

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**GELENEKSEL YOĞURTLARDAN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU, MALDI TOF MS
BIOTYPER SİSTEMİ İLE TANIMLANMASI VE BAZI
STARTER KÜLTÜR ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞEYMA BETÜL KULOĞLU

BOLU, TEMMUZ - 2019

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI



**GELENEKSEL YOĞURTLARDAN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU, MALDI TOF MS
BIOTYPER SİSTEMİ İLE TANIMLANMASI VE BAZI
STARTER KÜLTÜR ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞEYMA BETÜL KULOĞLU

BOLU, TEMMUZ - 2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

Şeyma Betül KULOĞLU tarafından hazırlanan “Geleneksel Yoğurtlardan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, MALDI TOF MS Biotyper Sistemi ile Tanımlanması ve Bazı Starter Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda 16.07.2019 tarihinde savunularak Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

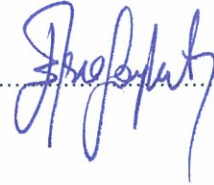
Jüri Üyeleri

Danışman
Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye
Doç. Dr. Enes DERTLİ
Bayburt Üniversitesi

Üye
Doç. Dr. Esra ACAR SOYKUT
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

İmza



Prof. Dr. Ömer ÖZYURT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü




Anneme,

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

1. Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 2. Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 3. Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 4. Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 5. Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Şeyma Betül KULOĞLU



ÖZET

**GELENEKSEL YOĞURTLARDAN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
İZOLASYONU, MALDI TOF MS BIOTYPER SİSTEMİ İLE
TANIMLANMASI VE BAZI STARTER KÜLTÜR ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ŞEYMA BETÜL KULOĞLU
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. İBRAHİM ÇAKIR)**

BOLU, TEMMUZ - 2019

Bu çalışmada Bolu ve çevre illerinden toplanan geleneksel yöntemlerle üretilmiş yoğurt örneklerinden laktik asit bakterilerinin (LAB) izolasyonu, tanımlanması ve bazı starter kültür özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İzole edilen suşların tanımlanması MALDI-TOF MS Biotyper sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında izole edilen 84 izolattan 2 tanesi *Lactobacillus helveticus*, 2 tanesi *Lactobacillus plantarum*, 3 tanesi *Lactobacillus fermentum*, 1 tanesi *Enterococcus faecalis* ve 76 tanesi *Lactobacillus delbrueckii* olarak tanımlanmıştır. İzole edilen bu suşların antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi amacıyla 16 farklı antibiyotik kullanılmıştır. Sonuç olarak izolatların eritromisin, teikoplanin, streptomisin, rifampisin, amfisilin, klindamisin, sefotaksim, kloramfenikol, tetrasiklin ve vankomisin antibiyotiklerine karşı duyarlılıklarının fazla olduğu, buna karşın nalidiksik asit, siprofloksasin, ofloksasin, gentamisin ve trimetoprim sülfametoksazol antibiyotiklerine dirençli oldukları tespit edilmiştir. İzolatların asit üretim yetenekleri, diasetil üretimi, antimikrobiyal aktiviteleri ve bazı izolatların da proteinaz aktivitesi araştırılmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin analizi amacıyla *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus* indikatör mikroorganizma olarak kullanılmış ve sonuç olarak izolatların çoğunluğu *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* patojenlerine karşı inhibe edici etki göstermezken, izolatların çoğunluğunun *Salmonella* Typhimurium ve *E. coli* O157:H7 patojenlerine karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Yine izolatların çoğunlukla diasetil üretimi gerçekleştirdiği tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Laktik asit bakterileri, MALDI TOF MS, Starter kültür özellikleri, Antibiyotik dirençlik

ABSTRACT

ISOLATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM TRADITIONAL YOGHURTS, IDENTIFICATION BY MALDI TOF MS BIOTYPER SYSTEM AND DETERMINATION OF SOME STARTER CULTURE CHARACTERISTICS

MSC THESIS

SEYMA BETUL KULOGLU

BOLU ABANT IZZET BAYSAL UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF
NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING
(SUPERVISOR: PROF. DR. IBRAHIM CAKIR)

BOLU, JULY 2019

In this study, yogurt samples which were produced by traditional methods from some provinces around Bolu were collected and lactic acid bacteria (LAB) were isolated. Isolated strains were identified by MALDI-TOF MS Biotyper system. Of the 84 isolates isolated from the study, 2 were identified as *Lactobacillus helveticus*, 2 *Lactobacillus plantarum*, 3 *Lactobacillus fermentum*, 1 *Enterococcus faecalis* and 76 *Lactobacillus delbrueckii*. In order to determine the antibiotic resistance of the isolates, 16 different antibiotics were used and as a result, the susceptibility to erythromycin, teicoplanin, streptomycin, rifampicin, ampicillin, clindamycin, cefotaxime, chloramphenicol, tetracycline and vancomycin antibiotics was higher, whereas the majority of the isolates were nalidixic acid, ciprofloxacin, ofloxacin, gentamicin and showed resistance to trimethoprim sulfamethoxazole antibiotics. Acid production capabilities, diacetyl production, antimicrobial activities and protease activity of some isolates were investigated. For the analysis of antimicrobial activity, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* were used as indicator microorganisms. As a result, while the majority of the isolates did not show any inhibitory effect against *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* pathogens, the majority of isolates were found to have antimicrobial effect against *Salmonella* Typhimurium, *E. coli* O157:H7 pathogens. It was determined that the isolates mostly produced diacetyl production.

KEYWORDS: Lactic acid bacteria, MALDI TOF MS, Starter culture properties, Antibiotic resistance

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	x
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xi
TEŞEKKÜR	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1 Laktik Asit Bakterileri ve Genel Özellikleri	3
2.1.1 Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması	4
2.2 Laktik Asit Bakterilerini Tanı Yöntemleri	6
2.2.1 Fenotipik yöntemler	7
2.2.2 Moleküler/Genotipik yöntemler	8
2.2.3 MALDI-TOF MS Biotyper yöntemi ile bakteri tanısı.....	8
2.3 Yoğurt.....	11
2.3.1 <i>Streptococcus thermophilus</i> 'un genel özellikleri.....	15
2.3.2 <i>Lactobacillus bulgaricus</i> 'un genel özellikleri	16
2.4 Laktik Asit Bakterilerinin Starter Kültür Olarak Kullanımı.....	16
2.4.1 Laktik Asit Üretimi	17
2.4.2 Proteolitik Aktivite	18
2.4.3 Aroma Maddeleri Üretimi	18
2.4.4 Ekzopolisakkarit Üretimi.....	19
2.4.5 Antimikrobiyal Aktivite.....	20
2.4.6 Antibiyotik Dirençlilik.....	21
2.4.7 Bakteriyofaj Dirençlilik	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1 Materyal.....	22
3.1.1 Örneklerin Toplanması	22
3.1.2 İndikatör Mikroorganizmalar.....	22
3.1.3 Kullanılan Antibiyotikler	22
3.1.4 Kullanılan Çözeltiler	23
3.2 Yöntem	23
3.2.1 Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu.....	23
3.2.2 İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinden Stok Kültür Hazırlama	24

3.2.3	İzolatların Morfolojik, Fenotipik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	24
3.2.3.1	Gram Boyama	24
3.2.3.2	Katalaz Testi.....	25
3.2.3.3	Glukozdan Gaz Oluşumu Testi	25
3.2.3.4	Farklı Sıcaklıklarda Gelişme Testi.....	25
3.2.3.5	Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Testi.....	26
3.2.3.6	Farklı pH' larda Gelişme Testi.....	26
3.2.4	İzolatların Moleküler Tanısı	26
3.2.5	İzolatların Antibiyotik Dirençlilikleri	27
3.2.6	İzolatların Bazı Starter Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi	27
3.2.6.1	Yüzde Asitlik Ölçümü ve Asidifikasyon	27
3.2.6.2	Proteinaz Testi.....	28
3.2.6.3	Antimikrobiyal Aktivite Testi	28
3.2.6.4	Diasetil Oluşumu Testi.....	29
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	30
4.1	Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	30
4.2	Morfolojik, Fenotipik ve Biyokimyasal Tanı Sonuçları	30
4.3	MALDI TOF MS Biotyper Tanı Sonuçları	35
4.4	Antibiyotik Duyarlılık	39
4.5	İzole Edilen Suşların Bazı Starter Kültür Özelliklerinin Değerlendirilmesi	52
4.5.1	Yüzde Asitlik ve Asidifikasyon	52
4.5.2	Antimikrobiyal Aktivite.....	57
4.5.3	Diasetil Üretimi.....	62
4.5.4	Proteinaz Aktivitesi.....	64
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	67
6.	KAYNAKLAR.....	70
7.	EKLER.....	79
	EK A: CLSI Antibiyotik Kriterleri.....	79
	EK B: İzolatların Antimikrobiyal Aktiviteleri	80
8.	ÖZGEÇMİŞ	82

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. MALDI TOF MS ile analiz akış şeması.....	10
Şekil 2.2. Yoğurdun geleneksel olarak üretilmesi.	12
Şekil 4.1. Tüm izolatların dağılımları.	37
Şekil 4.2. İzolatların illere göre dağılımı.	37
Şekil 4.3. <i>Lb. delbrueckii</i> Z4-3'ün MALDI TOF MS Biotyper sonucu.	38
Şekil 4.4. <i>Lb. fermentum</i> Z1'in MALDI TOF MS Biotyper sonucu.	38
Şekil 4.5. İzolatların antibiyotiklere karşı duyarlılığı.	48
Şekil 4.6. İzolatların zamana bağlı asit üretimi.....	56
Şekil 4.7. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi.....	59
Şekil 4.8. İzolatların antimikrobiyal aktiviteleri.	60
Şekil 4.9. Sırasıyla diasetil üretimi olan ve olmayan örnekler	64
Şekil 4.10. İzolatların proteolitik aktivitelerinin belirlenmesi.	65

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1. 1. Orlo Jensen'in sınıflandırması	5
Çizelge 4.1. Yoğurt numunelerinin toplandığı iller ve izolat sayısı	30
Çizelge 4.2. Seçilen suşların izole edildiği yerler, kodları ve fenotipik karakterizasyonu.....	31
Çizelge 4.3. İzolatların MALDI TOF MS Biotyper tanı sonuçları.....	36
Çizelge 4.4. İzolatların antibiyotiklere karşı oluşturduğu zon çapları	40
Çizelge 4.5. İzolatların antibiyotiklere karşı direnç sonuçları	44
Çizelge 4.6. İzolatların yüzde laktik asitlik ve asidifikasyon sonuçları.....	52
Çizelge 4.7. İzolatların antimikrobiyal aktiviteleri	57
Çizelge 4.8. İzolatların diasetil üretimi.....	63
Çizelge 4.9. Bazı izolatların proteinaz aktivitesi zon çapları.....	65
Çizelge A.1. CLSI kriterlerine göre antibiyotik zon çapı standartları	79
Çizelge B.1. İzolatların patojenlere karşı oluşturduğu inhibisyon çapları.....	80

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

ACEI	: Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory
CO₂	: Karbondioksit
g	: Gram
GRAS	: Generally Recognised As Safe
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
Mbp	: Megabase Pair
mL	: Mililitre
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
PCR	: Polimerase Chain Reaction
sa	: Saat
°C	: Santigrat Derece

TEŞEKKÜR

Bu alıŐma TUBİTAK KAMAG tarafından desteklenen 116G012 (116G024) Kodlu “Ülkemize Özgü Yoğurt, Peynir Kültürü Geliştirilmesi ve Pilot Ölçekte Üretimi” adlı proje kapsamında verilen destekle gerçekleştirilmiştir. Deteklerinden dolayı TUBİTAK’a teşekkür ederim.

Tez dönemim boyunca maddi manevi her türlü desteğini ve yardımlarını benden esirgemeyen, her zaman yanımda olduğunu bildiğim kıymetli danışman hocam sayın Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR’a, laboratuvarında geçirdiğimiz vakitlerde hoŐ sohbetini benden esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaŐan sayın hocam Doç. Dr. Esra ACAR SOYKUT’a teşekkür ederim.

Yüksek lisansa baŐlamama vesile olan canım arkadaŐım Kezban GÜNDOĞDU’ya ve her daim yanımda olan Zahide GÜBÜL’e, bu süreçte bana destek olan ev arkadaŐlarım Őebnem GÜNDOĞDU ve AyŐegül ACAR’a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca yanımda olan, beni bu günlere getiren, bana güvenen ve her daim arkamda olan Aileme, özellikle Anneme tüm kalbimle teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Yoğurt, sütün fermantasyon yoluyla asitlendirilmesi ve olumlu organoleptik özellikler kazanması ile ortaya çıkan, asırlardır Anadolu'da sevilerek tüketilen en yaygın fermente süt ürünlerinden biridir. Yoğurdun süte nazaran çok daha uzun raf ömrüne sahip olması nedeniyle de sütün yoğurda işlenmesi, sütün muhafazası için oldukça tercih edilen bir yöntemdir (Herdem, 2006). Aynı zamanda yoğurt sahip olduğu yüksek asitlik sayesinde bünyesinde patojen mikroorganizmaların gelişimini engellemektedir. Sütün yoğurda dönüşümünü kapsayan fermantasyon sürecinde ise laktik asit bakterileri hâkim mikroorganizma grubunu oluşturmaktadır.

Laktik asit bakterileri (LAB) fermantasyon sürecinde merkezi rol oynayan ve gıda endüstrisinde fermente yiyecek ve içecek üretiminde uzun yıllardır güvenle kullanılan önemli bir bakteri grubunu oluşturmaktadır. Bu bakteriler başta laktik asit olmak üzere organik asitlerin üretimi yoluyla hammaddenin hızla asitlendirilmesine neden olmakta, ayrıca asetik asit, etanol, aroma bileşikleri, bakteriyosinler, ekzopolisakkaritler ve çeşitli enzimlerin üretimini de sağlamaktadır. Bu şekilde raf ömrüne ve ürünün mikrobiyal açıdan güvenliğine katkı sağlamakta, ürünün yapısını geliştirmekte ve böylece nihai ürünün duyuşal profiline de olumlu yönde katkı sağlamaktadırlar (Leroy ve Vuyst, 2004).

Starter kültür, fermantasyon sürecini hızlandırıp fermantasyona yön veren en az bir mikroorganizmanın çok sayıda hücresinin mikrobiyal bir preparatı olarak tanımlanmaktadır (Leroy ve Vuyst, 2004). Süt endüstrisinde kullanılan starter kültürlerin büyük çoğunluğunu laktik asit bakterileri oluşturmakta ve uzun yıllardır güvenle kullanılmaktadır. Gıda sektöründe seri üretime uygun, güvenilir ve kaliteli gıda üretimi, gıda endüstrisinin temel hedefini oluşturmaktadır. Günümüzde tüketicilerin daha bilinçli olması ve katkı maddelerine olan bakış açısı, doğal veya doğala yakın ürünlere olan talebi artırmaktadır. Bu sebeple gıdalara uygun doğal koruyucuların ve katkıların kullanımı önem kazanmakta ve bu konuyla ilgili çalışmalar giderek artmaktadır. Bu açıdan bakıldığında laktik asit bakterileri ürettikleri metabolitler ile hem doğal gıda koruyucusu görevini görmekte hem de sağlık üzerine önemli etkileri bulunmaktadır (Hurst, 1981).

Laktik asit bakterileri süt ürünleri endüstrisinde starter kültür, diyet takviyeleri, probiyotik olarak kullanım gibi sayısız endüstriyel uygulamada kullanılmaktadır (Horvath vd, 2009). Laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretebilme kabiliyeti, probiyotik olma özelliği ve fermente ettiği ürüne kattığı duyuşsal özellikler hem nihai ürünün raf ömrünü uzatmakta hem de ürünün besin değerini artırmaktadır. Bu nedenle laktik asit bakterileri starter kültür olarak kullanımı en cazip mikroorganizmalar olarak kabul edilmektedir (Soomro vd., 2002). Özellikle *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus* ve *Weisella* cinsleri gıda endüstrisinde kullanılan türleri ve yine bu cinslerden *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* ve *Lactobacillus* cinsleri süt fermantasyonunda kullanılan suşları içermektedir (Klein vd., 1998; Gezin, 2010).

Bu alışmada Batı Karadeniz Bölgesine ait illerden inek veya manda sütü kullanılarak, geleneksel yöntemlerle yapılmış yoğurtlar toplanılmış, bu yoğurtlardan laktik asit bakterilerin izolasyonu ve MALDI TOF MS Biotyper sistemi ile tanımlanması yapıldıktan sonra, antibiyotik dirençlilikleri, çeşitli gıda patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivitesinin yanı sıra, starter kültür olarak kullanılabilmeleri konusunda gerekli olan bazı teknolojik özellikleri araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Laktik Asit Bakterileri ve Genel Özellikleri

Laktik asit bakterileri genel olarak Gram pozitif, katalaz negatif, *Sporolactobacillus inulinus* dışında spor oluşturmeyen, sitokroma sahip olmayan bakterilerdir. Kok veya çubuk şeklinde morfolojik özellik gösteren bu bakteriler aerotolerant anaeroblar olup, termofil veya mezofil gelişebilme özelliği göstermektedirler. Hayvan ve insan bağırsak sisteminden, bitkilerden ve bitki atıklarından, süt ve süt ürünlerinden, diğer fermente gıdalardan izole edilebilmekte ancak toprak ve sudan izole edilememektedir (Horvath vd, 2009).

Laktik asit bakterileri gelişebilmek için amino asitlere, B grubu vitaminlerine, pürin ve pirimidin bazlarına ihtiyaç duyarlar (Reddy, 2008). Laktik asit bakterileri, Gram pozitif bakteriler içerisinde genellikle %50'den daha az guanin ve sitozin (G+C) oranına sahip olan bir bakteri grubudur ve bu grupta bulunan bakterilerin genom büyüklükleri genel olarak 1.8-3.4 Mbp arasında değişmektedir (Gürsoy, 2011; Yılmaz ve Temiz, 2003). Geneli mezofilik olan laktik asit bakterilerinin bazı türleri 5°C'nin altında veya 45°C gibi yüksek sıcaklıklarda gelişebilmektedir, aynı şekilde genel gelişme aralığı pH 4,0-4,5 olmasına karşın bazı türleri 3,2 gibi düşük veya 9,6 gibi yüksek pH'larda da gelişebilmektedir (Caplice ve Fitzgerald, 1999).

Laktik asit bakterileri, isimlerini karbonhidrat metabolizmaları sonucunda ürettikleri laktik asitten alırlar ve glikozu farklı metabolik yollar izleyerek kullanır, buna bağlı olarak da farklı son ürünler üretirler. Bununla birlikte laktik asit bakterilerinin en belirgin özellikleri Gram pozitif olmaları ve porfirin gruplarını sentezleyememesidir. Porfirin gruplarının sentezlenememesi sonucu laktik asit bakterileri katalaz ve sitokromdan yoksun kalmakta ve elektron taşıyıcısı bulundurmamakta ve bu nedenle de enerji kazanımlarını yalnızca substrat düzeyinde fosforilasyonu ile gerçekleştirmektedirler (Reddy, 2008). Laktik asit bakterilerinden bazıları glikolizisi EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) yolunu izleyerek tamamlamakta ve son ürün olarak %90 laktik asit ve %10 CO₂ üretmeleri durumunda homofermantatif laktik asit bakterisi olarak adlandırılmaktadır. Ancak fermantasyon 6-fosfoglukonat/ fosfoketolaz yoluyla tamamlanır ve laktik asit yanında etil alkol,

asetik asit gibi diğer son ürünler de üretilirse bu bakteriler heterofermantatif laktik asit bakterisi olarak adlandırılmaktadır (Salminen ve Von, 2004).

Laktik asit bakterileri laktozu fermente ederek son ürün olarak başta laktik asit ve bunun yanında asetik asit, formik asit gibi organik asitler, diasetil, alkol, CO₂, hidrojen peroksit, bakteriyosin ve benzeri ürünler üretebilmektedirler (Mohania vd., 2008). Laktik asit ilk defa İsveçli bilim adamı C. W. Scheele tarafından 1780 yılında ekşi sütte bulunmuş olup L (+) ve D (-) olmak üzere iki optik izomeri bulunmaktadır. D (-) laktik asit insanlar için zararlı olmasına rağmen L (+) izomeri başta gıda sanayii olmak üzere ilaç, tekstil, deri, biyoteknoloji ve kimya endüstrisinde de kullanılmaktadır (Gezginç, 2010).

Laktik asit bakterileri ürettikleri asitler ile ortam pH'ını düşürerek ve ürettikleri bakteriyosinin antimikrobiyal etkisi sayesinde patojenlerin ve kontamine diğer mikroorganizmaların gelişimlerini inhibe etmekte, aynı zamanda ürettikleri organik asitlerle gıdanın duyuşal profiline katkı sağlamaktadırlar (Hurst, 1981). Bunun yanı sıra bazı laktik asit bakterileri ürettikleri ekzopolisakkaritlerle özellikle süt ürünlerinde istenilen tekstürün oluşmasına katkı sağlamaktadır (Sanlibaba ve Çakmak, 2016). Laktik asit bakterileri Amerika Birleşik Devletleri'nde GRAS (Genellikle güvenli kabul edilen) statüsünde kabul edildiklerinden, bu bakterilerinin ve bazı metabolitlerinin gıdalarda kullanılmasına veya ilave edilmesine izin verilmektedir (Osmanağaoğlu ve Beyatlı, 2002). Ancak laktik asit bakterilerinden Enterokoklar suda buldukları için fekal kontaminasyon indikatörü olarak kabul edilmekte ve bu nedenle de GRAS statüsünde kabul edilmemektedir. Buna rağmen proteolitik ve lipolitik aktiviteleri, sitrat metabolizmaları, probiyotik özellikleri ve bakteriyosin gibi antimikrobiyel aktiviteye sahip bileşikleri sentezleme yeteneklerinden dolayı fermente gıda sanayinde önemli bir yere sahip durumdadırlar (Gezginç, 2010).

2.1.1 Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması

Laktik asit bakterileri terimi, "sütte ekşime yapan organizmalar" anlamında kullanılmış ve bu bakterilerin ilk saf kültürü, 1873'te J. Lister tarafından elde edilen "*Bacterium lactis*" (muhtemelen *Lactococcus lactis*) olmuştur (Peighambardoust vd.,

2011). Laktik asit bakterilerinin bir grup olarak ilk tanımlanması, koliform bakterilerle birlikte laktiklerin sütü fermente ve koagüle etme özellikleri üzerine yapılmış ancak 1901 yılında *Lactobacillus* mikroorganizmalarının Gram pozitif olarak tanımlanması ile koliform grubu bakteriler, laktik asit bakterilerinden ayrılmıştır (Yörük ve Güner, 2011).

