



**GELENEKSEL OLARAK ÜRETİLMİŞ
EV TİPİ TURŞULARDA
LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
İZOLASYONU VE TANISI**

Rahime DÜNDAR

**Yüksek Lisans Tezi
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Doç. Dr. Bülent ÇETİN
2017
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GELENEKSEL OLARAK ÜRETİLMİŞ EV TİPİ TURŞULARDA
LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE TANISI**

Rahime DÜNDAR

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ERZURUM
2017**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**GELENEKSEL YÖNTEMLERLE ÜRETİLMİŞ EV TİPİ TURSULARDAN
LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE TANISI**

Doç. Dr. Bülent ÇETİN danışmanlığında, Rahime DÜNDAR tarafından hazırlanan bu çalışma 14/07/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. M. Fatih ERTUGAY

İmza :

Üye : Prof. Dr. Ahmet ERDOĞAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Bülent ÇETİN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun 20.../ 07.../ 2017... tarih ve 29 / 42...
nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No:2013/129

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GELENEKSEL OLARAK ÜRETİLMİŞ EV TİPİ TURŞULARDA LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE TANISI

Rahime DÜNDAR

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Bülent ÇETİN

Turşu, meyve ve/veya sebzelerin fermantasyonu sonucu oluşan hem geleneksel hem de ticari bir üründür. Geleneksel olarak eski tariflerle hazırlanan turşular gerek içerisine giren hammaddeler açısından gerekse tuz oranı, asitlik vb. kimyasal özellikleri açısından birçok değişik şekilde üretilebilmektedir. Bu çalışmada amacımız ev turşularındaki mevcut doğal mikrofloranın belirlenmesi ve floraya hakim türlerin ortaya çıkarılmasıdır. Projemizde farklı yörelere ait 41 adet geleneksel ev turşusu toplanıp mikrobiyolojik ve bazı kimyasal analizleri yapılmış ve izole edilen laktik asit bakterilerinin genetik tanısı belirlenmiştir. Çalışmamızda mikrobiyolojik parametrelerden toplam aerobik mezofilik bakteri, maya ve küf, koliform, enterokok, laktobasil, laktokok, *Staphylococcus aureus* sayımları ve kimyasal analizlerden pH, asitlik ve tuz miktarı tayini gerçekleştirilmiştir. Ayrıca toplam 176 adet turşu kaynaklı suş izole edilmiş olup, bunların 100 tanesi laktobasil, 66 tanesi laktokok ve 10 tanesi enterokok olmak üzere gruplandırılmıştır. İzolatlar RAPD metodu ile benzerliklerine göre sınıflandırılmış ve grubu temsil eden izolatların 16S rRNA bölgesi referans alınarak tanıları gerçekleştirilmiştir. Tanı sonucunda laktobasil ve laktokok gruplarının *Lactobacillus plantarum* (iki farklı suş), *Pediococcus parvulus*, *Lactobacillus paracasei*, *Leuconostoc holzapfelii*, *Leuconostoc mesenteroides*, enterokokların ise *Enterococcus faecium* (iki farklı suş) türünden oluştuğu görülmüştür. Sonuç olarak ev turşusu örneklerine mevcut hakim floranın *L. plantarum*'a ait olduğu tespit edilmiştir.

2017, 64 sayfa

Anahtar Kelimeler: turşu, fermantasyon, laktik asit bakterisi, RAPD, 16S rRNA

ABSTRACT

MS Thesis

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM TRADITIONALLY PRODUCED HOME-TYPE PICKLE

Rahime DÜNDAR

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bulent CETIN

Pickle, is both of traditional and commercial product formed as a result of the fermentation of fruit and/or vegetables. Pickle traditionally prepared with old recipes can be produced in many different ways both in terms of raw materials and chemical properties like salt ratio, acidity etc. In this study our aim is determination microflora available in natural home pickle and identification of the prevalent species of flora. In our project after 41 traditional home-made pickles belong to the different regions were collected, chemical and microbiological analyses were performed and genetic diagnosis of isolated lactic acid bacteria was determined. In our study, microbiological parameters as counts of total mesophilic aerobic bacteria, yeast and mold, coliform, enterococci, lactobacilli, lactococci, *Staphylococcus aureus* and chemical analysis as pH, determination of the amount of salt and acidity were carried out. Also total 176 strains, pickle welded are isolated and grouped as Lactobacillus including 100 of them and Lactococcus including 66 strains and Enterococcus including 10 strains. All isolates are classified according to the similarities with method of RAPD and the diagnosis of isolates representing the group was performed by taking as the reference of 16S rRNA region. As a result of the diagnosis, it was found the groups of Lactobacillus and Lactococcus constituted by *Lactobacillus plantarum* (two different strains), *Pediococcus parvulus*, *Lactobacillus paracasei*, *Leuconostoc holzapfel*, *Leuconostoc mesenteroides* and the group of Enterococcus occurred from *Enterococcus faecium* (two different strains). Consequently, it was determined that the dominant flora in home-made pickles was belonged to *L. plantarum*.

2017, 64 pages

Keywords: Pickle, fermentation, lactic acid bacteria, RAPD, 16S rRNA

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda baştan sona her aşamada yardımcı olan ve bugün dahil gelecek için de tavsiyelerine ihtiyaç duyduğum danışman hocam Sayın Doç. Dr. Bülent ÇETİN'e,

Tez çalışmamı yürüttüğüm Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne ve 2013/129 nolu projemizi desteklediği için BAP Koordinasyon Birimi'ne,

Yüksek lisans çalışmalarına destek veren Gümüşhane Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne,

Erzurum'da bana destek olan soğuk hatta çok soğuk kış günlerini ısıtan sevgili arkadaşım Nur BAYRAK'a,

Bazen turşu yaparak bazen nasihat vererek hayata karşı daha cesur olmamı sağlayan Anne ve Babama,

Her türlü sevincimi, sıkıntımı paylaştığım ömrüme ortak canım kardeşlerime,

İyi günümde kötü günümde hatta laboratuvar çalışmalarım da bile hep yanımda olan, beni motive eden, hayatıma anlam katan Sevgili eşim Ayhan DÜNDAR'a ve biricik kızım Zeynep'e, Teşekkürler.

Rahime DÜNDAR

Haziran, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	28
3.1. Materyal.....	28
3.2. Yöntem	29
3.2.1. Mikrobiyolojik analizler.....	30
3.2.1.a. Toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı.....	30
3.2.1.b. Maya ve küf sayımı	30
3.2.1.c. Staphylococcus aureus sayımı	31
3.2.1.d. Enterobacteriaceae sayımı.....	31
3.2.1.e. Laktik asit bakterilerinin sayımı	31
3.2.2. LAB izolasyonu.....	32
3.2.3. İzolatların Moleküler Tanısı	33
3.2.4. Kimyasal analizler	35
3.2.4.a. pH tayini	35
3.2.4.b. Tuz tayini.....	35
3.2.4.c. Titrasyon asitliği tayini	36
3.2.5. İstatistik analizler	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	38
4.1. Mikrobiyolojik Bulgular.....	38
4.2. Makroskobik ve Mikroskobik İnceleme Bulguları	41
4.3. RAPD-PCR Sonundaki Jel Görüntüleri	46
4.4. Moleküler Tanı Bulguları.....	47

4.5. Kimyasal Bulgular.....	50
4.6. İstatistiksel Bulgular.....	53
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	56
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	65



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
g	gram
M	Molar
ml	Mililitre
$^{\circ}$ C	Santigrat Derece
pH	Asitlik Bazlık

Kisaltmalar

GRAS	Generally Recognized As Safe
kob	Koloni Oluşturan Birim
L.	Lactobacillus
LAB	Laktik Asit Bakterisi
log	Logaritma
Max.	Maksimum
Min.	Minumum
Ort.	Ortalama

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Geleneksel yöntemlerle turşu üretimi.....	4
Şekil 1.2. Endüstriyel salatalık turşusu üretimi	6
Şekil 1.3. Hıyar turşusu üretimi	7
Şekil 1.4. Homofermentatif ve heterofermentatif LAB gerçekleştirdikleri reaksiyonlar	11
Şekil 1.5. 16S rRNA geni	17
Şekil 3.1. Çizilen saf kültürlerin görüntüsü	32
Şekil 4.1. Gram pozitif 62 nolu izolatın immersiyon objektifinde görüntüsü	43
Şekil 4.2. Gram pozitif 155 nolu izolatın immersiyon objektifinde görüntüsü	43
Şekil 4.3. Gram pozitif 309 nolu izolatın immersiyon objektifinde 100x görüntüsü	44
Şekil 4.4. Gram pozitif 320 nolu izolatın immersiyon objektifinde 100x görüntüsü	44
Şekil 4.5. Gram pozitif 48 nolu izolatın basil yapılarının boyutlandırılması	45
Şekil 4.6. 129 nolu izolata ait a,b farklı preparatında gözlenen tetrakok yapıları ve boyutları	46
Şekil 4.7. Sırasıyla a;b;c: Laktobasil; Laktokok; Enterokok gruplarından bazı farklı DNA parmakizine sahip izolatların jelde görüntüsü	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Fermantasyon aşamalarında ortamda mevcut mikroorganizmalar (Daeschel <i>et al.</i> 1987; Aktan vd 1998).....	10
Çizelge 1.2. Son ürüne göre LAB grupları (Erkmen and Bozoğlu 2016).....	12
Çizelge 1.3. Farklı fermente ürünlerde mevcut LAB (Erkmen and Bozoğlu 2016).....	14
Çizelge 3.1. Toplanan ev turşusu örneklerinin menşei ve içerikleri.....	28
Çizelge 4.1. Mikrobiyolojik sonuçlar ($\log \text{ kob ml}^{-1}$)	38
Çizelge 4.2. Bazı izolatların makroskobik özellikleri ve test sonuçları.....	42
Çizelge 4.3. Laktobasil izolatlarının genetik tanı sonucu.....	47
Çizelge 4.4. Laktokok izolatlarının genetik tanı sonucu.....	48
Çizelge 4.5. Enterokok izolatlarının genetik tanı sonucu	49
Çizelge 4.6. Kimyasal analizlerin sonuçları	50
Çizelge 4.7. Mikrobiyolojik ve kimyasal sonuçlar arasında korelasyon testi	54

1. GİRİŞ

Fermente gıdaların üretimi insanoğlunun en eski gıda işleme teknolojisidir. Turşu kelimesinin kökeni “ekşi” anlamına gelen Farsça bir kelime olan “*torsh*” dan gelmektedir (Kabak 2009).

Anadolu'da birçok geleneksel yiyecek ve içecek laktik asit bakterileri, maya ya da her ikisini de içeren karışımların aktivitesiyle elde edilir. Türkiye’de geleneksel yiyecek ve içeceklerin üretiminde özellikle laktik asit fermantasyonu önemli ve baskın bir rol oynar (Kabak and Dobson 2011).

Turşu çeşitli sebze ve meyvelerin belirli tuz konsantrasyonunda laktik asit bakterileri ile fermantasyonu sonucunda oluşan uzun süre dayanabilen bir üründür (Aktan vd 1998). Ayrıca Türk mutfağının vazgeçilmez unsurlarından ve eski çağlardan beri kullanıla gelen bozkır kültürünün gıda saklama yöntemlerindedir (Aktan vd 1998).

Süt, et ve meyve sebzelerin fermantasyonu; tarih boyunca gelişerek çiğ gıdaların özel olarak işlenmesi ve depolanması için özel bir yöntem olarak halen devam etmektedir. Geleneklerle yaygınlaşan tarifler gıdaların kalitesini korumakla beraber orijinal halinden farklı hatta organoleptik açıdan tatminkâr bir karaktere de sahip olması yönünden talep edilmektedir (Caplice and Fitzgerald 1999). Buna ek olarak, çok sayıda fermente sebze gıdalar küçük ölçeklerde ya da bir evde geleneksel yöntemler kullanarak yapılır. Bu durum sadece son ürünün benzersiz bir lezzet ve tadı için değil aynı zamanda kültürel miras ve biyolojik çeşitliliğin korunmasındaki katkıları için de özel bir takdiri hak etmektedir (Giraffa *et al.* 2008). Bu yüzden geleneksel turşular yöreye göre değişen içerik, tat ve aromaya sahip olmaktadır.

Dünyada benzer ürünler olmakla beraber bizim anladığımız özellikte turşu üretimi Anadolu ve benzer kültürün paylaşıldığı bir dönem Osmanlı İmparatorluğu çatısı altında yaşamış Ortadoğu ve Balkan ülkelerinde görülmektedir. Ülkemiz ise son yıllarda meyve

sebze alanında artan üretimi ile her geçen gün gelişen bir turşu sanayiine sahiptir. Günümüzde evlerde ve küçük işletmelerde yapıldığı gibi artık modern tesislerde de yapılmaktadır (Aktan vd 1998).

Ticari amaçla üretilen turşu hamburger gibi fast food tarzı gıda sektöründe kullanılmaktadır. Önemli bir turşu üreticisi olan ülkemizde turşu ayrı bir öneme sahip olup “turşu kurmak” ya da “turşu vurmak” gibi özel deyimler mevcuttur. Turşu kurulumu/vurulurken meyve sebzelerin laktik asit fermantasyonu ile dayanıklılığının artmasının yanında, tat ve renk bakımından da farklı bir son ürün elde edilir (Aktan vd 1998; Şahin ve Akbaş 2001).

Çok çeşitlilikte farklı sebze ve meyveden turşu yapılabilir. Salatalık, lahana, yeşil domates, yeşilbiber ve acur (Ermeni salatalığı) turşu hazırlamak için kullanılan en popüler sebzeler arasındadır (Kabak 2009).

Türkiye’de en yaygın olarak fermente edilen sebzeler lahana, salatalık, havuç, pancar, yeşil domates, biber, şalgam, turp, fasulye, soğan, kelek (olgunlaşmamış kavun), bamyası, kereviz ve sapı, patlıcan, maydanozdur. Bunlara ek olarak sarımsaktan da lezzet vermesi için turşu kurma işleminde faydalanılmaktadır. Turşu sade veya karışık üretilir. Genelde Türkiye’de karışık turşu formülasyonu lahana, salatalık, havuç, yeşil domates, biber ve sarımsağın eklenmesiyle oluşur (Daeschel *et al.* 1987; Çetin 2011).

Çetin’in (2011) ifade ettiği gibi sebzelerin yanısıra çalışmamızda yer alan örneklerde karnabahar, çarşır, olgunlaşmamış üzüm (koruk), nohut, ekmek ve baharat olarak nane, dereotu gibi bileşenler de yer almaktadır.

Dünya üzerinde Sauerkraut (Almanya), Kimchi (Kore), Dhamuoi (Vietnam), Dakguadong (Tayland) ve Burong mustasa (Filipinler) gibi sebze fermantasyonu ile elde edilen birçok turşu benzeri ürün tüketilmektedir. Özellikle Sauerkraut ve Kimchi üzerinde oldukça yoğun çalışmalar olmasına karşın turşu mikrobiyolojisi üzerine az sayına çalışma bulunmaktadır (Hui and Evranuz 2012; Breidt *et al* 2013).

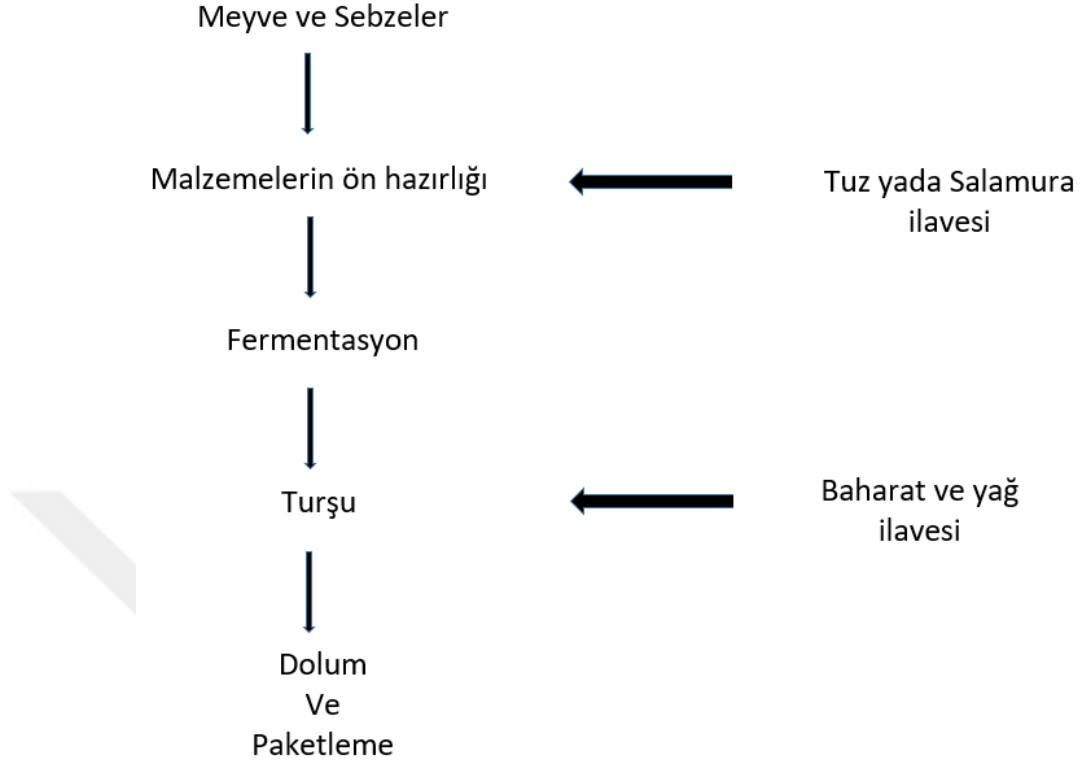
Sauerkraut (Lahana turşusu) için tasarlanmış kültürler diğer sebzelerin fermantasyonu için ideal starterler olmayabilir. Örneğin; havuç, soğan veya pancarın inokülasyonu için uygun hiçbir ticari starter kültür mevcut değildir ve bu amaç için uygun starterlerin değerlendirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Gardner *et al.* 2001).

Starter kültürlerin ilavesi üretim sürecini hızlandırabilir ve kontrolsüz fermantasyonla alakalı ürün kalite ve tat varyasyonları gibi sorunları önleyebilir. Aynı zamanda daha düşük tuz veya asit içeriğinde salamura kullanımına izin verebilir (Seseña *et al.* 2001; Giraffa *et al.* 2008). Bu işlem gıda maddelerinde istenmeyen mikrofloranın gelişmesine ve varlığını sürdürmesine engel olabilen bir dizi metabolitlerin üretimi için mikroorganizmaların biyolojik aktivitesine dayalıdır. Sonuç olarak, fermente ürünler genellikle hammaddelerinden daha uzun raf ömrüne sahiptir. Ayrıca gıda güvenliği bakımından daha az risk teşkil etmektedir (Giraffa *et al.* 2008).

Son on yılda fonksiyonel probiyotik gıdaların tüketimi, sağlıkları konusunda farkındalık bilincindeki tüketici ve araştırmacıların da destekleyici etkileri ile birlikte artış göstermektedir. Bu durum yeni fonksiyonel gıda formülasyonunun oluşturulmasına yönelik ilgiye yol açmaktadır. Fermente süt ürünleri probiyotiklerin insanlara ulaşmasında hala en yaygın vektörler olmasına rağmen, meyve sebze gibi diğer gıda matrisleri probiyotik suşların kaynakları ve taşıyıcıları olarak umut verici bir performans sunmaktadır (Peres *et al.* 2012).

Çeşitli Avrupa ülkelerinde fermente bitkisel ürünlere artan ilgi bu alanda yeni araştırma başlatılması için ana nedendir. Avrupada, 21 farklı ticari sebze fermantasyonu olup, bunlardan ekonomik açıdan en uygunları zeytin, salatalık ve lahanadır (Giraffa *et al.* 2008).

Turşu üretimi geleneksel olarak ev ölçeğinde birçok farklı yolla üretilmektedir. Aşağıdaki şekilde (Şekil 1.1) FAO (Food and Agriculture Organization / Gıda ve Tarım Örgütü) tarafından önerilen turşu üretim prosedürü görülmektedir.



