 ± 0,09	1,49 ± 0,00	0,76 ± 0,01	0,71 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,45 ± 0,02	1,11 ± 0,02	0,45 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,93 ± 0,01
66	<i>P. ethanolidurans</i>	2,00 ± 0,01	1,90 ± 0,01	1,33 ± 0,01	1,17 ± 0,07	0,08 ± 0,04	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,43 ± 0,01	1,05 ± 0,00	0,56 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,29 ± 0,00	0,82 ± 0,01
69	<i>P. ethanolidurans</i>	2,22 ± 0,00	1,93 ± 0,00	1,77 ± 0,03	1,33 ± 0,04	0,07 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,02	0,38 ± 0,00	1,46 ± 0,01	1,29 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,01	0,80 ± 0,01
73	<i>P. ethanolidurans</i>	2,06 ± 0,00	1,99 ± 0,01	1,13 ± 0,01	1,03 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,06 ± 0,03	0,49 ± 0,00	1,25 ± 0,01	0,76 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,95 ± 0,02
87	<i>P. ethanolidurans</i>	2,19 ± 0,01	1,70 ± 0,02	0,81 ± 0,00	0,90 ± 0,04	0,12 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,24 ± 0,01	1,35 ± 0,00	0,89 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,36 ± 0,03	1,13 ± 0,01
95	<i>P. ethanolidurans</i>	2,11 ± 0,00	1,85 ± 0,01	1,34 ± 0,07	0,58 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,14 ± 0,00	1,17 ± 0,00	0,71 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,37 ± 0,04	0,91 ± 0,01
97	<i>P. ethanolidurans</i>	1,88 ± 0,03	1,88 ± 0,03	0,68 ± 0,12	0,24 ± 0,05	0,04 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,28 ± 0,02	0,39 ± 0,03	1,04 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,25 ± 0,01	0,99 ± 0,03
102	<i>P. ethanolidurans</i>	2,11 ± 0,03	1,82 ± 0,01	1,46 ± 0,55	0,17 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,94 ± 0,03	0,71 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,73 ± 0,06
113	<i>P. ethanolidurans</i>	2,21 ± 0,00	1,89 ± 0,01	1,10 ± 0,14	1,16 ± 0,03	0,20 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,36 ± 0,02	1,26 ± 0,01	1,14 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,41 ± 0,06	1,00 ± 0,03
125	<i>P. ethanolidurans</i>	2,24 ± 0,02	1,73 ± 0,03	0,92 ± 0,01	1,43 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,07 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,14 ± 0,00	1,33 ± 0,02	0,86 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,02	0,29 ± 0,02	1,07 ± 0,03
126	<i>P. ethanolidurans</i>	2,17 ± 0,01	1,95 ± 0,01	1,37 ± 0,03	1,35 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,66 ± 0,04	1,23 ± 0,03	0,99 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,04	0,33 ± 0,01	1,00 ± 0,02
129	<i>P. ethanolidurans</i>	2,10 ± 0,00	1,85 ± 0,00	1,25 ± 0,03	1,14 ± 0,01	0,12 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,26 ± 0,01	1,44 ± 0,00	1,14 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,02	0,33 ± 0,03	0,95 ± 0,00
131	<i>P. ethanolidurans</i>	2,16 ± 0,01	1,90 ± 0,02	1,03 ± 0,09	1,22 ± 0,00	0,24 ± 0,07	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,58 ± 0,02	1,31 ± 0,02	0,46 ± 0,07	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,05	0,30 ± 0,02	1,13 ± 0,00
133	<i>P. ethanolidurans</i>	2,17 ± 0,01	1,86 ± 0,03	1,05 ± 0,06	1,08 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,12 ± 0,01	1,19 ± 0,02	0,69 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,03	0,25 ± 0,00	0,95 ± 0,02
149	<i>P. ethanolidurans</i>	2,14 ± 0,00	2,02 ± 0,01	1,94 ± 0,04	0,32 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,95 ± 0,03	1,10 ± 0,01	1,10 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,02	0,12 ± 0,07	0,55 ± 0,04
150	<i>P. ethanolidurans</i>	1,90 ± 0,01	1,52 ± 0,02	0,59 ± 0,15	0,22 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,02	0,55 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,95 ± 0,01
158	<i>P. ethanolidurans</i>	2,13 ± 0,00	1,86 ± 0,07	1,27 ± 0,24	0,13 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,01	1,35 ± 0,01	0,68 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,01	0,36 ± 0,01	1,04 ± 0,01
159	<i>P. ethanolidurans</i>	2,20 ± 0,00	1,92 ± 0,02	1,74 ± 0,01	1,21 ± 0,05	0,11 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,18 ± 0,00	1,18 ± 0,02	0,82 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,02	0,33 ± 0,02	1,03 ± 0,01