İlk olarak Orla-Jensen 1919 yılında laktik asit bakterilerini, morfolojik özellikleri glikozu fermente etme şekilleri, belirli sıcaklıklarda gelişebilme ve şeker kullanım aralıklarını göz önünde bulundurarak sınıflandırmıştır (Salminen ve Von Wright, 2004) (Çizelge 1.1.).

Çizelge 1.1. Orlo Jensen'in sınıflandırması

Özellik	Basil		Kok							
	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weissella</i> ^a
Tetrat form	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
CO ₂ üretimi ^b	- ^c	±	-	-	-	+	-	-	-	+
10 °C de gelişme	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
45 °C de gelişme	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
%6,5 NaCl'de gelişme	B ^d	±	+	+	-	±	±	-	+	±
%18 NaCl'de gelişme	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
pH 4,4'te gelişme	B	±	-	+	±	±	+	-	-	±
pH 9,6'da gelişme	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Laktik asit ^e	L	D, L, DL ^f	L	L	L	D	D, DL ^f	L	L	D, DL ^f

+: Pozitif, -: Negatif, B: Belirlenemedi

a: *Weissella* suşları çubuk şeklinde olabilir.

b: Glukozdan CO₂ üretimi ile homo- veya heterofermentatif özelliğe bakılmıştır. Negatif ve pozitif sırasıyla homofermentatif ve heterofermentatif anlamına gelir.

c: Besiyerine göre küçük miktarda CO₂ üretimi görülebilir.

d: %8 NaCl'de üreme rapor edilemedi.

e: Glukozdan üretilen laktik asidin konfigürasyonu.

f: D-, L- veya DL- laktik asit üretimi türler arası farklılık gösterir.

Laktik asit bakteri 16S ve 23S rRNA sekans verilerine dayanarak, Firmicutes ve Actinobacteria olmak üzere iki ayrı filumda incelenmektedir (Liu vd. 2014; Wood & Holzapfel, 1992).

Firmicutes filumunda, *Lactobacillales* ailesine ait olan düşük guanin-sitozin içerikli (%31-49) *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Symbiobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* yer almaktadır. Actinobacteria filumunda ise yüksek guanin-sitozin içeriğine (%58-61) sahip olan *Bifidobacterium* cinsi yer almaktadır (Liu vd. 2014; Wood & Holzapfel, 1992).

2.2 Laktik Asit Bakterilerini Tanı Yöntemleri

Laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve sınıflandırılması endüstriyel ve bilimsel açıdan önem taşımaktadır. Tanımlamada bakterilerin morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinin yanında antibiyotik duyarlılıkları, faj tiplerinin belirlenmesi ve serolojik özelliklerinin belirlendiği klasik yöntemlerle birlikte güncel tekniklerden de yararlanılmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP), çoğaltılmış rDNA'nın restriksiyon analizi (ARDRA), pulsed field jel elektroforezi (PFGE), sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve DNA dizilim analizi gibi moleküler biyoloji teknikleri, kullanılan güncel tekniklerdendir (Busch ve Nitschko, 1999).

Erkuş (2007), Anadolu'daki geleneksel yöntemlerle yapılmış doğal yoğurt örneklerinden, starter kültürlerinin izolasyonu, biyokimyasal ve moleküler tanımlamasını yapmıştır. Çalışmanın sonucunda toplam 66 kok ve 71 basil izolatu elde edilmiştir. Biyokimyasal tanımlama sonuçlarına göre tüm basil izolatları *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, kok izolatların ise 7 tanesi tam olarak *S. thermophilus* olarak tanımlanmıştır. Tüm izolatların tanısının moleküler metotlarla başarılı bir şekilde yapılabildiği bildirilmiştir.

Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan yöntemler fenotipik ve moleküler (genotipik) yöntemler olmak üzere iki sınıfta incelenebilir.

2.2.1 Fenotipik yöntemler

Laktik asit bakterilerinin fenotipik olarak sınıflandırılmasında morfolojik özellikleri ve biyokimyasal özellikleri dikkate alınmaktadır. Cins ve tür düzeyinde sınıflandırmaya olanak sağlayan fenotipik yöntemler arasında fizyolojik, metabolik ve kemotaksonomik markörler (hücre sel yağ asitleri, mikolik asit, polar lipitler, quininer, poliaminler, hücre duvarı bileşikler, ekzopolisakkaritler) ile hücre yüzeyindeki antijenler, faj tiplendirmeleri, antimikrobiyal duyarlılık karakterleri, toplam hücre ya da hücre duvarı proteinlerinin bir boyutlu ya da iki boyutlu elektroforetik paternleri yer almaktadır (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2015).

İlk olarak mikroskopik inceleme laktik asit bakterilerinin cinsi hakkında ve saflığı açısından bize bilgi vermektedir (Bulut, 2003). Bu doğrultuda boyama teknikleri kullanılarak hücrelerin ayrımı sağlanabilmektedir. Gram boyama tekniği ile laktik asit bakterilerinin Gram negatif bakterilerden ayrımı sağlanmakta ve aynı zamanda mikroskopik inceleme ile hücrelerin eni, boyu ve çapı ile beraber flagella bulundurup bulundurmadığı, hücre şekillerinin çubuk veya kok olması durumları tespit edilmektedir (Kılıç, 2008).

Orlo-Jensen tarafından laktik asit bakterilerinin sınıflandırılmasının temelini oluşturmuş olan farklı pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonunda gelişme, glikozdan gaz üretimi gibi bazı basit fizyolojik testler bunun yanında katalaz reaksiyonu, karbonhidrat fermantasyonu, üretilen laktik asidin konfigürasyonu, arjininden amonyak üretimi, indol, Voges-Proskauer, jelatin hidrolizi ve üreaz testleri, sukrozdan dekstran oluşturma gibi biyokimyasal testler laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Böylece tür bazında ayırım sağlanabilmektedir (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2015; Yılmaz ve Temiz, 2003).

Bu analizlerin yanı sıra ticari olarak üretilmiş cins ve tür düzeyinde hızlı biyokimyasal tanı yapabilen test kitleri de bulunmaktadır. Bu test kitlerinden alınan sonuçlar, ilgili kitin veri tabanında yer alan bakteri türleri ile sınırlı olarak tanımlanmakta ve sonuçlar “% tanımlama” şeklinde verilmektedir (Yılmaz ve Temiz, 2003). Ancak bu fenotipik yöntemlerin az tekrarlanabilir olması, bazı tekniklerin belirsizliği geniş çaplı araştırma gerektirmesi ve ayırt etmede kesinlik sağlamamaktadır (Mohania vd, 2008).

Ertürkmen ve Öner (2015) Beyaz peynirlerden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin starter kültür özelliklerini biyokimyasal yöntemlerle incelemiş ve çalışma sonunda laktik asit bakterilerinin tanısında biyokimyasal ve karbonhidrat test sonuçları arasında farklılıkların olmasının genotipik tanının önemini ortaya koyduğunu belirtmiştir.

2.2.2 Moleküler/Genotipik yöntemler

Laktik asit bakterilerini sınıflandırmak için fenotipik özelliklerinden yararlanmak önemli olmakla birlikte, kesin tanımlama yapılabilmesi için fenotipik özellikler yeterli olmamaktadır. Bakterilerin tanısını yapabilmek için bakterinin DNA baz diziliminin belirlenmesi en iyi bilinen yöntemlerdendir. Moleküler karakterizasyon yöntemleri yakından ilişkili türlerin ayrımında bile etkilidir. Ayrıca böylece türler arası genetik ilişkiler daha iyi incelenebilmektedir (Al-Bayati, 2014). Türkiye’de yapılan araştırmalarda en çok kullanılan moleküler tanımlama yöntemlerinin başında PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), PCR (Polymerase Chain Reaction) ve 16S rDNA dizilim analizi gelmektedir (Çetinkaya ve Ayhan, 2012).

2.2.3 MALDI-TOF MS Biotyper yöntemi ile bakteri tanısı

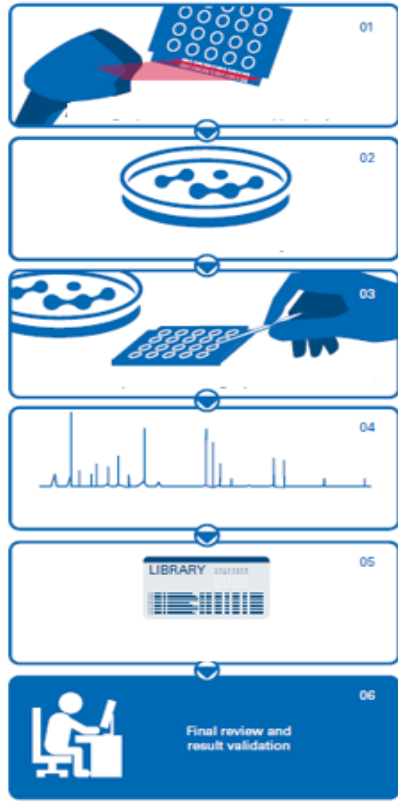
MALDI-TOF MS (Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu/ Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi) Biotyper sistemi bir organizmanın özgün proteomik parmak izini belirlemek için kullanılarak, dakikalar içinde mikroorganizmaların spesifik ve güvenilir bir şekilde tanımlanmasını sağlamaktadır (Bruker, 2019).

Kütle spektrometri tekniğinin gelişmesi ve mikrobiyal tanı alanında kullanıma girmesiyle, biyomoleküler bileşenlerin HPLC (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi) ya da elektroforez işlemine tabi tutularak ayrılması gerekmeksizin, büyük moleküller ile mikroorganizmalarda tür tanımlanması olanaklı hale gelmiştir. Böylelikle MALDI-TOF MS Biotyper, çok sayıda geleneksel ve biyokimyasal tanımlama yönteminin yerine geçmiş ve bu yöntem DNA dizi analizlerindeki birden fazla adım ve farklı gereksinimlerinin yükünü ortadan kaldırmıştır.

Oligonükleotidler, PCR ürünleri, peptit ve proteinler gibi büyük moleküllerin kimyasal bir ön işlem gerektirmeksizin incelenebilecek olması bu yöntemin avantajını olmuşturmaktadır (Bruker, 2019; Akyar, 2011).

İlk kez 1975 yılında Anhalt ve Fenselau tarafından patojen bakterilerin tanımlanmasında MALDI-TOF MS cihazı kullanılmıştır (Anhalt, 1975). Ancak yöntemin rutin kullanımı oldukça yenidir. MALDI-TOF MS’de tanımlanması istenilen mikroorganizmanın saf kültürü küçük daireler içeren metal bir plak üzerine, daireleri dolduracak şekilde yayılır, üzerine matriks solüsyonu konur ve havada kurutulur. MS aygıtı içine yerleştirilip lazer ışınları ile atışlar yapılır (Şekil 2.1.) (Bruker, 2019). Matriks ışığı emer, biyomoleküllerin ve büyük organik moleküllerin iyonize edilmesi sağlanır, ardından elektrik ve/veya manyetik alandan geçirilerek protein profilleri çıkarılır. Ortaya çıkan protein profillerinin sistemin veri tabanındaki referans spektra ile karşılaştırılması sonucuna göre mikroorganizmaların cins veya tür bazında tanısı yapılır (Yılmaz vd., 2014; Akyar, 2011).

Dušková ve ark. (2012) yaptıkları bir çalışmada laktobasillerin, PCR ve MALDI-TOF MS ile tanısını yapmış ve her iki yöntemi kıyaslamıştır. Sonuç olarak tür tanımlanmasında PCR için %77 ve MALDI-TOF MS için %93 oranında başarılı olduğunu, ayrıca yakından ilişkili *Lactobacillus* türleri arasında ayırım yapmak için, MALDI-TOF MS’in diğer genotipik tekniklerle birlikte kullanılmasının daha güvenilir olacağı bildirilmiştir.



1. Hedef plaka MALDI-TOF MS Biotyper proje listesine eklenir.
2. İzole edilmiş kolonilerden biri seçilir.
3. Koloni hedef plakaya aktarılır ve üzerine matris eklenir.
4. MALDI-TOF spektrumu yazılım tarafından otomatik olarak oluşturulur.
5. Spektrum tanı için referans kütüphaneye karşı eşleştirilir.
6. Son inceleme ve sonuç onaylama yapılır.

Şekil 2.1. MALDI TOF MS ile analiz akış şeması.

Yine aynı şekilde Nacef ve ark. (2016) Maroilles peynirlerinden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin MALDI-TOF MS ile tanısını yapmış ve ardından seçilen bazı suşların 16S rDNA bazlı tanısını gerçekleştirmiştir. Sonuç olarak elde edilen verilerin uyumlu olduğunu bunun yanında, bakteri tanısı için MALDI-TOF MS yönteminin hızlı, ekonomik ve güvenilir olduğu böylece diğer yaygın olarak kullanılan yöntemlere bir alternatif olabileceğini vurgulamıştır.

MALDI-TOF MS Biotyper yönteminin klasik yöntemlere göre belki de en büyük avantajı çok kısa bir sürede tanımlamanın yapılabilmesidir. Diğer yaygın moleküler tanı yöntemlerinde tanı işlemi 1-2 gün sürebilirken, MALDI-TOF MS Biotyper sistemi ile tanımlama yönteminde bu süre 1 saatten daha kısa bir süre içerisinde gerçekleştirilebilmektedir (Bruker, 2019).

MALDI-TOF MS Biotyper tekniği, tanısı yapılacak kültür için kullanılan besiyerlerinden ve üreme koşullarından etkilenmeden çalışabilmektedir ancak analiz için alınacak koloninin 48 saatten daha yaşlı olmaması tercih edilir. Yaşlanan

kültürlerde meydana gelen ribozomal proteinlerin parçalanması ve buna bağlı olarak ayırt edici pik sayısı ve bu piklerin yoğunluğu düşmektedir (Wieser vd., 2012).

MALDI-TOF MS Biotyper yöntemi mikrobiyolojik tanımlama için nispeten yeni bir yöntem olduğundan yanlış tanımlama yapılması ya da tanımlama yapılamamasının nedeni genellikle veri tabanında yeterli referans spektrumlarının bulunmamasıdır. Veri tabanının gün geçtikçe gelişmesi ile beraber bu eksikliğin giderileceği düşünülmektedir. MALDI-TOF MS Biotyper'in tür bazında doğru tanımlama oranının %84,1 ile %95,2 arasında değiştiği bildirilmiştir (Yılmaz, 2014). MALDI-TOF MS Biotyper tür saptamasında oldukça başarılı olmasına rağmen alt türlerin saptanmasında şimdilik çok güvenilir bulunmamaktadır. Anaerobik bakterilere ait verileri kısıtlı olduğu için başarılı bir tanımlama %50'nin altına düşmektedir (Kanak ve Yılmaz, 2018a).

2.3 Yoğurt

Yoğurt, sütün laktik asit bakterileri tarafından mayalanması ile oluşan yoğun kıvamlı, hafif ekşimsi tadı olan fermente bir süt ürünüdür. Yoğurdun tarihi çok eski zamanlara dayanmakla birlikte ilk olarak ne zaman yapıldığına dair kesin bilgi yoktur, ancak kökeni konusunda en çok kabul edilen görüş Orta Asya'dan çıkmış olduğu yönündedir (Yurdakök, 2013; Yaygın, 1981).

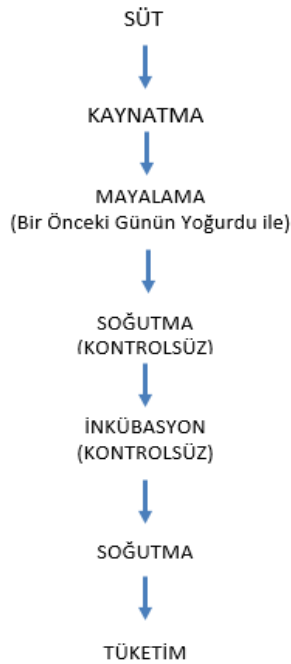
Yoğurt çok uzun zamanlardan beri tüketilmekle birlikte, yoğurdun besleyici özelliği ve insan sağlığı üzerine olumlu etkileri araştırmalar ile kanıtlandıktan sonra yoğurda olan ilgi iyice artmıştır (Yaygın, 1981). Yoğurdun besleyici değeri, sütün tüm besin öğelerini içermesiyle birlikte ihtiva ettiği canlı mikroorganizmalar ve bu organizmaların faaliyetleri sonucu oluşturduğu bileşiklerden oluşmaktadır.

Yoğurdun sağlık üzerine etkileri uzun zamandır bilinmesine rağmen bilimsel olarak araştırılması 20. yüzyıla dayanmaktadır. Rus bilim insanı Elie Metchnikoff Balkanlar'da ve Anadolu'da dağlık bölgelerde yaşayan insanların uzun ömürlü olduğunu görmüş ve bu insanların günlük yaşamlarını incelemiştir. Buradaki köylülerin bol miktarda yoğurt tükettiklerini tespit etmiş ve bu yüzden uzun ömürlü oldukları teorisini sunmuştur. Metchnikoff yediğimiz gıdalardan bağırsaklara atık

olarak geçen materyallerin bağırsaklarda pütrefaksiyona, yani kokuşmaya uğrarken toksik maddelerin açığa çıktığını ve bunun da kronik zehirlenmeye yol açarak yaşamı kısalttığını ileri sürmüştür. Metchnikoff devamlı yoğurt yiyerek faydalı enzimlerin alınacağı ve zararlı mikropların etkisinin önlenebileceğini bildirmiştir (Özden, 2008).

Laktik asit bakterileri, doğal bir antibiyotik olarak tanımlanan nisin ve laktik asit gibi maddeler üretirler ve bu metabolitler *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Listeria*, *Candida* gibi patojenlere karşı aktiftirler. Yoğurt, antimikrobiyal maddelerin varlığı sayesinde gastrointestinal ve ürogenital hastalıklara neden olan enfeksiyonlara karşı koruyucu etki gösterir. Ayrıca yoğurdun, diş plaklarının oluşumuna sebep olan mikroorganizmaların oluşumunu da engellediği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Petti vd., 2001).

Ülkemizde yoğurdun hazır olarak alınıp tüketilmesinin yanı sıra evlerde geleneksel yöntemlerle üretimi ve tüketimi de oldukça yaygındır. Evlerde geleneksel olarak yapılan yoğurtlarda çok farklı yöntemler kullanılmaktadır. Genel olarak kaynatılan çiğ süt, mayalanma sıcaklığına getirilmekte ve yine aynı yöntemle yapılmış önceki yoğurttan bir miktar katılarak (mayalama) inkübasyona bırakılmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Yoğurdun geleneksel olarak üretilmesi.

Sütün yoğurda dönüşümü temelde *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bakterileri ve bu bakterilerin iş birliği sayesinde (Yurdakök, 2013). Bu bakteriler süt şekeri olan laktozu enerji elde için tüketirken sonuç olarak laktik asit üretirler ve bu asit sayesinde ortamın pH'ını düşürürler. Ortam pH'ının düşmesiyle pH 5,2 civarında pıhtı oluşumu başlar ve 4,6-4,7 pH'da tamamlanır. Pıhtı oluşum mekanizması, yükselen asitlikle birlikte kazein misellerinin stabilitesini kaybetmesi ve sıcaklık etkisiyle serum proteinlerinin (özellikle β -laktoglobulin) denatürasyonu sonucu bu proteinlerin interaksiyona girmesi prensibine dayanır (Yetişemiyen, 2013).

Pourahmad ve Assadi (2007), geleneksel starter kültürlerin kullanımı ile yoğurt üretimini gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla geleneksel olarak üretilmiş yoğurtlardan *Lb. bulgaricus* ve *S. thermophilus*'u izole etmişler ve bu suşları yoğurt üretiminde kullanmışlardır. Üretim sonrası yoğurtların kimyasal, mikrobiyal ve organoleptik özelliklerini incelemişlerdir. Örneklerin soğuk depolama sırasında asetaldehitte önemli artış, mikrobiyal populasyon ve pH'sında azalış belirlemişlerdir. Soğuk depolama sırasında tat, koku ve yapı özelliklerinde önemli bir farklılık olmadığını, yoğurt üretiminde geleneksel starter kültürlerin yeterli olabileceğini ve bu kültürlerin kullanılabilmesi, ulusal kültür koleksiyonuna eklenebileceğini önermişlerdir.

Singh ve ark. (2009)'nın yaptıkları bir araştırmada, *Lactobacillus* türlerinin gıda açısından güvenilir laktik asit bakterileri arasında en önemli türlerden biri olduğunu, günümüzde endüstriyel açıdan önemli olanlarından yaklaşık 140 türün kullanıldığını belirtmiştir. Gıda üretiminde; doğal flora başta olmak üzere, çiğ süt, fermente süt ürünleri, meyve, sebzeler, et ürünlerinin üretiminde, starter kültürlerin kullanımının sağlığa faydalarının yanında kaliteyi artırmada da etkili olduğunu bildirilmiştir.

Fermente gıdaların üretimi, ham materyalin hızlı asidifikasyonunun başlangıcı, laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak kullanımının gerçekleştirilmesine bağlıdır. Laktik asit bakterilerinin endüstriyel olarak önemli işlevselliği olan yeni starter kültürleri geliştirilmektedir. Laktik asit bakterileri gıda güvenliği, daha iyi duyuşsal, teknolojik, besinsel özellik ve sağlık açısından avantaj sağlayabilir. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal maddeler, şeker polimerleri,

tatlandırıcılar, aromatik bileşikler, vitaminler ya da enzimler gibi faydalı probiyotik özelliklere genetik olarak sahip olması starter kültür olmaları açısından önem arz eder (Leroy ve Vuyst, 2004).

Moleküler biyoloji çalışmalarının artması ile ekonomik önemi olan organizmaların gelişmesinin endüstriyel açıdan çok faydalı olduğu, bilimsel açıdan önemli olan starter ve starter olmayan kültürlerin elde edilmesi ve bağışıklık sisteminde rol oynayan probiyotik laktik asit bakterileri üzerinde çalışıldığı bildirilmiştir (Cogan ve ark., 2007).

Klasik yoğurt yapımının yanı sıra probiyotik bakterilerin kullanılmasıyla probiyotik yoğurtların yapımı da yaygındır. Probiyotik bakteriler bağırsak yüzeyine tutunarak bağırsak mikroflorasını olumlu yönde değiştirir. Sağlıklı bir sindirim sisteminde *Lactobacillus* ssp. ve *Bifidobacterium* ssp. başlıca olarak rol oynamaktadır (Yetişemiyen, 2013). Ancak klasik yoğurt yapımında kullanılan starter kültürlerin bağırsaklara tutunma ve kolonize olma özellikleri olmadığından tek başlarına probiyotik mikroorganizma olarak nitelendirilememektedir (Çakır, 2003). *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium* türleri gibi probiyotiklerin biyoyoğurt yapımında kullanımı yaygın olarak görülmektedir (Lourens ve Viljoen, 2001).