Şekil 1.1. Geleneksel yöntemlerle turşu üretimi (FAO)

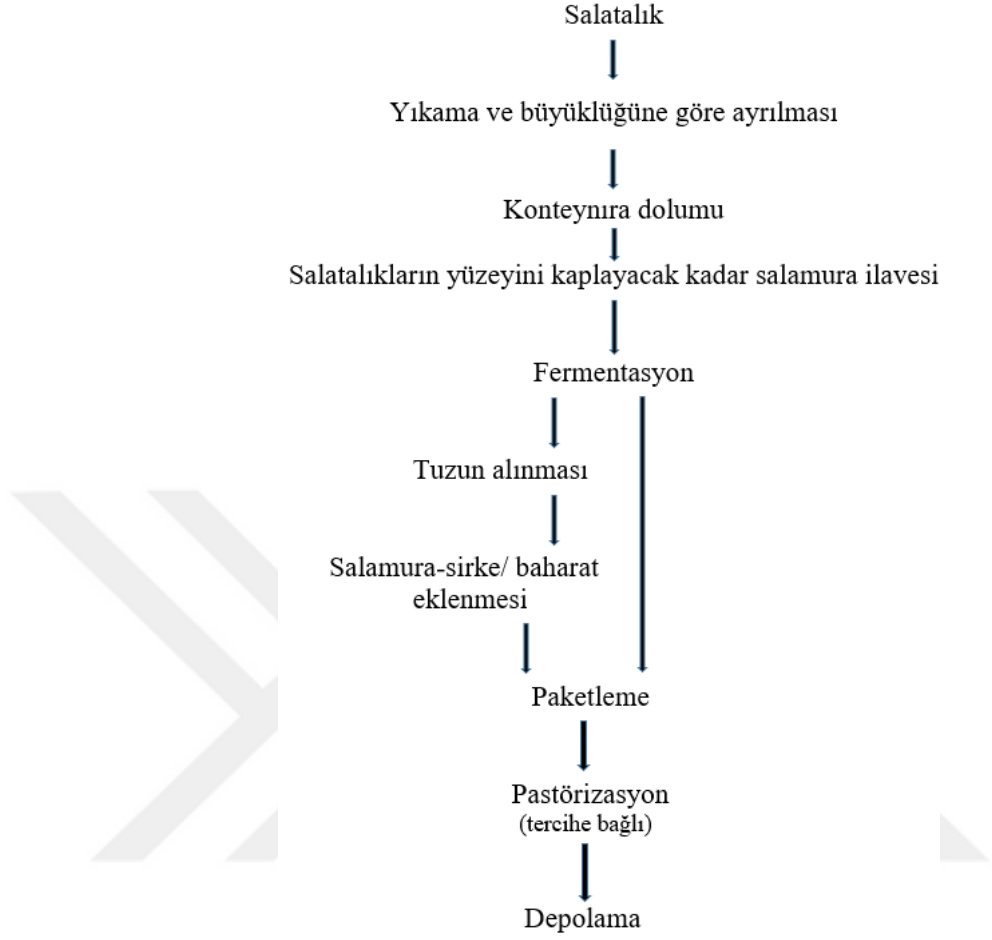
Fermentasyon, salamura eklenir eklenmez başlamaktadır. Ardından karbondioksit gazının baloncukları görülmeye başlanabilmektedir. Ortam sıcaklığına bağlı olarak 1-4 hafta fermente olması için turşular bekletilmektedir. Daha fazla baloncuk görünmemesi fermentasyonun bittiğini işaret etmektedir. FAO'nun turşu çeşitlerinde yer alan Battcock ve Azam-Ali (1998) tarafından hazırlanan akış şeması Şekil 1.1'de görüldüğü üzere son aşama turşuların temiz kavanozlara dolumu ve soğukta depolanması şeklinde devam etmektedir. Bazı durumlarda turşuların üzeri kapatılmadan önce bir yağ tabakası ile kaplanabilmektedir.

Salatalık turşusu üretiminde salatalık boyu, ağırlığı, eklenecek tuz ve aroma maddeleri gibi bileşenler tariften tarife değişmektedir. Ancak turşu üretimin ilk aşaması uygun salatalıkların seçilmesidir. Salatalıkların içinde varsa çürük, ezik, hasarlı olanlar çıkarılmalıdır. Temiz ve soğuk suyla yıkanmasının ardından su tahliye edilmelidir. Salatalıklar tüm ya da kesilmiş şekilde turşuluk olarak hazırlanabilmektedir. Eğer

kesileceklerse boyutlar 5-8 cm'lik parçalar halinde olmalıdır.

Turşu yapımında önce her 15-20 kg salatalık için 1 kg tuz olacak şekilde salatalıklar ve tuz bir kaba yerleştirilmelidir. Salamura suyu salatalıkların üzerini kapatacak şekilde konulmalıdır. Tüm parçaların salamuraya batması gereklidir. Eğer salamura salatalıkların üzerine çıkamayacak olursa tekrar salamura hazırlanıp eklenmelidir.

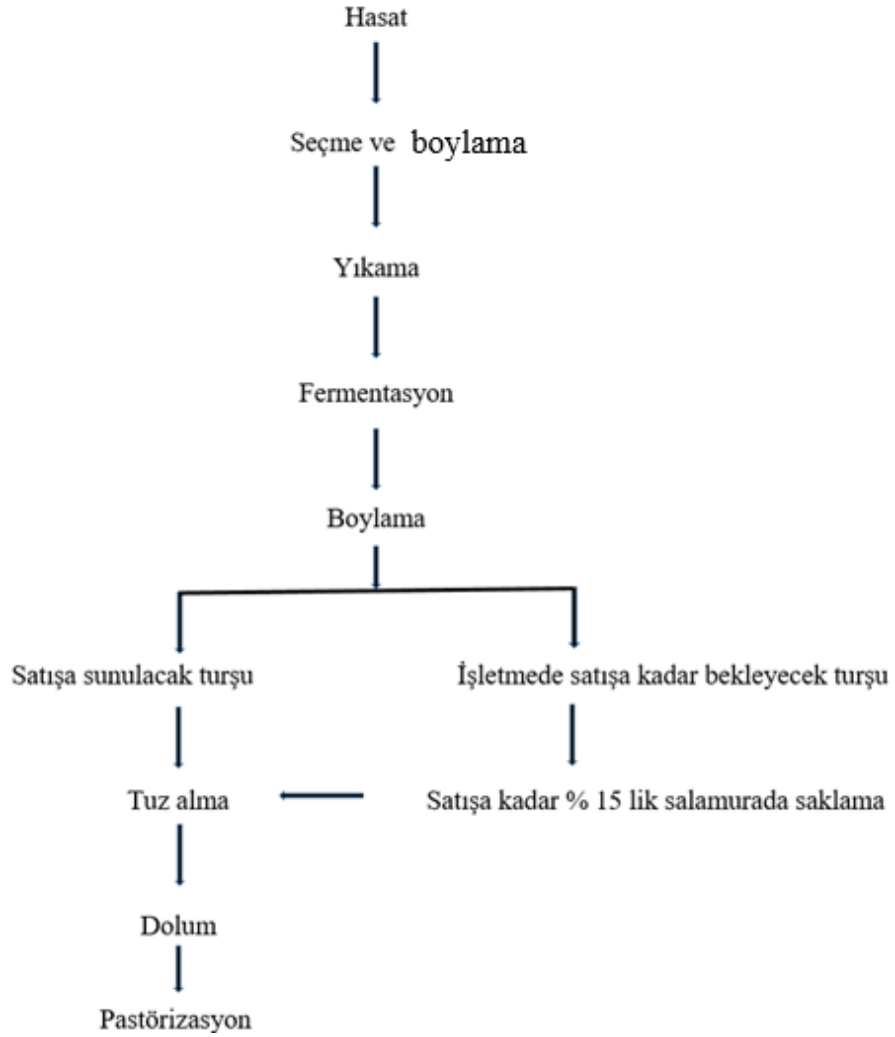
Şekil 1.2' de görüldüğü gibi endüstriyel turşu üretimi de yine salatalıkların seçilmesiyle başlamaktadır. Turşu prosesine katılacak salatalıklar sadece küçük ve olgunlaşmamış (yeşil ve sert) salatalık olmaktadır. Devamında seçilenler boylarına göre sınıflandırılmakta, yıkanmakta ve tanklara yerleştirilmektedir. Salamura üstlerine eklenmekte ve salatalıklar tamamıyla salamura suyunun içinde olmalı, yüzen olmamalıdır. Bozulmanın önlenmesinde bu aşama önemli ve gereklidir. Salamura alışlageldik şekliyle %5-12 tuz (NaCl) içermektedir. Salamura sirke (asetik asit) kullanılarak asitlendirilmektedir. Bu aşamada isteğe göre gazlı ve şişmiş turşular elde etmek için %1 oranında glukoz eklenebilmektedir. Düşük tuz ve yüksek tuz yöntemi olmak üzere tuzlamada iki genel yöntem kullanılmaktadır.



Şekil 1.2. Endüstriyel salatalık turşusu üretimi (Erkmen and Bozoğlu 2016)

Düşük miktarda tuzlama da tuz az miktarda eklenir ve konsantrasyon bakteri gelişimi durana kadar yavaş yavaş artırılır. Bu yöntemde önce yaklaşık %78'lik salamura kullanılmakta; daha fazla tuz eklenmeye devam edildiği takdirde toplam tuz konsantrasyonu %12'nin üzerine çıkmaktadır. Tuz aralıklarıyla haftada bir eklenmektedir.

Yüksek miktarda tuzlama için %12 konsantrasyonunda salamura kullanılır. Kuvvetli salamura salatalıklardan şeker ve suyu dışarı çeker, bu durum eş zamanlı olarak çözeltinin tuz yoğunluğunu azaltmaktadır. Fermentasyon esnasında tuz çözeltisinde belli bir düzeyi korumak için daha fazla tuz salamuraya eklenmek zorundadır (Erkmen and Bozoğlu 2016).



Şekil 1.3. Hıyar turşusu üretimi (Aran 2014)

Yukarıdaki şekilde (Şekil 1.3.) yine endüstriyel olarak üretilen hıyar turşusu üretimi sunulmuştur. Diğer salatalık üretim hattından farklı olarak pastörizasyon (isteğe bağlı olmaksızın) gibi farklı basamakları içerebilmektedir. Ayrıca yüksek tuz oranında turşuların satışa kadar beklenebildiği görülmektedir.

Turşu yapımında bir problem de turşu kabının yüzeyinde maya tabakasının oluşmasıdır. Direk güneş ışığı ya da ultraviyole ışık bu problemi çözmeye yardımcıdır. Fermantasyon sonrasında sirke ve baharat turşuların ekşimesi için eklenmektedir. Ayrıca şeker de tatlı turşulara eklenebilmektedir (Black and Black 2014).

Fermantasyon ve Laktik asit bakterileri

Fermantasyon gıda muhafazasında kullanılan en eski ve en ekonomik yöntemlerden biridir. Çağlar boyunca, fermantasyonun beslenme alışkanlıkları, gelenekler, kültür, ticari dağıtım ve yiyeceklerin depolanması üzerine büyük bir etkisi olmuştur. Fermente ürünler için kullanılan ana malzemeler süt, et ve sebzedir. Bu durum fermente sebze ürünleri kadar 400'ün üzerinde peynir çeşidi, geniş ölçüğe sahip farklı yoğurt türleri ve fermente süt içecekleri, fermente sucuk-sosis üretimine yol açmıştır.

Fermente gıdaların işlenmesinde genellikle laktik asit bakterilerinin yaptığı fermantasyonlar etkili olmaktadır. Laktik asit bakterileri (LAB), gıdaların stabilitesine, besinsel değerlerine olumlu yönde etki ederken, son üründe patojen gelişiminin ve mikrobiyal açıdan bozulmayı engellemektedir (Niku-Paavola *et al.* 1999).

Fermantasyon süreci genellikle sebze/meyvelerin salamuraya konulduktan birkaç gün içinde başlar. Bitkisel malzemelerin sahip olduğu mikrobiyal flora; salamuranın asit ve tuz bileşimi, fermantasyon sıcaklığı, ortamdaki oksijenin varlığı, fermantasyonda hangi mikroorganizmanın hakim olacağı ve nihai ürünün tadı gibi durumları etkiler. İyi bir fermantasyon için salamuranın %10-15 arası bir tuz konsantrasyonuna sahip olması çok önemlidir. Daha yüksek tuz konsantrasyonlarında, laktik asit bakterileri de iyi büyümeyecektir (Kabak 2009).

Mayalar ortamdayken NaCl konsantrasyonuna bağlı olarak gliserol üretildiği görülmüştür. Bu nedenle asitliğin kontrol edilmesi gerektiği ve fermantasyonda mayaların kullanılma durumları incelenmelidir (Daeschel *et al.* 1988).

Fermantasyon ısı ve asit üretmektedir. Fermantasyon sıcaklık seviyesi 15 ile 30°C arasında değişebilmektedir. Daha düşük sıcaklıklarda fermantasyonun tamamlanması daha uzun sürmektedir. Fermantasyon sonunda %0,6'dan %1,2'ye kadar (laktik asit) asitlikle birlikte pH 3,5 civarında olmaktadır. Turşulara su transfer edilmesiyle (canlandırma/ tazeleme diye adlandırılan işlem) tuzu alınabilmektedir. Fermantasyon

sırasında bakteri gelişimine bağlı olarak ilk birkaç gün salamura bulanık olmaktadır. LAB, salatalıklarda pekteolitik aktiviteye bağlı olarak yumuşamaya ve şişkinliğe sebep olan gaz üretebilmektedir. Fermantasyon sırasında gözle görünür değişiklikler olmaktadır. Salatalıkların yüzey rengi klorofillerin asitle reaksiyonu sonucu açık yeşilden koyu yeşile dönmektedir. Salatalıkların iç kısmı beyazdan (hücrelerden hava dışarı çıkmaya zorlandığı için) mumsu saydam bir halde kararmaktadır. Tuzun kademeli olarak absorpsiyonu yüzünden salatalıkların özgül ağırlığı da artmakta ve salamurada yüzmektense, batmaya başlamaktadır (Erkmen and Bozoğlu 2016).

Asitlik ve lezzeti istenen düzeyde üretmek için turşu hazırlama prosedürü önem arz etmektedir. Özellikle uzakdoğu ülkelerinde görülen farklı tariflerden birinde de görüleceği üzere genellikle lahana, kereviz, kırmızıbiber ve turp gibi çoğu sebze %6-8 tuzlu çözeltisine kırmızı pulbiber, yeşil soğan ve sarımsakla özel bir kavanozda yaz aylarında (20-27°C) en azından 5-7 gün; kış aylarında (8-15°C) 12-16 gün için daldırılmaktadır (Yu *et al.* 2012).

Taze sebzelerin mikrobiyotası normalde Gram (-) aerobik bakteri, maya ve daha düşük miktarda LAB içermektedir (Harris 1998). Bununla birlikte anaerobik ortam, nem seviyesi, tuz konsantrasyonu ve sıcaklıktaki değişimler popülasyon dengesinde değişikliklere sebep olmakta ve LAB tarafınca kendiliğinden gerçekleşen fermantasyonu seçilmektedir (Mozzi *et al.* 2010).

Yu *et al.* (2012)'nin özetlediği gibi evyapımı turşular hammaddelerin üzerindeki mevcut epifit mikroplara yüksek derecede bağlı olarak kendiliğinden gerçekleşen bir fermantasyon sergilemektedir. Salamura eklenmiş sebzelerin doğal fermantasyonu boyunca oluşan mevcut mikroorganizmaların gelişim sırası aşağıdaki çizelgede (Çizelge 1.1) görülmektedir (Daeschel *et al.* 1987; Aktan vd 1998).

Çizelge 1.1. Fermantasyon aşamalarında ortamda mevcut mikroorganizmalar (Daeschel *et al.* 1987; Aktan vd 1998)

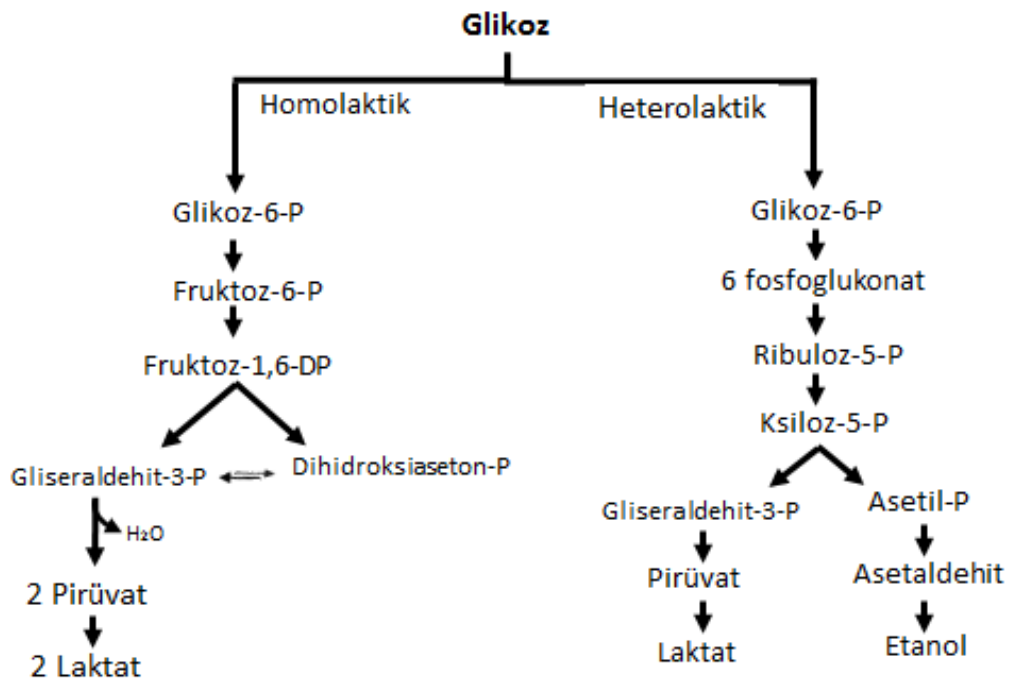
Aşama	Mevcut mikroorganizmalar
Başlangıç	Çeşitli Gram pozitif ve negatif bakteriler
Birincil fermantasyon	Laktik asit bakterileri, mayalar
İkincil fermantasyon	Mayalar
Fermantasyon sonrası	Aerobik: Yüzeyde oksidatif maya, küf ve bakteri gelişimi Anaerobik: Yok

LAB, gıda ürünlerinin besin değerine ve besinlerin biyolojik yolla korunmasına olumlu katkıda bulunmaları nedeniyle yüzyıllardır önemini koruyan mikroorganizmalardır. Bu bakterilerin çoğu; insan, hayvan ve bitkinin bulunduğu doğal ortamlarda bulunan, bu ortamlardan izole edilebilen, biyoteknolojik çalışmalarda ve endüstriyel birçok alanda kullanılan, beslenmemizde ve sağlığımız konusunda oldukça önemli mikrobiyal ajanlardır. Bazı türleri insan ve hayvanların solunum, bağırsak ve genital sistemlerinde de görülmektedir (Holzapfel and Wood 2014).

LAB gram pozitif, hareketsiz, spor oluşturmayan, katalaz ve oksidaz negatif, çubuk ya da kok şeklindedir. %50 G+C oranından daha az DNA baz kompozisyonuna sahiptirler. Enerji kaynağı olarak karbonhidrata ihtiyaç duyar ve karbonhidratların fermantasyonu sonucunda esas son ürün olan laktik asit üretirler. Çoğu laktik asit üreticileri aerotolerant anaerobe olup çok az miktardaki oksijen varlığında büyüyebilirler (Stiles *et al.* 1997; Klein *et al.* 1998).

LAB; Lactobacillales takımında yer alırlar. Bazıları flavoprotein aracılığıyla O₂'ni alır ve H₂O₂ üretmek için yükseltger. LAB'nin aminoasitler, B vitaminleri ve nükleik asit bazlarına (pürin ve pirimidin) gereksinimi vardır. Bazıları değişken pH aralıklarında gelişebilmekle beraber genellikle 4.0–4.5 aralığında (bazıları 3,2 kadar düşük, 9,6 kadar yüksek pH değerlerinde) iyi gelişim göstermektedirler. Bu bakteriler aslında mezofilik

(birkaç termofilik suş dahil) karakterdedir ve 5-45 °C aralığında büyüeyebilirler (Forsythe 2000; Erkmen and Bozoğlu 2016). Generasyon süreleri 30 -90 dakikadır. Ürettikleri laktik asit, gıdayı bozan diğer bakterilerin büyümesini engeller. LAB glukoz metabolizması, büyüme sıcaklıkları ve diğer özelliklerine göre farklı gruplara ayrılabilir (Stiles *et al.* 1997; Hofvendahl and Hägerdal 1999; Holzapfel and Wood 2014; Erkmen and Bozoğlu 2016).



Şekil 1.4. Homofermentatif ve heterofermentatif LAB gerçekleştirdikleri reaksiyonlar (Caplice and Fitzgerald 1999)

LAB, karbonhidratların fermantasyonu sonucu oluşan son ürün-laktik asidin üretimi gibi metabolik özelliğe sahip mikroorganizmaların heterojen grubunu kapsamaktadır (Mozzi *et al.* 2010). Şekil 1.4 homofermentatif ve heterofermentatif LAB'nin şekerleri fermente ederken son ürünlerin oluştuğu reaksiyonları göstermektedir.