**Ek 4 LAB türlerinin farklı tuz, pH değerlerindeki gelişme özellikleri ve asit üretim miktarları**

No	Tür	OD 600										% Laktik asit			
		% 0 tuz	% 3 tuz	% 6,5 tuz	% 10 tuz	% 12 tuz	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6,5	pH 9,6	12. h	24. h	48. h
160	<i>P. ethanolidurans</i>	2,06 ± 0,00	1,89 ± 0,00	0,86 ± 0,04	0,78 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,31 ± 0,02	0,59 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,03	0,21 ± 0,01	1,07 ± 0,02
163	<i>P. ethanolidurans</i>	2,11 ± 0,02	2,00 ± 0,02	1,34 ± 0,02	1,29 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,16 ± 0,02	0,84 ± 0,08	0,80 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,03	0,21 ± 0,01	0,87 ± 0,01
167	<i>P. ethanolidurans</i>	1,78 ± 0,00	1,71 ± 0,01	0,72 ± 0,00	0,68 ± 0,23	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,04	0,08 ± 0,01	0,52 ± 0,00	1,12 ± 0,02	0,52 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,88 ± 0,02
172	<i>P. ethanolidurans</i>	1,80 ± 0,01	1,44 ± 0,02	1,24 ± 0,01	1,14 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,01	1,19 ± 0,08	0,75 ± 0,07	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,22 ± 0,04	0,99 ± 0,03
173	<i>P. ethanolidurans</i>	2,29 ± 0,02	1,94 ± 0,02	1,09 ± 0,01	1,25 ± 0,02	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,21 ± 0,01	1,50 ± 0,01	1,04 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,26 ± 0,01	1,17 ± 0,05
174	<i>P. ethanolidurans</i>	1,84 ± 0,01	1,78 ± 0,01	0,98 ± 0,21	0,79 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,02	0,40 ± 0,00	0,72 ± 0,01	0,44 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,70 ± 0,04
175	<i>P. ethanolidurans</i>	2,29 ± 0,01	1,91 ± 0,00	1,43 ± 0,02	1,13 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,42 ± 0,03	0,88 ± 0,00	0,83 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,03	0,23 ± 0,05	1,01 ± 0,04
187	<i>P. ethanolidurans</i>	2,27 ± 0,00	2,00 ± 0,01	1,01 ± 0,05	1,30 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,01 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,34 ± 0,02	1,53 ± 0,00	1,14 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,01	0,26 ± 0,04	0,92 ± 0,04
188	<i>P. ethanolidurans</i>	2,18 ± 0,01	1,91 ± 0,02	1,33 ± 0,12	1,13 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,35 ± 0,04	0,86 ± 0,09	0,55 ± 0,07	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,58 ± 0,02
60	<i>P. parvulus</i>	2,15 ± 0,01	2,02 ± 0,00	0,41 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,02	0,04 ± 0,00	0,43 ± 0,00	1,05 ± 0,01	0,62 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,27 ± 0,01	1,06 ± 0,02
156	<i>P. parvulus</i>	2,15 ± 0,00	1,95 ± 0,01	1,36 ± 0,08	0,19 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,02	1,38 ± 0,01	1,25 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,02	0,26 ± 0,04	1,02 ± 0,00
192	<i>P. parvulus</i>	2,13 ± 0,06	1,58 ± 0,01	0,57 ± 0,09	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,31 ± 0,00	1,08 ± 0,02	0,79 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,27 ± 0,02	1,05 ± 0,04