Gezginç (2010), Türkiye'nin farklı yörelerine ait rastgele toplanılmış yoğurt örneklerinden izole edilen *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* türlerinin kimyasal ve moleküler yöntemlerle tanısını yapmıştır. İzole edilen suşların plazmit içeriği ve biyojen amin üretimi bakımından gıda endüstrisinde kullanılabilirliği araştırılmıştır. İzolatların antibiyotik dirençleri incelenmiş ve en fazla dirençliliği kanamisin (%53)'e gösterdikleri ayrıca rifampisin (%17)'e karşı ise duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Antibiyotik direnci ile plazmit içeriği arasında doğrusal bir ilişki tespit edilmemiştir. Biyojen amin üretme özelliğinin ise türler arasında ve tür içinde farklılık gösterdiği rapor edilmiştir. Sonuç olarak toplanan geleneksel yoğurt örneklerindeki mikroorganizmaların gıda kalite ve güvenliği açısından risk unsuru taşıyabileceği, gıdalarda kullanılacak kültürlerin kalite ve güvenlik sağlama adına teyitlerinin yapılmasının gerekli ve yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

Al-Bayati (2014), yaptığı bir çalışmada Irak'tan alınmış olan fermente sucuk ve geleneksel olarak yapılmış olan peynir, yoğurt, sarımsaklı peynir ve kaşar peynirinden toplamda 141 laktik asit bakterisi izole etmiştir. İzoleler PZR teknikleri

kullanılarak 16S rRNA bölgelerine göre genetik karakterizasyonu sağlanmıştır. Suşlardan ikisinin *Streptococcus* ssp, 36 suşun *Enterococcus* ssp. ve 8 suşun *Enterococcus durans* olarak tanımlaması gerçekleştirilmiştir. Tanımlamaları yapılmış olan izolatların antimikrobiyal özellikleri, bakteriyosin üretimleri ve proteaz aktiviteleri üzerine çalışılmıştır.

Uzunsoy (2018) ülkemiz tüketicisinin taleplerine yanıt verebilecek yoğurt üretiminde kullanılmak üzere yerel kaynaklardan izole edilmiş bakterilerin starter kültür özelliklerini belirlemiş ve endüstriyel üretime uygun starter kombinasyonları geliştirmiştir. Çalışma kapsamında izole edilen suşların asit geliştirme, seri pasajlama süreçlerine direnç göstererek canlılıklarını koruma ve yoğurt için tipik tat/aroma ve tekstür geliştirebilme potansiyeli olan 12 *S. thermophilus* ve 8 *Lb. bulgaricus* izolatu seçilmiş ardından bu suşlar ile yoğurt üretimleri gerçekleştirilmiştir. Teknolojik performans testleri sonucunda ise 1 *S. thermophilus* ve 7 *Lb. bulgaricus* kombinasyonunun endüstriyel yoğurt üretimine uygunluk gösterdiği ve yine bu kombinasyonların hem tanımlayıcı hem de hedonik duyuşal değerlendirmelerde yüksek duyuşal skorlar aldığı bildirilmiştir. Sonuç olarak kombinasyonlar için ticarileşebilir değerlendirilmesi yapılmıştır.

2.3.1 *Streptococcus thermophilus*'un genel özellikleri

Streptococcus thermophilus, bakterilerin Terrabacterium grubunun, Streptococcaceae ailesinin *Streptococcus* cinsine ait bir türdür (NCBI, 2019b).

Yuvarlak veya oval formda bulunabilir, hücreleri ikili veya zincir halinde olan homofermentatif laktik asit bakterisidir. Hücrelerin çapları 0,7-0,9 µm civarındadır. Optimum gelişme sıcaklığı 40-45°C'dir (Mitchell ve Sandine, 1984).

S. thermophilus heteropolisakkarit üreten başlıca laktik asit bakterileri türlerindedir. Böylelikle yoğurt oluşumunda istenen kıvamlı yapının meydana gelmesi, viskozitenin artması ve serum ayrılmasının azalması gibi faydaları vardır (Pektaş, 2014). Proteolitik aktivitesi zayıf olan *S. thermophilus* suşları yoğurt dışında Emmental, Cheddar gibi pıhtısı pişirilen peynirler ile bazı İtalyan tipi peynirlerin üretiminde kullanılmaktadır (Oberge ve Broadbent, 1993).

2.3.2 *Lactobacillus bulgaricus*'un genel özellikleri

Lactobacillus bulgaricus, bakterilerin Terrabacterium grubunun, Lactobacillaceae ailesinin *Lactobacillus* cinsine ait bir türdür (NCBI, 2019a)

Lb. bulgaricus düz ya da hafif kıvrık çubuk şekilli olup homofermentatiftir bir laktik asit bakterisidir. Tek veya zincir şeklinde görülür. Optimum gelişme sıcaklığı 45-50°C'dir. Proteolitik aktivitesi *S. thermophilus* gibi zayıftır ancak *S. thermophilus*'dan daha yüksektir. *Lb. bulgaricus*, yoğurt dışında Bulgar tipi yaykaltı, kefir, kıymız ve İtalyan tipi peynirlerin üretiminde de kullanılmaktadır (Özyurt, 2005).

2.4 Laktik Asit Bakterilerinin Starter Kültür Olarak Kullanımı

Fermentasyon işlemi mikroorganizmaların keşfinden çok daha önce bilinmekteydi, ancak proses anlaşılamadığı için gizemli görünmekteydi. Mikroorganizmaların keşfiyle ve mikrobiyolojinin bilimsel bir disiplin haline dönüşmesiyle birlikte artık gıda fermentasyonu kontrol edilebilir hale gelmiştir. Böylece uygun koşullarda ve gıdanın özelliğine göre istenilen özellikleri optimum ölçüde sağlayan mikroorganizmaların starter kültür olarak kullanılması başlamıştır. Fermente gıda üretiminde en çok kullanılan ve ticari starter kültür olarak en değerli grubu oluşturan mikroorganizmalar laktik asit bakterileridir (Demirgöl ve Sağdıç, 2017).

Starter kültür olarak kullanılacak bakterilerin kesin tanısının yapılmış olması ve endüstriyel özelliklerinin doğru bir şekilde belirlenmesi gerekmektedir. Laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak kullanılabilmesi konusunda belirleyici olan endüstriyel özelliklerden bazıları, laktik asit üretimi, proteolitik aktivite, aroma maddeleri üretimi, ekzopolisakkarit üretimi, antimikrobiyal aktivite, antibiyotik dirençlilik ve bakteriyofaj dirençlilik özellikleridir.

2.4.1 Laktik Asit Üretimi

Laktik asit bakterilerinin laktozu fermente ederek laktik asit oluşturmaları şüphesiz ki en önemli özelliklerinden biridir. Bu bakteriler ortamdaki laktozu, hücre zarından içeriye alarak, β -galaktozidaz enzimi ile glukoz ve galaktoz 6-fosfat'a hidroliz ederler. Glukoz doğrudan piruvata dönüştürür ve piruvattan da laktat dehidrogenaz enzimi ile laktik asit meydana getirmektedir (Aslım vd., 2000).

Laktik asit ortam pH'sını düşürerek ortamda istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini inhibe eder. Yine aynı şekilde heterofermentatif laktik asit bakterileri laktik asit yanında başka asitlerde üretir ve bu asitlerin de farklı düzeylerde antimikrobiyal etki gösterdiği bilinmektedir (Çelikyurt ve Arıcı, 2008).

Asit üretimini önemli kılan bir diğer özellik ise pH'ın düşüşüne bağlı olarak proteinlerin koagüle olmasını yani sütün pıhtılaşmasını sağlayarak yoğurt oluşum mekanizmasının temelini oluşturmasıdır.

İyi bir yoğurtta %0,9-0,95 laktik asit bulunması gerekir. Aynı zamanda, yoğurt aromasında son derece önemli olan laktik asit, yoğurdun keskin ve hoşta giden tadının oluşmasını sağlar (Kormaz, 2011). Üründeki laktik asit miktarı kullanılan starter kültür, sütün cinsi, üretim ve depolama koşullarına bağlı olarak değişiklik gösterir (Çelik, 2007). Bu yüzden kültürlerin asit oluşturma kapasitesi incelenirken dinlendirme ve tüketim sırasındaki asitliği de göz önünde bulundurulmalıdır. Genellikle yoğurt için hazırlanan kültürlerin asitliğine bakılırken steril yağsız süte %2 oranında aşılama yapılır ve 42°C'de 3 saatlik inkübasyon sonucu 38-40 SH seviyesinde asitlik oluşumu beklenir (Kılıç, 2008).

Zhou ve ark. (2019), *Lactobacillus helveticus* H9 suşunu yoğurt üretiminde yardımcı kültür olarak kullanmış ve fermantasyon ile depolama üzerine etkilerine bakmıştır. Çalışma kapsamında yoğurtların 28 gün boyunca 4 C°'de pH, titre edilebilir asitlik, serbest amino grupları, ACEI aktivitesi, fiziksel özellikler, uçucu lezzet bileşikleri ve duyu kalite parametreleri takip edilmiştir. Sonuç olarak *Lactobacillus helveticus* H9 suşunun ilavesi ile proteolizin arttığı buna bağlı olarak fermantasyonun kısaldığı bununla birlikte ACEI aktivitesini önemli ölçüde arttığı, H9 suşunun ilave edildiği yoğurtlarda daha fazla alkol, aldehid ve azotlu bileşik,

özellikle asetoin ve benzaldehit tespit edildiği rapor edilmiş ve *Lactobacillus helveticus* H9 fermente süt endüstrisinde ilgi çekici olabileceği bildirilmiştir.

2.4.2 Proteolitik Aktivite

Proteoliz özellikle kazeinin olmak üzere proteinlerin, polipeptid ve oligopeptidler üzerinden serbest aminoasitlere kadar parçalanması olayıdır.

Laktik asit bakterileri yaşamsal döngüleri için gerekli olan aminoasitleri sentezleyemezler bu yüzden bu aminoasitlerin ekzogen kaynaklardan karşılanması zorunludur. Süt teknolojisi için önemli olan türlerin ihtiyaç duydukları belli başlı amino asitler belirlenmiştir. *Lb. bulgaricus* için treonin ve serinin; *St. thermophilus* için glutamik asit, histidin, sistein, metionin, valin, losin ve triptofan veya tirosinin önemli olduğu belirtilmiştir. Bu bakteriler söz konusu aminoasitlerin açığa çıkabilmesi için proteinaz ve peptidaz gibi enzimler bulundurlar (Kılıç, 2008).

Proteolitik aktivite ile bakterilerin hem gelişmeleri teşvik edilir hem de glikoliz olayı hızlanır. Bununla beraber proteinin parçalanma ürünleriyle diğer bakterilerin metabolik gereksinimleri karşılanmış olur ve de tipik aroma ve tat bileşenlerinin oluşumu sağlanır.

Yoğurt kültürlerinde yer alan *Lb. bulgaricus*, *S. thermophilus*'tan daha proteolitikdir ve böylece yoğurt içeriği amino asit ve peptitlerce zenginleşir. Proteolitik aktivitenin orta düzeyde olması yoğurt yapısının stabilitesi ve dayanıklılığı açısından önemlidir (Kılıç, 2008). Yüksek proteolitik özellik gösteren suşların yoğurt yapımında kullanılması durumunda yoğurtta acı tat oluşabilir. Acı peptitler, düşük inkübasyon sıcaklığında ve soğuk depolamadaki enzimatik faaliyetler sonucunda oluşur (Korkmaz, 2011).

2.4.3 Aroma Maddeleri Üretimi

Fermente süt ürünlerinin karakteristik tat ve aroması genel olarak starter bakteriler tarafından sentezlenen laktik asit, asetik asit, formik asit, bütirik, piruvik ve süksinik asit gibi organik asitler ile asetaldehit, diasetil, aseton gibi karbonil

bileşiklerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, birçok laktik asit bakterisi amino asitlerden aroma bileşenlerini sentezleyebilirler (Kırmacı, 2010).

Laktik asit, yoğurt için gerekli olan pıhtının oluşumunu sağladığı gibi yoğurdun kendine has ekşimsi tadının oluşumdan da sorumludur. Bunun yanında fermente süt ürünlerinde diasetil ve asetaldehit ana aroma bileşiklerindedir. Sütte bulunan sitrat veya ara ürün olan piruvatın fazlasından yararlanılarak diasetil oluşturulur. Diğer bir aroma bileşeni olan asetaldehitin başlıca kaynağının da laktozun indirgenmesi olduğu düşünülmektedir (Aslım vd., 2000).

Yoğurdun tipik tat ve aromasının oluşumunda olgun bir tadın oluşması için asetaldehit/asetoin oranının 2,8:1 olması gerektiği belirtilmiştir. *Lb. bulgaricus*, asetaldehit oluşumundan, *S. thermophilus*'un ise daha fazla asetoin ve diasetil oluşumundan sorumlu olduğu bildirilmiştir.

Asetaldehit ve diasetil doğrudan ortam pH'ına bağlıdır. Ayrıca diasetil üretimi sütte bulunan sitrat ve mangan miktarına bağlı değişir. Bununla birlikte bazı suşlar aromatik bileşikleri aromatik olmayan veya daha az aromatik olan bileşiklere indirgeyebilen enzimlere sahiptir. Bu gibi nedenlerden dolayı suşların aromatik madde üretme yetenekleri tam olarak belirlenemeyebilir. Bu yüzden suşların farklı sıcaklıklarda aroma üretim kinetiği ölçülmelidir. Bu sayede ürün için daha uygun suş kombinasyonlarının yapılabilir (Kılıç, 2008).

2.4.4 Ekzopolisakkarit Üretimi

Ekzopolisakkarit (EPS)'ler organizmaların buldukları ortama salgıladıkları monosakkaritlerin glikozidik bağ ile bağlanmasıyla oluşan, yüksek molekül ağırlığına sahip, geri dönüşebilen ve suda çözünebilen biyopolimerleridir (Ergene ve Avcı, 2016; Soyucok vd., 2016).

EPS'ler süt sanayisinde; gıda katkı maddesinin kullanımını azaltmak, yoğurdun viskozitesini geliştirmek, yapıyı ve aromayı iyileştirmek, fermantasyon süresi boyunca ve depolama sırasında sinerezisi önlemek, tekstürün oluşmasında, ağızdaki istenilen hissin ve yapının oluşmasında temel rol oynar (Schwab vd., 2008).

Bugüne kadar bildirilen en yüksek üretim seviyeleri *Lactobacillus rhamnasus* 9595M (1200 mg/L) ve *Lactobacillus sakei* 0-1 (1375 mg/L) için elde edilmiştir (Sanlibaba ve Çakmak, 2016).

Hassan ve ark. (2001) tarafından yapılan araştırmada yoğurttaki ticari kültüre (%1,5) ek olarak EPS üretimi tespit edilmiş *Lb. bulgaricus* B3 ve *S. thermophilus* W22 suşları ile üretilen yoğurtlarda viskozite değerleri açısından bu suşların kullanıldığı yoğurtların daha kıvamlı olduğu belirtilmiştir.

2.4.5 Antimikrobiyal Aktivite

Gıdalarda yalnızca gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaları inhibe etmek ve/veya raf ömrünü uzatmak için kullanılan, bu sırada da gıdanın duyuşal özelliklerinde herhangi bir değişime sebep olmayan antagonistik kültürlerle “koruyucu kültürler” denir ve laktik asit bakterileri de koruyucu kültür özelliği göstermektedir (Yörük ve Güner, 2011).

Laktik asit bakterilerinin patojen mikroorganizmalara karşı göstermiş olduğu inhibe edici etki laktik asit üreterek ortamın pH’sını düşürmeleriyle bilinir. Ancak bunun yanında ürettikleri diğer organik asitler, H₂O₂, bakteriyosin, bakteriyosin benzeri bileşikler, diasetil, alkol ve CO₂ gibi metabolitlerinde inhibe edici özelliği bulunmaktadır.

Özellikle bakteriyosinlerin insan ve hayvan bağırsak sisteminde kolayca parçalanmaları ve bulunduğu gıdaların fizikokimyasal yapılarında herhangi bir değişime neden olmadan bozulma ve hastalık etmeni bakterileri inhibe etmeleri bakteriyosinler üzerinde yapılan çalışmaların sayısının artışına sebep olmuştur (Bayram ve Yıldırım, 2016).

Özellikle de son zamanlarda başta peynir ve yoğurt gibi birçok gıdanın fermantasyonu için starter kültürlerin bakteriyosin üretme yetenekleri seçim için bir kriter olmuştur (Demirgöl ve Sağdıç, 2017).

2.4.6 Antibiyotik Dirençlilik

Laktik asit bakterilerinin birçok türü plazmit taşır ve bu plazmitler çoğunlukla bakterinin metabolik aktivitesi için gerekli enzimleri kodlayan genleri taşır. Ancak bazı türler bu genler dışında çeşitli antibiyotiklere karşı direnç göstermeyi sağlayan genleri taşıyan plazmitleri de içerebilir. Bu bakteriler çeşitli gıda ürünlerinde direnç taşıyıcı ve aktarıcı görevi görebilirler (Alp ve Öner, 2014).

Laktik asit bakterileri genellikle antibiyotiklere karşı duyarlıdırlar. Ancak bakterilerin sahip olduğu antibiyotiğe dirençlilik karakteri plazmidlerle patojen mikroorganizmalara aktarılabilmesi mümkün olduğundan üretim için seçilen suşlarda dirençlilik istenmeyen bir özelliktir (Kılıç, 2008).

2.4.7 Bakteriyofaj Dirençlilik

Starter kültürlerde aranan en önemli özelliklerden birisi de suşların fajlara karşı dirençli olmasıdır. Bakteriyofajlar yalnızca bakterileri hücrelerini enfekte eden veya bakterinin lize olmasını sağlayan virüslerdir (Temelli ve Çetin, 2011). Kullanılan starter kültürlerden birinin bile ortamda bulunabilecek faj veya fajlara duyarlı olması demek hücrelerin lize olması, fermantasyonun yavaşlaması veya durma noktasına gelmesi demektir. Dolayısıyla bu durum ciddi bir ürün kaybı ve işletmenin ekonomik olarak zorlanması anlamına gelmektedir. Kültürün faj duyarlılığının olması sahip olduğu diğer özelliklerin bir anlamının olmadığıdır (Acar Soykut ve Tunail, 2009).

İşletmelerde yaşanan bu faj problemini önleyebilmek için, starter kültürlerin hazırlanmasında faj inhibitör ortamların kullanımı, yeni bir fabrika dizaynı, kültür hazırlama bölümünün fabrika ortamından farklı bir yerde bulunması, sanitasyon prosedürlerinin geliştirilmesi, kapalı sistemlerin kullanılması, çalışılırken hijyen kurallarına uyulması gibi birçok önlem alınabilir. Ancak bu önlemler fajların çoğalmasını yalnızca sınırlandırabilir, fakat tamamen ortadan kaldırmaz. Bu yüzden, starter kültür seçiminde ortamda baskın bulunan faj/fajlara dirençli suşların rotasyona sokulması tercih edilmelidir (Acar Soykut ve Tunail, 2009).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Örneklerin Toplanması

Araştırmada kullanılan yoğurtlar Batı Karadeniz Bölgesine ait Bolu, Bartın, Kastamonu, Karabük / Yenice ve Zonguldak illerinden temin edilmiştir. Yoğurt örnekleri özellikle yerel üreticilerden, maya olarak yıllardır kendi mayasını kullanan ve geleneksel yöntemlere göre evde üretilmiş yoğurtlardan toplanmıştır. Toplanan örnekler hızlı bir şekilde laboratuvara getirilmiş ve izolasyon yapılmaya kadar 4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.2 İndikatör Mikroorganizmalar

Bu çalışmada izole edilen suşların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan indikatör mikroorganizmalar Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir. Araştırmada *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus* türleri indikatör olarak kullanılmıştır.

3.1.3 Kullanılan Antibiyotikler

Bu çalışmada izole edilen suşların antibiyotiklere olan duyarlılıklarının ölçülmesi amacıyla çeşitli antibiyotik diskleri (Liofilchem, İtalya) kullanılmıştır. Kullanılan antibiyotikler ve kodları: E: Erytromycin (15 µg/disk), TM: Trimethoprim (5 µg/disk), NA: Nalidixic acid (30 µg/disk), CIP: Ciprofloxacin (5 µg/disk), TEC: Teicoplanin (30 µg/disk), S: Streptomycin (300 µg/disk), RD: Rifampicin (5 µg/disk), AMP: Ampicillin (10 µg/disk) CTX: Cefotaxime (30 µg/disk), OFX: Ofloxacin (5 µg/disk), CD: Clindamycin (2 µg/disk), C: Chloramphenicol (30

$\mu\text{g/disk}$), TE: Tetracycline (30 $\mu\text{g/disk}$), SXT: Trimethoprim sulfamethoxazole (25 $\mu\text{g/disk}$), CN: Gentamicin (10 $\mu\text{g/disk}$), VA: Vancomycin (5 $\mu\text{g/disk}$).

3.1.4 Kullanılan Çözeltiler

α -Naftol çözeltisi: 5 g α -Naftol, 100 mL %95'lik etil alkol içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır.

%40'lık KOH çözeltisi: 40 g potasyum hidroksit (KOH) bir miktar saf su içinde çözündürülmüş ve sonra saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Çalışmada Batı Karadeniz Bölgesine ait Bolu, Bartın, Kastamonu, Karabük / Yenice ve Zonguldak illerinden temin edilen yoğurt numuneleri laboratuvara getirildikten sonra, aseptik koşullarda 10'ar gram alınmış ve 90 mL MRD (Maximum Recovery Diluent) dilüsyon sıvısında homojenize edilmiştir. Daha sonra 10^{-6} desimal dilüsyona kadar seyreltme yapılmıştır. Her bir dilüsyondan 2 paralelli olacak şekilde 0,1 mL alınarak MRS Agar ve M17 Agara yayma kültür yöntemi ile ekim yapılmıştır. MRS Agar olan Petriler 37°C 'de, M17 Agar olan Petriler ise 42°C sıcaklıkta 2-3 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda Petrilerde oluşan farklı tipteki koloniler seçilmiş ve izole edildiği besiyerinin aynı olan sıvı besiyerlerini içeren tüplere inoküle edilmiştir. İnkübasyon sonucu gelişen kültürler öze yardımı ile agara sürme ekim yöntemi ile inoküle edilmiş ve tek koloni düşürülünceye kadar bu işlem tekrarlanarak saf kültürler elde edilmiştir.