Homofermentatif LAB (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* ve bazı *Lactobacillustürleri*) Embden - Meyerhoff - Parnas (EMP) pathway ile şekerleri fermente ederek pirüvata (laktat dehidrogenaz (LDH) ile laktik aside dönüşen)

indirgemektedir (Caplice and Fitzgerald 1999; Forsythe 2000; Mozzi *et al.* 2010).

Leuconostoc, *Oenococcus*, *Weisella* ve bazı laktobasil türleri gibi heterofermentatif LAB genellikle phosphoketolase pathway (PKP) ile şekerleri fermente eder. Pentozların (ksiloz, riboz) fermantasyonu ile pirüvat ve asetil- P oluşumuna ve devamında laktat ve asetata dönüşümlerine sırasıyla öncülük eder. Bu bakterilerle hekzos (glukoz, fruktoz, mannoz) laktat, CO₂ ve etanole çevrilebilir (Caplice and Fitzgerald 1999; Forsythe 2000; Mozzi *et al.* 2010; Holzapfel and Wood 2014).

Çizelge 1.2. Son ürüne göre LAB grupları (Erkmen and Bozoğlu 2016)

Homofermentatif LAB	Fakültatif heterofermentatif LAB	Heterofermentatif LAB
<i>Lactococcus spp.</i> <i>Lac. lactic subsp. lactis</i> <i>Lac. Lactic subsp. cremoris</i>	<i>Lactobacillus spp.</i> <i>Lb. animalis</i> <i>L. bif fermentans</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. homuhiochii</i> <i>Lb. murinus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. pentosus</i> <i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb. sake</i>	<i>Lactobacillus spp.</i> <i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. cellobiosus</i> <i>Lb. confusus</i> <i>Lb. coprophilus</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. kefir</i> <i>Lb. reuteri</i> <i>Lb. sanfrancisco</i> <i>Lb. viridescens</i>
<i>Lactobacillus spp.</i> <i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. lactis</i> <i>Lb. bulgaricus</i> <i>Lb. leichmannii</i> <i>Lb. salivarius</i>		
<i>Pediococcus spp.</i> <i>Ped. acidilactici</i> <i>Ped. damnosus</i> <i>Ped. pentosaceus</i>	<i>Leuconostoc spp.</i> <i>Leu. dextranicum</i> <i>Leu. mesenteroides</i> <i>Leu. paramesenteroides</i> <i>Leu. carnosum</i> <i>Leu. gelidium</i>	
<i>Streptococcus spp.</i> <i>Str. bovis</i> <i>Str. thermophilus</i>		
<i>Enterococcus spp.</i> <i>Ent. faecium</i> <i>Ent. Faecalis</i>		

Turşuya salamura eklenmesiyle beraber fermantasyon başlar ve CO₂ baloncukları

görülür. Doğal fermantasyonda önce karışık bakteri popülasyonu (koliform, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Leu. mesenteroides*, *Enterococcus faecalis* ve *Ped. cerevisiae* gibi) gelişir ve asit üretir. Sonrasında *Lb. brevis*, *Leu. mesenteroides* ve *Lb. plantarum* baskın hale gelir ve daha sonraki asitliğe katkı sağlar.

Doğal fermantasyonda başlangıç aşamasında LAB sayısı düşüktür ve bu nitrat indirgeyen bakterinin hızlı büyümesine neden olmaktadır.

Fermantasyonun ortalarında Enterobacteriaceae ailesi üyeleri (*Escherichia*, *Enterobacter* ve buna benzer) ve *Bacillus* türleri tuz ve anaerobik koşullar nedeniyle gitgide yavaşlayan bir gelişimle ölmektedir. Eş zamanlı olarak LAB hızla çoğalır, asit üretir ve anaerobik koşullarda baskın hale gelir. Fermantasyon sonunda oldukça yüksek sayıdaki LAB baskın mikroorganizma olur ve turşu fermantasyonu kararlı halde kalır. Biyolojik ve teknolojik olarak bakıldığında bu bakterilerin turşudan izole edilip tanımlanması, turşu fermantasyonu için endüstriyel starterlerin oluşturulması açısından değerlidir (Yu *et al.* 2012).

Lactobacillus plantarum'un diğer laktik asit bakterilerinden daha yüksek asit toleransına sahip olması nedeniyle doğal meyve ve sebze fermantasyonunun son aşamasını tamamlamaktadır. Salatalık ve lahanalar fermantasyonlarında *Lb. plantarum*'un büyüme ve fermantasyon aktivitesi son ürünün mikrobiyal stabilite ve kalitesini büyük ölçüde etkilemektedir (Lu *et al.* 2003).

Dünyada fermente sebze ürünleri incelendiğinde ürünün genel laktik florasının *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus plantarum* türlerinden oluştuğu görülmektedir (Breidt *et al.* 2013). Çizelge 1.3'de görüldüğü gibi çoğu sebzenin laktik asit fermantasyonu tek bir mikroorganizmadansa farklı cinslere ait türlere bağlıdır.

Çizelge 1.3. Farklı fermente ürünlerde mevcut LAB (Erkmen and Bozoğlu 2016).

Ürün	Gıda kaynağı	Fermantasyon mikroorganizması
Saurkraut	Lahana	<i>Leu. mesenteroides</i> , <i>Leu. fallax</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> ve <i>Ped. pentosaceus</i>
Zeytin	Zeytin	<i>Leu. mesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> ve <i>Ped. Pentosaceus</i>
Turşu	Salatalık	<i>Leu. mesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i> ve <i>Lb. brevis</i>

Günümüzde LAB başlıca süt ürünleri, turşu, et ürünleri ve şarap gibi gıdalarda starter olarak endüstriyel alanda kullanılmaktadır (Papagianni 2012). Dahası LAB'nin aşağıda verilen birkaç fizyolojik karakterleri daha geniş endüstriyel uygulamalarda yer alması için daha uygun hale getirmektedir (Mazzoli *et al.* 2014):

- Genel olarak LAB, endüstriyel süreçlerin stresine hali hazırda adapte edilmiş dirençli mikroorganizmalardır. Çünkü yüksek asit toleransı göstermekte (pH 5 veya daha düşük pH değerlerinde hayatta kalabilirler) ve geniş optimal büyüme sıcaklıklarına (cinsine, suşuna bağlı olarak 20-45°C arasında değişen) sahiptirler.
- Çok sayıda mono(heksoz ve pentoz) ve di-sakkaritleri metabolize edebilirler. LAB gıda ve gıda dışı sektörlerde desteklenen uygulamalara dahil olan birçok metaboliti doğal olarak üretmektedirler. Örneğin; bakteriyosinler gibi antimikrobiyal moleküller; diasetil ve asetaldehit gibi gıda aroma ve tatları; vitamin gibi gıda kompleksleri; ekzopolisakkaritler gibi gıda tekstür ajanlarını; mannitol gibi tatlandırıcıları; yaminobütirik asit, opioid peptitler, selenometabolitler gibi nutrasötik moleküller; laktik asit ve etanol gibi kitlesel halde elde edilen kimyasallar, hatta plastik polimer üretimindeki uygulamalarla birlikte polilaktik asit (PLA) yada polietilen terafitalat (PET); etil asetat ve etanol gibi çözünen yada biyoyakıtlar; polihidroksialkanotlar (PHA) gibi biyoçözünür plastikler (Ross *et al.* 2002; Mazzoli *et al.* 2014).
- Patojenik streptokoklar haricinde LAB, patojen olmayan mikroorganizmalar olup GRAS (genel olarak güvenilir/ Generally Recognized as Safe) statüsünde yer almaktadır (Ogier and Serror 2008; Mozzi 2010; Mazzoli *et al.* 2014).
- Çeşitli sebze ve meyvelerden izole edilen laktik asit bakterilerinin küfler üzerinde inhibitif etkisi olduğu, patulin ve sitrinin gibi mikotoksin üretimini de inhibe ettiği

yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Bu durumda gıdaların raf ömrünün uzatılabileceği ve mikotoksinlerin gıdayla tüketimi ile oluşabilecek risklerin önüne geçilebileceği de düşünülmektedir (Ross *et al.* 2002; Yıldız 2011).

- Bakteriosinler; diğer Gram-pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olan laktik asit bakterilerinin ribozomlarında üretilen peptidler olarak tanımlanmıştır (Garneau *et al.* 2002; Foulquié Moreno *et al.* 2006; Boye 2015). Laktik asit bakterileri dört grup bakteriosin üretmektedir. En iyi belgelenen ve faydalanılan bakteriosin nisin (1.grup bakteriosin) olup ayrıca posttraslasyonel modifiye bir aminoasittir (bir lantibiyotik olarak da bilinir). Nisin *Lactococcus lactis* subsp *lactis* tarafından üretilir ve Gram-pozitif bakterilere karşı geniş bir bakteriyostatik spektruma sahiptir. peynir ürünleri, konserve gıdalar ve bebek mamaları ve özellikle yüksek asitli gıdalar gibi birçok gıda maddelerinde (2.5-100 ppm konsantrasyon aralığı) formüle edilmektedir (Ennahar *et al.* 1999; Ross *et al.* 2002; Boye 2015).
- FAO ve WHO probiyotikleri, yeterli miktarda sağlandığında konağına sağlık açısından bir yarar sunmakta olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlamaktadır. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Pediococcus acidilactici* ve *Saccharomyces boulardii* önemli probiyotik bakteri ve maya türleridir. Bağırsak mikroflorası tarafından fermente edilebilir ve sindirilebilir oligosakkaritlerin geniş bir grubu olan prebiyotiklerin varlığı ile bu bakterilerin olumlu katkısı arasında yüksek derecede ilişki vardır (Saarela *et al.* 2000; Boye 2015).
- Çetin (2011) belirttiği üzere fermantasyon için kullanılan mikroorganizmalar ürüne probiyotik özellik kazandırmaktadır. Bir dizi çalışmada probiyotik tüketimi; ishal tedavisinde, laktoz intoleransı, kolon kanseri, kolesterol, tansiyonu olanlarda, bağışıklık sistemi ve enfeksiyonlarda, mineral emiliminde, irritable bağırsak sendromu ve kolitlerde yararlı olmaktadır (Saarela *et al.* 2000).
- Süt, et, tahıl ve meyve, sebze gibi çoğu gıda ham maddelerinin muhafazasında aktif rol üstlenen bu bakteriler üretilen fermente gıda ve yemlerin organoleptik, reolojik ve besinsel değerine katkıda bulunmaktadır (Kılıç 2001; Leroy and Vuyst 2004). Starter kültür ve probiyotik özellikleri dışında, bakteriosin gibi antibiyotik ajanların üretimi ve gıda kaynaklı patojenleri engellemesi sayesinde LAB, fermente gıdaların işlenmesinde

artan potansiyele sahiptir. Dahası bu durum biyolojik olarak gıda muhafazasındaki önemini vurgulamaktadır (Singh and Ramesh 2009).

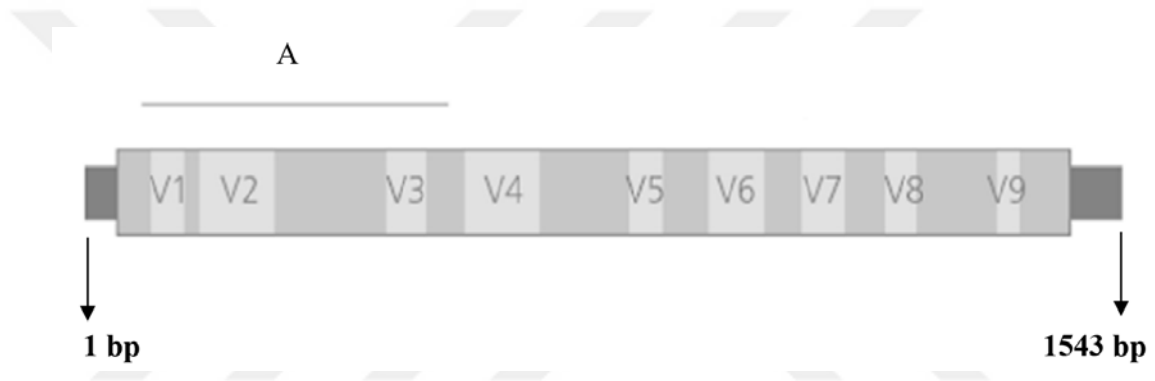
- Genetik yöntemler ışığında laktik asit bakterilerinin taksonomik çalışmaları yapılmakta olup önceden morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerin bu çalışmalarda yer aldığı görülmektedir (Abdelgadir *et al.* 2001). Laktobasillus cinsinin genetik açıdan heterojen suşları içermesi bakımından bu türleri biyokimyasal testlerle sınıflandırmak kompleks ve zor bir işlemdir (Collins *et al.* 1991). Örneğin Curk *et al.* (1996) *L. plantarum* suşlarının tanımlanmasının; bu bakterinin genotipik olarak farklı türlere yakınlığı ve fenotipik olarak *L. pentosus* ve *L. paraplantarum*'a çok benzerlik göstermesi nedeniyle zor yapıldığını ifade etmişlerdir.
- Son on yılda moleküler biyoloji teknikleri; geleneksel yolla fermente edilen sebzelerin mikrobiyal ekolojisi için yeni bir kılavuz olmuş ve gıda fermantasyonunda yeni bir pencere açmıştır (Giraffa *et al.* 2008).

Mikrobiyoloji alanında klasik tanılama yöntemlerine karşılık moleküler tanı yöntemleri bilimsel çalışmalara hem katkı sağlamakta hem de kendine özgü birçok avantajı da beraberinde getirmektedir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR; polymerase chain reaction, PCR) bazlı metotlar LAB suşlarının tanımlanmasında starter kültürlerin gözlenmesinde, antagonistik LAB belirlenmesinde ve moleküler tiplendirmede daha hızlı ve elverişli koşullar sunmaktadır (Singh and Ramesh 2009).

PCR reaksiyonu çift zincirli DNA molekülüne ısı işlem uygulanmasıyla iki zincir arasındaki hidrojen bağlarının kopması ilkesine dayanmaktadır. Temel olarak PCR mekanizması istenilen sayıda döngülerden oluşmaktadır. Tekrarlanabilen her döngü denatürasyon, yapışma ve uzama olarak üç adımı kapsamaktadır. Denatürasyon, yüksek sıcaklıkta (94-98°C) birbirinden ayrılan çift sarmallı DNA iplikçiklerinin birbirinden ayrılmasını; yapışma, 37-65°C aralığında çoğaltılması istenen hedef DNA bölgesinin iki ucuna spesifik olarak belirlenen 20-30 baz uzunluğundaki iki ayrı oligonükleotidin yapışmasını; son olarak uzama ise 72 °C'lerde bağlanan bölgelerden uzayarak yeni çift zincirli DNA'ların oluşmasını ifade etmektedir. Genel olarak PCR reaksiyonunun 30-35 döngü halinde tekrarlanması ile polimerizasyon ürünü bir önceki döngüye göre iki kat

artmakta ve daha düşük DNA/RNA konsantrasyonlarını saptanması mümkün olmaktadır (Aran 2014).

Ribozomal RNA tüm bakterilerde mevcut olduğundan filogenetik ilişkilerini incelemek için en iyi hedef olarak görülmektedir. İşlevsel olarak sabit ve daha değişken alanlarla ve yüksek oranda korunmuş alanlardan oluşmaktadır. Ribozomal RNA dizileri modern mikrobiyal taksonomi için bir omurga gibi hizmet veren filogenetik bir çerçeve sağlamaktadır (Ludwig and Klenk 2005; Hozapfel and Wood 2014).



Şekil 1.5. 16S rRNA geni (Gürtler and Stanisich 1996; Cohen *et al.* 2016)

16S rRNA genleri yaklaşık 1500 bp uzunluğunda olup korunmuş ve değişken bölgeler içerir. Korunmuş bölgeler, türler arasındaki filogenetik akrabalığı yansıtırken; yüksek orandaki değişken bölgeler, türler arasındaki farklılığı yansıtmaktadır. Şekil 1.5’de “A” ile gösterilen ve V1, V2 ve V3 bölgelerini kapsayan LAB’nin tanı ve tiplendirilmesinde yoğunlukla kullanılan 16S rRNA dizilerini ifade etmektedir (Gürtler and Stanisich 1996; Cohen *et al.* 2016).

Bu çalışmada doğal olarak üretilmiş turşulardan laktik asit bakteri izolasyonu yapılarak izolatların makroskobik, mikroskobik ve moleküler yöntemlerle tanımlanması amaçlanmıştır. İzolatların tanısı yapıldıktan sonra ileriki çalışmalarda ve turşu endüstrisinde kullanılabilme imkanlarının araştırılması amacıyla muhafaza edilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Ülkemizde yapılan bir çalışmada geleneksel yöntemle üretilmiş olan turşu örneklerinin mikrobiyotasında laktobasiller ve pediokokların yüksek oranda bulunduğu ve bu laktik floranın ise büyük bir bölümünü *Lactobacillus* türlerinin oluşturduğu bildirilmiştir. Lahana turşusu haricinde tüm turşu örneklerinde izolatların %34,9 unu *P. pentosaceus* oluştururken *Lb. plantarum* ise tüm izolatların %18,6 sını teşkil ettiği belirtilmiştir. Genel olarak turşu örneklerinde mevcut laktik asit bakterilerinde geniş bir çeşitlilik görülmüş ve nedeninin hammadde kaynaklarındaki farklılık, fermantasyon süre ve sıcaklık değişkenliği ile muhafaza koşulları olduğu öne sürülmüştür (Yıldız 2011).

Uylaşer ve Erdem (2014) %10 tuz + %1 asit ve %10 tuz + %8 asit içeren iki farklı salamura ile hazırlanan iki farklı hıyardan turşu üretimi yapmışlardır. Ayrıca iki farklı tuz (%0 - %2,5) ve asit (%0,5 - %1,3) konsantrasyonları ve üç farklı CaCl_2 konsantrasyonu (%0 - %0,15 - %0,3) denenmiştir. Bir gruba pastörizasyon (88 °C’de 20 dakika) uygulanırken, diğer gruba da koruyucu (0,5 g/L K-sorbat + 0,5 g/L Na-benzoat) eklenmiştir. 6 ay 20°C’de depolanan turşuların aylık olarak brüt ağırlık, net ağırlık, süzme ağırlığı, vakum, sertlik, asit, pH, tuz, kurumadde, kül ve indirgen madde analizleri yapılmıştır. Sonuçta son tuz konsantrasyonuna tuz alma işlemi yapılmadan ulaşmayı sağlayacak uygun konsantrasyondaki salamuralar ile stoklanmış hıyardan turşu üretilebileceği görülmüştür. Salamura içeriğinde yer alan CaCl_2 ’ün sertlik üzerine olumlu etkisi saptanırken pastörizasyon yerine koruyucu kullanımının sertliği artırdığı tespit edilmiştir. Tüm üretimler içinde en yüksek sertlik (128.9 td) stoklanmış No 1 hıyarın %2,5 tuz + %0,3 CaCl_2 + %1,3 asit + koruyucu formülüne sahip salamurayla kullanıldığı turşu denemesinde kaydedilmiştir.

Günümüzde birçok antialerjik gıda veya gıda faktörleri rapor edilmektedir. Bu durumla ilgili olarak Fujii *et al.* (2014) yaptıkları çalışmada antialerjik laktik asit bakterilerini insan bazofilik hücre hattı KU812F kullanarak taramışlardır. IgE çapraz bağlanmasının KU812F hücrelerinde Ca^{2+} girişini ve bir sonraki histamin salınımını indüklediğini belirtmiştir. LAB suşlarının, IgE çapraz bağlama tarafından tetiklenmiş [Ca^{2+}]

seviyesindeki artışı bastırma yetenekleri çalışmanın devamında incelenmiş ve 5 adet LAB suşunun (T2101, C0102, H1001, C1103 ve H0709) hem $[Ca^{2+}]$ girişindeki artışı hem de histamin salınımı bastırıldığı ifade edilmiştir. Sonuç olarak 5 adet LAB suşu anti-alerjik LAB'lere aday olarak gösterilmiştir.

Sanlibaba *et al.* (2012) Ankara Çubuk Bölgesi'ndeki turşu izole edilen laktik asit bakterilerinin izolatlarının karakterize edilmesini amaç edinmişlerdir. 153 LAB kültürü 16S rRNA genetiği polimeraz zincir reaksiyonu restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizmine (RFLP) dayanan moleküler yöntem kullanılarak tanımlanmıştır. Tüm suşların genomik DNA'ları izole edilmiş ve F27 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) ve R1492 (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) primerleri kullanılarak 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Sonuçta izolatlar tür seviyesinde tespit edilmiştir. İzolatların dağılımının; 37 *Lactobacillus brevis*, 46 *Pediococcus ethanolidurans*, 38 *Lactobacillus plantarum*, 15 *Lactobacillus buchneri*, 8 *Pediococcus parvulus*, 6 *Lactobacillus namurensis*, 1 *Lactobacillus diolivarans*, 1 *Lactobacillus parabrevis* ve 1 *Enterococcus casseliflavus* şeklinde olduğu görülmüştür.