Ek 5 LAB'nin indikatörlere karşı genel antimikrobiyal aktiviteleri (zon çapları, cm)

No	Tür	<i>B. cereus</i> FMI	<i>C. albicans</i> SLM	<i>Lb. brevis</i>	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>L. innocua</i> LMG2813	<i>A. parasiticus</i>
1	<i>Lb. brevis</i>	y	y	y	1	0,7	y	y
16	<i>Lb. brevis</i>	y	y	y	y	1,5	y	y
19	<i>Lb. brevis</i>	y	y	y	0,7	1,2	0,7	y
57	<i>Lb. brevis</i>	y	y	y	1	1,3	1	y
62	<i>Lb. brevis</i>	y	y	y	y	y	y	y
65	<i>Lb. brevis</i>	y	y	y	y	1	0,7	y
67	<i>Lb. brevis</i>	y	y	y	y	y	0,6	y
78	<i>Lb. brevis</i>	0,8	y	y	1	1	1,1	y
80	<i>Lb. brevis</i>	y	y	y	1	1,5	0,7	y
96	<i>Lb. brevis</i>	y	y	y	1	0,8	1	y
104	<i>Lb. brevis</i>	0,8	y	y	1	1,5	1,3	y
117	<i>Lb. Brevis</i>	y	y	y	1	1	0,7	y
118	<i>Lb. brevis</i>	y	y	y	0,8	0,8	0,7	y
121	<i>Lb. brevis</i>	y	y	y	1	1	1	y
123	<i>Lb. brevis</i>	0,8	y	0,7	1	1,5	1	y
165	<i>Lb. brevis</i>	y	y	y	y	0,7	0,6	y
170	<i>Lb. brevis</i>	0,6	y	y	y	0,6	y	y
171	<i>Lb. brevis</i>	0,6	y	y	1	1,2	0,8	y
186	<i>Lb. brevis</i>	0,7	y	y	1	0,7	0,8	y
189	<i>Lb. brevis</i>	0,8	y	y	1	0,9	1	y
191	<i>Lb. brevis</i>	1	y	y	1	1,4	1,2	y
195	<i>Lb. brevis</i>	y	y	y	y	y	1	y
206	<i>Lb. brevis</i>	0,8	y	y	1	1,3	0,8	y
227	<i>Lb. brevis</i>	y	y	y	y	1	0,7	y
247	<i>Lb. brevis</i>	y	y	y	y	0,6	y	y
258	<i>Lb. brevis</i>	y	y	y	0,8	1	y	y
260	<i>Lb. brevis</i>	y	y	0,6	0,7	0,9	0,7	y
281	<i>Lb. brevis</i>	y	0,6	y	0,8	1,2	0,6	y
313	<i>Lb. brevis</i>	y	y	y	y	0,8	y	y
325	<i>Lb. brevis</i>	y	y	y	1	1,4	1,2	y
329	<i>Lb. brevis</i>	y	y	y	0,6	1	0,7	y
330	<i>Lb. brevis</i>	y	y	y	0,7	1	0,7	y
331	<i>Lb. brevis</i>	y	y	y	y	1,2	0,8	y
381	<i>Lb. brevis</i>	y	y	y	y	0,9	0,6	y
40	<i>Lb. buchneri</i>	0,8	y	y	1	1,5	1,3	y
42	<i>Lb. buchneri</i>	0,8	y	y	0,7	1,7	1,2	y
48	<i>Lb. buchneri</i>	y	y	y	1	1,6	1,2	y
53	<i>Lb. buchneri</i>	0,6	y	y	1	1,5	1,2	y
82	<i>Lb. buchneri</i>	y	y	y	0,9	1	1,2	y
90	<i>Lb. buchneri</i>	0,7	y	y	2	1	1,1	y
107	<i>Lb. buchneri</i>	0,6	y	y	1	1,3	1	y