3.2.2 İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinden Stok Kültür Hazırlama

Saflaştırmaları yapılan izolatların tanısı yapıldıktan sonra izolata uygun sıvı besiyerinde geliştirilmiş 18 saatlik aktif kültürlerden alınarak %20 oranında steril gliserol ile karıştırıldıktan sonra -18°C’de stoğa alınarak muhafaza edilmiştir (Randazzo vd., 2004).

3.2.3 İzolatların Morfolojik, Fenotipik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.3.1 Gram Boyama

İzole edilen kültürlerin Gram boyamalarının yapılması amacıyla katı besiyerinde bulunan aktif kültürlerden steril bir öze ile bir koloni alınmış ve bir lam üzerine 1 damla su ile yayılmıştır. Lam kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan lam bek alevinden 2-3 kez geçirilerek fiksasyon yapılmıştır. Daha sonraki aşamalar şu şekilde ilerlemiştir:

1. Preparata kristal viyoleto damlatılarak 1-2 dakika beklenir.
2. Preparat su ile yıkanır.
3. Lügol-iyot çözeltisi damlatılır.
4. Preparat yıkanır.
5. %95’lik etil alkol ile muamele edilir ve 10-15 sn. beklenir.
6. Preparat yıkanır.
7. Safranin damlatılır ve 45-60 sn. beklenir.
8. Preparat yıkanır.
9. Preparat kurutulur.

Kuruyan preparatın üzerine immersiyon yağı damlatılmıştır. Koloniler immersiyon objektifinde (x100’lük objektif) incelenmiştir. Böylelikle suşların Gram

reaksiyonları ve koloni morfolojisi incelenmiştir. Mavi-mor renkteki koloniler Gram pozitif, pembe renkli koloniler ise Gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Temiz 1996, Tamer vd., 1989).

3.2.3.2 Katalaz Testi

Katalaz enzimi, elektron transfer zincirinin sonunda açığa çıkan hidrojen peroksiti (H_2O_2) parçalayıp, su ve oksijen gazına dönüştürür. Gaz oluşumu, kabarcıklar şeklinde gözlemlenir ve böylelikle katalaz enziminin varlığı görülmüş olur.

Katalaz testinin yapılabilmesi için katı besiyerinde gelişmiş laktik asit bakterilerinin kolonilerinden biri steril öze ile alınmış ve bir lam üzerine yayılmıştır. Yayılan koloni üzerine %3'lük H_2O_2 damlatılmış ve kabarcık oluşumu gözlemlenmiştir. Reaksiyon sonucu kabarcık oluşumu var ise katalaz (+) yok ise katalaz (-) olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 1996).

3.2.3.3 Glukozdan Gaz Oluşumu Testi

Analiz için MRS broth ve M17 broth besiyerlerine %2 olacak şekilde glukoz ilave edilmiştir. Hazırlanan besiyerleri 10'ar mL tüplere dağıtılmıştır. Tüplerin içerisine kabarcık olmamasına dikkat edilerek Durham tüpleri atılmıştır. Besiyerleri otoklavlandıktan sonra kültürler %1 oranında inoküle edilmiştir ve 3-5 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda Durham tüpleri içerisinde gaz kabarcıkları varsa pozitif (+) yoksa negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Randazzo vd., 2004).

3.2.3.4 Farklı Sıcaklıklarda Gelişme Testi

İzolatların farklı sıcaklıklarda gelişimini belirlemek amacıyla 5'er mL MRS broth ve M17 broth sıvı besiyeri içeren tüplere %1 oranında inokülasyon yapılmıştır. Her bir bakteri 10°, 15° ve 45°C sıcaklığında 5-7 gün inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonucunda gelişme gösteren suşlar pozitif (+) göstermeyen suşlar ise negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Öngün, 2015).

3.2.3.5 Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Testi

Bakterilerinin farklı tuz konsantrasyonlarında gelişmesini tespit etmek amacıyla %2, %4 ve %6,5 NaCl içeren MRS broth ve M17 broth sıvı besiyerleri hazırlanmıştır. Bu besiyerleri 5'er mL olacak şekilde tüplere ayrıştırılmış ve sterilize edildikten sonra %1 oranında inokülasyon yapılmıştır, 5-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda bulanık tüpler pozitif (+) bulanıklık görülmeyen tüpler ise negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Öngün, 2015).

3.2.3.6 Farklı pH' larda Gelişme Testi

İzole edilen suşların asidik ve bazik ortamda gelişebilmelerinin ölçülmesi için pH 3,5 ve pH 9 olan MRS broth ve M17 broth besiyerleri hazırlanmıştır. Bazik ortam için 1M NaOH kullanılarak pH 9 ve asidik ortam için fosforik asit kullanılarak pH 3,5 olan sıvı besiyerleri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerleri 5'er mL tüplere ayrıştırılmış ve sterilize edilmiştir. Steril besiyerlerine %1 oranında inokülasyon yapılmış ve 5-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu bulanıklık görülen tüpler pozitif (+) bulanıklık görülmeyenler ise negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Öngün, 2015).

3.2.4 İzolatların Moleküler Tanısı

İzolatların kesin tanılarının yapılabilmesi için MALDI-TOF MS Biotyper sistemi kullanılmıştır. Bu amaçla izole edilen suşlar MRS ve M17 Agarda geliştirilmiş ve 18-24 saatlik aktif kolonilerin bulunduğu petriler analizlerinin yapılabilmesi için Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Bilimsel Endüstriyel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi (BETUM)' ne gönderilmiştir.

3.2.5 İzolatların Antibiyotik Dirençlilikleri

İzole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik duyarlılıklarının ölçümü amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır.

Mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılıklarının ölçümü için steril eküvyonlar, sıvı besiyerinde geliştirilmiş olan 18-24 saatlik aktif kültürlerle aseptik koşullarda daldırılmış ve ardından MRS ve M17 Agar yüzeyine tüm yüzeyi kapayacak şekilde yayılmıştır. Daha sonra antibiyotik diskleri (Kullanılan antibiyotikler bölüm 3.1.3'te verilmiştir.) disk dağıtıcı (Liofilchem, İtalya) ile bir Petriye 6 tane disk gelecek şekilde yerleştirilmiştir ve Petriler düz bir şekilde inkübatöre konularak uygun sıcaklıklarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu disklerin etrafında oluşan zonlar ölçülmüştür (Monica, 2002).

3.2.6 İzolatların Bazı Starter Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.6.1 Yüzde Asitlik Ölçümü ve Asidifikasyon

İzole edilen laktik asit bakterilerinin % asit üretim miktarlarını bulmak amacıyla 18 saatlik aktif kültürlerden 0,1 mL alınarak 10 mL yağsız süt tozu (skim milk) besiyerine ilave edilmiş ve 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyona bırakılan örneklerden steril bir şekilde 6. ve 24. saat sonunda 2 mL alınarak 1-2 damla fenol fitalein damlatılmış ve 0,1 N NaOH ile titre edilmiştir. Titrasyonda harcanan NaOH miktarına göre üretilen asitlik bulunmuş ve % laktik asit miktarı olarak hesaplanmıştır (Kırmacı, 2010). Hesaplama kullanılan formül aşağıda verilmiştir.

$$(3.1) \quad \text{Laktik Asit (\%)} = (V_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}} \times F_{\text{NaOH}} \times 90 \times 10 - 3 \times 100) / m$$

V: Harcanan NaOH miktarı (mL)

m: Süt miktarı (mL)

F: 0.1 N NaOH çözeltisinin faktörü

N: NaOH normalitesi

Asidifikasyon

İzolatların asidifikasyon kapasitesi pH değerinin zaman içindeki değişiminin ölçümü ile belirlenmiştir. Bu amaçla 18 saatlik aktif kültürlerden 10 mL skim milk besiyerine 0,1 mL ilave edilerek inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyona bırakılan kültürlerden 6. ve 24. saat sonunda 2'şer mL örnek alınarak pH metre ile pH'ları ölçülmüştür ve sonuçlar Δ pH olarak verilmiştir (Ertürkmen ve Öner, 2015).

3.2.6.2 Proteinaz Testi

Proteinaz testi için 1 g yağsız süt tozu ve 1,5 g agaroz 100 mL distile su içerisinde çözündürülmüş ve mikrodalgada kaynatılarak besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri Petrilere dökülmüş ve herbir Petriye 6 örnek konulacak şekilde Petriler çizilmiştir. Ekim amacıyla her örnekten 10 μ L damlatılmış ve kuruması beklendikten sonra Petriler 37°C'de 5 saat inkübasyona bırakılmış ardından Petrilere oluşan zon çapları ölçülmüştür (Fox, 1989).

3.2.6.3 Antimikrobiyal Aktivite Testi

İzolatların antimikrobiyal aktivite testleri agar yüzeyine nokta ekim yöntemi ile yapılmıştır. Bu amaçla önce MRS agar yüzeyine aktif kültürlerden yaklaşık 1-2 μ L olacak şekilde izolatlar damlatılmış ve 24 saat inkübatörde gelişmeleri sağlanmıştır. Antimikrobiyal aktivite testi için kullanılacak patojenler (*E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus*) ise TSB besiyerinde geliştirilmiştir. İzolatların gelişmelerinin ardından 5 mL yumuşak agarlı TSB besiyerlerine 100 μ L aktif patojenlerden ilave edilerek karıştırılmış ve gelişmiş olan izolatların üzerine Petri yüzeyini kaplayacak şekilde dökülmüştür. Daha sonra Petriler patojenlerin gelişmesine uygun olan 37°C ye bırakılmış ve gelişmeleri sağlanmıştır. Ardından oluşan zonların çapları ölçülmüştür (Fleming vd., 1975).

3.2.6.4 Diasetil Oluşumu Testi

İzolaların sitratı metabolize ederek diasetil oluşturup oluşturmadıklarını incelemek amacıyla 18-24 saatlik aktif kültürler 5'er mL steril skim milk besiyeri içeren tüplere inoküle edilmiş ve 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu tüplerden 1'er mL alınarak üzerlerine 0,5 mL α -Naftol (% 1w/v) çözeltisi ve KOH (%16 w/v) eklenmiş ve 30°C'de 1 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu kırmızı renkte halka oluşumu diasetil üretiminin olduğunu göstermiştir (Franciosi vd, 2009).



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada Batı Karadeniz'in 5 farklı ilinden geleneksel olarak üretilmiş inek ve manda yoğurdu numuneleri toplanmış ve aseptik koşullarda numunelerden laktik asit bakterileri izole edilmiştir. Numunelerin toplandığı iller ve yoğurt yapımında kullanılan sütlerin türü Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Yoğurt numunelerinin toplandığı iller ve izolat sayısı

Numune Toplanan İller	Numune Çeşidi	İzolat Sayısı
Bartın	Manda yoğurdu	23
Bolu	Manda yoğurdu, İnek yoğurdu	39
Yenice/Karabük	Manda yoğurdu	6
Kastamonu	Manda yoğurdu	3
Zonguldak	Manda yoğurdu	13

4.1 Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

İzolasyon için MRS ve M17 besiyerleri kullanılmıştır. Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı şekilde suşların izolasyonu sağlanmıştır. Besiyerlerinde oluşan kolonilerden farklı koloni morfolojisine ait kolonilerin seçimine dikkat edilmiştir. Böylelikle farklı laktik asit bakterilerinin izole edilmesi hedeflenmiştir. İzole edilen suşlara Gram boyama ve katalaz testleri yapılmış ve Gram pozitif, katalaz (-) sonuç veren suşların muhtemel laktik asit bakterisi olduğu düşünülerek izolatların fenotipik ve biyokimyasal analizleri yapılmıştır. İzole edilen suşların %20 gliserol içeren MRS broth ortamında stok kültürleri hazırlanmış ve -18 °C'de muhafaza edilmiştir.

4.2 Morfolojik, Fenotipik ve Biyokimyasal Tanı Sonuçları

Petrilerden seçilen olası laktik asit bakterilerinin saflaştırılmasından sonra izolatların Bölüm 3'te anlatıldığı gibi Gram boyama, katalaz reaksiyonlarına bakılmıştır. Mavi-mor renkteki koloniler Gram pozitif ve pembe renkli koloniler ise

Gram negatif olarak değerlendirilmiştir. Katalaz testinde ise koloniler üzerine H₂O₂ damlatılmış ve kabarcık oluşturan koloniler katalaz (+) olarak değerlendirilmiştir. Suşlardan Gram pozitif ve katalaz (-) suşlar seçilmiş ve diğer suşlar elenmiştir.

Seçilen suşların fenotipik tanısının yapılabilmesi amaçlı farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme, farklı sıcaklıklarda gelişme ve farklı pH'larda gelişme testleri ile glukozdan gaz oluşturma testleri uygulanmıştır. İzolatların kodları ve fenotipik tanı sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Seçilen suşların izole edildiği yerler, kodları ve fenotipik karakterizasyonu

İzolat Kodu	Örnek Toplanan İl	Tuza Direnç (% NaCl)			Farklı Sıcaklıkta Gelişme (°C)			Farklı pH'larda Gelişme		Glukozdan Gaz Oluşumu
		2	4	6,5	10	15	45	3,5	9,0	
A1	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
A2	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
P1	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
P2	Bolu	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	z	(-)	(+)	(-)
P3	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	z	(+)	(-)
P3-2	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
P3-3	Bolu	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	z	(+)	(-)
P4	Bolu	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	z	(-)	(+)	(-)
C1	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
C2	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	z	(+)	(-)
C3	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	z	(+)	(-)
C4	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	z	(+)	(-)
D1	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
D2	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
D3	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
D4	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
D5	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
E2	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	z	(+)	z	(+)	(-)
E2-2	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
E3	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
E4	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
E5	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	z	(+)	(-)	(+)	(-)
F3	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
F5	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
F6	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
B4	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
B6	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)

Çizelge 4.2 (devam)

B7	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
B8	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
B9	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
B9-2	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
B10-2	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
B10-3	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
B11-2	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
B12	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
B14	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
B15-2	Bolu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Y1	Yenice/ Karabük	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
Y1-2	Yenice/ Karabük	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Y2	Yenice/ Karabük	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Y3-2	Yenice/ Karabük	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Y5	Yenice/ Karabük	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Y15	Yenice/ Karabük	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
Z1	Zonguldak	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
Z3-3	Zonguldak	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
Z4	Zonguldak	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Z4-3	Zonguldak	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
Z5	Zonguldak	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Z5-2	Zonguldak	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Z5-3	Zonguldak	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Z5-4	Zonguldak	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Z6	Zonguldak	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Z6-2	Zonguldak	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Z6-3	Zonguldak	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Z6-4	Zonguldak	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Z7	Zonguldak	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Z8	Zonguldak	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Z8-2	Zonguldak	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Br1	Bartın	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Br1-2	Bartın	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Br6	Bartın	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Br7-2	Bartın	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Br11	Bartın	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Br12	Bartın	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Br12-2	Bartın	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Br15	Bartın	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)

Çizelge 4.2 (devam)

Br17	Bartın	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Br17-2	Bartın	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
Br17-3	Bartın	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Br18-2	Bartın	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Br22	Bartın	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Br22-2	Bartın	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Br22-3	Bartın	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Br23	Bartın	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Br23-2	Bartın	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Br25	Bartın	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Br25-2	Bartın	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Br25-3	Bartın	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Br26	Bartın	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Br29	Bartın	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Br29-2	Bartın	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Ks7	Kastamonu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Ks9	Kastamonu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Ks9-2	Kastamonu	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)

(+): Gelişme var, (-): Gelişme yok, z: Zayıf gelişme

Çizelgeden anlaşıldığı gibi izolatlardan yalnızca 2 tanesi (Y15, Z1) glukozdan gaz üretmiştir. Yani muhtemel laktik asit bakterisi olan bu suşların heterofermantatif olduğu, çoğunluğun ise homofermantatif karakterde olduğu anlaşılmaktadır.

İzolatların farklı sıcaklıklarda gelişmelerine bakıldığında Z4-3 izolatı hariç tüm suşlar 45°C'de gelişme göstermiş, P2, P4, E2, E5, Y15, Z1 kodlu izolatlar 15°C'de gelişme göstermiş buna karşın yalnızca P2 izolatı 10°C'de gelişebilmiştir. Genel olarak izolatların 45°C'de iyi geliştiği ancak 10-15°C gibi düşük sıcaklıklarda gelişimin zayıf olduğu belirlenmiştir.

İzolatların farklı tuz konsantrasyonlarında gelişmelerine bakıldığında %2 NaCl içerikli besiyerinde tüm izolatların gelişebildiği, %4 NaCl içerikli besiyerinde 7 izolatın gelişebildiği (P2, P3-3, P4, Y15, Z1, Z4-3, Br17-2), %6,5 NaCl içerikli besiyerinde ise 5 izolatın (P2, P4, Y15, Z1, Z4-3) gelişebildiği tespit edilmiştir. Genel değerlendirme yapıldığında artan tuz konsantrasyonu suşların yaşam şansını sınırlandırmakta ve suşların yalnızca yaklaşık %8'i, %4 NaCl içerikli ortamda ve yine suşların yaklaşık %6'sı %6,5 NaCl içerikli ortamda gelişebilmiştir.

İzolatların farklı pH değerlerinde gelişmelerine bakıldığında 4 izolat (Br17-2, Y1, P1, Z3-3) hariç tüm izolatların pH 9'da gelişme gösterdiği, buna karşın pH 3,5'da ise yalnızca 6 izolatın (P3, P3-3, C2, C3, C4, E2) zayıf gelişme gösterdiği, geri kalan izolatların ise gelişme göstermedikleri belirlenmiştir.

Yörük ve Güner (2011) yaptıkları çalışmada 10-45°C'de ve %6,5 NaCl içeren besiyerinde gelişen suşların genel olarak enterokok türlerine ait olduklarını belirtmişlerdir. Benzer olarak bu çalışmada izole ettiğimiz 84 izolattan dördü enterokok olarak tanımlanmıştır.

Hebert vd. (2000), peynirlerden izole ettikleri muhtemel laktobasillus suşlarının hiçbirinin glukozdan gaz üretmediğini, izolatların 37°C ve 45°C'de geliştiğini ancak hiçbir izolatın 15°C'de gelişmediğini bildirmiştir. Çalışmamıza benzer şekilde elde edilen izolatların termofil karakterde olduğu görülmektedir.

Yüce (2017), farklı illerden toplanmış olan peynir ve yoğurt örneklerinden izole ettiği 101 adet laktik asit bakterisinin tamamının 15, 30 ve 45°C'de iyi geliştiğini ancak *Lc. lactis* PLc23B, *E. faecalis* PLj43C, *Lb. bulgaricus* YLr12A ve *Lactobacillus* subsp. YLj63'ün hiç gelişmediğini rapor etmiştir. Yine aynı çalışmada izolatlardan 47 bakterinin %6 NaCl konsantrasyonunda iyi geliştiği, 53 bakterinin zayıf geliştiği, ancak *Lb. bulgaricus* YLa27C'nin ise hiç gelişme göstermediği belirlenmiştir.

Yine çalışmamıza paralel olarak Hindistan'da 'dahi' olarak adlandırılan bir süt ürünü üzerine çalışılmış ve izole edilen *Lactobacillus* cinsine ait izolatların %4 NaCl içeren ortamda gelişebildikleri ve en iyi pH 5,5-6,5 arasında gelişme gösterdiklerini belirtilmiştir (Chakraborty ve Bhowal, 2015).

Aynı şekilde İşleroğlu vd., (2008) yöresel peynirlerden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin %3,0-6,5 NaCl konsantrasyonuna, pH 4,5-9,6 ve 10-45°C'de gelişebildiğini tespit etmiştir. Farklı olarak Tabak (2018), geleneksel yolla üretilmiş yoğurtlardan izole ettiği *Streptococcus* ssp. izolatlarının yalnızca 2'sinin (27 ve MS5-1) %6,5 NaCl+M17 broth varlığında gelişemediğini rapor etmiştir.

4.3 MALDI TOF MS Biotyper Tanı Sonuçları

MRS Agar ve M17 Agar kullanılarak izole edilen muhtemel laktik asit bakteri suşlarının öncelikli olarak Gram reaksiyonları ve katalaz reaksiyonlarına bakılmıştır. Gram pozitif ve katalaz (-) olan suşlar muhtemel laktik asit bakterisi olarak değerlendirilmiş; suşların farklı sıcaklık, tuz konsantrasyonu ve farklı pH değerlerinde gelişme ve glukozdan gaz oluşumu test edilerek suşların fenotipik ve biyokimyasal değerlendirilmesi yapılmıştır.

Büyükyörük ve Soyutemiz (2010), İzmir Tulum peynirinden *Lactococcus lactis* suşlarının izolasyonunu sağlamış ardından fenotipik ve biyokimyasal testler sonucu izolatlarından 36 tanesinin laktokok özelliği gösterdiğini belirtmiştir. Daha sonra çalışmada izole edilmiş olan 90 izolatın tümü PCR tekniği ile analizi yapılmış, sonuç olarak 18 izolatın laktis primeriyle 11 izolatın da kremoris primeri ile pozitif bant verdiği yani başlangıçta fenotipik testler sonucu laktokok özelliği gösteren 17 izolatın fenotipik ve biyokimyasal analizlerle yanlış sonuç verdiği ortaya konulmuştur. Bu çalışmadan da anlaşıldığı gibi izolatların tanımlanmasında fenotipik ve biyokimyasal testler yetersiz kalmakta veya yanlış sonuç verebilmektedir.

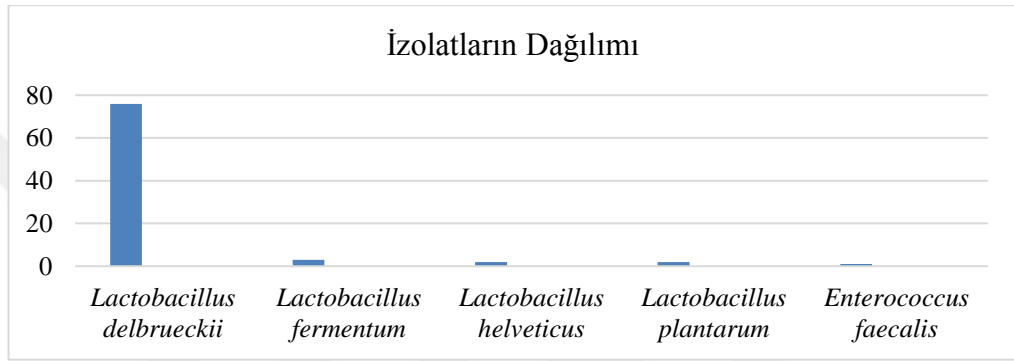
Fransa'da yapılmış bir çalışmada yerel marketlerden yoğurt ve probiyotik örnekleri alınarak laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve tanısı yapılmıştır. Bu çalışmada mikroorganizma tanısında MALDI-TOF MS ve PCR teknikleri kullanılmıştır. Yoğurtlardan izole edilmiş olan *Lb. delbrueckii* ve *S. thermophilus* izolatlarının tanı sonuçları birbiriyle uyumlu çıkmıştır (Angelakis vd., 2011).