Cheng and Jiang (2006) gram negatif bakteriler, gram pozitif bakteriler ve mayalardan genomik DNA eldesi için çok basit ve hızlı bir yöntem sunmuştur. Bu yöntemde, bakteriler veya mayalar doğrudan fenol ile eritilmekte ve fenol kalıntılarını uzaklaştırmak için süpernetant kloroform ile ekstrakte edilmektedir. Süpernetant, genomik kütüphane oluşturulması ve PCR gibi uygun moleküler analizlerde kullanılan DNA içermektedir. Bu yöntemin bakteri ve mayalardan rutin DNA ekstraksiyonu için basit, tekrarlanabilir olduğu belirtilmiş ve yapılan bir grup mikroorganizma analizinde yüksek kalitede DNA elde edilmiştir.

Bir diğer çalışmada %3 - %4 NaCl ve 0,025 - 0,05 M Ca-asetat içeren salamuralarda fermente edilen hıyar turşuları, farklı depolama sıcaklıklarında (4, 20°C) ve değişik sürelerde (3, 6 ay), pastörize edilerek (70°C 15 dakika) ve edilmeden depolanmıştır. 3 ve 6 ay depolama sonunda, salamuradaki kimyasal ve mikrobiyolojik değişimler ve hıyar turşusunun doku sertliği belirlenmiştir. Salamuraya ilave edilen Ca-asetat hıyar

dokusu sertliğini %26,91 düzeyine kadar artırırken, Ca-asetat içermeyen salamura içerisinde depolanan hıyar turşularında %37,93 düzeyine kadar ulaşan yumuşama gözlenmiştir. Pastörizasyon işlemi (70°C 15 dakika) laktik asit bakterisi ve maya gelişmesini engellemiş, aynı zamanda, hıyar dokusu sertliğinin korunmasına yardımcı olmuştur (Özçelik ve İç 2000).

Gundruk, sinki ve khalpi hindistanda Sikkim bölgesindeki laktik fermente edilmiş ürünlerdir. İnziangsang ise Nagaland ve Manipur bölgesinde sebzelerin fermantasyonu ile elde edilen diğer bir üründür. Bu ürünlerin kullanıldığı bir çalışmada 25 gundruk, 12 sinki, 25 khalpi ve 3 inziangsang olmak üzere toplamda 65 örneğin mikrobiyolojik analizi yapılmıştır. LAB ve aerobik mezofilik bakteri sayımı 10^7 kob g^{-1} seviyesinde tespit edilmiştir. Maya popülasyonuna sinki ve khalpi örneklerinin birkaçında rastlanırken hiç küf tespit edilmemiştir. Çalışmada toplamda 269 LAB suşu izole edilmiştir. Bu suşların fenotipik karakteristiği belirlendikten sonra genotipleme için RAPD PCR, repetitive element PCR ve tür-spesifik PCR teknikleri kullanılmıştır. Bu fermente ürünlerde LAB'nin ana temsilcileri olarak *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici* ve *Leuconostoc fallax* türleri tanımlanmıştır (Tamang *et al.* 2005).

Bir diğer çalışmada kendilerince hazırlanan turşu örneklerinden toplam 40 adet bakteri izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen izolatların tanımlanması için gram boyama, katalaz, morfolojik özellikler, biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri test edilmiştir. Tanımlanması yapılan izolatlardan 40 tanesinin *Lactobacillus* cinsine ait olduğu tespit edilmiş ve Gram pozitif, katalaz negatif ve çubuk şeklinde olan izolatlar moleküler tanımlama yapılncaya kadar -20°C'de saklanmıştır (Alan ve Dığrak 2012).

Ankara ili Çubuk ilçesine ait 15 adet farklı ev ve endüstriyel olarak doğal yöntemlerle üretilen turşu örneğinden 174 adet laktik asit bakterisi izole edilmiş ve bu izolatlara morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler yapılmıştır. Bu izolatlara yapılan fenotipik testler sonucu laktik asit bakterisi olma özelliği gösteren 51 adet izolattan 45 tanesinin API 50 CHL kiti ile karbonhidrat fermantasyon profilleri belirlenmiştir. 51

izolatın 38'inin *Lactobacillus* cinsi olduğu ve bunlar arasında *L. brevis*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*'un baskın türler olduğu belirlenmiştir. Bu sonucu doğrulamak için de izolatların SDS-PAGE yöntemi ile toplam hücre protein profilleri incelenerek standart marker proteinler yardımıyla protein fingerprintleri belirlenmiştir (Dursun 2010).

Turşu ve zeytinlerin fermantasyon sürecinde antogonistik starter kültürlerin seçiminin amaçlandığı bir diğer çalışmada Türkiye'nin çeşitli yerlerinden toplanan 70 turşu ve 16 zeytin örneğinde kimyasal ve mikrobiyolojik analiz yapılmıştır. 86 LAB izolatının bakteriosin benzeri metabolit ürettiği belirlenmiştir. Ayrıca fermente edilmiş turşu ve zeytin üretiminde öne çıkan en uygun olan starter kültür tespit edilmiştir. Araştırmacılar antagonistik etkiye sahip 16 suşun 13 ünün *Lb. plantarum*, diğer üçünün ise *Lactobacillus pentosus* olduğunu bildirmişlerdir (Con and Karasu 2009). Araştırmacılar ilgili çalışmanın devamı niteliğinde gerçekleştirdikleri bir diğer çalışmalarında izolatlardan birinin (*L. plantarum* 22) teknolojik ve probiyotik özellikleri açısından uygunluğunu bildirmişlerdir (Karasu vd 2010).

Kontrollü fermantasyon yapılan bir çalışmada görülmüştürki, bu uygulama ticari turşu salatalıklarının stok kalitesini olumlu yönde artırmıştır (Fleming *et al.* 1975). Ardından Etchells *et al.* (1976) benzer uygulama ile salatalıklarda sertlik, renk gibi duyuşal özelliklerin normal; şişme durumunun az olduğu ve kaliteli salamura stoklarının elde edildiğini belirtmişlerdir.

Bir diğer çalışmada turşuda aroma gelişimi sağlamak ve probiyotik özellik kazandırmak amacı ile ürüne *Lactobacillus plantarum* suşu ilave edilmiştir. Denemede ilk başlarda sirke ilavesiyle de düşük bir pH sağlanarak rekabetçi mikrofloranın gelişiminin kısıtlandığı görülmüştür. Depolamanın 60. gününe kadar ürün probiyotik özelliğini korurken maya gelişimi nedeni ile tüketilebilirliğini kaybettiği rapor edilmiştir (Çetin 2011).

Lahana, havuç ve pancar esaslı sebze ürünlerinin fermantasyonu için çeşitli laktik asit bakterileri (LAB) tespiti gerçekleştirilmiştir. Tarama prosesinin bir kısmı olarak, sebze

suyu besiyerinde (VJM) 15 kültürün gelişimi otomatik spektrofotometre ile karakterize edilmiştir. Denemede gelişimin gözlenmesi amacıyla asitlendirme modelleri de ek olarak kurulmuştur. Çalışmada *Lb. plantarum* NK-312, *Pediococcus acidilactici* AFERM 772 ve *Leu. mesenteroides* BLAC kültürleri ile sebzeler inoküle edilmiştir. Depolama sırasında yaşaması ve sebze suyu besiyerinde gelişimleriyle ilgili olarak saf kültürler ile karışık kültürler arasında büyük farklılıklar bulunmuştur. Fermente VJM'nin depolanması sırasında karışık kültüre kıyasla saf suşun canlı hücre sayımında azalmalar daha hızlı meydana gelmiştir. Havuç lahanalı sebze karışımının fermantasyonu sırasında şeker metabolizması hem glukoz hem de fruktozun sindirimi ile karakterize edilmiştir. Ancak asitlendirme durduğu anda fermente sebzelerde şeker miktarı değişmeden kalmıştır. 72 saat sonra 20°C'de LAB inoküle edilmiş sebzelerin pH'sı edilmemiş kontrollere göre belirgin bir şekilde daha düşük çıkmıştır. LAB inokülasyonu fermantasyon sırasında asetik asit üretimini engellemekle sonuçlandıran ve etanol üretimini durduran sebze fermantasyonu için tasarlanmıştır. VJM'de seçme (seleksiyon) işlemi fermente sebzelerin depolanmasında ve fermantasyon sırasında gaz üretimini azaltmada daha etkili ve ortamı asitledirmede sebze inokülantlarından daha hızlı olan bir karışık kültür hazırlanmasına olanak vermektedir (Gardner *et al.* 2001).

Havuç suyu (*Daucus carota* L.) en popüler sebze sularından biri olup zengin bir doğal b-karoten kaynağıdır. Sebze suları fermente edilse de edilmese de tüketilebilir. Laktik fermente sebze suları üretimi ile, havuç suyu mikrobiyolojik olarak stabil, lezzetli ve potansiyel olarak yüksek besin değeri kazanmaktadır. Bu çalışmada, Refik Saydam Kültür Koleksiyonu (RSKK) 1602 kodlu *L. plantarum* havuç püresi için starter kültür olarak kullanılmıştır. Pürede başlangıç bakteri konsantrasyonunun 3×10^5 kob g⁻¹ olan havuç suyu duyuşal değerlendirme sonucunda en çok tercih edilen fermente havuç suyu olmuştur. Fermente havuç suyunun asitliği *Lb. plantarum* RSKK 1602 starter kültürünün popülasyonunu ve 15-16 saatlik fermantasyon süresini değiştirerek ayarlanabilir. Havuç püresindeki *Lb. plantarum* RSKK 1602 büyüme eğrisini tanımlamak için *modifiye Gompertz* denklemi seçilmiştir (Demir *et al.* 2006).

Bir diğer çalışmada hıyar turşusu fermantasyonunda karışık kültür olarak

Saccharomyces cerevisiae ve *Saccharomyces rosei*'nin *Lb. plantarum* ile birlikte kullanılabilirliği değerlendirilmiştir. Bu denemede şeker kullanımı ve her bir mikroorganizmanın hücre sayısı ve inokülasyon zamanından etkilenildiği görülmüştür. Eş zamanlarda aynı miktarlarda maya ve bakteri veya bakterilerden önce mayalar eklendiği zaman şeker fermantasyonunun 28°C'de 6 günde tamamlandığı görülmüştür. *Lb. plantarum* eklendiğinde veya düşük sayıda maya eklendiğinde ise şeker fermantasyonu durmuştur (Daeschel *et al.* 1988).

Çin'in güneyine ait 6 farklı bölgeden toplanan geleneksel 36 turşu örneğinde baskın laktik asit bakterisinin tanımlanması ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Örneklerden 3,90'dan 8,40 log kob ml⁻¹'e kadar değişen laktik asit bakterisi sayım sonuçları elde edilmiştir. Gram pozitif, katalaz negatif olan *Enterococcus thailandicus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lb. brevis*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. sakei*, *L. spicheri*, *Leuconostoc lactis* ve *Pediococcus ethanolidurans* türlerine ait toplam 185 suş morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre ayrılmıştır. Suşlar, doğrulama amacıyla 16S rRNA nükleotid sekans analizine tabi tutularak tanımlandı (Yu *et al.* 2012).

Wouters *et al.* (2012) yaptıkları bir araştırmada sebzelerin fermantasyonu sonunda *Lb. brevis* ve *Lb. plantarum* suşlarının kontrollü sebze fermantasyon işlemleri için iyi birer starter kültür adayları olabileceğini belirtmişlerdir.

Lactobacillus plantarum suşlarının izolasyon ve tanısının yapıldığı bir çalışmada yine doğal turşu örnekleri kullanılmıştır. İzolatlar gram boyama, koloni morfolojisi ve katalaz testi ile belirlenmiştir. Moleküler düzeyde tanımlanması için recA primerleri kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonuçta 22 adet *Lb. plantarum* izolatu elde edilmiş ve bunlar starter kültürü olma potansiyeli ve genetik içeriklerinin belirlenmesi amacıyla stoklanmıştır (Alan ve Dığrak 2012).

Büyükyörük ve Soyutemiz (2010) çalışmalarında starter kültür kullanılmadan geleneksel usullere göre üretilmiş İzmir Tulum peynirinde laktokok cinsine ait starter

bakterilerin izolasyonunu gerçekleştirmiştir. Bu amaçla, 90 adet peynir örneğinin analizinde nalidiksik asit içeren M17 kullanılmıştır. Mikroorganizma sayısının $1,9 \times 10^7 - 2,1 \times 10^8$ kob/g düzeyleri arasında değiştiği her bir peynir örneğinden 90 adet izolata elde edilmiş ve hepsi *L. lactis* ve *L. cremoris* alttürlerini saptamak için PCR tekniği ile incelenmiştir. 18 izolat *lactis* primeri; 11 izolat da *cremoris* primeri ile pozitif bant göstermiştir. Fenotipik testlerde laktokok özelliği göstermeyen 10 izolat, *lactis* primeri ile eşleşmiş ve atipik olarak adlandırılmıştır. Ayrıca fenotipik testler neticesinde laktokok özelliği gösteren 17 izolat her iki tür için de pozitif bant vermemiştir.

DNA parmak izi yöntemleri laboratuvarında susuz lahana turşusu fermantasyonunda starter kültürlerin gelişimini takip etmek için kullanılmıştır. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) metodu *Leu. mesenteroides* kültürlerinin suşa spesifik tanımlanmasında kullanılmıştır. Fermantasyon izolatları ve starter kültürlerine yönelik RAPD bant desenlerinin karşılaştırmalı analizi genetik olarak işaretlenmiş ve işaretlenmemiş kültürler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RAPD desenlerinde bazı varyasyonlar gözlemlenirken sonuçlar gösterdi ki starter kültürlerin fermantasyonun başlangıcından 5 gün sonraya kadar olan erken heterofermentatif aşama sırasında fermantasyona hakim olmuştur. İşaretlenmiş ve işaretlenmemiş starter kültürlerinin sonuçları genler arası bölgeler için gerçekleştirilen ITS-PCR işlemiyle doğrulanırken suş tanımlama darbeli alan jel elektroforez (PFGE) desenleri tarafından doğrulanmıştır. Sonuçlar susuz lahana turşusunun fermantasyonunda işaretlenmemiş *Leu. mesenteroides* starter kültürlerinin gelişimini takip etmekte RAPD uygulamasının yararlılığını göstermiştir (Plengvidhya *et al.* 2004)

Randazzo *et al.* (2004), Sicilya'nın farklı bölgelerinden toplanan doğal fermente yeşil zeytinlerdeki laktik asit bakterilerinin fenotipik ve genotipik özelliklerini araştırmışlardır. Biyokimyasal ve PCR gibi moleküler metodlarla 16S rRNA kullanılarak izolatların karakterizasyonunu yapmışlardır.

Konu ile ilgili diğer bir projede 148 adet Laktik asit bakterisi kullanılmış ve 16S rDNA bölgesinin dizi analizi yapılmıştır. Ön çalışmada PZR ile çoğaltılan 16S rDNA bölgesi

kit kullanılarak jelden saflaştırılmış ve sekans analizi için hazırlanmıştır. Bu amaçla gram-pozitif ve benzer bakterileri hedef alan pB 5'd TAA CAC ATG CAA GTC GAA CG 3' ve 1492r 5'd TAC CTT GTT ACG ACT T 3' primer çifti kullanılmıştır (Osmanağaoğlu 2010).

Geleneksel fermente ürünlerimizden tarhanada laktik asit bakterilerinin sayımı, tanımlanması ve izolasyonu yapılmış; sonuçta MRS, M17 ve SBM(Slanetz ve Bartley Medium)'den 226 gram-pozitif, katalaz negatif izolat elde edilmiştir. İzolatlar rep-PCR, multiplik PCR, 16S rRNA sekansı ve karbohidrat asimilasyon profili metotlarını içeren fenotipik ve genotipik analizlerin kombinasyonları ile gruplandırılarak tanımlanmıştır. İzolatların %27'si *Pediococcus acidilactici*, %19'u *Streptococcus thermophilus*, %19'u *Lactobacillus fermentum*, %12'si *Enterococcus faecium*, %7'si *Pediococcus pentosaceus*, %5'i *Leuconostoc pseudomesenteroides*, %4'ü *Weissella cibaria*, %2'si *Lactobacillus plantarum*, %2'si *Lactobacillus delbrückii* spp. *bulgaricus*, %2'si *Leuconostoc citreum*, %1'i *Lactobacillus paraplantarum* ve %0,5'i *Lactobacillus casei* olarak tanımlamıştır (Sengun *et al.* 2009).

Diğer bazı bakterilerde olduğu üzere LAB'lerinin tanımlanmasında kullanılan diğer bir metot spesifik gen bölgelerinin çalışılmasıdır. Bu yöntemle örnek olabilecek çalışmada *L. plantarum* tanımlanması *recA* geninin amplifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada ileri primer olarak *recA* gen planF (5'-CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA-3') ve geri primer olarak pREV (5'-TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC-3') kullanılmıştır (Torriani *et al.* 2001).

Liu *et al.* (2011) yaptıkları çalışmada doğal olarak fermente olan çin turşularından konjuge linoleik asit üreten *Lactobacillus plantarum* suşlarının izolasyonu konu edilmiştir. Doğal fermantasyona bırakılan 3 farklı turşunun suyundan 43 adet LAB suşu izole edilmiştir. Konjuge linoleik asit üreten bu suşlardan 15 izolatı *Lactobacillus plantarum* olarak tanımlanmıştır. Bunun için API 50 CHL sistemi ve 16S rDNA sekans analizinden yararlanılmıştır. Böylece tanımlanan bu suşun turşu gibi gıda kaynaklarını konjuge linoleik asit yönünden zenginleştirebilecek uygun bir aday olduğu ortaya

konmuştur.

Akbaş'ın (2006) yaptığı çalışmada, cam kavanozlarda satışı sunulan 10 çeşit pastörize ve 10 çeşit pastörize edilmemiş 20 turşu ile 20 adet ev yapımı turşu örneğini içeren toplam 40 adet turşu örneğinde mikrobiyolojik, kimyasal analizler ve biyojen amin miktarları belirlenmiştir. Bu turşuların raf ömrü süresince 4°C ve 20°C'de depolanmada kimyasal değerlerinde önemli değişiklik olmamıştır. Mikrobiyolojik olarak ise depolama sonrasında pastörize örneklerde TMAB (Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri), LAB, maya-küf, koliform ve enterobakteri sayım sonuçları <1 log kob/mL olarak bulunmuştur. Ev yapımı pastörize olmayan örneklerde ise TMAB, LAB, maya-küf sayım sonuçları ve kimyasal analiz sonuçları her bir örnek için farklı miktarlarda bulunmuştur. Biyojen amin miktarında ise depolama süresince önemli bir artış ve azalış olmadığı saptanmıştır. Genellikle biyojen amin içerikleri salamuradaki hallerinde meyvelerinin biyojen amin miktarına kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Turşularda en yüksek konsantrasyona sahip olan biyojen aminler sırasıyla putresin, kadaverin ve triptamin en düşük konsantrasyona sahip biyojen amin ise spermin olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada, Ankara Çubuk bölgesi turşularından izole edilerek tanımlanan ve kültür koleksiyonuna katılan 36 adet laktik asit bakterisinin bazı özellikleri saptanmıştır. Bu analizler suş bazında gerçekleştirilmiş olup farklı pH ve tuz konsantrasyonunda gelişmesi; laktik asit, H₂O₂, bakteriyosin üretme durumu; antimikrobiyal ve proteolitik aktivitesi, enzim profilleri gibi özellikleri incelenmiştir. Sonuçta pH 5.0, pH 6.5, %3 ve %6.5 tuz konsantrasyonlarında çoğunun geliştiği ve LAB'de 24 saat inkübasyon sonrası 0.02-1.2 g/100 mL asit üretimi ile *L. innocua*, *E. coli* ve *Salmonella* üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip oldukları, fakat bakteriyosin ve benzeri maddeler üretilmediği bulunmuştur (Arslankoz 2011).