Ek 5 LAB'nin indikatörlere karşı genel antimikrobiyal aktiviteleri (zon çapları) (devam)

No	Tür	<i>B. cereus</i> FMI	<i>C. albicans</i> SLM	<i>Lb. brevis</i>	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>L. innocua</i> LMG2813	<i>A. perasiticus</i>
109	<i>Lb. buchneri</i>	y	y	y	1	1,7	1,3	y
136	<i>Lb. buchneri</i>	0,8	y	y	1,2	1,6	1,1	y
147	<i>Lb. diolivorans</i>	y	y	y	0,8	1,5	1	y
74	<i>Lb. namurensis</i>	0,8	y	y	1	1	1,4	y
130	<i>Lb. namurensis</i>	0,7	y	y	0,7	1,2	0,8	y
137	<i>Lb. namurensis</i>	y	y	y	0,9	1,9	1,2	y
145	<i>Lb. namurensis</i>	y	y	y	1	1,4	1	y
4	<i>Lb. plantarum</i>	1,4	y	1	1	2	2	y
18	<i>Lb. plantarum</i>	1,7	y	1	1,5	1,8	2	y
92	<i>Lb. plantarum</i>	1,6	y	1	1	2	1,8	y
99	<i>Lb. plantarum</i>	1,3	y	1	2	1,7	1,6	y
105	<i>Lb. plantarum</i>	1,1	y	0,8	1,2	1,5	1,5	y
115	<i>Lb. plantarum</i>	1,6	y	0,9	1,5	1,9	1,9	y
122	<i>Lb. plantarum</i>	1,2	y	1	1	1,5	1,6	y
124	<i>Lb. plantarum</i>	1,8	y	1	1,5	1,5	1,7	y
140	<i>Lb. plantarum</i>	1,4	y	0,8	2	1,8	1,6	y
148	<i>Lb. plantarum</i>	1	y	0,8	2	1,8	1,7	y
154	<i>Lb. plantarum</i>	1,4	y	1	1,5	1,7	1,7	y
161	<i>Lb. plantarum</i>	1,4	y	1,1	2	1,5	1,8	y
166	<i>Lb. plantarum</i>	1,6	y	0,9	1,4	1,6	1,5	y
169	<i>Lb. plantarum</i>	1,1	y	0,8	1,6	1,6	1,8	y
183	<i>Lb. plantarum</i>	1,7	y	1	1	1,5	1,8	y
184	<i>Lb. plantarum</i>	1	y	0,7	0,7	1,5	1,3	y
199	<i>Lb. plantarum</i>	1	y	1	1	1,5	1,5	y
204	<i>Lb. plantarum</i>	1	y	1	1	1,3	1,4	y
216	<i>Lb. plantarum</i>	1,5	y	1,1	1,6	1,9	2	y
218	<i>Lb. plantarum</i>	1,6	y	0,8	1,2	1,6	1,5	y
221	<i>Lb. plantarum</i>	1,3	0,6	0,9	1,5	1,5	1,5	y
223	<i>Lb. plantarum</i>	1,4	y	0,8	1,1	1,2	1,6	y
256	<i>Lb. plantarum</i>	1,1	y	1	1,6	1,4	1,4	y
261	<i>Lb. plantarum</i>	1,1	y	1	2	2	1,8	y
269	<i>Lb. plantarum</i>	1,5	y	1	2	1,8	1,7	y
270	<i>Lb. plantarum</i>	1,6	0,8	0,9	1,6	1,8	1,4	y
271	<i>Lb. plantarum</i>	1,3	y	0,8	1,3	1,5	1,6	y
273	<i>Lb. plantarum</i>	1,1	y	1	1,3	1,6	1,6	y
283	<i>Lb. plantarum</i>	1,1	y	1	1,4	1,6	1,5	y
315	<i>Lb. plantarum</i>	1	y	1	1,5	1,4	1,2	y
349	<i>Lb. plantarum</i>	1	y	1	1	1,2	1,6	y
376	<i>Lb. plantarum</i>	1,6	y	0,9	1,5	1,5	1,5	y
383	<i>Lb. plantarum</i>	1,4	y	1,1	1,4	1,9	1,9	y
13	<i>P. ethanolidurans</i>	1	y	0,7	1,5	1,5	1,3	y
33	<i>P. ethanolidurans</i>	1	y	y	1,4	1,5	1,3	y
35	<i>P. ethanolidurans</i>	1	y	y	1,5	1,5	1	y