Çalışmamızda fenotipik ve biyokimyasal karakterizasyonu sağlanan suşların kesin tanısının yapılabilmesi amacıyla MALDI TOF MS Biotyper sistemi kullanılmıştır. İzolatların tanısı Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Bilimsel Endüstriyel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan MALDI TOF MS Biotyper sistemi yazılımı kullanılarak, veritabanında bulunan mikroorganizma türleri ile karşılaştırılarak gerçekleştirilmiştir. İzolatların tanı sonuçları Çizelge 4.3'te verilmiştir.

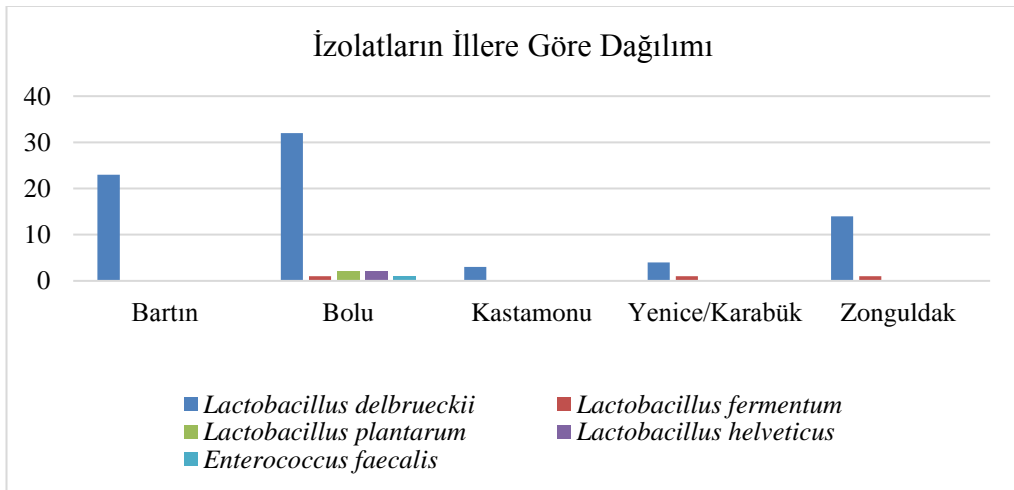
Çizelge 4.3. İzolatların MALDI TOF MS Biotyper tanı sonuçları

İzolat Kodu	Tanı Sonucu	İzolat Kodu	Tanı Sonucu
A1	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Y15	<i>Lactobacillus fermentum</i>
A2	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Z1	<i>Lactobacillus fermentum</i>
P1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Z3-3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
P2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Z4	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
P3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Z4-3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
P3-2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Z5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
P3-3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Z5-2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
P4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Z5-3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
C1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Z5-4	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
C2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Z6	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
C3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Z6-2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
C4	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Z6-3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
D1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Z6-4	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
D2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Z7	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
D3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Z8	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
D4	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Z8-2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
D5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Br1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
E2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Br1-2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
E2-2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Br6	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
E3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Br7-2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
E4	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Br11	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
E5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Br12	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
F3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Br12-2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
F5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Br15	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
F6	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Br17	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
B4	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Br17-2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
B6	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Br17-3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
B7	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Br18-2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
B8	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Br22	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
B9	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Br22-2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
B9-2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Br22-3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
B10-2	<i>Enterococcus faecalis</i>	Br23	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
B10-3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Br23-2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
B11-2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Br25	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
B12	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Br25-2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
B14	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Br25-3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
B15-2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Br26	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Y1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Br29	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Y1-2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Br29-2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Y2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Ks7	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Y3-2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Ks9	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Y5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Ks9-2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>

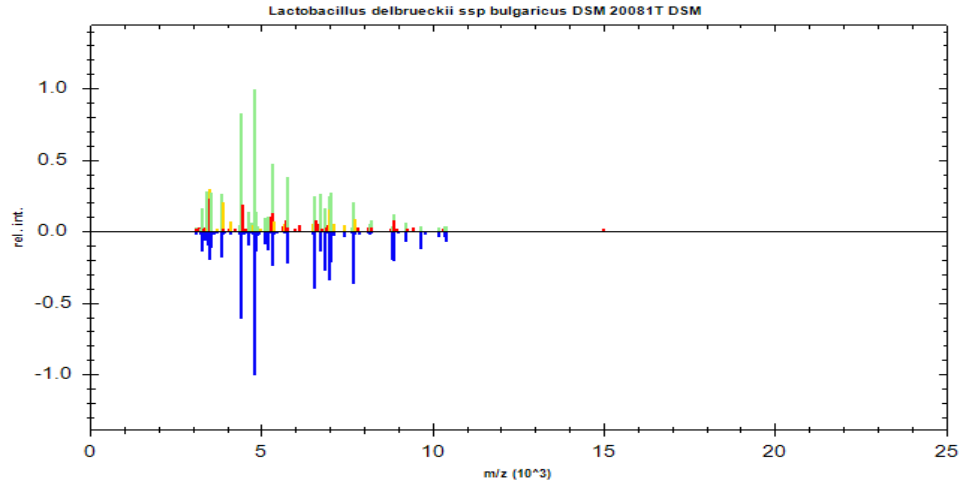
MALDI TOF MS Biotyper tanı sonuçlarına göre izole edilen 84 izolattan 2 tanesi *Lb. helveticus*, 2 tanesi *Lb. plantarum*, 3 tanesi *Lb. fermentum*, 1 tanesi *E. faecalis* ve 76 tanesi *Lb. delbrueckii* olarak tanımlanmıştır. Sonuçlara bakıldığında izolatların %90'ının *Lb. delbrueckii*, %4'ünün *Lb. fermentum*, %2,5'inin *Lb. helveticus*, %2,5'inin *Lb. plantarum* ve %1'inin de *E. faecalis* olduğu belirlenmiştir. İzolatların dağılımları Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de, *Lb. delbrueckii* ZA-3, *Lb. fermentum* Z1 izolatlarına ait MALDI TOF MS Biotyper tanı sonuçları ise Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te verilmiştir.



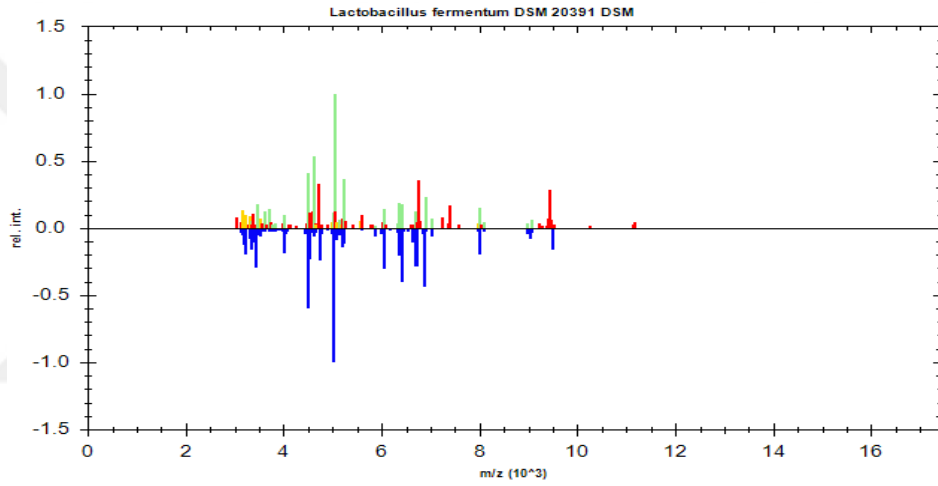
Şekil 4.1. Tüm izolatların dağılımları.



Şekil 4.2. İzolatların illere göre dağılımı.



Şekil 4.3. *Lb. delbrueckii* Z4-3'ün MALDI TOF MS Biotyper sonucu.



Şekil 4.4. *Lb. fermentum* Z1'in MALDI TOF MS Biotyper sonucu.

Erkuş (2007), Anadolu'daki doğal yoğurt örneklerinden yoğurt kültürlerinin izolasyonunu yapmış ve toplam 66 kok ve 71 basil izolatu elde etmiştir. Biyokimyasal tanımlama sonuçlarına göre tüm basil izolatları *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* olarak bulunmuşken, kok izolatların sadece 7 tanesi tam olarak *S. thermophilus* olarak tanımlamıştır ve tanımlamaları moleküler yöntemlerle desteklemiştir.

Bölükbaşı (2007) çalışmasında, Trakya'da farklı köylerden alınmış yoğurtlardan laktik asit bakterilerini izole etmiş ve API 50 CHL biyokimyasal tanımlama sonuçlarına göre izolatların 7 adedini *S. thermophilus*, 3 adedini *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, 1 adedini *E. faecium*, 1 adedini *E. durans*, 12 adedini ise *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşu olarak tanımlamıştır.

Özteber (2013), fermente süt ürünlerindeki laktik asit bakterilerinin izolasyonunu ve antibiyotik dirençliliklerini belirlediği çalışmada yoğurt örneklerinden 16S rRNA analizi ile yalnızca *Lactobacillus* cinsine ait türler izole edilebilmiştir. Çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında izolatların yaklaşık %90'ı *Lb. delbrueckii* olduğu ve Özteber (2013) ile Bölükbaşı (2007)'nin çalışmalarına paralellik gösterdiği görülmektedir. Buna karşın Aslım ve Yavuz (2001) yaptıkları çalışmada Türkiye'nin farklı yörelerine ait yoğurt örnekleri toplamış ve örneklerden 34 *S. thermophilus* suşu izole etmiştir. Yine benzer şekilde Gezginç (2010), Türkiye'nin farklı yörelerinden topladığı geleneksel yöntemlerle yapılmış yoğurt örneklerinden 115 adet *S. thermophilus* ve 35 adet *Lb. bulgaricus* türü izole etmiştir.

Tavşanlı (2015), geleneksel yöntemlerle üretilen yoğurtlardan ve bitki, yağmur suyu ve çiy damllarından üretmiş oldukları yoğurt örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonunu gerçekleştirmiştir. Araştırma sonucuna göre geleneksel yollarla üretilmiş yoğurtlardan MALDI-TOF yöntemi ile 27 adet *Lb. delbrueckii* ve 42 adet *S. thermophilus* suşu tanımlanmıştır. Bu suşların dışında ayrıca 19 adet *Lb. fermentum*, 5 adet *Pediococcus acidilactici*, 3 adet *Lb. plantarum*, 3 *E. faecium*, 1 adet *Lb. casei*, 1 adet *Lb. acidophylus* suşu tanımlanmıştır. Çalışmada elde edilen farklı türdeki *Lactobacillus* izolatları ve *Enterococcus* varlığı çalışmamıza benzerlik göstermektedir.

Tabak (2018), geleneksel yöntemlerle üretilen 39 yoğurt örneğinden 283 adet *S. thermophilus*, 101 adet *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* şüpheli kolonisi elde etmiştir ve daha sonra incelenmek üzere tekrar besiyerlerinde aktive edilen izolatlardan 153'ü *S. thermophilus* ve 28'i ise *Lb. bulgaricus* şüpheli izolatu tespit edilmiştir. MALDI-TOF MS ile yapılan analizlere göre izolatların 53 tanesi *S. thermophilus*, 23 tanesi *Lb. bulgaricus* olarak tanımlanmıştır. Gerçek-zamanlı PZR ile yapılan analiz sonuçlarına göre ise 49 tane *S. thermophilus*, 22 tane *Lb. bulgaricus* suşu tanımlanmıştır.

4.4 Antibiyotik Duyarlılık

Bu çalışma kapsamında izolatların antibiyotik disklerine karşı oluşturdukları zon çapları ve antibiyotik duyarlılıkların saptanmasında CLSI standartları (Clinical

and Laboratory Standarts Institute) esas alınmıştır (Ek A). Buna göre suşların antibiyotiklere karşı oluşturduğu zon çapları Çizelge 4.4.'te, dirençlilik veya duyarlılık durumları ise Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. İzolatların antibiyotiklere karşı oluşturduğu zon çapları

İzolat Adı	E15	TMS	NA30	CIP5	TEC30	S300	RD5	AMPIO
<i>Lb. helveticus</i> A1	3	(-)	(-)	(-)	28	24	24	3
<i>Lb. helveticus</i> A2	32	(-)	(-)	(-)	26	26	2	4
<i>Lb. delbrueckii</i> P1	34	14	(-)	8	22	16	28	3
<i>Lb. plantarum</i> P2	32	(-)	(-)	(-)	8	14	2	26
<i>Lb. delbrueckii</i> P3	34	16	(-)	1	2	16	28	26
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-2	34	14	(-)	8	22	2	3	3
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-3	34	1	(-)	(-)	22	16	22	26
<i>Lb. plantarum</i> P4	24	(-)	(-)	(-)	22	16	18	24
<i>Lb. delbrueckii</i> C1	4	(-)	(-)	(-)	38	3	16	32
<i>Lb. delbrueckii</i> C2	46	(-)	(-)	(-)	38	4	3	46
<i>Lb. delbrueckii</i> C3	46	3	(-)	(-)	44	38	42	>
<i>Lb. delbrueckii</i> C4	48	(-)	(-)	(-)	34	36	4	>
<i>Lb. delbrueckii</i> D1	42	(-)	(-)	(-)	4	36	29	42
<i>Lb. delbrueckii</i> D2	44	(-)	(-)	(-)	38	32	36	36
<i>Lb. delbrueckii</i> D3	4	(-)	(-)	(-)	32	26	34	48
<i>Lb. delbrueckii</i> D4	38	2	(-)	(-)	3	(-)	3	32
<i>Lb. delbrueckii</i> D5	23	14	(-)	(-)	4	44	36	16
<i>Lb. delbrueckii</i> E2	38	2	(-)	(-)	26	26	32	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> E2-2	3	12	(-)	1	22	28	2	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> E3	38	16	(-)	12	26	2	26	28
<i>Lb. delbrueckii</i> E4	4	(-)	(-)	14	3	22	>	>
<i>Lb. delbrueckii</i> E5	4	(-)	(-)	16	24	24	2	26
<i>Lb. delbrueckii</i> F3	(-)	(-)	(-)	1	26	24	34	4
<i>Lb. delbrueckii</i> F5	44	(-)	(-)	(-)	36	26	15	1
<i>Lb. delbrueckii</i> F6	4	24	(-)	(-)	46	2	38	42
<i>Lb. delbrueckii</i> B4	40	26	(-)	(-)	28	22	38	36
<i>Lb. delbrueckii</i> B6	42	(-)	(-)	(-)	34	3	34	42
<i>Lb. delbrueckii</i> B7	4	26	(-)	(-)	3	24	36	44
<i>Lb. delbrueckii</i> B8	46	42	(-)	(-)	42	38	3	44
<i>Lb. delbrueckii</i> B9	32	(-)	(-)	(-)	34	34	36	32
<i>Lb. delbrueckii</i> B9-2	44	(-)	(-)	(-)	36	36	3	32
<i>E. faecalis</i> B10-2	44	(-)	(-)	(-)	34	38	32	42
<i>Lb. delbrueckii</i> B10-3	44	(-)	(-)	(-)	38	34	26	26
<i>Lb. delbrueckii</i> B11-2	46	3	(-)	(-)	32	32	38	52
<i>Lb. delbrueckii</i> B12	44	16	(-)	(-)	34	3	26	34
<i>Lb. delbrueckii</i> B14	46	16	(-)	8	3	3	38	36
<i>Lb. fermentum</i> B15-2	3,6	(-)	(-)	(-)	22	3	34	4
<i>Lb. delbrueckii</i> Y1	46	(-)	(-)	(-)	26	26	34	34
<i>Lb. delbrueckii</i> Y1-2	44	(-)	(-)	(-)	4	4	28	4
<i>Lb. delbrueckii</i> Y2	5	(-)	(-)	(-)	36	28	34	54

Çizelge 4.4 (devam)

<i>Lb. delbrueckii</i> Y3-2	38	(-)	(-)	(-)	26	26	34	>
<i>Lb. delbrueckii</i> Y5	42	(-)	(-)	(-)	32	26	>	>
<i>Lb. fermentum</i> Y15	28	3	(-)	12	12	16	19	22
<i>Lb. fermentum</i> Z1	28	26	(-)	12	1	16	15	2
<i>Lb. delbrueckii</i> Z3-3	46	26	(-)	(-)	32	36	26	34
<i>Lb. delbrueckii</i> Z4	42	(-)	(-)	(-)	3	34	4	4
<i>Lb. delbrueckii</i> Z4-3	28	36	(-)	3	24	22	44	48
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5	34	18	(-)	(-)	2	18	34	28
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-2	34	(-)	(-)	(-)	24	24	24	32
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-3	4	32	(-)	12	26	26	46	42
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-4	38	(-)	(-)	(-)	28	22	28	36
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6	4	(-)	(-)	(-)	26	36	42	4
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-2	4	(-)	(-)	1	24	2	52	>
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-3	44	36	(-)	(-)	28	3	42	48
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-4	(-)	(-)	(-)	(-)	22	2	24	28
<i>Lb. delbrueckii</i> Z7	42	(-)	(-)	(-)	12	22	36	38
<i>Lb. delbrueckii</i> Z8	4	(-)	(-)	(-)	3	38	26	4
<i>Lb. delbrueckii</i> Z8-2	44	(-)	(-)	(-)	3	24	34	4
<i>Lb. delbrueckii</i> Br1	28	(-)	(-)	(-)	24	16	28	3
<i>Lb. delbrueckii</i> Br1-2	28	2	(-)	(-)	2	18	4	28
<i>Lb. delbrueckii</i> Br6	34	(-)	(-)	(-)	3	26	36	36
<i>Lb. delbrueckii</i> Br7-2	36	(-)	(-)	(-)	24	18	32	34
<i>Lb. delbrueckii</i> Br11	34	(-)	(-)	(-)	24	1	28	3
<i>Lb. delbrueckii</i> Br12	28	(-)	(-)	(-)	22	14	42	5
<i>Lb. delbrueckii</i> Br12-2	28	(-)	(-)	(-)	26	18	38	34
<i>Lb. delbrueckii</i> Br15	3	(-)	(-)	(-)	2	2	36	42
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17	3	(-)	(-)	8	22	16	28	38
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17-2	3	(-)	(-)	(-)	22	2	28	3
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17-3	36	(-)	(-)	(-)	22	14	22	36
<i>Lb. delbrueckii</i> Br18-2	44	(-)	(-)	(-)	4	3	22	38
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22	38	(-)	(-)	(-)	24	26	4	5
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22-2	32	(-)	(-)	(-)	2	(-)	24	24
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22-3	4	1	(-)	1	3	32	32	4
<i>Lb. delbrueckii</i> Br23	42	(-)	(-)	(-)	3	28	24	46
<i>Lb. delbrueckii</i> Br23-2	34	(-)	(-)	(-)	2	22	6	34
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25	34	12	(-)	(-)	3	26	28	4
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25-2	44	22	2	(-)	3	24	24	32
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25-3	3	22	(-)	(-)	2	2	3	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br26	38	22	(-)	(-)	26	2	32	3
<i>Lb. delbrueckii</i> Br29	34	(-)	(-)	(-)	26	24	32	28
<i>Lb. delbrueckii</i> Br29-2	42	(-)	(-)	(-)	3	26	28	42
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks7	32	(-)	(-)	(-)	28	24	3	34
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks9	48	(-)	(-)	(-)	34	3	26	4
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks9-2	4	26	(-)	(-)	32	36	34	44
İzolat Adı	CTX30	OFX5	CD2	C30	TE30	SXT25	CN10	VA5
<i>Lb. helveticus</i> A1	38	(-)	1	35	2	(-)	1	28
<i>Lb. helveticus</i> A2	46	(-)	(-)	14	32	32	(-)	26

Çizelge 4.4 (devam)

<i>Lb. delbrueckii</i> P1	28	(-)	2	22	34	(-)	(-)	24
<i>Lb. plantarum</i> P2	(-)	(-)	8	26	26	1	1	2
<i>Lb. delbrueckii</i> P3	28	(-)	1	32	26	1	1	2
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-2	22	(-)	16	32	3	(-)	8	22
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-3	32	(-)	18	34	26	(-)	(-)	18
<i>Lb. plantarum</i> P4	(-)	(-)	3	24	16	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> C1	32	(-)	32	24	3	(-)	18	26
<i>Lb. delbrueckii</i> C2	36	(-)	34	36	4	(-)	1	3
<i>Lb. delbrueckii</i> C3	>	(-)	>	4	34	12	16	28
<i>Lb. delbrueckii</i> C4	>	(-)	>	42	4	18	18	3
<i>Lb. delbrueckii</i> D1	38	(-)	38	4	34	18	14	32
<i>Lb. delbrueckii</i> D2	42	(-)	4	34	32	(-)	14	28
<i>Lb. delbrueckii</i> D3	46	(-)	3	32	34	(-)	14	28
<i>Lb. delbrueckii</i> D4	38	(-)	36	3	24	14	14	22
<i>Lb. delbrueckii</i> D5	(-)	(-)	32	36	3	(-)	14	3
<i>Lb. delbrueckii</i> E2	34	(-)	28	4	22	(-)	8	2
<i>Lb. delbrueckii</i> E2-2	2	(-)	26	32	24	14	14	2
<i>Lb. delbrueckii</i> E3	24	(-)	16	26	26	(-)	(-)	16
<i>Lb. delbrueckii</i> E4	>	>	>	>	4	(-)	1	22
<i>Lb. delbrueckii</i> E5	2	(-)	12	26	28	(-)	1	2
<i>Lb. delbrueckii</i> F3	36	(-)	3	34	28	(-)	18	26
<i>Lb. delbrueckii</i> F5	17	17	17	16	28	(-)	(-)	22
<i>Lb. delbrueckii</i> F6	4	(-)	4	38	3	18	1	18
<i>Lb. delbrueckii</i> B4	32	(-)	4	44	48	18	8	26
<i>Lb. delbrueckii</i> B6	36	(-)	38	34	36	(-)	12	26
<i>Lb. delbrueckii</i> B7	4	(-)	28	32	3	(-)	8	24
<i>Lb. delbrueckii</i> B8	4	(-)	32	38	36	16	18	24
<i>Lb. delbrueckii</i> B9	4	(-)	39	36	32	(-)	14	18
<i>Lb. delbrueckii</i> B9-2	24	(-)	34	3	26	(-)	16	18
<i>E. faecalis</i> B10-2	32	(-)	36	32	34	(-)	12	22
<i>Lb. delbrueckii</i> B10-3	(-)	(-)	(-)	16	28	(-)	1	22
<i>Lb. delbrueckii</i> B11-2	6	(-)	6	4	28	14	1	26
<i>Lb. delbrueckii</i> B12	3	(-)	32	32	28	(-)	1	24
<i>Lb. delbrueckii</i> B14	32	(-)	24	38	26	1	8	22
<i>Lb. fermentum</i> B15-2	4	(-)	32	3	32	(-)	14	24
<i>Lb. delbrueckii</i> Y1	34	(-)	24	3	32	(-)	14	26
<i>Lb. delbrueckii</i> Y1-2	5	(-)	22	4	24	(-)	16	26
<i>Lb. delbrueckii</i> Y2	52	(-)	38	42	36	(-)	1	28
<i>Lb. delbrueckii</i> Y3-2	>	(-)	>	38	34	(-)	1	24
<i>Lb. delbrueckii</i> Y5	>	>	>	>	44	(-)	12	3
<i>Lb. fermentum</i> Y15	19	05	18	2	34	16	18	(-)
<i>Lb. fermentum</i> Z1	14	05	13	15	24	1	1	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z3-3	3	(-)	38	36	26	16	18	22