Kumar *et al.* (2012) yaptığı çalışmada yerel sebze turşuları ve fermente içeceklerden izole edilen laktik asit bakterileri yeni probiyotiksuş olma potansiyelleri gibi fonksiyonel karakteristiklerini araştırmışlardır. Safraya yüksek toleransı (%0,2) esas

alınarak seçilen 4 izolata (hepsi Laktobasil türleri) hem standart hemde moleküler metodlar (16S rDNA) uygulanmış ve sırasıyla izolatları *Lb. helveticus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* ve *Lb. bulgaricus* olarak tanımlamışlardır. Bu seçilen suşlar antibiyotik direnci, yapay mide suyu ve fenole (%0,4) tolerans, enzimatik profil, enterik patojenlere (*Enterobacter sakazakii*, *Salmonella Typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* ve *Aeromonas hydrophila*) karşı antagonistik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Tüm suşlar düşük pH (3,0) değerlerinde 4 saat boyunca safra tuzu hidrolaz aktivitesinin olduğu yapay mide suyunda yaşamıştır ve vankomisin içeren çoğu antibiyotiğe karşı duyarlıdır. Ek olarak bu suşlar fenole karşı yüksek tolerans, yüksek hücre yüzeyi hidrofobikliği/su geçirmezliği (>%60) göstermiş ve fareye ait splenositlerin (dalağın sabit primitif retiküler hücreleri) çoğalmasını teşvik etmiştir. Mevcut çalışmadaki bu dört suş *L. casei*'nin en güçlü baskılayıcı etkiye sahip olmasına rağmen farenin dalak hücrelerinin konkanavalin A uyarılmış proliferasyonunu baskılamıştır. Çalışmanın sonuçları probiyotik gıdaların gelişiminde bu suşların potansiyel olarak tatbik edilebileceğini (sonrasında insan klinik deneyleri ile) önermektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Ülkemizin farklı illerinde evlerde üretilmiş 41 farklı turşu örneği toplanmış ve içerik bakımından incelenerek mikrobiyolojik ve kimyasal analizleri yapılana dek +4 °C’de muhafaza edilmiştir. Denemede kullanılan turşu örneklerinin menşei ve içeriklerine ait bilgiler Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Toplanan ev turşusu örneklerinin menşei ve içerikleri.

Örnek no	Menşei	İçerik
1	Gümüşhane	Domates
2	Trabzon	Fasulye
3	Manisa	Karışık
4	Rize	Kırmızıbiber, lahana, havuç
5	Samsun	Karışık
6	İstanbul	Kornişon
7	Osmaniye	Kornişon
8	Gümüşhane	Şalgam
9	Giresun	Kornişon
10	Erzurum	Şalgam
11	Diyarbakır	Şalgam
12	Artvin	Lahana, biber
13	Hatay	Biber
14	Samsun	Domates, biber, fasulye
15	Kayseri	Karışık
16	Erzurum	Fasulye
17	Gümüşhane	Salata, biber
18	Erzurum	Mor lahana, acur
19	Bursa	Salata, lahana, havuç
20	Erzurum	Lahana, domates, biber
21	Erzurum	Acur, biber, lahana
22	Bursa	Fasulye
23	Bursa	Fasulye
24	Bursa	Fasulye
25	Bursa	(Nohut) lahana, limon, salatalık, havuç
26	Bursa	(Ekmek-nohut) havuç, lahana, maydanoz
27	Bursa	(nohut) biber

Çizelge 3.1. (devam)

28	Erzurum	Çaşır
29	Erzurum	Lahana, biber, havuç
30	Bursa	Salatalık
31	Malatya	Domates, salatalık, acur
32	Malatya	Domates, biber, lahana
33	Malatya	Koruk*, havuç, biber, lahana, salatalık
34	Malatya	Karnabahar
35	Ardahan	Biber, lahana, havuç, maydanoz
36	Ardahan	Biber, lahana, havuç
37	Ardahan	Lahana
38	Ardahan	Havuç, lahana, maydanoz
39	Ardahan	Karnabahar
40	Ardahan	Pancar sapı
41.	Ardahan	Pancar

*Koruk:olgunlaşmamış üzüm

Turşu örnekleri Çizelge 3.1’de görüldüğü üzere genelde karışık meyve ve sebze içermektedir. Bununla birlikte farklı bölgelerde turşuya (çizelgede parantez içinde gösterilen) nohut, ekmek ve olgunlaşmamış üzüm de katılabilmektedir. Fakat kaynaklarda da belirtildiği gibi aroma vermesi için genellikle sarımsak ve baharat turşu yapımında kullanılmaktadır. Ev turşularının hepsinde sarımsak bulunduğundan ayrıca yazılmamıştır.

Çalışmamızda 41 adet ev turşusundan daha fazla örnek toplanmıştır. Ancak bazıları fermantasyonunu tamamladığından yapılan mikroskopik inceleme sonucunda sadece maya gözlenmiştir. Bu yüzden ilgili örnekler analize alınmamıştır.

3.2. Yöntem

Çeşitli illerden temin edilen örnekler muhafaza ortamından çıkarılmış ve (oda sıcaklığına geldiğinde) analizler için örneklerin salamura kısımları kullanılmıştır. Mikrobiyolojik analizlerinden toplam mezofilik aerobik bakteri, maya ve küf, koliform, enterekok, laktobasil, laktokok, *Staphylococcus aureus* sayımları yapılmış ardından pH, asitlik ve tuz miktarı tayini gibi mikrobiyolojik özellikleri etkileyen kimyasal analizleri

gerçekleştirilmiştir. Aşağıda ilgili analiz metotları görülmektedir.

3.2.1. Mikrobiyolojik analizler

Mikrobiyolojik analizler için %0,85 NaCl içeren steril fizyolojik tuzlu su (fts) ile hazırlanan dilüsyonlar kullanılmıştır. Bu amaçla numunelerin salamura kısmından 1 ml alınarak 9 ml fts içeren tüplere konulmuş ve her adımda 10 kat seyreltme yapılmıştır (Temiz 2016). Dilüsyon hazırlanması dahil yapılan tüm mikrobiyolojik analizler 2 paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan her türlü cam ve metal malzeme, besiyeri ve çözeltiler 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edilmiştir (Wise clave, WAC-47).

İnkübasyon sonunda 30-300 arası koloni içeren belli dilüsyonlardan hazırlanmış petriler sayıma alınmıştır (Temiz 2016). Sayım sonuçlarının logaritması alınarak kaydedilmiştir.

3.2.1.a. Toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı

Bu amaçla Plate Count Agar (PCA) (Merck) besiyeri kullanılmıştır. Yüzeye yayma tekniği ile örneklerin inokülasyonu yapılmış ve 30-32°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır ve uygun sayıda koloniler sayılarak sayım sonucu belirlenmiştir (Harrigan 1998).

3.2.1.b. Maya ve küf sayımı

Maya ve küf sayımı için Potato Deksroz Agar (PDA) (Oxoid) sterilize edildikten sonra %10'luk steril laktik asit çözeltisi ile asitlendirilerek (pH 3,5) 50°C gibi bir sıcaklıkta petri kaplarına dökülmüştür (Temiz 2016). Besiyeri hazırlandıktan sonra uygun dilüsyonlardan yüzeye yayma yöntemiyle ekim yapılarak oda sıcaklığında (25°C)'de 5

gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda uygun sayıdaki koloniler sayılmıştır (Harrigan 1998).

3.2.1.c. *Staphylococcus aureus* sayımı

Uygun dilüsyonlardan 0,1 ml Baird-Parker Agar'a (Merck) ilave edilerek steril drigalski spatülü yardımı ile petri yüzeyine yayılmıştır. Ekimi tamamlanan petriler 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tipik *S. aureus* kolonileri (siyah, etrafı opak zonlu) sayılmıştır (Harrigan 1998).

3.2.1.d. Enterobacteriaceae sayımı

Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) (Fluka) katı besiyeri kullanılarak Enterobacteriaceae analizi dökme plak yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (Temiz 2016). Parlak kırmızı renkli koloniler sayılarak sonuçlar kaydedilmiştir (Harrigan 1998).

3.2.1.e. Laktik asit bakterilerinin sayımı

MRS (de Man, Rogosa, Sharpe Agar) ve M17 agarlara (Oxoid) ekim yapılmıştır. Ayrıca heterofermentatif laktobasiller için APT agar (Merck) da kullanılmıştır. MRS agara ekim yapılan petriler (Anaerocult® A ile sağlanan) anaerobik kavanozda 2-3 gün, M17 ve APT agardaki ekimler ise aerobik şartlarda 1 gün 30-32°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sona erdiğinde 30-300 koloni içeren petrilerde beyaz, krem, sarı renkteki, katalaz negatif koloniler mikroskopik muayene eşliğinde sayılmıştır (Harrigan 1998; Cetin 2011).

MRS ve M17 agarda oluşan kültürler APT agar ile yapılan kültürlerle kıyasla daha belirgin ve çok sayıda olduğundan APT agar ile sayım sonucu alınmamıştır.

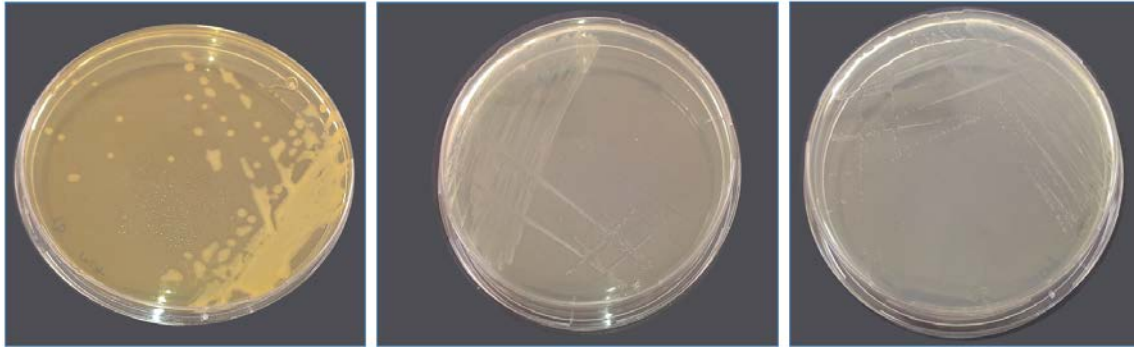
Enterokok grubu LAB için örneklerin uygun dilüsyonlarından Kanamycin Aesculin

Azide Agar (KAA) (Merck)'a ekimi yapılmış ardından petri kutuları 35-37°C'de 2-3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gözlenen siyah ve haleli koloniler sayılmıştır (Harrigan 1998).

3.2.2. LAB izolasyonu

Turşu örnekleri MRS, M17 agar ile KAA besiyerlerine (enterokoklar için) inoküle edilmiş ve oluşan karışık kültürlerden makroskobik ve mikroskobik özelliklerine göre farklı oldukları belirlene koloniler izole edilmiştir.

Daha sonra bu izolatlar laktokok; laktobasil; enterokok olarak gruplandırılmış ve sırasıyla 1-99; 100-299; 300-399 arasında numaralandırılmıştır. Şekil 3.1.'de görüldüğü gibi izolatların saflaştırılmasında tek koloni düşürme yöntemi (üçlü çizim) kullanılmıştır (Temiz 2016).



Şekil 3.1. Çizilen saf kültürlerin görüntüsü

İzolatların Makroskobik ve Mikroskobik İncelenmesi

Laktik asit bakterilerinin elde edilmesi amacıyla saf kültürlerle makroskobik ve mikroskobik inceleme (Olympus BX51T Scientific ve Zeiss Axio Imager 2) yapılmış katalaz testi sonucuna göre tasnif edilerek uygun izolatlar belirlenmiştir. İzolatlar

belirlendikten sonra saf kültürlerinin koloni şekilleri ve yapıları incelenmiş ve kaydedilmiştir (Jamaly *et al.* 2011).

Mikroskopik inceleme amacıyla da gram boyama yapılmış olup preparatlardan mor renkteki görüntüye sahip olanlar gram pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz 2016).

Katalaz testi

Mikroskopik inceleme sonunda laktik asit bakterisi olduğu şüphelenen kültürlerden bir lam üzerine öze ile alınarak saf su ile iyice karıştırılmıştır. Üzerlerine %30'luk H₂O₂ damlatılmasıyla çıkan hava kabarcığı katalaz pozitif test sonucunu göstermektedir (Temiz 2016).

Tespit edilen gram pozitif ve katalaz testi ile belirlenen katalaz negatif izolatlar moleküler tanı işlemi için tekrar saflaştırılmıştır. Saf kültürler sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere MRS Broth, M17 Broth ve Enterokoklar için Nutrient Broth içerisinde %20 gliserol çözeltisi içinde -80°C'de muhafaza edilmiştir (Jamaly *et al.* 2011).

3.2.3. İzolatların Moleküler Tanısı

Moleküler tanısı yapılmak üzere -80 C°de derin dondurucudan çıkarılan suşlar ilgili besiyerlerine çizilmiş ve kaydedilen özellikleriyle tekrar kontrol edilerek canlandırılmışlardır. Bu taze kültürlerde öncelikle izolatların suş seviyesinde benzerlikleri moleküler seviyede belirlenmiştir. Tespit edilen gruplandırılmış suşlardan birer adet temsili suşun sekans işlemi gerçekleştirilerek ürünün laktik asit bakteri florası ortaya koyulmuştur.

İzolatların tekrar canlandırılması

Genetik analiz yapılacağı zamana kadar -80°C 'de saklanan izolatlar işlem öncesi taze olmaları amacıyla tekrar çıkarılmıştır. Olası kontaminasyon riski için tekrar MRS, M17 agar ile KAA'a çizim yapılmıştır. Kaydı tutulan izolatlar aynı numaralı canlandırılan izolatlarla eşleştirilmiş ve DNA izolasyon aşamasına hazır hale getirilmiştir.

İzolatların moleküler seviyede gruplandırılması ve tanısı

Katı ve saf kültürler özeyle toplanmıştır. Ardından steril saf su eklenerek homojenize edilmiştir ($\text{OD}_{600}=0,4$). Süspansiyon $5000 \times \text{G}$ 'de 3 dk santrifüj edilmiş ardından fosfat tamponu ile 2 kez ultra saf su ile 1 kez olmak üzere 3 defa yıkanmıştır. Bu süspansiyon; içine 0,5 ml 6 M üre ve 0,1 ml %10 SDS ilave edilerek 37°C 'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler kaynama sıcaklığında 5 dk tutulduktan sonra $8000 \times \text{G}$ 'de 25°C 'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılmıştır.

Pellet üzerine 0,1 ml 0,2 N NaOH eklenerek 37°C 'de 10 dk inkübe edilmiştir. Nükleik asit hariç hücresel parçaların ayrılması için $3000 \times \text{G}$ 'de 25°C 'de 3 dk santrifüj edilmiş ve yine süpernatant uzaklaştırılmıştır. DNA saflaştırılması için 2,5 hacim absolute (mutlak) alkol ilave edilerek -20°C 'de 2 saat bekletilmiştir. $13200 \times \text{G}$ 'de, 4°C 'de 15 dk santrifüj edilmiş, %70'lik etanol ile yıkanmıştır. DNA pelleti oda sıcaklığında kuruduktan sonra 20 μl TE tamponunda tekrar süspanse edilmiş ve PCR işlemine hazır hale getirilmiştir (Singh and Ramesh 2009).

İzolatların suş seviyesinde gruplandırılması amacıyla RAPD PCR işlemi uygulanmış ve analizlerde $(\text{GTG})_5$ primeri ($5' \text{-GTGGTGGTGGTGGTG-3'}$) kullanılmıştır. Toplam 25 μl 'lik PCR karışım hazırlanarak Kathleen *et al.* (2014) tarafından önerilen PCR protokolü uygulanmıştır. Elektroforezde ilk kuyucuğa 100-3000 bp uzunluğuna kadar çeşitli sayıdaki bp sahip marker (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder) yüklenmiştir. PCR ürünlerinin 5 μl 'si; 1 μl 10 mg/ml Etidyum Bromür içeren 1X Tris-

Borat-EDTA (TBE) tamponu ile %1,5 agaroz jelde 30 V gerilimde 10 saat yürütülerek fingerprintler görüntülenmiştir (Vasdinyei and Dea'k 2003).

DNA fingerprint sonuçları analiz edilerek izolatlar benzerliklerine göre laktobasil, laktokok ve enterokoklar için ayrı ayrı gruplandırılmış ve temsili örnekler sekans işlemi için kullanılmıştır.

Genotipik tanılama 16S rRNA-PCR yöntemi ile yapılmıştır. Bu amaçla 8F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') ve 534 R (5-ATT ACC GCG GCT GCT GGC-3') primerleri kullanılmıştır. Kathleen *et al.* (2014) tarafından önerilen işlemde PCR için toplam 25 µl reaksiyon karışımı belirtilmiş olup yönergeye uyulmuştur. PCR ürünleri DNA sekanslama işlemi hizmet alımı ileABI 3130 XI genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçta edinilen DNA dizileri Nation Center for Biotechnology Information (NCBI) ile Blast programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.4. Kimyasal analizler

3.2.4.a. pH tayini

pH ölçümü dijital pH metre (Hanna pH-211) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla pH ölçümü salamura kısmından alınacak 10 ml örneğe probun daldırılması ile gerçekleştirilmiştir (Aktan vd 1998).

3.2.4.b. Tuz tayini

Turşu örneklerinin salamura kısımlarında tuz tayini için; salamuradan bir pipetle 10 ml deney numunesi bir behere alınıp içerisine birkaç damla metil oranj katılmıştır. Ayarlı 1 N NaOH çözeltisi ile renk sarıya dönünceye kadar titre edilmiştir. Daha sonra indikatör olarak 1 ml %5'lik potasyum kromat çözeltisi ile gümüş kromattan meydana gelen

kırmızı renk görülünceye kadar titrasyona devam edilmiştir. Örneklerin salamuralarının 100 ml’indeki tuz miktarı g olarak aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Aktan vd 1998).

$$M = 0,585 \times V \times N$$

Burada;

M: 100 ml salamuradaki tuz miktarı, g

V: Sarf olunan 0.1 N AgNO₃ çözeltisi, ml

0,585: 1 N AgNO₃ çözeltisinin tekabül ettiği tuz miktarı

N: Kullanılan AgNO₃’ün normalitesi

3.2.4.c. Titrasyon asitliği tayini

Numunelerin % asitlik miktarı örneklerin 0,1 N NaOH ile titrasyonu ile belirlenmiştir (Aktan vd 1998).

Numunelerin salamura kısımlarının 100 ml’indeki, H⁺ iyonunun milimol değeri olarak ifade edilen titre edilebilir asitliği (A) aşağıdaki şekilde elde edilmiştir (Yıldız 2011).

$$A = 1000 \times V_1 \times C / V_0$$

Burada;

V₁: Sarf olunan 0,1 N NaOH miktarı, ml

V₀: 50 ml

C: NaOH’ın gerçek derişimi: 0,1 N

3.2.5. İstatistiksel analizler

Çalışmamız tam şansa bağlı deneme planına göre iki paralelli olarak gerçekleşmiştir. Mikrobiyolojik ve kimyasal analizlerden elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS for Windows Release Ver. 13.00 paket programı kullanılarak yapılmıştır (SPSS inc. Chicago IL, USA). Ayrıca mikrobiyolojik ve kimyasal bulgularda yer alan tüm sayısal verilerin aritmetik ortalaması, standart sapması, maximum ve minimum değerleri hesaplanmıştır.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Ülkemizin çeşitli bölgelerinden elde edilen ve geleneksel yöntemlerle üretilmiş 41 adet turşu örneği toplanmış olup mikrobiyolojik ve kimyasal analizlere tabi tutulmuştur. Mikrobiyolojik analizlerden özellikle ürünün karakterizasyonu açısından önemli olan toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı, maya ve küf sayımı, muhtemel laktobasil ve laktokok sayımı, Enterobacteriaceae familyasının sayımı, enterokokların sayımı ve *S. aureus* aranması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1’de sunulmuştur. Kimyasal analizlerden ise pH, asitlik ve tuz gibi ürünün mikrobiyolojik karakteristiklerini etkileyen parametrelerin sonuçları (Çizelge 4.6) bulunmaktadır.

4.1. Mikrobiyolojik Bulgular

Mikrobiyolojik sayım sonuçları hesaplanarak logaritmaları alınmıştır. Değerler log kob ml⁻¹ birimiyle ifade edilmiş olup aşağıdaki çizelgede (Çizelge 4.1) yer almıştır.