Ek 5 LAB'nin indikatörlere karşı genel antimikrobiyal aktiviteleri (zon çapları) (devam)

No	Tür	<i>B. cereus</i> FMI	<i>C. albicans</i> SLM	<i>Lb. brevis</i>	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>L. innocua</i> LMG2813	<i>A. perasiticus</i>
41	<i>P. ethanolidurans</i>	0,6	y	0,6	1,6	1,3	1,2	y
45	<i>P. ethanolidurans</i>	0,8	y	y	1,2	1,4	1,4	y
52	<i>P. ethanolidurans</i>	1	y	y	1,1	1,3	1,2	y
54	<i>P. ethanolidurans</i>	1	y	y	1	1,2	1,4	y
66	<i>P. ethanolidurans</i>	1	y	y	1,4	1,6	1,5	y
69	<i>P. ethanolidurans</i>	1	y	y	0,8	1	1	y
73	<i>P. ethanolidurans</i>	0,6	y	y	1,5	1,4	1,2	y
87	<i>P. ethanolidurans</i>	0,6	y	y	1,2	1,2	1,1	y
95	<i>P. ethanolidurans</i>	0,8	y	y	1,4	1,1	1	y
97	<i>P. ethanolidurans</i>	0,7	y	y	1,6	1	1	y
102	<i>P. ethanolidurans</i>	1	y	0,7	1	1	1,4	y
113	<i>P. ethanolidurans</i>	0,7	y	0,7	0,8	1	1,2	y
125	<i>P. ethanolidurans</i>	0,6	y	0,7	2	2	1,3	y
126	<i>P. ethanolidurans</i>	0,7	y	y	1	1,4	1	y
129	<i>P. ethanolidurans</i>	y	y	y	1,4	1,3	1	y
131	<i>P. ethanolidurans</i>	0,6	y	y	1,2	1,2	1,2	y
133	<i>P. ethanolidurans</i>	1	y	y	1,1	1,2	1,2	y
149	<i>P. ethanolidurans</i>	y	y	y	1	1,4	1	y
150	<i>P. ethanolidurans</i>	y	y	y	1	1,4	1,3	y
158	<i>P. ethanolidurans</i>	y	y	y	y	y	y	y
159	<i>P. ethanolidurans</i>	0,7	y	y	1,4	1,1	1,4	y
160	<i>P. ethanolidurans</i>	0,7	y	y	1,1	1	1	y
163	<i>P. ethanolidurans</i>	1	y	0,6	2	1,5	1,4	y
167	<i>P. ethanolidurans</i>	1	y	y	1	1,3	1,1	y
172	<i>P. ethanolidurans</i>	1	y	y	1,1	1,4	1,2	y
173	<i>P. ethanolidurans</i>	0,8	y	y	1	1,5	1,1	y
174	<i>P. ethanolidurans</i>	0,6	y	0,6	1	1,2	1,1	y
175	<i>P. ethanolidurans</i>	0,8	y	0,8	1	2	1,6	y
187	<i>P. ethanolidurans</i>	0,7	y	y	1,2	1,3	1,2	y
188	<i>P. ethanolidurans</i>	0,9	y	0,8	1	1,5	1,8	y
60	<i>P. parvulus</i>	0,9	y	0,6	1	1,1	1,4	y
156	<i>P. parvulus</i>	1	y	0,7	1	1,5	1,4	y
192	<i>P. parvulus</i>	1	y	y	1,4	1,6	1,3	y