Çizelge 4.4 (devam)

<i>Lb. delbrueckii</i> Z4	4	1	38	3	3	(-)	18	24
<i>Lb. delbrueckii</i> Z4-3	52	3	4	38	6	38	24	2
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5	3	(-)	28	4	22	(-)	(-)	2
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-2	28	(-)	42	38	26	(-)	1	18
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-3	38	(-)	46	12	32	(-)	12	24
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-4	32	(-)	28	28	32	(-)	(-)	28
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6	48	(-)	4	4	4	(-)	12	26
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-2	>	(-)	5	>	24	(-)	1	32
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-3	44	(-)	34	4	3	(-)	1	28
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-4	3	(-)	2	34	3	(-)	14	22
<i>Lb. delbrueckii</i> Z7	28	(-)	3	42	25	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z8	38	(-)	3	34	32	(-)	16	24
<i>Lb. delbrueckii</i> Z8-2	36	(-)	38	42	31	(-)	12	26
<i>Lb. delbrueckii</i> Br1	3	(-)	28	26	32	(-)	(-)	22
<i>Lb. delbrueckii</i> Br1-2	24	(-)	32	4	22	(-)	8	24
<i>Lb. delbrueckii</i> Br6	4	(-)	5	4	28	(-)	12	12
<i>Lb. delbrueckii</i> Br7-2	48	(-)	46	3	22	(-)	(-)	22
<i>Lb. delbrueckii</i> Br11	28	(-)	32	22	38	(-)	(-)	22
<i>Lb. delbrueckii</i> Br12	44	(-)	4	36	34	(-)	(-)	22
<i>Lb. delbrueckii</i> Br12-2	48	(-)	38	26	32	(-)	1	24
<i>Lb. delbrueckii</i> Br15	4	(-)	32	4	28	(-)	16	2
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17	36	(-)	44	42	26	(-)	1	2
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17-2	3	(-)	4	26	13	(-)	(-)	2
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17-3	3	(-)	52	38	26	(-)	8	16
<i>Lb. delbrueckii</i> Br18-2	(-)	(-)	(-)	18	42	(-)	1	36
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22	42	(-)	44	46	32	(-)	12	28
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22-2	26	(-)	3	32	28	(-)	1	26
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22-3	36	(-)	36	36	3	(-)	12	2,4
<i>Lb. delbrueckii</i> Br23	26	(-)	3	34	28	(-)	1	18
<i>Lb. delbrueckii</i> Br23-2	36	(-)	32	3	28	(-)	12	24
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25	38	(-)	42	38	28	(-)	12	24
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25-2	42	(-)	4	3	18	(-)	1	2
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25-3	3	(-)	3	(-)	22	(-)	14	2
<i>Lb. delbrueckii</i> Br26	22	(-)	26	28	28	(-)	12	16
<i>Lb. delbrueckii</i> Br29	3	(-)	34	24	24	(-)	2	2
<i>Lb. delbrueckii</i> Br29-2	36	(-)	36	32	28	(-)	1	24
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks7	3	(-)	38	34	3	(-)	1	2
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks9	34	(-)	46	38	3	(-)	14	24
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks9-2	42	(-)	4	4	32	(-)	12	2

TM5: Trimethoprim 5µg, NA30: Nalidixic acid 30 µg, CIP5: Ciprofloxacin 5 µg, TEC30: Teicoplanin 30 µg, S300: Streptomycin 300 µg, RD5: Rifampicin 5 µg, AMP10: Ampicillin 10 µg, CTX30: Cefotaxime 30 µg, OFX5: Ofloxacin 5 µg, CD2: Clindamycin 2 µg, C30: Chloramphenicol 30 µg, TE30: Tetracycline 30µg, SXT25: Trimethoprim sulfamethoxazole 25 µg, CN10: Gentamicin

10 µg, VA5: Vancomycin 5 µg. Sonuçlar mm olarak verilmiştir, (-): zon oluşumu yok, >:60 mm'den büyük zon

Çizelge 4.5. İzolatların antibiyotiklere karşı direnç sonuçları

İzolat Adı	E15	TMS	NA30	CIP5	TEC30	S300	RD5	AMP10
<i>Lb. helveticus</i> A1	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. helveticus</i> A2	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> P1	S	I	R	R	S	I	S	S
<i>Lb. plantarum</i> P2	S	R	R	R	S	R	S	R
<i>Lb. delbrueckii</i> P3	S	S	R	R	R	I	S	R
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-2	S	I	R	R	S	I	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-3	S	R	R	R	S	I	S	R
<i>Lb. plantarum</i> P4	S	R	R	R	R	I	S	R
<i>Lb. delbrueckii</i> C1	S	R	R	R	S	S	I	S
<i>Lb. delbrueckii</i> C2	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> C3	S	S	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> C4	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> D1	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> D2	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> D3	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> D4	S	S	R	R	S	R	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> D5	S	I	R	R	S	S	S	R
<i>Lb. delbrueckii</i> E2	S	S	R	R	S	S	S	R
<i>Lb. delbrueckii</i> E2-2	S	I	R	R	S	S	S	R
<i>Lb. delbrueckii</i> E3	S	S	R	R	S	I	S	R
<i>Lb. delbrueckii</i> E4	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> E5	S	R	R	I	S	S	S	R
<i>Lb. delbrueckii</i> F3	R	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> F5	S	R	R	R	S	S	S	R
<i>Lb. delbrueckii</i> F6	S	S	R	R	S	I	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> B4	S	S	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> B6	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> B7	S	S	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> B8	S	S	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> B9	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> B9-2	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>E. faecalis</i> B10-2	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> B10-3	S	R	R	R	S	S	S	R
<i>Lb. delbrueckii</i> B11-2	S	S	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> B12	S	S	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> B14	S	S	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. fermentum</i> B15-2	S	R	R	R	S	S	S	S

Çizelge 4.5 (devam)

<i>Lb. delbrueckii</i> Y1	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Y1-2	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Y2	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Y3-2	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Y5	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. fermentum</i> Y15	S	S	R	R	I	I	S	R
<i>Lb. fermentum</i> Z1	S	S	R	R	R	I	I	R
<i>Lb. delbrueckii</i> Z3-3	S	S	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Z4	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Z4-3	S	S	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5	S	S	R	R	S	I	S	R
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-2	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-3	S	S	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-4	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-2	S	R	R	R	S	I	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-3	S	S	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-4	R	R	R	R	S	I	S	R
<i>Lb. delbrueckii</i> Z7	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Z8	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Z8-2	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br1	S	R	R	R	S	R	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br1-2	S	S	R	R	S	I	S	R
<i>Lb. delbrueckii</i> Br6	S	R	R	R	S	R	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br7-2	S	R	R	R	S	I	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br11	S	R	R	R	S	R	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br12	S	R	R	R	S	R	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br12-2	S	R	R	R	S	I	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br15	S	R	R	R	S	I	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17	S	I	R	R	S	I	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17-2	S	R	R	R	S	I	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17-3	S	R	R	R	S	R	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br18-2	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22-2	S	R	R	R	S	R	S	R
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22-3	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br23	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br23-2	S	R	R	R	S	S	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25	S	I	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25-2	S	S	S	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25-3	S	S	R	R	S	I	S	R
<i>Lb. delbrueckii</i> Br26	S	S	R	R	S	I	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br29	S	R	R	R	S	S	S	R

Çizelge 4.5 (devam)

<i>Lb. delbrueckii</i> Br29-2	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks7	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks9	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks9-2	S	S	R	R	S	S	S	S
İzolot Adı	CTX30	OFX5	CD2	C30	TE30	SXT25	CN10	VA5
<i>Lb. helveticus</i> A1	S	R	R	S	S	R	R	S
<i>Lb. helveticus</i> A2	S	R	R	I	S	S	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> P1	S	R	I	S	S	R	R	S
<i>Lb. plantarum</i> P2	R	R	R	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> P3	S	R	R	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-2	I	R	I	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-3	S	R	I	S	S	R	R	S
<i>Lb. plantarum</i> P4	R	R	R	S	I	R	R	R
<i>Lb. delbrueckii</i> C1	S	R	S	S	S	R	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> C2	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> C3	S	R	S	S	S	I	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> C4	S	R	S	S	S	R	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> D1	S	R	S	S	S	S	I	S
<i>Lb. delbrueckii</i> D2	S	R	S	S	S	R	I	S
<i>Lb. delbrueckii</i> D3	S	R	S	S	S	R	I	S
<i>Lb. delbrueckii</i> D4	S	R	S	S	S	I	I	S
<i>Lb. delbrueckii</i> D5	R	R	S	S	S	R	I	S
<i>Lb. delbrueckii</i> E2	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> E2-2	I	R	S	S	S	I	I	S
<i>Lb. delbrueckii</i> E3	S	R	I	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> E4	S	S	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> E5	I	R	R	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> F3	S	R	S	S	S	R	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> F5	I	I	I	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> F6	S	R	S	S	S	S	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> B4	S	R	S	S	S	S	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> B6	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> B7	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> B8	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> B9	S	R	S	S	S	R	I	S
<i>Lb. delbrueckii</i> B9-2	S	R	S	S	S	R	S	S
<i>E. faecalis</i> B10-2	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> B10-3	R	R	R	I	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> B11-2	S	R	S	S	S	I	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> B12	S	R	S	S	S	R	R	S

Çizelge 4.5 (devam)

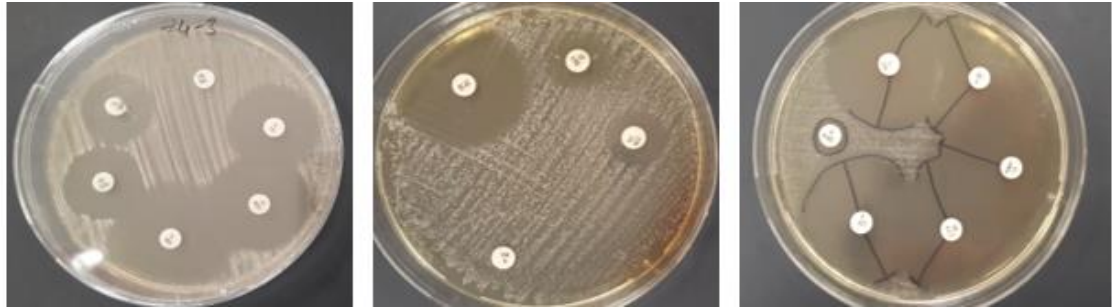
<i>Lb. delbrueckii</i> B14	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. fermentum</i> B15-2	S	R	S	S	S	R	I	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Y1	S	R	S	S	S	R	I	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Y1-2	S	R	S	S	S	R	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Y2	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Y3-2	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Y5	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. fermentum</i> Y15	S	R	I	S	S	S	S	R
<i>Lb. fermentum</i> Z1	S	R	R	I	S	R	I	R
<i>Lb. delbrueckii</i> Z3-3	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Z4	S	R	S	S	S	R	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Z4-3	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-2	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-3	S	R	S	R	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-4	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-2	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-3	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-4	S	R	I	S	S	R	I	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Z7	S	R	S	S	S	R	R	R
<i>Lb. delbrueckii</i> Z8	S	R	S	S	S	R	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Z8-2	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br1	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br1-2	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br6	S	R	S	S	S	R	R	I
<i>Lb. delbrueckii</i> Br7-2	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br11	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br12	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br12-2	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br15	S	R	S	S	S	R	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17-2	S	R	S	S	R	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17-3	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br18-2	S	R	R	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22-2	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22-3	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br23	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br23-2	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25-2	S	R	S	S	I	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25-3	S	R	S	R	S	R	I	S

Çizelge 4.5 (devam)

<i>Lb. delbrueckii</i> Br26	I	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br29	S	R	S	S	S	R	S	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Br29-2	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks7	S	R	S	S	S	R	R	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks9	S	R	S	S	S	R	I	S
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks9-2	S	R	S	S	S	R	R	S

TM5: Trimethoprim 5µg, NA30: Nalidixic acid 30 µg, CIP5: Ciprofloxacin 5 µg, TEC30: Teicoplanin 30 µg, S300: Streptomycin 300 µg, RD5: Rifampicin 5 µg, AMP10: Ampicillin 10 µg, CTX30: Cefotaxime 30 µg, OFX5: Ofloxacin 5 µg, CD2: Clindamycin 2 µg, C30: Chloramphenicol 30 µg, TE30: Tetracycline 30µg, SXT25: Trimethoprim sulfamethoxazole 25 µg, CN10: Gentamicin 10 µg, VA5: Vancomycin 5 µg, S: Duyarlı, I: Orta düzeyde duyarlı, R: Dirençli

İzolatların antibiyotik diskleri etrafında oluşturduğu opak zonlar ölçülmüş ve (Şekil 4.5) CLSI standartlarına göre değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeye göre izolatlardan *Lb. delbrueckii* Z4-3 suşu yalnızca nalidiksik aside ve siproflaksasine direnç göstermekte olup diğer 14 antibiyotiğe karşı duyarlılık göstermiştir. Çalışma kapsamındaki duyarlı olduğu antibiyotik sayısı en fazla olan izolat *Lb. delbrueckii* Z4-3 izolatı olmuştur. *Lb. plantarum* P4 izolatı ise 11 antibiyotiğe karşı dirençli bulunmuştur. Çalışma kapsamında dirençli olduğu antibiyotik sayısı en fazla olan izolat *Lb. plantarum* P4 izolatı olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. İzolatların antibiyotiklere karşı duyarlılığı.

Antibiyotiklerin bilinçsizce kullanımı patojen bakterilerde antibiyotik dirençliliğine sebep olmakta ve hem insan sağlığını hem de hayvan sağlığını tehlikeye sokmaktadır (Alp ve Öner, 2014).

Starter kültür olarak gıda endüstrisinde büyük öneme sahip olan laktik asit bakterilerinin, antibiyotiğe karşı direnç genlerini taşımaları istenilen bir özellik gibi dursa bile, bu genlerini gastrointestinal sistemde patojenlere aktarabildiği göz önünde

bulundurulduğunda istenilen bir özellik olmadığı anlaşılmaktadır (Meral ve Korukluoğlu, 2014).

İzolatların antibiyotik duyarlılıklarına genel olarak bakıldığında eritromisin, teikoplanin, streptomisin, rifampisin, amfisilin, klindamisin, sefotaksim, kloramfenikol, tetrasiklin ve vankomisin antibiyotiklerine karşı duyarlılığın fazla olduğu görülmektedir. *Lb. delbrueckii* Br23-2 izolatı rifampisine karşı dirençli, *Lb. delbrueckii* C1 ve *Lb. fermentum* Z1 izolatları orta düzeyde duyarlı olmak üzere diğer tüm suşlar rifampisine karşı duyarlıdır. Yalnızca *Lb. delbrueckii* Br17-2 izolatı tetrasikline karşı dirençli, *Lb. plantarum* P4 ile *Lb. delbrueckii* Br25-2 orta derecede duyarlı ve diğer tüm izolatlar da tetrasikline duyarlı bulunmuştur. Yine yalnızca *Lb. delbrueckii* F3 ve *Lb. delbrueckii* Z6-4 izolatları eritromisine karşı dirençli olmakla birlikte diğer tüm izolatlar eritromisine karşı duyarlıdır. İzolatlardan *Lb. plantarum* P4, *Lb. fermentum* Y15, *Lb. fermentum* Z1, *Lb. delbrueckii* Z7 izolatları vankomisine karşı dirençli ve diğer izolatlar *Lb. delbrueckii* Br6 izolatı orta düzeyde duyarlı olmak üzere vankomisine karşı duyarlı bulunmuştur. İzolatların duyarlılık sonuçları Hummel ve arkadaşlarının (2007) yaptığı çalışmaya paralellik göstermektedir. Hummel vd. (2007), içerisinde yoğurt, peynir, sosis gibi fermente gıdalardan izole edilmiş laktik asit bakterileriyle birlikte ticari olarak satılan birkaç probiyotik suşunda bulunduğu çalışmalarında toplamda 45 laktik asit bakterisinin antibiyotik dirençliliğini analiz etmiştir. Sonuç olarak *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve *Streptococcus* cinsine ait izolatların penisilin G, ampisilin, tetrasiklin, eritromisin ve kloramfenikol gibi tıbbi amaçlı kullanılan antibiyotiklere karşı oldukça duyarlı olduğu belirtilmiştir.

Çalışmamızda nalidiksik aside karşı yalnızca *Lb. delbrueckii* Br25-2 izolatı duyarlı, diğer izolatların ise dirençli olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde yalnızca *Lb. delbrueckii* E5 izolatı siproflaksasine orta düzeyde duyarlı, bunun dışındaki tüm izolatlar siproflaksasine karşı dirençli bulunmuştur. Suşların çoğunluğunun oflaksasin ve trimetoprim sülfametoksazol antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Hoque vd. (2010), Bangladeş'teki iki farklı yöresel yoğurttan (Bogra ve Khulna) fenotipik ve biyokimyasal tanı yöntemleriyle izole ettikleri *Lactobacillus* suşlarının 9 farklı antibiyotiğe olan duyarlılığını test etmiştir. Bogra yoğurdundan

izole edilen *Lactobacillus* ssp. izolatının amoksisiline duyarlı, gentamisin, klindamisin, azitromisin antibiyotiklerine nispeten duyarlı ve kanamisin, nalidiksik asit, metronidazol, sefradin ve tetrasikline karşı dirençli olduğunu rapor etmiştir. Bununla birlikte Khulna yoğurdundan izole edilen suşların da gentamisin ve klindamisine duyarlı olduğu, tetrasiklin, kanamisin, nalidiksik asit, metronidazol, sefradin, amoksisilin ve azitromisine antibiyotiklerine ise dirençli olduğu bildirilmiştir. Bildirilen sonuçlara bakıldığında iki farklı bölgeden alınmış yöresel yoğurtlardan izole edilen *Lactobacillus* ssp. suşlarının farklı antibiyotik duyarlılığı gösterdiği görülmektedir.

Ahi (2011), *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Leuconostoc* cinslerine ait bazı suşların antibiyotik dirençliğini araştırmıştır ve izolatların tümünün çalışmamıza benzer şekilde nalidiksik aside dirençli olduğu bulunmuştur. Çalışmadaki tüm izolatların nalidiksik asit, polimiksin B ve kanamisin dışında tüm antibiyotiklere duyarlılık gösterdiklerini tespit edilmiştir. Sonuç olarak çalışmadaki laktik asit bakterilerinin amfisilin (%13) ve rifampisin (%4) antibiyotiklerine düşük seviyede dirençli oldukları, en yüksek dirençliliğin nalidiksik asit (%100), polimiksin B (%100) ve kanamisin (%100) antibiyotiklerine karşı olduğu tespit edilmiştir.

Özteber (2013), fermente süt ürünlerinden izole ettiği 168 laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençliliklerini araştırmış ve sonuç olarak izolatların en yüksek direnci linkomisin (%25,59) antibiyotiğine karşı, daha sonra tetrasiklin (%19,04), meropenem (%16,66), ampisilin (%16,16), gentamisin (%7,14), eritromisin (%5,35), siprofloksasin (%5,35), kloramfenikol (%4,16) ve vankomisin (%3,06) antibiyotiklerine karşı bulmuştur. Teikoplanin antibiyotiğine ise direnç gözlenmediği ifade edilmiştir. Çalışmamızda da Özteber (2013)'e benzer olarak izolatların çoğunlukla tetrasiklin, siprofloksasine karşı dirençli olduğu, teikoplanine karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Al-Bayati (2014), fermente ürünlerden laktik asit bakterilerini izole etmiş ve izole ettiği tüm *Enterococcus* ve *Streptococcus* türlerinin 1 izolat hariç çalışmamıza paralel olarak ampisilin, kloramfenikol, tetrasiklin, rifampisin, penisilin, eritromisin antibiyotiklerine duyarlı olduğunu fakat çalışılan tüm izolatların çalışma sonuçlarımızdan farklı olarak vankomisine dirençli olmadığını tespit etmiştir.

Tavşanlı (2015), geleneksel üretilmiş yoğurtlardan izole ettiği suşların antibiyotik dirençliliklerini ölçtüğü çalışmada *Lb. delbrueckii* suşlarının tamamının quinupristin/dalfopristin, tetrasiklin ve kloramfenikole duyarlılık gösterdiğini bildirmiştir. İzolatların 8 tanesi tüm antibiyotiklere duyarlı, 21 suş ise sadece bir antibiyotiğe dirençli ve çoklu direnç profili olarak da 1 suşun 7 adet antibiyotiğe dirençli olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca *S. thermophilus* suşlarının 8 tanesinin kullanılan 14 antibiyotiğin tamamına duyarlı olduğu, 3 adedinin ise sadece 1 antibiyotiğe dirençli olduğu saptanmıştır.

Ünal Turhan ve Erginkaya (2016), bazı ticari probiyotik gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençlerinin belirlenmesini amaçladıkları çalışmalarında *Lactobacillus* ssp., *Lb. acidophilus* ve *Bifidobacterium* subsp. türlerini izole etmişlerdir. Çalışma kapsamında izole edilen 5 adet *Lactobacillus* izolatının vankomisin (%20), tetrasiklin (%20), ampisilin (%20), gentamisin (%20) ve siprofloksasine (%80) karşı dirençli olduğu ve tüm *Lactobacillus* izolatlarının eritromisin (%100), kloramfenikol (%100) ve nitrofurantoine (%100) karşı ise duyarlı olduğunu belirlemişlerdir.