Çizelge 4.1. Mikrobiyolojik sonuçlar (log kob ml⁻¹)

Numune	Tekrar	TAMB	M-K	LB	LK	Enterokok	Enterobacteriaceae	<i>S. aureus</i>
1	1	7,04	0,60	6,67	1,93	<1	<1	<1
	2	6,94	0,78	6,54	1,98	<1	<1	<1
2	1	<1	3,76	4,76	<1	1,90	1,70	<1
	2	<1	2,72	4,65	<1	1,30	1,70	<1
3	1	1,95	3,48	<1	<1	<1	<1	<1
	2	1,85	3,29	<1	<1	<1	<1	<1
4	1	1,48	<1	6,92	<1	<1	<1	<1
	2	1,70	<1	7,07	<1	<1	<1	<1
5	1	2,34	5,42	<1	<1	<1	<1	<1
	2	2,15	5,56	<1	<1	<1	<1	<1
6	1	3,14	<1	1,48	<1	<1	<1	<1
	2	3,17	<1	2,08	<1	<1	<1	<1

Çizelge 4.1. (devam)

7	1	7,29	7,10	<1	<1	<1	<1	<1
	2	7,18	7,06	<1	<1	<1	<1	<1
8	1	5,16	5,18	6,71	<1	5,59	<1	<1
	2	5,03	5,04	6,81	<1	5,51	<1	<1
9	1	4,72	3,34	4,86	<1	<1	<1	<1
	2	4,76	3,29	4,87	<1	<1	<1	<1
10	1	6,66	5,98	2,83	<1	<1	<1	<1
	2	6,41	6,02	2,78	<1	<1	<1	<1
11	1	4,79	5,14	7,05	<1	5,17	2,15	<1
	2	4,91	5,07	7,05	<1	5,21	2,30	<1
12	1	<1	3,58	<1	<1	<1	<1	<1
	2	<1	3,56	<1	<1	<1	<1	<1
13	1	<1	3,37	1,30	<1	<1	<1	<1
	2	<1	3,20	1,00	<1	<1	<1	<1
14	1	<1	5,90	<1	<1	<1	<1	<1
	2	<1	5,82	<1	<1	<1	<1	<1
15	1	6,68	3,30	<1	<1	<1	<1	<1
	2	6,40	3,40	<1	<1	<1	<1	<1
16	1	7,18	6,76	6,65	5,62	3,70	3,95	<1
	2	7,16	6,77	6,59	5,43	3,72	3,94	<1
17	1	4,88	4,89	1,70	<1	1,00	<1	<1
	2	5,14	5,12	1,00	<1	<1	<1	<1
18	1	5,30	3,09	5,70	2,88	1,00	<1	<1
	2	5,34	3,10	5,90	2,91	<1	<1	<1
19	1	6,58	2,60	6,74	<1	6,25	<1	<1
	2	6,82	2,38	6,53	<1	6,20	<1	<1
20	1	5,61	2,38	5,04	3,50	<1	<1	<1
	2	5,56	2,56	4,86	3,53	<1	<1	<1
21	1	6,79	6,69	5,77	5,46	4,02	4,17	<1
	2	6,61	6,46	5,96	5,56	4,10	3,23	<1
22	1	6,76	6,14	7,87	7,32	5,93	1,30	<1
	2	6,56	6,06	7,84	7,26	5,78	1,30	<1
23	1	7,46	7,35	<1	3,68	<1	<1	<1
	2	7,55	7,45	<1	3,60	<1	<1	<1
24	1	7,60	6,57	7,92	7,51	3,83	1,00	<1
	2	7,73	6,60	7,85	7,57	3,78	1,00	<1
25	1	5,87	5,49	5,72	5,34	5,24	1,00	<1
	2	5,90	5,52	5,61	5,44	<1	1,30	<1
26	1	3,52	3,36	<1	1,70	<1	<1	<1
	2	3,56	3,56	<1	1,78	<1	<1	<1
27	1	6,06	6,11	<1	<1	<1	2,51	<1
	2	6,04	6,03	<1	<1	<1	2,54	<1
28	1	5,23	4,51	5,93	3,09	3,20	3,02	<1
	2	5,15	4,66	5,90	3,12	3,25	3,07	<1

Çizelge 4.1. (devam)

29	1	5,91	<1	5,42	5,74	2,08	<1	<1
	2	5,94	<1	5,47	5,77	2,28	<1	<1
30	1	6,05	3,18	5,98	2,11	<1	1,00	<1
	2	6,20	3,22	5,98	2,18	<1	1,00	<1
31	1	7,11	<1	7,12	6,75	3,16	<1	<1
	2	7,08	<1	7,14	6,66	3,13	<1	<1
32	1	7,63	<1	7,52	7,43	3,56	<1	<1
	2	7,65	<1	7,30	7,35	3,53	<1	<1
33	1	6,48	<1	4,41	<1	3,78	<1	<1
	2	6,51	<1	4,48	<1	3,83	<1	<1
34	1	7,12	6,94	<1	7,17	1,60	<1	<1
	2	7,13	7,01	<1	7,03	2,00	<1	<1
35	1	6,94	1,78	7,28	7,03	3,93	<1	<1
	2	6,93	1,78	7,28	7,10	3,10	<1	<1
36	1	7,31	2,38	7,70	7,35	3,25	2,26	<1
	2	7,41	2,34	7,67	7,41	3,33	2,20	<1
37	1	7,44	4,49	7,23	7,01	4,23	2,49	<1
	2	7,40	4,40	7,22	7,19	4,33	2,51	<1
38	1	6,60	6,51	7,64	7,68	<1	3,47	<1
	2	6,65	6,58	7,54	7,81	<1	3,48	<1
39	1	7,46	1,85	7,87	7,72	<1	<1	<1
	2	7,38	2,08	7,93	7,79	<1	<1	<1
40	1	6,97	3,49	6,98	6,79	<1	<1	<1
	2	7,04	3,42	6,86	6,57	<1	<1	<1
41	1	5,58	1,30	6,08	7,31	3,16	<1	<1
	2	5,55	1,48	6,57	7,41	3,18	<1	<1
Maks.		7,73	7,45	7,93	7,81	6,25	4,17	<1
Min.		<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Ev ort		5,33	3,75	4,45	3,13	1,75	0,72	<1
Standart Sapma		2,34	2,30	3,02	3,18	2,08	1,22	0

Deneme sonuçları incelendiğinde laktobasil ve laktokokların maksimum değere sahip verileri barındırdığı görülmektedir. Bu durum ürünün fermantasyonla üretildiğini bir defa daha kanıtlar niteliktedir. Öyleki laktik asit bakterileri grubunda bulunmasına ve üründe fazla miktarda rapor edilmemesine karşın enterokoklar da bazı örneklerde nispeten yüksek seviyelerde tespit edilmiştir. Ortalama veriler incelendiğinde ise TMAB sayısının yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumun fermantasyon sürecini henüz

tamamlanmamış veya bitirmemiş durumdaki turşu örneklerinde laktik floranın azlığından dolayı olduğu görülmektedir.

Turşu örneklerinde maya ve küf sayısı ortalama 3.90 log kob/ml olarak tespit edilmiştir. Literatür özetinin verildiği kısımlarda da ifade edildiği üzere mayalar turşu fermantasyonunun bir parçası olup sayılarının beklenen düzeyde olduğu görülmektedir.

Deneme örneklerinin sadece 13 tanesinde Enterobacteriaceae familyası üyesi mikroorganizma kolonileri tespit edilmiştir. Bu durumda hammaddenin yetiştirilmesi ve satışı süresince maruz kaldığı kontaminasyonun etkili olduğu görülmektedir. Hiçbir örnekte *S.aureus* şüpheli koloni tespit edilmemiştir.

Karasu (2006) çalışmasında turşu ve zeytin örneklerinde yaptığı mikrobiyolojik analiz sonucunda <3,00 - 7,77 log kob/g laktik asit bakterisi, <3,00 - 8,28 log kob/g toplam aerobik mezofilik bakteri, <3,00 – 7,85 log kob/g maya ve küf içerdiğini tespit etmiştir.

Minumum ve maksimum değer aralıklarına bakıldığında çalışmamız ile benzer sonuçlar görülmektedir.

4.2. Makroskobik ve Mikroskobik İnceleme Bulguları

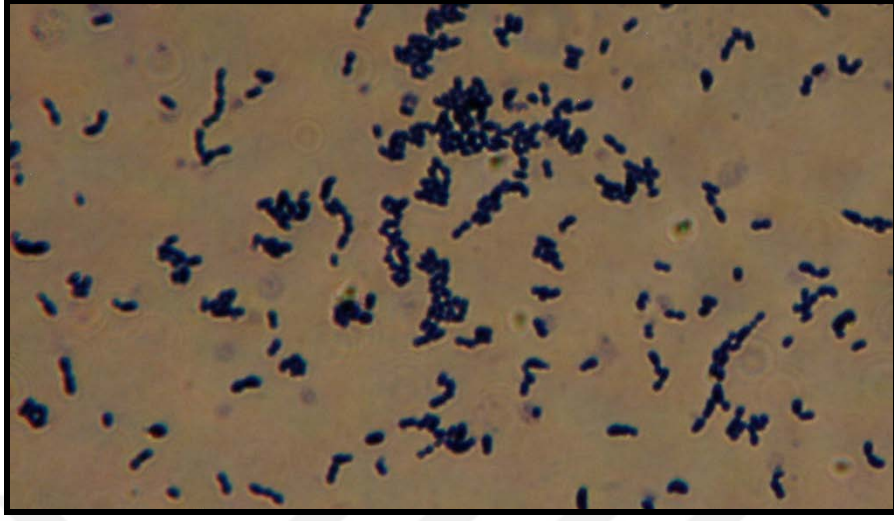
İzolatlar belirlendikten sonra saf kültürlerin koloni morfolojileri incelenmiştir. Kaydedilen koloni şekilleri ve yapıları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Hücre morfolojileri incelendiğinde ise genel olarak MRS besiyeri ortamında gelişen kültürler basil ve bazen kok şeklinde (tetrakok hücre düzeninde) şeklinde; M17 besiyeri ortamında gelişen kültürler kok ve bazen basil şeklinde; KAA besiyeri ortamında gelişen kültürler kok şeklinde ve enterokok hücre düzeninde gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.2. Bazı izolatların makroskobik özellikleri ve test sonuçları

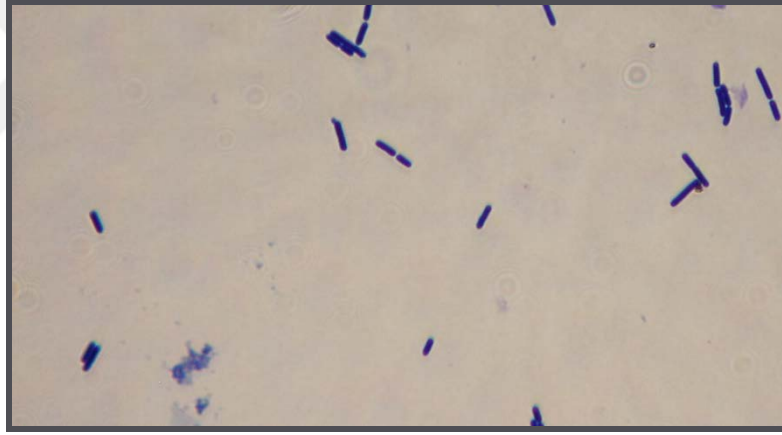
Ortam	İzolat no	Koloni Rengi	Koloni Şekli-Büyüklüğü	Katalaz testi	Gram boyama
M17	3	Krem, mat	Yuvarlak, küçük	negatif	pozitif
	6	Şeffaf, parlak	Yuvarlak, büyük	negatif	pozitif
	19	Sarı, mat	Yuvarlak, çok küçük	negatif	pozitif
	35	Krem, parlak	Yuvarlak, küçük	negatif	pozitif
	47	Krem, mat	Yuvarlak, büyük	negatif	pozitif
MRS	101	Beyaz, parlak	Yuvarlak, küçük	negatif	pozitif
	129	Beyaz, parlak	Yuvarlak, çok küçük	negatif	pozitif
	151	Sarımsı, parlak	Yuvarlak, küçük, dolgun	negatif	pozitif
	166	Beyaza yakın şeffaf, parlak	Yuvarlak, küçük	negatif	pozitif
	178	Beyaz, parlak	Yuvarlak, orta büyük	negatif	pozitif
KAA	309	Siyah, haleli	Yuvarlak, küçük	negatif	pozitif
	314	Siyah, haleli	Yuvarlak, büyük	negatif	pozitif
	320	Siyah, haleli	Yuvarlak, çok küçük	negatif	pozitif

Ayrıca saf kültür oluştuktan sonra izolatların yaş prepsasyonu yapılmıştır. Sonuçta ışık mikroskobu ile yapılan mikrobiyolojik incelemede tüm suşlar gözlemlenmiştir.

Gram boyama yapılan izolatlara ait preparatlar da yine ışık mikroskobu ile incelenmiş ve bazılarının görüntüleri Şekil 4.1-4.4’de verilmiştir.



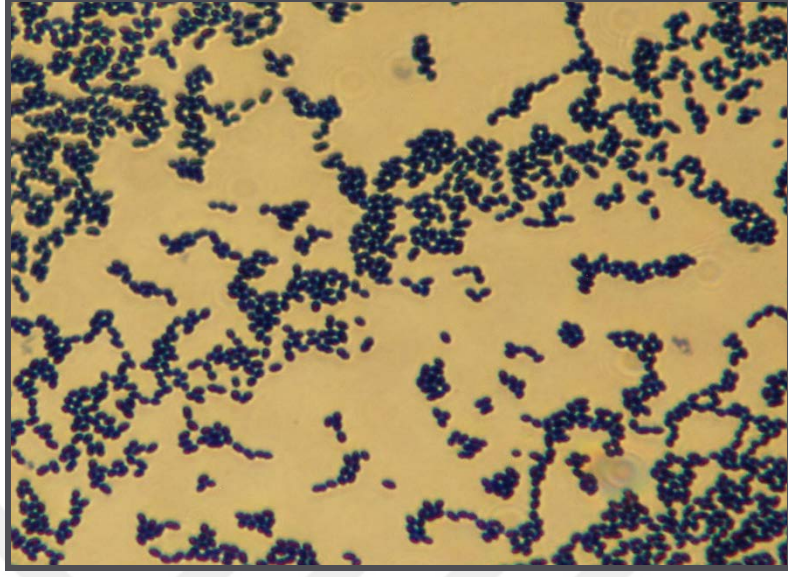
Şekil 4.1. Gram pozitif 62 nolu izolatin immersiyon objektifinde görüntüsü



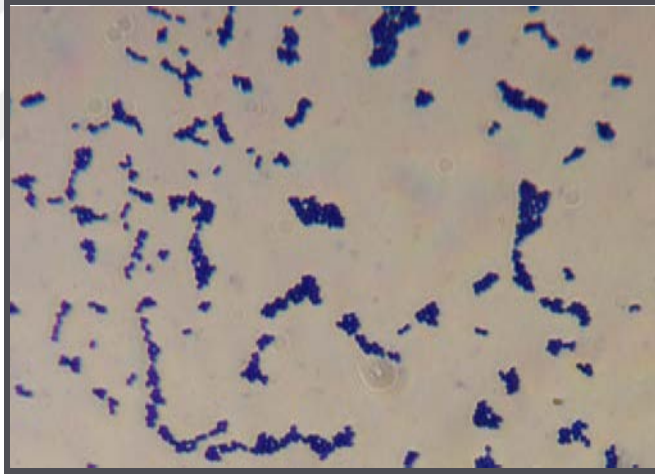
Şekil 4.2. Gram pozitif 155 nolu izolatin immersiyon objektifinde görüntüsü

İzolatlara ait preparatlarda bakteriler bazen kok bazen basil şeklinde olup hepsi mor renkte gözlenmiştir. Şekil 12-16 görüldüğü gibi gram boyama sonucu izolatların tümü Gram pozitif olarak kaydedilmiştir.

Şekil 4.3 ve Şekil 4.4 ise enterokok grubuna ait Gram pozitif izolatlara aittir.

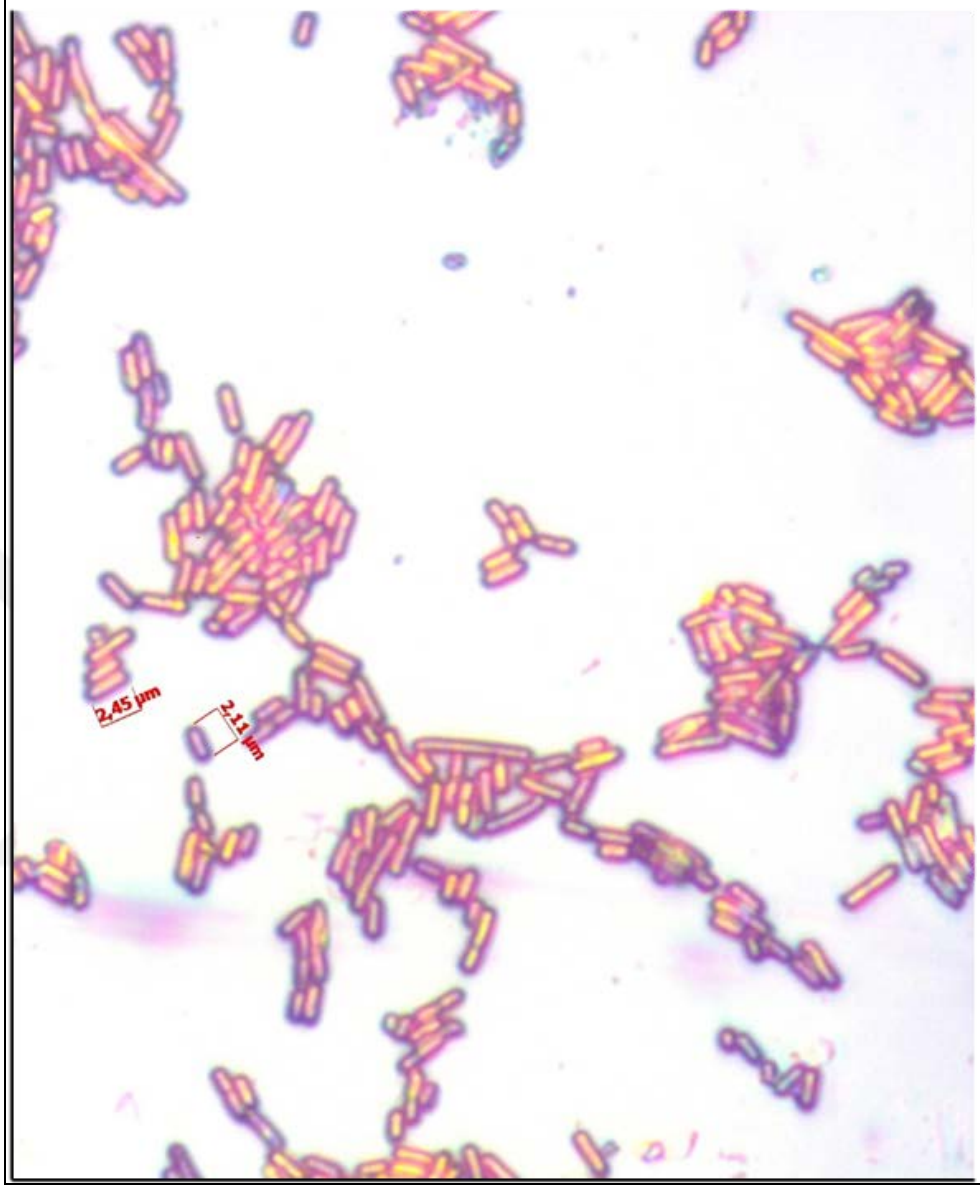


Şekil 4.3. Gram pozitif 309 nolu izolatin immersiyon objektifinde 100x görüntüsü



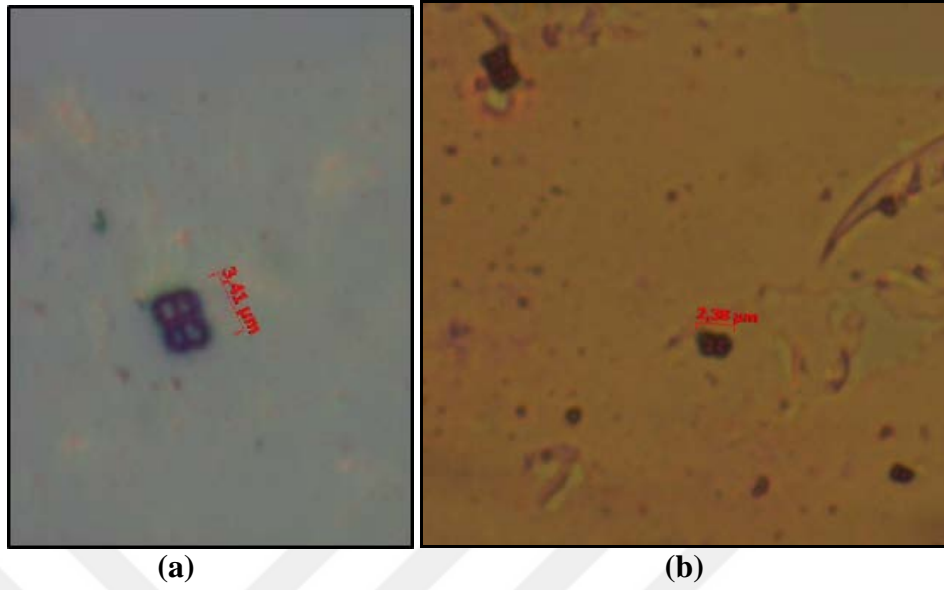
Şekil 4.4. Gram pozitif 320 nolu izolatin immersiyon objektifinde 100x görüntüsü

Gümüşhane Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan Zeiss mikroskobu ile 50x objektifte alınan görüntüler ve boyutlandırılması aşağıdaki Şekil 4.5.'de yer almıştır.