\*y; zon çapı ölçülemedi

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mehmet TOKATLI  
Doğum Yeri : Denizli  
Doğum Tarihi : 1981  
Medeni Hali : Evli  
Yabancı Dili : İngilizce

### Eğitim Durumu:

Lise : Denizli Cumhuriyet Lisesi (1995-1999)  
Lisans : Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü (1999-2003)  
Yüksek Lisans : Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (2003-2007)

### Çalıştığı Kurumlar:

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (Araştırma Görevlisi)

Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (Araştırma Görevlisi)

### Yayımları:

**Tokatli, M.**, Dursun, D., Arslankoz, N., Şanlıbaba, P. ve Özçelik, F. 2012. Turşu üretiminde laktik asit bakterilerinin önemi. Akademik Gıda, 10,1, 70-76.

Şanlıbaba, P., Bağder, S., **Tokatli, M.**, Arslankoz, N., Özçelik, F. 2012. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from pickles. 23<sup>rd</sup> International ICFMH Symposium FoodMicro 2012, 3-7 Eylül 2012, İstanbul, p. 775. (Poster bildiri).

Arslankoz, N., **Tokatli, M.**, Bağder, S., Şanlıbaba, P., Özçelik, F. 2012. Evidence for proteolytic activity of lactic acid bacteria isolated from pickles. 23<sup>rd</sup> International ICFMH Symposium FoodMicro 2012, 3-7 Eylül 2012, İstanbul, p. 562. (Poster bildiri).

Bağder, S., Arslankoz, N., **Tokatli, M.**, Şanlıbaba, P., Özçelik, F. 2012. Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençlilik Düzeyleri. Türkiye 11. Gıda Kongresi, 10-12 Ekim 2012, Hatay, p.270. (Poster bildiri).

Özçelik, F., **Tokatli, M.**, Arslankoz, N., Şanlıbaba, P., Bağder, S. 2012. Laktik Asit Bakterilerinin Biyojen Amin Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi. Türkiye 11. Gıda Kongresi, 10-12 Ekim 2012, Hatay, p.271. (Poster bildiri).

**Tokatli, M.**, Arslankoz, N., Bağder, S., Şanlıbaba, P., Özçelik, F. 2012. Laktik Asit Bakterilerinin Enzim Profillerinin Belirlenmesi. Türkiye 11. Gıda Kongresi, 10-12 Ekim 2012, Hatay, p.274. (Poster bildiri).

Şanlıbaba, P., **Tokatli, M.**, Arslankoz, N., Bağder, S., Özçelik, F. 2012. Laktik Asit Bakterilerinin Farklı pH Değerlerinde Gelişme Yetenekleri. Türkiye 11. Gıda Kongresi, 10-12 Ekim 2012, Hatay, p.279. (Poster bildiri).

Arslankoz, N., **Tokatli, M.**, Şanlıbaba, P., Bağder, S., Özçelik, F. 2012. Laktik Asit Bakterilerinin Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Yetenekleri. Türkiye 11. Gıda Kongresi, 10-12 Ekim 2012, Hatay, p. 280. (Poster bildiri).

Isleroglu, H., Yıldırım, Z., **Tokatli, M.**, Oncul, N., Yıldırım, M. 2012. Partial Characterisation of Enterocin KP Produced by *Enterococcus faecalis* KP, a Cheese Isolate. Dairy Technology, 65 (1):90-97.

**Tokatli, M.**, Arslankoz, N., Bağder, S., Ozcelik F. 2011. The Properties of Pickles Fermented with Lab Isolated from Traditional Pickles in Ankara-Cubuk Region. Fruit and Vegetable Processing, 18-21 April, Avignon, France.