Tabak (2018) yaptığı çalışmada geleneksel yoğurtlardan izole etmiş olduğu 61 *S. thermophilus* ve 21 *Lb. bulgaricus* izolatının, 9 farklı antibiyotiğe (gentamisin, tetrasiklin, kloramfenikol, penisilin G, klortetrasiklin, ampisilin, roksitrimosin, linkomisin ve streptomisin) karşı dirençliliğini araştırmıştır. Sonuç olarak *S. thermophilus* izolatlarının kloramfenikole karşı dirençliliği %90,2 olarak, tetrasikline karşı %73,8'inin dirençli, ampisiline karşı %98,4'ünün duyarlı olduğu saptanmıştır. *Lb. bulgaricus* izolatlarının ise hepsinin streptomisin ve kloramfenikole karşı dirençli olduğunu rapor etmiştir.

4.5 İzole Edilen Suşların Bazı Starter Kültür Özelliklerinin Değerlendirilmesi

4.5.1 Yüzde Asitlik ve Asidifikasyon

Laktik asit bakterileri laktozu fermente ederek laktik asit oluşturmakta ve bunun sonucunda ortamın pH'sında düşmeye neden olmaktadır. Asitliğin artması ile birlikte bakterilerin gelişimi, bakterilerin bulunduğu gıdanın aroma, tekstür gibi özelliklerinde değişiklik meydana gelmesi sebebiyle bakterilerin asitliği özellikle süt endüstrisinde önemli bir parametredir. Ayrıca fermantasyon sırasında yavaş gelişen asitlik serum ayrılması gibi kalite kusurlarına neden olmakla birlikte, fermantasyon süresinin uzaması ekonomik kayıplara da yol açmaktadır (Uzunsoy, 2018).

Araştırma sonuçlarına göre izolatlara ait yüzde asitlik ve asidifikasyon değerleri Çizelge 4.6'da verilmiştir ve % laktik asit üretimi (3.1) eşitliği yardımıyla hesaplanmıştır.

Çizelge 4.6. İzolatların yüzde laktik asitlik ve asidifikasyon sonuçları

İzolat Adı	pH Değeri		ΔpH		Laktik Asit Üretimi (%)
	6. sa	24. sa	ΔpH 6 sa	ΔpH 24 sa	
<i>Lb. helveticus</i> A1	6,40	3,96	1,10	3,54	1,71
<i>Lb. helveticus</i> A2	5,59	4,02	1,91	3,48	1,30
<i>Lb. delbrueckii</i> P1	5,76	4,10	1,74	3,40	1,17
<i>Lb. plantarum</i> P2	6,52	5,79	0,98	1,71	0,18
<i>Lb. delbrueckii</i> P3	5,68	4,09	1,82	3,41	0,90
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-2	5,84	4,10	1,66	3,40	1,17
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-3	6,00	4,10	1,50	3,40	0,94
<i>Lb. plantarum</i> P4	6,61	6,18	0,89	1,32	0,13
<i>Lb. delbrueckii</i> C1	6,51	4,44	0,99	3,06	0,99
<i>Lb. delbrueckii</i> C2	6,88	4,24	0,62	3,26	0,90
<i>Lb. delbrueckii</i> C3	6,93	5,69	0,57	1,81	0,45
<i>Lb. delbrueckii</i> C4	7,28	4,21	0,22	3,29	1,08
<i>Lb. delbrueckii</i> D1	6,85	6,20	0,65	1,30	0,04
<i>Lb. delbrueckii</i> D2	6,71	4,38	0,79	3,12	0,76
<i>Lb. delbrueckii</i> D3	6,41	4,4	1,09	3,10	0,90
<i>Lb. delbrueckii</i> D4	6,46	4,58	1,04	2,92	0,81
<i>Lb. delbrueckii</i> D5	6,22	4,22	1,28	3,28	0,81
<i>Lb. delbrueckii</i> E2	6,74	4,93	0,76	2,57	0,58

Çizelge 4.6 (devam)

<i>Lb. delbrueckii</i> E2-2	5,81	4,15	1,69	3,35	0,92
<i>Lb. delbrueckii</i> E3	5,54	4,10	1,96	3,40	0,90
<i>Lb. delbrueckii</i> E4	6,06	4,15	1,44	3,35	0,94
<i>Lb. delbrueckii</i> E5	6,36	4,24	1,14	3,26	0,85
<i>Lb. delbrueckii</i> F3	6,73	4,39	0,77	3,11	0,90
<i>Lb. delbrueckii</i> F5	6,27	4,21	1,23	3,29	1,03
<i>Lb. delbrueckii</i> F6	6,67	4,52	0,83	2,98	0,90
<i>Lb. delbrueckii</i> B4	6,56	4,95	0,94	2,55	0,49
<i>Lb. delbrueckii</i> B6	6,18	4,31	1,32	3,19	0,81
<i>Lb. delbrueckii</i> B7	6,50	4,28	1,00	3,22	0,85
<i>Lb. delbrueckii</i> B8	6,78	4,57	0,72	2,93	0,81
<i>Lb. delbrueckii</i> B9	6,75	4,64	0,75	2,86	0,67
<i>Lb. delbrueckii</i> B9-2	6,33	4,66	1,17	2,84	0,81
<i>E. faecalis</i> B10-2	6,86	4,50	0,64	3,00	0,85
<i>Lb. delbrueckii</i> B10-3	6,63	4,75	0,87	2,75	0,90
<i>Lb. delbrueckii</i> B11-2	6,82	4,87	0,68	2,63	0,63
<i>Lb. delbrueckii</i> B12	6,48	4,22	1,02	3,28	0,90
<i>Lb. delbrueckii</i> B14	6,79	4,39	0,71	3,11	0,85
<i>Lb. fermentum</i> B15-2	6,50	4,40	1,00	3,10	0,81
<i>Lb. delbrueckii</i> Y1	6,77	4,93	0,73	2,57	0,54
<i>Lb. delbrueckii</i> Y1-2	6,08	4,68	1,42	2,82	0,54
<i>Lb. delbrueckii</i> Y2	6,71	4,60	0,79	2,90	0,76
<i>Lb. delbrueckii</i> Y3-2	6,62	5,93	0,82	1,57	0,27
<i>Lb. delbrueckii</i> Y5	6,54	5,22	0,96	2,28	0,27
<i>Lb. fermentum</i> Y15	6,62	6,16	0,88	1,34	0,18
<i>Lb. fermentum</i> Z1	6,55	4,48	0,95	3,02	0,90
<i>Lb. delbrueckii</i> Z3-3	6,79	4,88	0,71	2,62	0,63
<i>Lb. delbrueckii</i> Z4	6,81	4,72	0,69	2,78	0,58
<i>Lb. delbrueckii</i> Z4-3	6,95	4,50	0,55	3,00	0,81
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5	6,36	5,76	1,14	1,74	0,22
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-2	6,28	5,42	1,22	2,08	0,27
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-3	6,51	4,92	0,99	2,58	0,54
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-4	6,21	5,35	1,29	2,15	0,31
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6	6,54	4,68	0,96	2,82	0,81
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-2	6,73	4,75	0,77	2,75	0,40
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-3	6,22	4,61	1,28	2,89	0,58
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-4	6,18	4,56	1,32	2,94	0,67
<i>Lb. delbrueckii</i> Z7	6,76	5,62	0,74	1,88	0,31
<i>Lb. delbrueckii</i> Z8	6,63	4,80	0,87	2,70	0,67
<i>Lb. delbrueckii</i> Z8-2	6,69	4,71	0,81	2,79	0,54
<i>Lb. delbrueckii</i> Br1	6,45	4,81	1,05	2,69	0,45
<i>Lb. delbrueckii</i> Br1-2	6,14	4,88	1,36	2,62	0,27
<i>Lb. delbrueckii</i> Br6	6,73	5,81	0,77	1,69	0,18
<i>Lb. delbrueckii</i> Br7-2	6,38	4,59	1,12	2,91	0,40
<i>Lb. delbrueckii</i> Br11	6,40	4,68	1,10	2,82	0,72

Çizelge 4.6 (devam)

<i>Lb. delbrueckii</i> Br12	6,45	5,07	1,05	2,43	0,58
<i>Lb. delbrueckii</i> Br12-2	6,83	5,15	0,67	2,35	0,40
<i>Lb. delbrueckii</i> Br15	6,75	4,62	0,75	2,88	0,76
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17	6,23	4,50	1,27	3,00	0,54
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17-2	6,59	4,63	0,91	2,87	0,81
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17-3	6,03	4,52	1,47	2,98	0,58
<i>Lb. delbrueckii</i> Br18-2	6,38	4,78	1,12	2,72	0,40
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22	6,71	5,19	0,79	2,31	0,36
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22-2	6,82	5,03	0,68	2,47	0,54
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22-3	6,47	4,35	1,03	3,15	0,72
<i>Lb. delbrueckii</i> Br23	6,08	4,60	1,42	2,90	0,36
<i>Lb. delbrueckii</i> Br23-2	6,53	4,54	0,97	2,96	0,72
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25	6,47	4,69	1,03	2,81	0,63
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25-2	6,48	4,82	1,02	2,68	0,54
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25-3	6,78	4,65	0,72	2,85	0,58
<i>Lb. delbrueckii</i> Br26	5,95	4,45	1,55	3,05	0,54
<i>Lb. delbrueckii</i> Br29	6,43	4,98	1,07	2,52	0,49
<i>Lb. delbrueckii</i> Br29-2	6,25	4,61	1,25	2,89	0,72
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks7	6,29	5,06	1,21	2,44	0,42
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks9	6,70	4,73	0,80	2,77	0,72
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks9-2	5,99	4,24	1,51	3,26	0,67

Yoğurdun oluşum mekanizmasında asitlik pH 5,1 değerinde kazein proteinlerinde agregasyon başlamakta ve pH 4,6-4,7 düzeyinde tamamlanmaktadır. Bu bilgiye göre izolatların 24 saat sonundaki pH değerlerine bakıldığında izolatların 19 tanesi asitlik değerini pH 4,7 veya altına düşürememiştir. Bu izolatlardan *Lb. plantarum* P4 ve *Lb. fermentum* Y15 suşları ortam asitliğini pH 6'nın altına dahi düşürememiştir. İzolatların 24 saat sonundaki pH değerlerine bakıldığında *Lb. helveticus* A1 pH 3,96 ile ortam pH'sını en çok düşüren izolat olurken, *Lb. plantarum* P4, pH 6,18 ile ortam pH'sını en az düşüren izolat olmuştur. *Lb. helveticus* A1 izolatının göstermiş olduğu sonuç Ahi (2011)'nin çalışması ile benzerlik göstermektedir. Ahi (2011), *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Leuconostoc* cinslerine ait bazı suşlar ile yaptığı çalışmasında laktik asit bakterilerinin uygun besi ortamındaki son pH değerlerinin birbirine yakın olduğunu belirtmiştir. İzotlar arasında *Lb. helveticus* ATCC 15807 suşu 4,04 değeri ile en düşük; *E. faecium* DSM 20442 suşu ise 4,95 ile en yüksek ortam pH değerini sağlamıştır. Bununla birlikte kültürlerin titre edilebilir yüzde asit miktarları en düşük

%0,69 (*Streptococcus thermophilus* RSKK) ve en yüksek %2,06 (*Enterococcus faecalis* RT121) olarak belirlemiştir.

Yine benzer olarak Kırmacı (2010) geleneksel Urfa peynirlerinden izole ettiği *Lactobacillus* ssp. izolatının (suş no: 46) 6 saat sonunda pH'yı 5,3'ün altına düşürebildiğini rapor etmiştir. *Enterococcus* ssp. grubu bakterilerin ise 37°C'de 6 saatlik inkübasyon sonunda ortam pH'sını 5,4 ile 6,0 arasında bir değere düşürdüğünü rapor etmiştir. Farklı olarak Çetin (2017), geleneksel olarak üretilmiş yoğurtlardan izole ettiği 14 izolattan 16 saatlik inkübasyonun ardından yalnızca 6 adedinin (3B8, 3B10, İ10B16, 1B2, 2B1 ve 3B7) sütün başlangıç pH'sını 6.0'ın altına düşürdüğünü rapor etmiştir.

Korkmaz (2011) iyi bir yoğurttaki %0,9-0,95 laktik asit bulunması gerektiğini bildirmiştir. Bu bilgiye göre *Lb. delbrueckii* P3-3, *Lb. delbrueckii* E2-2, *Lb. delbrueckii* E3, *Lb. delbrueckii* F3, *Lb. delbrueckii* F6, *Lb. delbrueckii* B10-3, *Lb. delbrueckii* B12, *Lb. fermentum* Z1 izolatları yani 8 izolatın % laktik asit değeri 0,9 ve 0,95 arasında bulunmuştur.

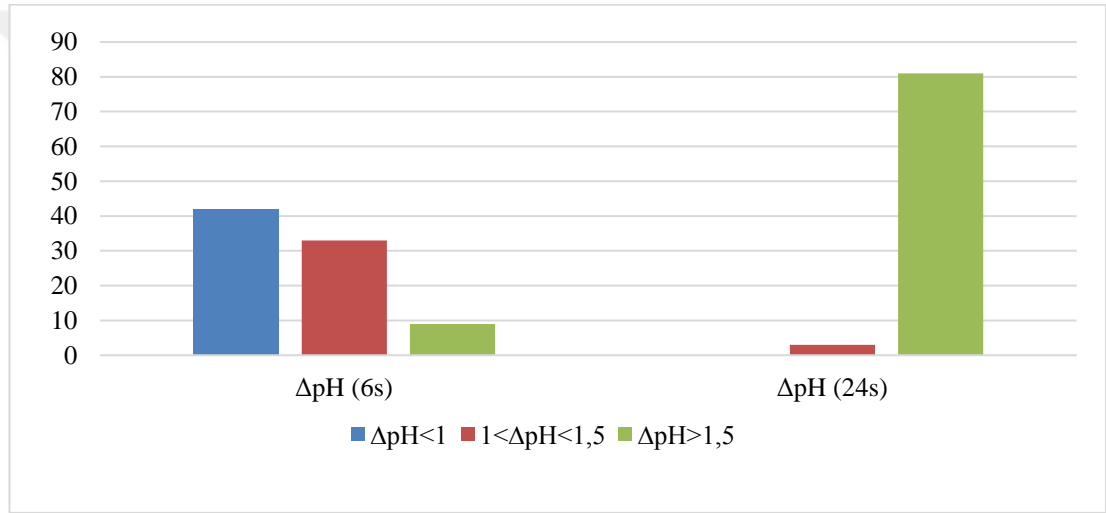
Bulut (2003) peynirlerden izole ettiği *Lactococcus* ve *Enterococcus* cinslerinin 24 saat sonunda 0,595 g/100 mL, *Lactobacillus* cinslerinin ise 0,6247 g/100 mL laktik asit ürettiğini rapor etmiştir.

Ertürkmen ve Öner (2015) Beyaz peynirden izole ettikleri laktik asit bakterileri ile olan çalışmalarında Δ pH değerlerinde meydana gelen değişim 1'in altında olanlar düşük düzeyde, 1-1,5 arasında olanlar orta düzeyde, 1,5'ten yüksek olanlar suşlar ise yüksek düzeyde asit üreten suşlar olarak tanımlanmıştır. Araştırmacılar bu çalışmada Beyaz peynirlerden izole ettikleri ve peynir üretimi için uygun özelliklerde bulunan *E. faecalis* (İE25) suşunun Δ pH (6 sa) değerini 0,67 ve Δ pH (24 sa) değerini 2,17 olarak bulmuştur.

Çizelge 4.6'da izolatların Δ pH (6 sa) değerine bakıldığında zaman izolatlarından 9 tanesinin (*Lb. helveticus* A2, *Lb. delbrueckii* P1, *Lb. delbrueckii* P3, *Lb. delbrueckii* P3-2, *Lb. delbrueckii* P3-3, *Lb. delbrueckii* E2-2, *Lb. delbrueckii* E3, *Lb. delbrueckii* Br26, *Lb. delbrueckii* Ks9-2) yüksek düzeyde asit ürettiği görülmektedir. Altıncı saat sonunda yüksek asit üreten bu suşlardan 1 tanesi *Lb. helveticus* A2 diğerleri ise *Lb. delbrueckii* olarak tanımlanmış izolatlardır. İzolatların

Δ pH (6 sa) değerine bakıldığında en çok asit üreten izolat Δ pH (6 sa):1,96 ile *Lb. delbrueckii* E3 izolatu, en az asit üreten izolat ise Δ pH (6 sa):0,22 değeri ile *Lb. delbrueckii* C4 izolatu olmuştur. İzolatların 24 saat sonundaki pH değerlerine bakılırsa izolatlardan *Lb. plantarum* P4, *Lb. fermentum* Y15 ve *Lb. delbrueckii* D1 izolatları Δ pH (24 sa) <1,5 ve diğer tüm izolatlar Δ pH (24 sa) \geq 1,5 değerinde asit üretmişlerdir.

Şekil 4.6’da zamana bağlı olarak izolatların asit üretiminde belirgin bir artış olduğu görülmektedir. İnkübasyonun ilk 6 saatlik periyodundan sonra düşük düzeyde asit üreten izolat sayısı fazla iken 24 saat sonunda tüm izolatlar en azından orta düzeyde asit üretmiştir.



Şekil 4.6. İzolatların zamana bağlı asit üretimi.

Akoğlu vd. (2016) Mengen peynirlerinden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin 6. saat ve 24. saat sonundaki Δ pH değerlerinin laktokoklarda 0,19-1,20 ve 0,96-2,61; enterokoklarda 0,04-1,61 ve 0,74-2,34; laktobasillerde 0,11-0,36 ve 0,7-2,35 arasında değişim gösterdiğini rapor etmişlerdir. Çalışmada izole edilen 35 laktobasil suşunun 5 tanesinin Δ pH (24sa) değerinin 2’nin üzerinde olduğu yani yüksek asidifikasyon aktivitesinin olduğu belirtilmiştir. Benzer olarak Uzunsoy (2018) geleneksel yöntemlerle üretilmiş yoğurtlardan izole ettiği *Lb. bulgaricus* izolatlarından 3 adedinin (27, 29 ve 42 nolu izolatlar) çok güçlü asit üretme yeteneğine sahip olduğunu bulmuştur. Çalışmamızda ise elde edilen 84 izolattan 81 tanesinin 24 saat sonunda yüksek düzeyde asit ürettiği tespit edilmiştir. Buna benzer olarak Hoque ve ark. (2010) geleneksel olarak üretilen iki farklı bölgelerden alınmış

yoğurtlardan izole ettikleri laktik asit bakterilerinin 24 saat sonunda oluşturdukları ortalama asit miktarını %2.290 ve %2.130 olarak ölçmüştür. Yine 24 saat sonunda ölçülen pH değerleri 5,09 ve 5,13 olarak rapor etmiştir.

4.5.2 Antimikrobiyal Aktivite

Yoğurtlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin gıda patojeni olan test mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkileri Bölüm 3.2.6.3'te anlatıldığı gibi test edilmiştir. İzolatların antimikrobiyal aktivite sonuçları Çizelge 4.7'de verilmiştir. Ayrıca izolatların test mikroorganizmalarına karşı oluşturdukları zon çapları ekler bölümünde Ek B'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. İzolatların antimikrobiyal aktiviteleri

İzolat Adı	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>
<i>Lb. helveticus</i> A1	+++	(-)	(-)	+++	+++
<i>Lb. helveticus</i> A2	++	+++	++	+++	+++
<i>Lb. delbrueckii</i> P1	+++	+++	++	+++	+++
<i>Lb. plantarum</i> P2	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Lb. delbrueckii</i> P3	++	+++	+++	+++	+
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-2	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-3	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Lb. plantarum</i> P4	+++	+++	+++	+++	+
<i>Lb. delbrueckii</i> C1	(-)	+++	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> C2	++	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> C3	(-)	+++	(-)	++	++
<i>Lb. delbrueckii</i> C4	(-)	+++	(-)	+++	+++
<i>Lb. delbrueckii</i> D1	(-)	+++	++	+++	+++
<i>Lb. delbrueckii</i> D2	(-)	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> D3	(-)	+++	(-)	++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> D4	(-)	+++	+	+	+
<i>Lb. delbrueckii</i> D5	+++	+++	+++	++	+++
<i>Lb. delbrueckii</i> E2	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Lb. delbrueckii</i> E2-2	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Lb. delbrueckii</i> E3	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Lb. delbrueckii</i> E4	+++	+++	++	+++	++

Çizelge 4.7 (devam)

<i>Lb. delbrueckii</i> E5	++	+++	(-)	+++	+++
<i>Lb. delbrueckii</i> F3	+	+++	(-)	++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> F5	(-)	+++	(-)	++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> F6	(-)	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B4	(-)	+++	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B6	++	+++	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B7	(-)	+++	(-)	++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B8	(-)	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B9	+	+++	(-)	+++	+++
<i>Lb. delbrueckii</i> B9-2	(-)	+++	(-)	+++	(-)
<i>E. faecalis</i> B10-2	(-)	+++	(-)	(-)	++
<i>Lb. delbrueckii</i> B10-3	(-)	+++	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B11-2	(-)	+++	(-)	+	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B12	(-)	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B14	++	+++	+++	+++	+++
<i>Lb. fermentum</i> B15-2	(-)	+++	++	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Y1	+	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Y1-2	(-)	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Y2	(-)	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Y3-2	(-)	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Y4-2	(-)	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Y5	(-)	+++	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. fermentum</i> Y15	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Lb. fermentum</i> Z1	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Lb. delbrueckii</i> Z3-3	+	+++	++	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z4	++	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z4-3	+++	+++	+	+++	+++
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5	(-)	+++	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-2	(-)	+++	+	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-3	(-)	+++	++	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-4	(-)	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6	(-)	+++	(-)	+++	++
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-2	(-)	+++	(-)	+	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-3	(-)	+++	(-)	++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-4	(-)	+++	++	++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z7	(-)	+++	(-)	+	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z8	(-)	+++	++	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z8-2	(-)	+++	++	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br1	(-)	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br1-2	(-)	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br6	(-)	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br7-2	(-)	+++	(-)	++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br11	(-)	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br12	(-)	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br12-2	(-)	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br15	(-)	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17	(-)	+++	(-)	(-)	(-)

Çizelge 4.7 (devam)

<i>Lb. delbrueckii</i> Br17-2	(-)	+++	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17-3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br18-2	(-)	+++	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22	(-)	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22-2	(-)	+++	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22-3	(-)	+++	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br23	(-)	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br23-2	(-)	+++	(-)	++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25	(-)	+++	(-)	++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25-2	(-)	+++	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25-3	(-)	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br26	(-)	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br29	(-)	+++	(-)	+++	++
<i>Lb. delbrueckii</i> Br29-2	(-)	+++	(-)	+++	+++
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks7	(-)	+++	(-)	(-)	++
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks9	(-)	+++	(-)	+++	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks9-2	(-)	+++	(-)	++	(-)

+++: >3,0 mm (Yüksek etkili); ++: 1,1-3,0 mm (Orta etkili); +: 0,5-1,0 mm (Zayıf etkili); (-): <0,5 mm (Etkisiz).