Şekil 4.5. Gram pozitif 48 nolu izolataın basil yapılarının boyutlandırılması

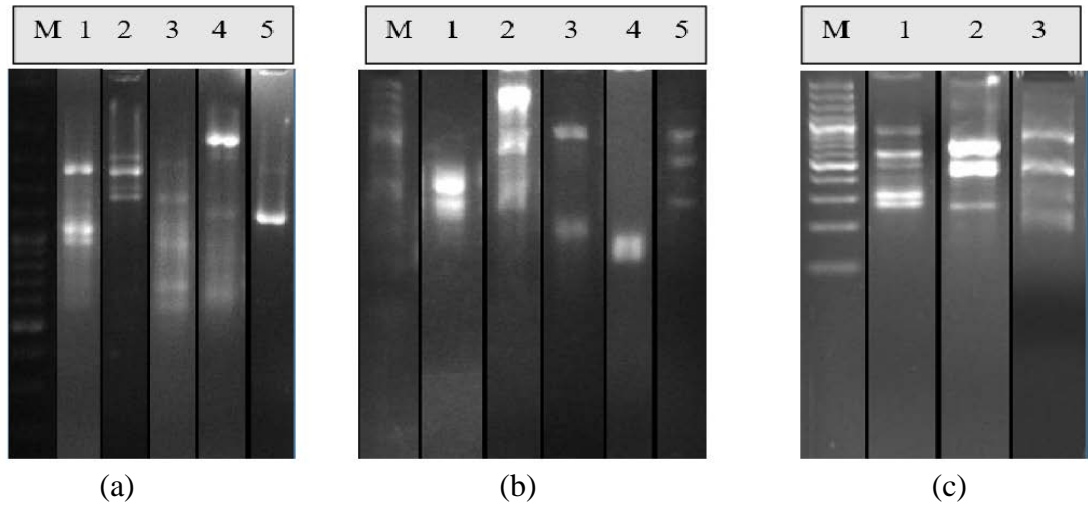
Şekil 4.6 ise *Pediococcus parvulus* olarak tanımlanan kok hücre şekline ve tetrakok hücre düzenine sahip olan gram pozitif 129 nolu izolata ait hücre yapılarının görüntü ve boyutları görülmektedir.



Şekil 4.6. 129 nolu izolata ait a,b farklı preparatında gözlenen tetrakok yapıları ve boyutları

4.3. RAPD-PCR Sonundaki Jel Görüntüleri

RAPD ile elde edilen jel elektroforezi sonucunda 176 suşun DNA parmakizi değerlendirilmiş ve 13 farklı suşun olduğu görülmüştür. Şekil 4.7’de temsili izolatların RAPD PCR sonundaki jel elektroforez görüntüleri yer almaktadır.



Şekil 4.7. Sırasıyla a;b;c: Laktobasil; Laktokok; Enterokok gruplarından bazı farklı DNA parmakizine sahip izolatların jelde görüntüsü

Denemede izole edilen toplam 100 laktobasilin aslında 5 farklı suş olduğu belirlenmiştir. Laktokoklar ise 66 suş olarak izole edilmiş ve 5 farklı fingerprint sergilemiştir. Enterokoklar ise 10 suş olarak izole edilmiş ve toplamda 3 farklı enterokok suşu olduğu belirlenmiştir. RAPD PCR işleminin tür ve suş bazında ayrımı çok iyi yaptığı görülmüştür.

4.4. Moleküler Tanı Bulguları

Laktobasil, laktokok ve enterokok grubu temsili izolatların moleküler tanı işlemleri farklı fingerprintlerden elde edilen temsili suşlar kullanılarak belirlenmiştir. Böylece turşuda tür ve suş seviyesindeki farklılıklar başarıyla ortaya konarak turşu mikrobiyotası hakkındaki literatüre katkı sağlamıştır.

Çizelge 4.3. Laktobasil izolatlarının genetik tanı sonucu

Sıra	Genetik tanı sonucu	Genetik benzerlik oranı	Referans suş no	Temsil ettiği izolat sayısı % oranı	Temsil ettiği izolatların numaraları
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98	KM495892.1	62 %74	101,103,104,105,109,110,111,112,113,114,115,120,121,122,124,125,126,133,135,136,138,139,140,141,146,151,152, <u>155</u> ,156,157,159,160,161,162,163,164,167,169,170,171, <u>172</u> ,173,174,175,176,180,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,195,196,197,199,200
2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	93	KP889230.1	14 %17	106,116,117,142,143,144,145,147, <u>148</u> ,151,166,168,182,194
3	<i>Pediococcus parvulus</i>	95	KM495950.1	2 %2	<u>129</u> ,130
4	<i>Lactobacillus paracasei</i>	97	EU637390.1	5 %6	119,149,177,178, <u>179</u>
5	<i>Leuconostoc holzapfelii</i>	94	AB904775.1	1 %1	<u>153</u>

Altı çizili numaralar sekans işlemi için gönderilen temsili izolatları ifade etmektedir.

Yukarıdaki çizelgede benzer laktobasil izolatlarının numaraları ve grubu temsil eden suşun genetik tanı sonucu yer almaktadır. RAPD fingerprint farklılıklarına göre 5 suş seçilmiştir. Tanısı yapılan suşların *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus parvulus*, *Lactobacillus paracasei*, *Leuconostoc holzapfelii* olduğu belirlenmiştir. Eldeki bulgular neticesinde çalışmadaki toplam 176 suşun %91 oranında *Lactobacillus plantarum* türünden oluştuğu görülmüştür. Bu durum turşu mikrobiyotasında hakim türün *Lb. plantarum* olduğu ve ürünle ilgili starter kültür çalışmalarının esasını oluşturmasını gerektiği görülmektedir.

Çizelge 4.4. Laktokok izolatlarının genetik tanı sonucu

Sıra	Genetik tanı sonucu	Genetik benzerlik oranı	Referans suş no	Temsil ettiği izolat sayısı % oranı	Temsil ettiği izolatların numaraları
1	<i>Bacillus</i> spp.	99	KP992104.1	22 %38	2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,13,14,15,17,18,19,20,21,22,24,31,33
2	<i>Bacillus megaterium</i>	99	KU647219.1	2 %3	1,46
3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	97	KJ702489.1	9 %16	23,49,57,59,60,61,62,63,64
4	<i>Pseudomonas fragi</i>	99	KU173830.1	13 %22	25,26,27,28,29,30,34,36,37,52,53,55,65
5	<i>Bacillus megaterium</i>	97	KU647219.1	12 %21	38,39,42,43,44,47,48,51,54,56,58,66

Altı çizili numaralar sekans işlemi için gönderilen temsili izolatları ifade etmektedir.

Benzer laktokok izolatlarının numaraları ve grubu temsil eden 5 farklı suş Çizelge 4.3'de yer almaktadır. Ancak beş suşun genetik tanı sonucu değerlendirildiğinde sadece bir suşun laktik asit bakterisi olduğu görülmüştür. Bu laktik türün *Leu. mesenteroides* olduğu ve izolatların %16'sını teşkil ettiği belirlenmiştir. Laktik olmayan diğer türler ise

Bacillus spp. ve *Pseudomonas* spp. olarak tanılanmıştır. Mikroskopik ve biyokimyasal testler sonucu LAB harici izolatlar belirlenmekle beraber turşu florasının tespiti ve ilgili besiyerlerinin etkinliğinin kanıtlanması amacıyla çalışma izolatları içersine dahil edilmiştir.

Çizelge 4.5. Enterokok izolatlarının genetik tanı sonucu

Sıra	Genetik tanı sonucu	Genetik benzerlik oranı	Referans suş no	Temsil ettiği izolat sayısı % oranı	Temsil ettiği izolatların numaraları
1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	KP690978.1	3 %30	307, 308, <u>309</u>
2	<i>Enterococcus faecium</i>	99	CP016163.1	2 %20	<u>311</u> , 314
3	<i>Enterococcus faecium</i>	95	JX847619.1	5 %50	310, 312, 316, 319, <u>320</u>

Altı çizili numaralar sekans işlemi için gönderilen temsili izolatları ifade etmektedir.

Yukarıda benzer enterokok izolatlarının numaraları ve grubu temsil eden üç farklı suşun genetik tanı sonucu bulunmaktadır. Laktik asit bakterisi olarak seçilen 10 tane izolattan üçünün enterokok olmadığı belirlenmiştir. *Enterococcus faecium* türüne ait iki farklı suş %70 oranında bulunurken deneme boyunca elde edilen toplam izolatlara göre değerlendirildiğinde %4'ünü oluşturmaktadır.

Enterokok sayısının belirlenmesi amacıyla yapılan işlemlerde 41 örneğin 21 tanesinde tipik koloni görülmüştür. Enterokokların izolasyonunda kolonilerinin oldukça küçük olması nedeniyle laboratuvar çalışması boyunca saflaştırma, depolama, DNA izolasyonu ve tanılama işlemlerinde zorluklar yaşanmıştır.

Dursun (2010) turşulardan izole ettiği laktik asit bakterilerini API 50 test kitiyle tanılamış ve 45 bakterinin 38 adedinin *Lactobacillus* cinsine ait olduğu; *Lb. brevis*, *L. acidophilus*, *Lb. plantarum*'un ise, turşu örneklerinde, baskın türler olduğunu belirtmiştir. Tanı yönteminin farklı olmasına rağmen çalışmamızda elde edilen bulgular cins ve nispeten tür seviyesinde benzerlik göstermektedir.

Tangüler (2010) çalışmasında hem kendi üretimi hem de işletmelerden elde ettiği şalgam sularında laktik asit bakterisi izole etmiştir. Bu amaçla en fazla izole edilen bakteri *Lb. plantarum* olup *Lb. brevis* ve *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* de tanımlanmıştır. Ayrıca *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lb. fermentum*, *Leu. mesenteroides*, *Lb. buchneri*, *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Pediococcus pentosaceus* bakterileri de izole edilerek tanımlanmıştır.

4.5. Kimyasal Bulgular

Denemede kullanılan 41 adet turşu örneğine ait kimyasal analiz sonuçları pH ve % tuz, % asitlik olarak aşağıdaki çizelgede (Çizelge 4.6) yer almıştır.

Çizelge 4.6. Kimyasal analizlerin sonuçları

Örnek	Tekrar	pH	% Tuz	% Asitlik
1	1	3,46	2,51	1,14
	2	3,47	2,53	1,14
2	1	3,56	5,06	0,16
	2	3,56	5,04	0,20
3	1	3,6	4,00	0,32
	2	3,6	3,99	0,33
4	1	3,93	3,65	0,26
	2	3,93	3,65	0,27
5	1	3,24	4,06	0,38
	2	3,24	4,10	0,38
6	1	3,38	2,86	0,62
	2	3,37	2,85	0,62

Çizelge 4.6. (devam)

7	1	3,74	0,58	1,53
	2	3,74	0,71	1,53
8	1	3,62	2,39	0,53
	2	3,62	2,42	0,54
9	1	3,55	4,68	1,04
	2	3,55	3,99	1,03
10	1	3,31	3,72	0,82
	2	3,30	3,71	0,82
11	1	3,72	2,45	0,32
	2	3,72	2,39	0,33
12	1	3,34	2,73	0,52
	2	3,34	2,71	0,52
13	1	3,32	4,35	0,78
	2	3,34	4,33	0,80
14	1	3,33	2,93	0,45
	2	3,34	3,01	0,45
15	1	4,12	4,09	0,98
	2	4,12	3,97	0,99
16	1	3,91	2,74	0,87
	2	3,90	2,75	0,85
17	1	4,78	3,35	0,16
	2	4,76	3,33	0,13
18	1	3,72	4,27	0,87
	2	3,72	4,25	0,88
19	1	3,87	3,91	0,90
	2	3,87	3,89	0,90
20	1	3,66	2,45	0,61
	2	3,65	2,45	0,64
21	1	3,58	3,51	1,15
	2	3,55	3,51	1,15
22	1	3,91	3,97	0,58
	2	3,91	3,98	0,57
23	1	4,67	1,93	0,41
	2	4,66	2,01	0,42
24	1	4,32	3,48	0,29
	2	4,32	3,49	0,27
25	1	3,98	5,85	0,11
	2	3,98	5,69	0,13
26	1	4,02	2,86	0,75
	2	4,02	2,85	0,74
27	1	4,32	5,14	0,14
	2	4,30	5,14	0,17
28	1	3,67	2,16	0,64
	2	3,66	2,15	0,64

Çizelge 4.6. (devam)

29	1	3,82	3,86	1,00
	2	3,82	3,88	1,01
30	1	4,06	2,69	0,21
	2	4,06	2,66	0,22
31	1	3,97	2,98	0,63
	2	3,96	2,87	0,63
32	1	3,81	2,34	0,87
	2	3,82	2,33	0,87
33	1	3,49	2,80	0,97
	2	3,50	2,92	0,99
34	1	3,90	1,75	0,56
	2	3,90	1,80	0,55
35	1	3,86	1,80	0,64
	2	3,86	1,81	0,64
36	1	3,73	3,62	0,51
	2	3,72	3,65	0,50
37	1	3,70	2,16	0,73
	2	3,71	2,07	0,74
38	1	3,86	2,04	0,95
	2	3,86	2,12	0,95
39	1	4,37	3,21	0,17
	2	4,35	3,30	0,18
40	1	4,79	4,27	0,32
	2	4,78	4,26	0,33
41	1	3,45	4,60	0,31
	2	3,45	4,57	0,31
Maks.		4,79	5,85	1,53
Min.		3,24	0,58	0,11
Ev ort		3,81	3,26	0,62
Standart Sapma		0,38	1,05	0,33

Kimyasal analizleri yapılan örneklerde ortalama olarak pH 3,81; % tuz 3,26 ve % asitlik ise 0,62 değerlerinde bulunmuştur.

Turgut (2006) çalışmasında yaptığı hıyar turşusu ürünlerinde pH 3,43; titrasyon asitliği %0,88 ve tuz oranını ise %4,2 olarak bildirmektedir. Sonuçlar elde ettiğimiz bulgulara yakın değerdedir.

Karasu (2006) çalışmasında turşu ve zeytin örneklerinde mikrobiyolojik ve kimyasal

analizler yapmıştır. Sonuçta tursu örneklerinin pH degerleri 2.0-6.41 arasında, asitlik dereceleri %0.18-4.41 arasında, tuz oranları ise %0.39-9.89 arasındadır. Sonuçlar elde ettiğimiz kimyasal değerlerle benzerlik teşkil etmektedir.

Türk Standardları Enstitüsü'nde yer alan Hıyar Turşusu (TS 11112) ve Lahana Turşusu (TS 4200) standartlarına bakıldığında, bu iki tursunun asitlik dereceleri çeşitlerine göre %0,5 ile %4 arasında, tuz ise hacmen en çok %7 olmalıdır (Anon 1990, Anon 1993). Bu değerlere göre, tursu örneklerinin ev üretimi olmasına rağmen hem % asitlik, hem de tuz bakımından standartlara uygun olduğu görülmektedir.

4.6. İstatistiksel Bulgular

41 ev tipi turşu numunesinde yapılan mikrobiyolojik ve kimyasal analizlerin sonuçları istatistiksel olarak hesaplanmıştır.

Mikrobiyolojik ve kimyasal parametreler arasında doğrusal ilişkinin olup olmadığı Pearson Korelasyon testi ile incelenmiştir. Çizelge 4.7.'de yer alan veriler arasında $p < 0.05$ ve $p < 0.01$ seviyelerinde yapılan korelasyon testi sonucunda önemli seviyede farklar tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. Mikrobiyolojik ve kimyasal sonuçlar arasında korelasyon testi

	Numune	TMAB	M-K	LB	LK	Enterokok	Enterobacteriaceae	<i>S. aureus</i>	pH	Tuz	Asitlik
Numune	1	,572**	-0,088	,387**	,772**	,248*	0,184	-	,413**	-0,1	-0,115
TAMB	,572**	1	0,097	,458**	,609**	,359**	0,2	-	,466**	-,285**	,271*
M-K	-0,088	0,097	1	-,292**	-0,001	0,016	,440**	-	0,181	-0,107	-0,06
LB	,387**	,458**	-,292**	1	,589**	,573**	,293**	-	0,099	0,007	-0,01
LK	,772**	,609**	-0,001	,589**	1	,340**	,277*	-	,315**	-0,121	-0,043
Enterokok	,248*	,359**	0,016	,573**	,340**	1	,317**	-	-0,055	-0,065	0,057
Enterobacteriaceae	0,184	0,2	,440**	,293**	,277*	,317**	1	-	0,028	-0,034	0,032
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH	,413**	,466**	0,181	0,099	,315**	-0,055	0,028	-	1	0,016	-,356**
Tuz	-0,1	-,285**	-0,107	0,007	-0,121	-0,065	-0,034	-	0,016	1	-,385**
Asitlik	-0,115	,271*	-0,06	-0,01	-0,043	0,057	0,032	-	-,356**	-,385**	1

** p <0.01 seviyesinde önemlidir.

* p <0.05 seviyesinde önemlidir.

Yukarıdaki tabloda görüleceği üzere birçok değişken birbiriyle anlamlı istatistiksel farklılık göstermektedir. Örneğin beklenildiği üzere pH ile asitlik arasında pozitif yönde bir ilişki ($p<0,01$) mevcuttur.

Tuz ve asitlik yüzdeleri arasında da yine pozitif yönde bir korelasyon ($p=0$ $p<0,01$) görülmektedir. Bu durum belirli tuz konsantrasyonlarında laktik asit bakterilerinin gelişimi ve laktik asit üretimiyle ilgili olabilir.

TMAB sayısı ise mikrobiyolojik analizlerden LAB ile kimyasal parametrelerin tümüyle doğrusal bir ilişkiye sahiptir.

LAB'nin kendi aralarında; laktobasiller grubunun ise mikrobiyolojik tüm değişkenlerle pozitif yönde ilişkisi olduğu görülmüştür.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Atatürk Üniversitesi BAP birimi tarafından desteklenen çalışma kapsamında ülkemizin turşu üretimi gerçekleştirilen yöreleri dikkate alınarak geleneksel metodla üretilmiş 41 farklı turşu örneği temin edilmiştir. Elde edilen turşu örnekleri laboratuvara getirilerek kimyasal ve mikrobiyolojik analizleri yapılmıştır. Bu amaçla örneklerde toplam mezofilik aerobik bakteri, maya-küf, laktobasil, laktokok, enterokok, Enterobacteriaceae ve *S. aureus* mikroorganizma sayımları gerçekleştirilmiştir. Kimyasal analizlerden pH, asitlik ve tuz tayini yapılmıştır. İzole edilen mikroorganizmalar ileri çalışmalarda kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir. Bu amaçla laktik asit bakterisi grubuna ait 176 bakteri izolatu elde edilmiştir.

Çalışmamızda izole edilen bakteri kültürleri Atatürk Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvarında kültür koleksiyonuna eklenmiştir. İzolatlar %20'lik gliserol çözeltisi içinde – 80°C'de depolanmıştır.

- 41 turşu örneğinin mevcut mikroorganizma yükü genel olarak şöyledir: Toplam mezofilik aerobik bakteri sayısı $5,33 \pm 2,34$; maya-küf sayısı $3,75 \pm 2,30$, laktobasil $4,45 \pm 3,02$; laktokok $3,13 \pm 3,18$; enterokok $1,75 \pm 2,08$; Enterobacteriaceae $0,72 \pm 1,22$ ve *S. aureus* sayımı da $<1 \log \text{ kob ml}^{-1}$ olarak bulunmuştur.
- Turşu örneklerinde genel olarak laktobasil sayım sonucu 39 nolu örnekte en fazla $7,93 \log \text{ kob ml}^{-1}$; laktokok sayım sonucu 38 nolu örnekte en fazla $7,81 \log \text{ kob ml}^{-1}$; enterokok sayım sonucu 19 nolu örnekte en fazla $6,25 \log \text{ kob ml}^{-1}$ değerine ulaşmıştır.
- 12, 13, 14 ve 15 nolu örneklerin mikrobiyolojik analiz sonuçlarında toplam mezofilik aerobik ve laktik asit bakterileri sayısı minimum düzeyde iken salamurada yaklaşık maya-küf sayısı $10^4-10^5 \text{ kob ml}^{-1}$ değerlerindedir. Bu durum örneklerin fermantasyonunun sona erdiğini göstermektedir.
- Enterobacteriaceae sayımı yapılan toplam 14 örneğe ait pH değerlerinin 3,56'dan yüksek olduğu tespit edilmiştir. Fermente meyve sebzelerde Enterobacteriaceae gibi bazı mikroorganizmaların dekarboksilaz enzimi ile serbest aminoasitlerden biyojen

amin oluşumuna sebep olabileceği belirtilmiştir (Erkmen and Bozoğlu 2016). Turşu gibi ürünlerde biyojen amin oluşumunu azaltması için starter kültür kompozisyonu hazırlanması gerektiği ve konsantrasyonun 100 g lahana için en az 5×10^6 kob olması gerektiği ifade edilmiştir. Böylece starter kültür etkisi ile hızlı ve etkin pH düşüşü sağlanarak muhtemel biyojen amin oluşumu engellenecektir.