Yıldırım, Z., **Tokatli, M.**, Oncul, N., Yıldırım, M. 2011. Laktoferrinin Biyolojik Aktivitesi. Akademik Gıda, 54: 52-63.

Mıdık, F., **Tokatli, M.**, Özçelik, F. 2011. Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritler ve Üretimini Etkileyen Faktörler. 7. Gıda Mühendisliği Kongresi, 24-26 Kasım, Ankara.

Bağder, S., **Tokatli, M.**, Cakir, İ., Őzcelik, F. 2010. Identification of Indigenous Wine Yeasts by Different Molecular Methods. 1<sup>st</sup> International Congress on Food Technology, 03-06 November, Antalya.

Arslankoz, N., Bağder, S., **Tokatli, M.**, Őzcelik, F. 2010. Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria. 1<sup>st</sup> International Congress on Food Technology, 03-06 November, Antalya.

**Tokatli, M.**, Bağder, S. 2010. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria and Their Food Applications. 1<sup>st</sup> International Congress on Food Technology, 03-06 November, Antalya.

**Tokatli, M.**, Dursun, D., Bağder, S., Şanlıbaba, P., Özçelik, F. 2009. Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Pickles in Ankara Çubuk Region. Biotech Metu 2009, 27-30 September, Ankara.

**Tokatli, M.**, Erdoğan, K., Yıldırım, Z., Yıldırım, M. 2009. KuŐburnu Çekirdeği Protein Konsantrasyonlarının Bazı Kimyasal ve Fonksiyonel Özellikleri. 6. Gıda Mühendisliği Kongresi, 6-8 Kasım, Antalya.

Özçelik F., **Tokatli M.** 2009. Hıyar Hücre Duvarının Yapısı ve Turşunun YumuŐaması Sırasındaki DeđiŐmeler. 2. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 27-29 Mayıs, Van.

Bağder, S., Acılıoğlu, Ö., **Tokathı, M.**, Özçelik, F. 2008. Malolaktik Fermantasyonda Aroma Değişimi. Ulusal Bağcılık Şarap Sempozyumu ve Sergisi, 6-9 Kasım, Denizli.

**Tokathı, M.**, Özçelik, F. 2008. Mikrobiyal Kaynaklardan Gıda Renklendiricisi Üretimi. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs, Erzurum.

Bağder, S., Özçelik, F., **Tokathı, M.** 2008. Şarap Üretiminde SO<sub>2</sub> Düzeyini azaltmak Amacıyla Kullanılabilecek Antimikrobiyal Bileşikler. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs, Erzurum.

**Tokathı, M.**, Özçelik, F., Bağder, S. 2007. Biyoteknolojik Uygulamalar ile Gıdaların Besin Değerinin Arttırılması. 15. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 28-31 Ekim, Antalya.

Erceyes, Ö., **Tokathı, M.**, Bayram, M., Erinç, H., Yıldırım, Z., Yıldırım, M. 2006. Tokat Piyasasında Satışa Sunulan Tulum Peynirlerinin Bazı Niteliklerinin İncelenmesi. Türkiye 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs, Bolu.

Sayılı, M., Batu, A., **Tokathı, M.**, Yıldız, M. 2006. Tokat İlinde Meyve ve Sebze Depoculuğunun Mevcut Durumu, Sorunları ve Çözüm Önerileri. Teknolojik Araştırmalar : GTED, 3: 27-36.

**Tokathı, M.**, Yıldırım, M., Yıldırım, Z. 2005. Kazein Türevli Biyoaktif Peptitler. Gıda Mühendisliği 4. Kongresi, 29 Eylül-1 Ekim, Ankara.

Erinç, H., **Tokathı, M.**, Yıldırım, M., Yıldırım, Z. 2005. Laktobasillerin ve Bifidobakterilerin Patojenlere Karşı Antogonistik Aktiviteleri ', Gıda Kongresi 2005, 19-21 Nisan, İzmir.