- Toplam 176 izolat (GTG)₅ primeri ile genetik parmak izlerine göre gruplandırılmış ve tanı için 13 tane izolatin suş bazında ayrımı gerçekleştirilmiştir. Böylece maliyet, işgücü ve malzeme açısından kazanç elde edilmiştir. Ayrıca kullanılan tiplendirme metodu turşu mikrobiyotasının ortaya koyulması açısından oldukça başarılı bulunmuştur.
- Starter kültür adayları olarak hakim floranın laktobasillerden ve laktokoklardan; *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus parvulus*, *Lactobacillus paracasei*, *Leuconostoc holzapfelii*, *Leuconostoc mesenteroides*; enterokoklardan *Enterococcus faecium* türlerinden oluştuğu belirlenmiştir.
- Genetik tanı sonucunda Bacillus türleri gibi laktik asit olmayan bakterilerin de izole edildiği görülmektedir. Toprak kökenli bu bakterilerin tekrar canlandırma aşamasında da katalaz testi ile elimine edilmesi gerektiği ortaya konmuştur.
- Foulquie Moreno *et al.* (2006)'da belirtildiği üzere bazı üyelerinde virülans faktörü ile laktik asit bakterilerinin özelliklerine zıt enterokoklar mevcuttur. Fakat fermente ürünlerde probiyotik türleride tespit edilmiştir. Enterokoklar bu özellikleriyle iki farklı grupta toplanırken probiyotik türleri turşu fermantasyonunda starter olarak aday gösterilmektedir.
- Sonuçlarda elde ettiğimiz pediokok türleri de Çetin'in (2011) ifade ettiği gibi insan sağlığı için yararlı nitelik kazandırılan probiyotik turşuların üretilmesinde kullanılacak starterlere aday olarak gösterilebilir.
- Daeschel *et al.* (1988) makalesinde belirttiği üzere çalışmamızda tespit ettiğimiz *Lactobacillus plantarum* (iki farklı suş), *Pediococcus parvulus*, *Lactobacillus paracasei*, *Leuconostoc holzapfelii*, *Leuconostoc mesenteroides* ve *Enterococcus faecium* türleri meyve sebzelerin fermantasyonu boyunca gözlenen laktik asit bakterileridir. Toplam izolatlarımız içerisinde %91 oranında *L. plantarum* türünün belirlenmesi turşuda baskın mikroorganizmanın bu bakteri olduğunu göstermektedir. Bu

durum özellikle turşu için oluşturulması düşünülen starter kültür çalışmalarının merkezine de *L. plantarum* türünü koymaktadır.

- Çalışmamızda gözlemlediğimiz bir diğer önemli konu laktokok bakterilerinin sayımı ve teşhisinde kullanılan M17 agar besiyerinin etkili olmadığıdır. Kısa süreli inkübasyonda dahi maya kolonileri bu besiyerinde iyi gelişebilmektedir. Mikroskopik inceleme itibariyle kolonilerin maya ya da laktokoklara ait olduğu kesinlikle belirlendikten sonra sayım ya da saflaştırma yapılmalıdır. Bu nokta sayım ve izolasyon için büyük önem taşımaktadır.
- Ayrıca üretilmesi ve geliştirilmesi planlanan doğal fermente ürünlerde kullanılmak üzere projemiz kapsamında izole edilen ve tanısı gerçekleştirilen suşlar kültür koleksiyonuna eklenmiştir.
- Çalışmamızda izole edilen starter kültür adaylarının biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi de hedefler arasındadır.
- Fermente gıdaların duyuşal özellikleri, raf ömrü ve güvenliği, laktik asit bakterilerinin metabolik aktivitesi ile yakından ilgilidir. Bu nedenle laktik asit bakterilerinin önemli metabolik yolları ve metabolizmanın çevresel koşullardan nasıl etkilendiği incelenmektedir (Gänzle 2015). Starter kültür çalışmalarında bu durum göz önünde bulundurulmalıdır.
- Çalışmamızda kullanılan numuneler il ve bölge farklılıkları göz önünde bulundurularak mikrobiyolojik ve kimyasal özellikleri bakımından varyans analizi sonucuna göre istatistiksel olarak farklılıklar gösterdiği ($p < 0,01$ ve $p < 0,05$ seviyelerinde) belirlenmiştir.
- Verilen literatür özetlerinde de ifade edildiği gibi sebze ve meyvelerin laktik asit fermantasyonu ile dayanıklı hale getirilmesi çeşitli avantajları beraberinde getirmektedir. İlk olarak, sebze ve meyveler fermantasyon tamamlandıktan sonra lezzet ve yapı bakımından hoşça giden bir duyuşal özellik kazanmaktadır. Oluşan laktik asit sayesinde ürünün bozulması önlenerek besin değerinde önemli kayıplar olmadan uzun süre saklanabilmekte, içerdiği vitamin ve mineraller korunarak sindirilmesi güç olan maddeler kolay sindirilebilir hale gelmektedir. Ayrıca turşuda bulunan *L. plantarum* ve diğer mikroorganizmaların ürettiği oldukları bakteriyosinler ile insan vücudundaki floraya zarar veren ve çeşitli hastalıklara sebep olan patojenlerin özellikle turşuda

gelişimini engelleyerek insan sağlığına katkı sağlamaktadır. Bunlara ilaveten, ürünün bol ve ucuz olduğu dönemlerde alınıp işlenmesiyle ekonomik bir kazanç da elde edilmektedir.

- Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda ileriki çalışmalarda kullanılacak starter kültür adayları olan laktik asit bakteri izolatlarıyla farklı özellikte turşuların üretilmesi ve endüstriyel boyuta taşınarak tüketicilere sunulması hedeflerimiz arasındadır.



KAYNAKLAR

- Abdelgadir, W.S., Hamad, S.H. Moller, P.L. and Jakobsen, M., 2001. Characterisation of the dominant microbiota of Sudanese fermented milk. *Rob. Int. Dairy J.*, 11: 63-70.
- Akbaş, L.G., 2006. Değişik turşularda biyojen amin miktarları üzerine araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 96s.
- Aktan, N., Yücel U. ve Kalkan, H., 1998. Turşu Teknolojisi. E. Ü. Ege Meslek Yüksek Okulu Yayınları No:23, E. Ü. Basımevi, İzmir, 138s.
- Alan, Y., Dığrak, M., 2012. Doğal Turşulardan İzole Edilen *Lactobacillus plantarum* Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması. *KSÜ Doğa Bil. Derg.*, 15(2), 46-49.
- Anonim, 1990. TS 4200 Lahana Turşusu Standardı. TSE, Ankara.
- Anonim, 1993. TS 11112 Hıyar Turşusu Standardı. TSE, Ankara.
- Aran, N., 2014. Gıda Biyoteknolojisi. 5.Basım, Nobel Yay. Yayın No: 232, Ankara 514s.
- Arslankoz, N., 2011. Ankara Çubuk yöresi turşularından izole edilen laktik asit bakterilerinin bazı teknolojik ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi. YL Tezi Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Battcock, M. and Azam-Ali, S., 1998. Fermented Fruits and Vegetables. A Global Perspective. *FAO Agricultural Services Bulletin No. 134.*
- Black, J. G. and Black, L. J. 2015. *Microbiology: principles and explorations.* 9th ed. Wiley. USA. 960 p.
- Boye, J. I. 2015. *Nutraceutical and Functional Food Processing Technology.* Wiley. Canada.
- Breidt, F., McFeeters, R. F., Perez-Diaz, I. and Lee, C., 2013. Fermented Vegetables. 841-855. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 4th Ed. Edited by M. P. Doyle and R. L. Buchanan © 2013 ASM Press, Washington, D.C.
- Büyükyörük, S. ve Soyutemiz, G.E., 2010. Geleneksel Olarak Üretilmiş İzmir Tulum Peynirinden *Lactococcus lactis* (*Lactococcus lactis* alttür *lactis* ve alttür *cremoris*) Suşlarının İzolasyonu, Fenotipik ve Moleküler Teknikler ile İdentifikasyonu. *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 7 (2), 81-87.
- Caplice, E., Fitzgerald, G.F., 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 131-149.
- Cheng, H. R. and N. Jiang (2006). "Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts." *Biotechnol Lett* 28(1): 55-59.
- Cohen, J. Powderly, W. Opal, S., 2016. *Infectious Diseases*, 4th Edition. Elsevier. USA.
- Collins, M.D., Rodrigues, U.M., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J.A.E., Martinez-Murcia, A., Phillips, B.A., Williams, A.M., Wallbanks, S. 1991. Phylogenetic Analysis of the Genus *Lactobacillus* and Related Lactic Acid Bacteria as Determined by Reverse Transcriptase Sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 77:5-12.
- Curk, M.C., Hubert, J.C., Bringel, F. 1996. *Lactobacillus paraplantarum* sp. nov., a new species related to *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46:595- 598.

- Çetin, B., 2011. Production of probiotic mixed pickles (Turşu) and microbiological properties. *African Journal of Biotechnology*, 10 (66), 14926-14931.
- Çon, A.H., Karasu, N., 2009. Determination of Antagonistic Starter Cultures for Pickle and Olive Fermentation Processes. *Czech J. Food Sci.*, 27, 185–193.
- Daeschel, M.A., Anderson, R.E., and Fleming, H.P., 1987. Microbial ecology of fermenting plant materials. *FEMS Microbiology Reviews*, 46, 357-367.
- Daeschel M.A., Fleming, H. P. and McFeeters R.F., 1988. Mixed Culture Fermentation of Cucumber Juice with *Lactobacillus plantarum* and Yeasts. *Journal Series of the North Carolina Agricultural Research Service*, Raleigh, NC 27695–7601.
- Demir, N., Bahçeci, K.S., Acar, J., 2006. The Effects Of Different Initial *Lactobacillus Plantarum* Concentrations On Some Properties Of Fermented Carrot Juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 30, 352–363.
- Dursun, D., 2010. Ankara Çubuk Yöresi Turşularından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması ve Toplam Hücre Protein Profillerinin Belirlenmesi YL Tezi Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Erkmen, O. and Bozoğlu T.F., 2016. *Food Microbiology: Principles Into Practice*, John Wiley & Sons, 944p.
- Etchells, J.L., Bell, T.A., Fleming, H.P., 1975. Factors Influencing the Growth of Lactic Acid Bacteria During the Fermentation of Brined Cucumbers., J.G. Carr C.V. Whiting, Ed., *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*. Academic Press, New York. 281-305.
- Etchells, J.L., Bell, T.A., Fleming, H.P., Thompson, R.L., 1976. The Controlled Fermentation Proces Compared with a Salt-Free Method for Preservation and Storage of Pickling Cucumbers. U.S. Food Fermentation Laboratory Publications Advisory Statements, 7s.
- Ennahar, S., Sonomoto, K. and Ishizaki, A., 1999. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *J Biosci Bioeng.* 87(6):705-16.
- Fleming, H.P., Thompson, R.L., Etchells, J.L., Bell, T.A., 1975. Purging of Carbondioxide From Cucumber Brinesto Reduce Bloat Damage, *Journal of Food Science*. 40,1304-1310.
- Fleming, H.P. McFeeters, R.F. and Breidt, F., 2001. Fermented and Acidified Vegetables Chp.51. *Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods*.521-532.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. Pickles. *Fruit Processing Toolkit*.
- Foulquie Moreno, M. R., *et al.* (2006). "The role and application of enterococci in food and health." *Int J Food Microbiol* 106(1): 1-24.
- Fujii, K., Fujiki, T., Koiso, A., Hirakawa, K., Yamashita, M., Matsumoto, T., Hasegava, T., Morimatsu, F., Katakura, Y., 2014. Identification of anti-allergic lactic acid bacteria that suppress Ca²⁺ influx and histamine release in human basophilic cells. *Journal Of Functional Foods*, 10, 370–376.
- Gardner, N.J., Savard, T., Obermeier, P., Caldwell, G., Champagne, C.P., 2001. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 261–275.
- Ganzle, M.G., 2015. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in

- food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106–117.
- Garneau, S., Martin N.I. and Vederas, J.C., 2002. Twopeptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *J. Biochem.*, 84: 577-592.
- Giraffa G. and Carminati D., 2008. Molecular techniques in food fermentation: principles and applications. In: *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods*, L. Coccolin & D. Ercolini (Editors). Springer Science, New York, pp. 1-30.
- Gürtler, V. and Stanisich, V.A., 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142, 3–16.
- Harrigan, W. F., 1998. *Laboratory Methods in Food Microbiology*. 3rd ed. Academic Press, San Diego, 532 p.
- Hofvendahl, K. and Hagerdal, B. H., 2000. Factors Affecting the Fermentative Lactic Acid Production from Renewable Resources. *J. of Enzymes and Microbial Technology*. 26: 87-107.
- Holzappel W. H., Wood B. J. B., 2014. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity And Taxonomy*. New York, NY: Wiley-Blackwell, 632p.
- Hui and Evranuz, 2012. *Handbook Of Plant-Based Fermented Food And Beverage Technology*, Second Edition. CRC press, 836 p.
- Jamaly, N., Benjouad, A., and Bouksaim, M., 2011. Probiotic Potential of Lactobacillus Strains Isolated from Known Popular Traditional Moroccan Dairy Products. *British Microbiology Research Journal*, 1 (4), 79-94.
- Kabak, B. 2009. Turşu üretimi ve fermantasyonda rol oynayan mikroorganizmalar. II. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 27–29 Mayıs, Van, pp. 834–837.
- Kabak, B. and Dobson, A. D., 2011. "An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey." *Crit Rev Food Sci Nutr* 51(3): 248-260.
- Karasu, N., 2006. Turşu ve zeytinlerden antogonistik ve prebiyotik özellikte laktik starter kültür eldesi. Pamukkale Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- Karasu, N., Şimşek, Ö., Çon, A.H., 2010. Technological and probiotic characteristics of Lactobacillus plantarum strains isolated from traditionally produced fermented vegetables. *Annals of Microbiology*, 60 (2), 227-234.
- Kathleen, M. M., Samuel, L., Felecia, C., Ng K. H., Lesley, M. B. and Kasing, A., 2014. (GTG)5-PCR analysis and 16S rRNA sequencing of bacteria from Sarawak aquaculture environment. *International Food Research Journal* 21(3): 915-920.
- Kılıç, S., 2001. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. Ege Üniv. Ziraat Fak. Yay. No: 542, 421s.
- Klein, G, Pack A, Bonaparte C, Reuter G., 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.*26;41(2):103-25.
- Kumar, M., Ghosh, M., Ganguli, A., 2012. Mitogenic response and probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from indigenously pickled vegetables and fermented beverages. *World J Microbiol Biotechnol*, 28, 703–711.
- Leroy, F., Vuyst, L.D., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 67–78.
- Liu, S.N., Han, Y., Zhou, Z.J., 2011. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International*, 44, 643–651.

- Lu, Z., Breidt Jr, F., Fleming, H.P., Altermann, E., Klaenhammer, T.R., 2003. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, AJL-1, from a cucumber fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 225–235.
- Ludwig, W. and Klenk. H.P., 2005. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In Brenner, Krieg, Staley and Garrity (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 2, The Proteobacteria, Part A, Introductory Essays. Springer, New York, pp. 49–65.
- Mazzoli, R., Bosco, F., Mizrahi, I., Bayer, E.A., Pessione, E., 2014. Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnology Advances*, 32, 1216–1236.
- Mozzi F., Raya, R. R. and Vignolo G. M., 2010. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Blackwell Publishing, USA.
- Niku-Paavola, M.L., Laitila, A., Mattila Sandholm, T., Haikara, A., 1999. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* 86: 29-35.
- Ogier, J. C. and Serror, P., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int J Food Microbiol* 126(3): 291-301.
- Osmanağaoğlu, Ö., 2010. Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmasında Amplifiye Edilmiş 16s rDNA Restriksiyon Analizinin Kullanımı. Ankara Üni.BAP Kesin Raporu, Ankara.
- Özçelik, F., İç, E., 2000. Hıyar Turşularının Düşük Tuz Konsantrasyonlarında Depolanması Üzerine Bazı Koşulların Etkileri. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 6 (4), 115-119.
- Papagianni, M., 2012. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. *Comput Struct Biotechnol J.*; 3.
- Peres, C.M., Peres, C., Mendoza, A.H., and Malcata, F.X., 2012. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria e With an emphasis on table olives. *Trends in Food Science & Technology*, 26, 31-42.
- Plengvidhya, V., Breidt Jr. F., Fleming, H.P., 2004. Use of RAPD-PCR as a method to follow the progress of starter cultures in sauerkraut fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 93, 287– 296.
- Randazzo, C.L., Restuccia, C., Romano, A.D., Caggia, C., 2004. *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 9 – 14.
- Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C., 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 3 – 16.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., Mattila-Sandholm, T., 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84, 197– 215.
- Seseña, S., Sánchez, I., Palop, Ll. and González-Viñas, M.A., 2001. Contribution of starter culture on the sensory characteristics of fermented Almagro eggplants. *Int J Food Microbiol* 67, 197–205.
- Singh, A.K. and Ramesh, A., 2009. Evaluation of a facile method of template DNA preparation for PCR-based detection and typing of lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 26, 504–513.
- Stiles, M. E., and Holzapfel, W. H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current

- taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1–29.
- Şahin, İ. ve Akbaş, H. 2001. Hıyar Turşularında Yumuşamanın Önlenmesi ve Kullanılabilecek Kalsiyum Klorür (CaCl_2) Miktarının Belirlenmesi. *Gıda*, 26 (5): 333-338.
- Şanlıbaba, P., 2012. Characterization of lactic acid bacteria based on genotypic analyses. *New Biotechnology* 29: S125.
- Sengun, I. Y., 2009. "Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food." *Int J Food Microbiol* 135(2): 105-111.
- Tamang, J.P., Tamang, B., Schillinger, U., Franz, C.M.A.P., Gores, M., Holzappel, W.H., 2005. Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 347– 356.
- 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, Adana.
- Temiz, A., 2016. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. 7. Baskı. Hatiboğlu Yayınevi. Ankara.
- Torriani, S., Felis, G.E., Dellaglio, F. 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene derived primers. *Applied and Environmental Microbiology* 67:3450–3454.
- Turgut, Z., 2006. Starter Kültür Kullanılarak Üretilen Hıyar Turşularında Biyojen Amin Oluşumu Üzerine Araştırma. YL Tezi Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara 72s.
- Uylaşer, V. ve Erdem, F., 2004. Stoklanmış Hıyarlardan Farklı Uygulamalarla Turşu Üretimi. *Ulud. Üniv. Zir. Fak. Derg.*, 18 (1), 81-92.
- Vasdinyei, R. and Dea'k T., 2003. Characterization of Yeast Isolates Originating from Hungarian Dairy Products Using Traditional and Molecular Identification Techniques, *International Journal of Food Microbiology*, 86: 123–130.
- Wouters, D., *et al.* 2013. "Bacterial community dynamics, lactic acid bacteria species diversity and metabolite kinetics of traditional Romanian vegetable fermentations." *J Sci Food Agric* 93(4): 749-760
- Yıldız, H., 2011. Turşu ve Zeytinlerden Laktik Asit Bakterileri ile Mayaların İzolasyonu ve elde edilen izolatların bazı özelliklerinin belirlenmesi. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Yu, J., Gao, W., Qing, M., Sun, Z., Wang, W., Liu, W., Pan, L., Sun, T., Wang, H., Bai, N., and Zhang, H., 2012. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles in Sichuan, China. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 58, 163-172.

ÖZGEÇMİŞ

13.06.1987 Ardahan doğumlu olan Rahime Dündar, Öztürk Ailesinin dört çocuğundan ilkidir. Çocukluğu Sakarya’da geçmiştir. İlköğreniminin ardından orta öğrenimine 2001 yılında Sakarya Anadolu Lisesi’nde başlamış olup Bursa-Şükrü Şenkaya Anadolu Lisesi’nde bitirmiştir. Ardından Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünde lisans okumaya hak kazanmış ve 2010 yılında mezun olmuştur. Ankara’da geçirdiği beş yıl sonunda Gıda Mühendisi ünvanını alarak öğrenimine devam etmeyi düşünmüş ve akademisyenliğe Gümüşhane Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde araştırma görevlisi olarak ilk adımı atmıştır. Halen Gümüşhane’de ikamet etmekte olup evli ve bir kız çocuk annesidir.