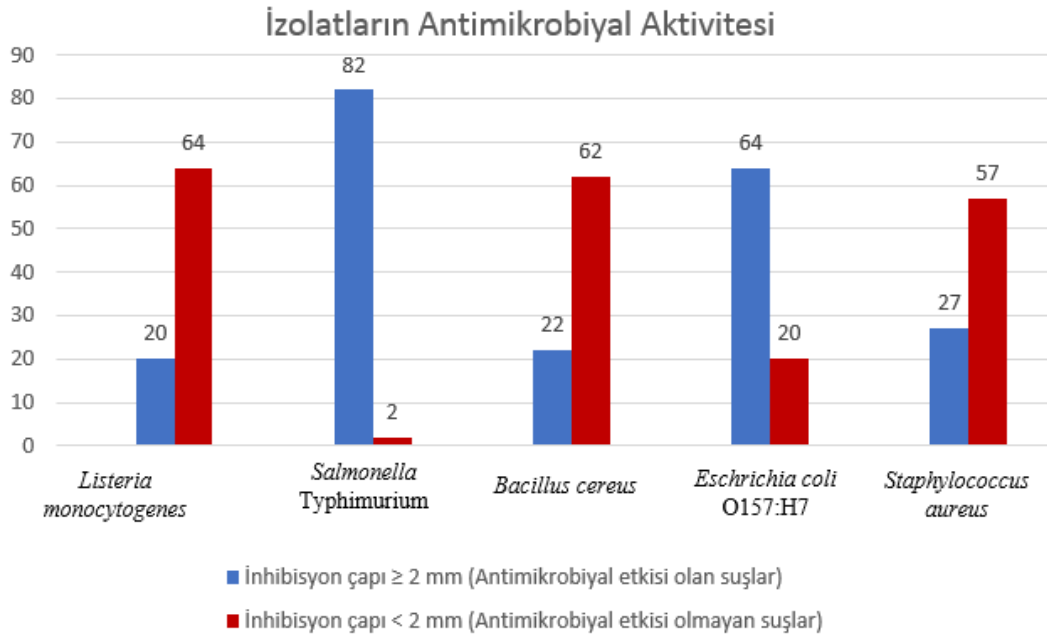
İzolatların gıda patojeni olan test mikroorganizmalara karşı oluşturduğu opak zonlar ölçülmüş ve değerlendirilmiştir (Şekil 4.7). Sonuçlarına bakıldığında *S. Typhimurium* patojenine karşı neredeyse tüm izolatlar yüksek etkili bulunmuştur. Yalnızca *Lb. helveticus* A1 ve *Lb. delbrueckii* Br17-3 izolatları *S. Typhimurium*'a karşı inhibe edici etki göstermemiştir. İzolatların çoğunluğu *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* patojenlerine karşı etkisiz bulunmuştur. Patojenlerden *L. monocytogenes*'e karşı toplamda 25 izolat zayıf/orta/yüksek etkili aynı şekilde *B. cereus*'a karşı toplam 25 izolat zayıf/orta/yüksek etkili olurken *S. aureus* patojenine karşı 28 izolat zayıf/orta/yüksek etkili olmuştur.



Şekil 4.7. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi.

İzolatlardan *Lb. helveticus* A2, 10 *Lb. delbrueckii* izolatu (P1, P3-2, P3-3, D5, E2, E2-2, E3, E4, B14, Z4-3), *Lb. fermentum* Z1 ve *Lb. fermentum* Y15 ile *Lb. plantarum* P2, *Lb. plantarum* P4 izolatu analiz için kullanılan tüm patojenlere karşı etkili bulunmuştur. Buna karşın izolatlardan *Lb. delbrueckii* Br17-3 analizde kullanılan hiçbir patojene karşı etkili olamamıştır. İzolatlardan 10 *Lb. delbrueckii* suşu (C1, B4, B10-3, Y5, Z5, Br17, Br17-2, Br18-2, Br22-3, Br25-2) ise yalnızca *S. Typhimurium*'a karşı inhibe edici etki göstermiş diğer patojenlere karşı ise inhibe edici etkisi tespit edilememiştir. Bu izolatların dışındaki tüm suşlar analizde kullanılan en az iki patojene karşı zayıf/orta/yüksek etkili bulunmuştur.

İzolatların inhibisyon çapı sınır olarak 2 mm'ye göre incelenip sonuçlar değerlendirilecek olursa izolatların %97'si *S. Typhimurium*'a, %76'sı *E. coli* O157:H7 patojenine karşı antimikrobiyal etkiye sahip bulunmuşken buna karşın izolatların %76'sı *L. monocytogenes*'e, %73'ü *B. cereus*'a ve %68'i *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etkiye sahip olamamıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. İzolatların antimikrobiyal aktiviteleri.

Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda özellikle *E. faecalis* izolatlarının etki spektrumu dikkat çekmektedir. González vd. (2007), 'Genestoso' adlı peynirlerden laktik asit bakterilerini izole ettiği bir çalışmada *E. faecalis* suşlarının *L. monocytogenes* CECT 4031 patojenine karşı etkili

olduğu görülmektedir. Aynı şekilde İşleroğlu vd. (2008), yöresel peynirlerden izole ettiği *E. faecalis* suşunun *L. monocytogenes*'e karşı inhibitör aktiviteye sahip olduğunu rapor etmiştir. Ancak *E. coli*, *S. aureus* ve *B. cereus* patojenlerine karşı etkili olmadığı gözlenmiştir. Çalışmamızda izole etmiş olduğumuz *E. faecalis* B10-2 benzer şekilde *E. coli* O157:H7'ye inhibe edici etki göstermemiş ancak *S. aureus* patojenine karşı etkili olmuş ve *L. monocytogene* 'e karşı etki göstermemiştir.

Tabakoğlu (2010), geleneksel olarak üretildiği bilinen peynir örneklerinden izole ettiği 210 koloniden 124 tane suş seçmiş ve bu suşların *Micrococcus luteus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. faecalis* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesini ölçmüştür. Sonuç olarak yalnızca 4 izolatın belirlenen patojen mikroorganizmalar üzerinde belirli oranlarda inhibisyon etkisinin olduğunu ve yine en etkili izolatın 34(5) nolu izolatın *E. faecium* rapor edilmiştir.

Zengin (2012) doğal olarak üretilen yoğurtlardan izole ettiği *S. thermophilus* ve *Lb. delbrueckii* subsp *bulgaricus* suşlarının antimikrobiyal özelliklerini incelemiş ve sonuç olarak izole edilen 15 *S. thermophilus* izolatının 11 tanesinin *S. Typhmurium*'a karşı etkili olduğunu rapor etmiştir. Buna karşın *B. cereus*'ün izolatlarına karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. *Lb. delbrueckii* subps. *bulgaricus* izolatları da benzer şekilde *B. cereus*'a karşı en düşük inhibisyon zonunu oluşturmuştur.

Tokatlı (2013) turşulardan izole ettiği kültürlerin antimikrobiyal özelliklerinin özellikle *Salmonella* ve *E. coli* üzerinde etkili olduğunu, *Lb. plantarum* suşlarının *B. cereus*'a karşı inhibe edici etkisi olduğunu belirtmiştir. Çalışmamızda izole edilen *Lb. plantarum* P2 ve *Lb. plantarum* P4 izolatlarının *B. cereus*'a karşı yüksek inhibe edici etkisi olması ve tüm izolatların *Salmonella* ve *E. coli* üzerindeki etkisi göz önüne alındığında sonuçların Tokatlı (2013)'nin çalışması ile paralellik gösterdiği görülmektedir.

Al-Bayati (2014) fermente ürünlerden izole etmiş olduğu 44 farklı laktik asit bakterisinin patojen bakterilere karşı inhibisyon etkisini ölçmüştür. İnhibisyon zonlarının 4 ile 28 mm arasında olduğunu ve en büyük zonun *E. fecalis*, *S. aureus* bakterilerine karşı olduğu rapor edilmiştir.

Pektaş (2014), süt ve süt ürünlerinden izole etmiş olduğu 163 laktik asit bakterisinin antimikrobiyal aktivitesini incelemiştir. İncelenen izolatlarının 86 tanesinin test bakterilerine (*S. aureus*, *L. monocytogenes* 1, *Candida glabrata*, *L. monocytogenes*, *E. coli* ve *Candida albicans*) karşı antimikrobiyal aktivitesi yüksek olarak bulunmuştur.

Yüce (2017), Tulum peynirlerinden izole ettiği 101 laktik asit bakterisinden *E. coli*, *S. aureus* ve *L. monocytogenes*'in indikatör olarak kullanıldığı antimikrobiyal aktivite deneylerinde toplamda 82 tane izolatin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu ifade etmiştir. Çalışmada *E. coli*'ye karşı en yüksek antimikrobiyal aktivitenin *Lb. bulgaricus* YLa4B izolatu, *S. aureus*'a karşı *E. faecium* PLb8B suşunun ve *L. monocytogenes*'e karşı ise en yüksek antimikrobiyal aktivitenin *Lb. bulgaricus* YLa18B suşuna ait olduğu tespit edilmiştir.

Kanak ve Yılmaz (2018b), geleneksel olarak üretilmiş peynirlerden izole etmiş olduğu 100 laktik asit bakterisinin antimikrobiyal aktivitesini incelemiş ve 10 izolatin antimikrobiyal aktivitesi olduğunu rapor etmiştir. İzolatlardan hiçbirinin *Staph. aureus* ATCC 25923 patojenine karşı inhibisyon etkisinin olmadığı ve izolatlardan *E. faecium*'un en yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada izole edilen *Lb. plantarum* (IS2) izolatinın *L. monocytogenes* ATCC 7644, *E. coli* O157:H7, *B. cereus* patojenlerine karşı etkili olduğu, *S. Typhimurium* ATCC 140828 patojenine ise yalnızca *E. faecalis* (IA2) izolatinın karşı etkili olduğu görülmektedir.

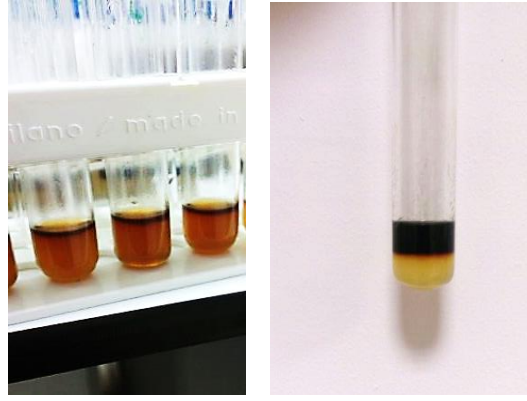
4.5.3 Diasetil retimi

Sitrat metabolizmasının son ürünü olarak ortaya çıkan diasetil ve asetaldehit laktik asit bakterileri tarafından üretilen asıl aroma bileşikleridir (Elçioğlu, 2010). İzolatların diasetil üretimleri Bölüm 3'te anlatıldığı gibi nitel olarak incelenmiş ve pembe-kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (şekil 4.9), sonuçlar ise izelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. İzolatların diasetil üretimi

İzolat Adı	Diasetil Üretimi	İzolat Adı	Diasetil Üretimi
<i>Lb. helveticus</i> A1	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Y5	(+)
<i>Lb. helveticus</i> A2	(+)	<i>Lb. fermentum</i> Y15	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> P1	(+)	<i>Lb. fermentum</i> Z1	(+)
<i>Lb. plantarum</i> P2	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Z3-3	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> P3	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Z4	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-2	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Z4-3	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-3	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Z5	(+)
<i>Lb. plantarum</i> P4	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-2	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> C1	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-3	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> C2	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-4	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> C3	(-)	<i>Lb. delbrueckii</i> Z6	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> C4	(-)	<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-2	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> D1	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-3	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> D2	(-)	<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-4	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> D3	(-)	<i>Lb. delbrueckii</i> Z7	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> D4	(-)	<i>Lb. delbrueckii</i> Z8	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> D5	(-)	<i>Lb. delbrueckii</i> Z8-2	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> E2	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Br1	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> E2-2	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Br1-2	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> E3	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Br6	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> E4	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Br7-2	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> E5	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Br11	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> F3	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Br12	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> F5	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Br12-2	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> F6	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Br15	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> B4	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Br17	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> B6	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Br17-2	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> B7	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Br17-3	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> B8	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Br18-2	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B9	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Br22	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> B9-2	(-)	<i>Lb. delbrueckii</i> Br22-2	(+)
<i>E. faecalis</i> B10-2	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Br22-3	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> B10-3	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Br23	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> B11-2	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Br23-2	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> B12	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Br25	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> B14	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Br25-2	(+)
<i>Lb. fermentum</i> B15-2	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Br25-3	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> Y1	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Br26	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> Y1-2	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Br29	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> Y2	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Br29-2	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> Y3-2	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Ks7	(+)
<i>Lb. delbrueckii</i> Y4-2	(+)	<i>Lb. delbrueckii</i> Ks9	(+)

(+): Diasetil üretimi var, (-): Diasetil üretimi yok.



Şekil 4.9. Sırasıyla diasetil üretimi olan ve olmayan örnekler

İzolatlardan 12'si (C3, D2, D3, D4, D5, E2, B9-2, Z3-3, Z6-3, Br18-2 (*Lb. delbrueckii*)) ve *Lb. fermentum* Y15 diasetil üretmemiş geri kalan 72 izolatın ise diasetil ürettiği tespit edilmiştir.

Elçioğlu (2010), Tulum peynirlerinden 96 adet laktik asit bakterisi izole etmiş ve bu izolatların 38 tanesinin diasetil ürettiğini ve diasetil üreten suşların ağırlıklı olarak *Enterococcus* türlerini içerdiği ifade etmiştir.

Yüce (2017), yoğurt ve peynirlerden izole etmiş olduğu 101 bakteriden 41 adedinde deney sonrası ilk 10 dakika içerisinde renk değişiminin olduğunu, inkübasyonun 24 saat sonrasında ise tüm izolatlarda renk değişiminin görüldüğünü rapor etmiştir.

4.5.4 Proteinaz Aktivitesi

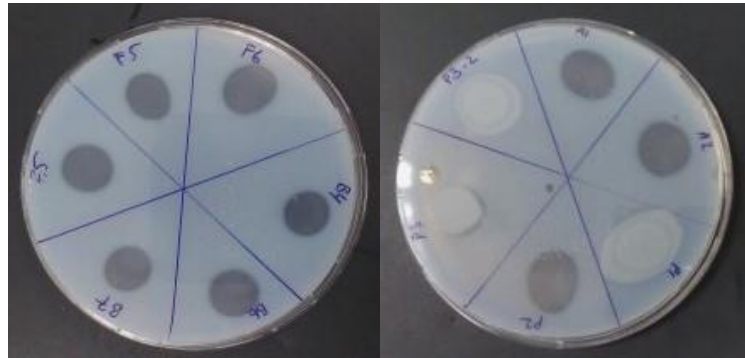
Araştırma kapsamında izole edilen suşları proteinaz aktivitesi Bölüm 3.2.6.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş analiz sonunda berrak zonların ölçümü yapılmıştır. Çalışma kapsamındaki izolatların antibiyotik duyarlılıkları, asidifikasyon özellikleri, antimikrobiyal özellikleri ve diasetil üretimi özellikleri göz önünde bulundurularak bazı suşlar seçilmiş ve bu izolatların proteinaz aktiviteleri ölçülmüş ve elde edilen zon çapları Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Bazı izolatların proteinaz aktivitesi zon çapları

İzolat Adı	Zon Çapı (mm)	İzolat Adı	Zon Çapı (mm)
<i>Lb. helveticus</i> A2	13	<i>Lb. delbrueckii</i> E2-2	11
<i>Lb. delbrueckii</i> P1	(-)	<i>Lb. delbrueckii</i> E3	(-)
<i>Lb. plantarum</i> P2	13	<i>Lb. delbrueckii</i> E4	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-2	(-)	<i>Lb. delbrueckii</i> E5	12
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-3	(-)	<i>Lb. delbrueckii</i> B8	11
<i>Lb. delbrueckii</i> C2	10	<i>Lb. delbrueckii</i> B9	10
<i>Lb. delbrueckii</i> C3	13	<i>E. faecalis</i> B10-2	13
<i>Lb. delbrueckii</i> C4	11	<i>Lb. delbrueckii</i> B14	10
<i>Lb. delbrueckii</i> D1	13	<i>Lb. fermentum</i> B15-2	10
<i>Lb. delbrueckii</i> D2	14	<i>Lb. delbrueckii</i> F5	10
<i>Lb. delbrueckii</i> D3	11	<i>Lb. delbrueckii</i> F6	13
<i>Lb. delbrueckii</i> D4	8	<i>Lb. delbrueckii</i> Br23	9
<i>Lb. delbrueckii</i> D5	14	<i>Lb. delbrueckii</i> Br26	10
<i>Lb. delbrueckii</i> E2	13	<i>Lb. delbrueckii</i> Ks7	10

(-): Berrak zon oluşumu yoktur.

Çizelge 4.9'a göre proteinaz aktivitesi ölçülen izolatlardan bazı *Lb. delbrueckii* (P1, P3-2, P3-3, E3, E4) suşlarının proteinaz aktivite göstermediği görülmektedir. Proteinaz aktivitesi gösteren ve göstermeyen bazı suşların zon görüntüleri Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. İzolatların proteolitik aktivitelerinin belirlenmesi.

Proteinaz aktivitesi olan izolatlardan en büyük zon çapını *Lb. delbrueckii* D1 ve *Lb. delbrueckii* D2 izolatları ve en küçük zon çapını *Lb. delbrueckii* D4 izolatı göstermiştir.

Laktik asit bakterileri sahip oldukları proteolitik enzimlerle kazeinin hidrolizini sağlayarak fermantasyon sırasında ürün reolojisi ve bununla birlikte aroma oluşumunda etkilidir (Karakuş, 1994). Aynı zamanda *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* bakterileri arasındaki simbiyotik ilişkinin en önemli parametrelerinden biridir. Ancak yüksek proteolitik aktivite acı tat oluşumuna sebep olmaktadır (Tavşanlı, 2015).

Al-Bayati (2014) geleneksel olarak üretilmiş fermente ürünlerden laktik asit bakterilerini izole etmiş ve proteinaz aktivitesine bakmıştır. Sonuçlar çalışmamızda elde edilen sonuçlara yakınlık göstermektedir. Al-Bayati (2014) izole ettiği *Enterococcus* ssp. suşlarında zon çaplarını 9,51 ile 13,71 mm arasında belirlemiştir.

Ramadan (2014) Kuzey Irak'ta yapılmış 40 farklı fermente üründen laktik asit bakterilerini izole ettiği çalışmasında izole ettiği suşların proteinaz aktivitesine bakmıştır. Sonuç olarak tüm izolatların yüksek proteinaz aktivite gösterdiğini rapor etmiştir.

Tavşanlı (2015) geleneksel olarak üretilen yoğurtlardan izole ettiği *Lb. delbrueckii* suşlarının 17 tanesinin kuvvetli, 12 tanesinin orta ve 16 tanesinin zayıf proteolitik aktiviteye sahip olduğunu rapor etmiştir.

Akoğlu vd. (2016) Mengen peynirlerinden izole ettikleri Laktokokların, Enterokoklardan ve Laktobasillerden daha yüksek proteolitik aktivite gösterdiklerini bildirmiştir. Uzunsoy (2018) geleneksel üretilmiş yoğurtlardan izole etmiş olduğu *Lb. bulgaricus* izolatlarının *S. thermophilus* izolatlarından daha güçlü proteolitik yeteneğe sahip olduğunu ifade etmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Batı Karadeniz’de bulunan bazı illerden geleneksel yollarla üretilmiş yoğurt örnekleri toplanarak laktik asit bakterilerinin izole edilmesi ve izole edilen suşların bazı starter kültür özelliklerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Muhtemel laktik asit bakterisi olarak düşünülen izolatların öncelikle fenotipik ve biyokimyasal tanımlarının yapılması amacıyla farklı sıcaklıklarda gelişme, farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme, farklı pH’larda gelişme, glukozdan gaz üretme analizleri yapılmıştır. Analizlerin sonucunda izolatlardan yalnızca 2 tanesi (Y15, Z1) glukozdan gaz ürettiği ve izolatların heterofermantatif özellikte oldukları tespit edilmiştir. İzolatların farklı sıcaklıklarda gelişmelerine bakıldığında 10°C 'de yalnızca P2 suşu gelişme özelliği göstermiştir, 15°C'de 6 suş (P2, P4, E2, E5, Y15, Z1) gelişme göstermiştir ve 45°C'de ise yalnızca Z4-3 suşu gelişme göstermezken P1 ve P4 suşları zayıf gelişme göstermiştir. Farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişmelerine bakıldığında ise %2 NaCl konsantrasyonunda tüm izolatların gelişebildiği, %4 NaCl içeren besiyerinde ise yalnızca P2, P3-3, P4, Y15, Z1, Z4-3, Br17-2 izolatlarının gelişebildiği ve %4 NaCl içeren besiyerinde ise P2, P4, Y15, Z1, Z4-3 izolatlarının geliştiği tespit edilmiştir. İzolatların farklı pH değerlerinde gelişebilmelerine bakıldığında ise Br17-2, Y1, P1, Z3-3 izolatları hariç tüm izolatların pH 9 değerinde gelişme gösterdiği buna karşın 6 izolatın (P3, P3-3, C2, C3, C4, E2) zayıf gelişme göstermesi dışında diğer izolatların pH 3,5 değerinde gelişme göstermedikleri tespit edilmiştir.

Elde edilen izolatların kesin tanımlarının yapılabilmesi için MALDI-TOF MS Biotyper sistemi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre izole edilen bakterilerin yaklaşık %90’ı *Lb. delbrueckii*, %4’ü *Lb. fermentum*, %2,5’i *Lb. helveticus*, %2,5’i *Lb. plantarum* ve yaklaşık %1’i *E. faecalis* şeklindedir. Bu sonuçlara göre MALDI-TOF MS Biotyper sisteminin laktik asit bakterilerini tanımlanmasında hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir.

İzole edilen laktik asit bakterilerin asidifikasyon ve asit üretme yetenekleri araştırılmıştır. Titrasyon yöntemi ve pH metre ile ölçüm yapılan analiz sonucu izolatlardan 6. saat sonunda en düşük pH değeri 5,59 ile *Lb. helveticus* A2 izolatı en yüksek pH değeri ise 7,28 ile *Lb. delbrueckii* C4 izolatı, 24 saat sonunda en düşük

pH değeri 3,96 ile *Lb. helveticus* A1 izolatında ve en yüksek pH değeri ise 6,20 ile *Lb. delbrueckii* D1 izolatında tespit edilmiştir. İzolatlardan *Lb. delbrueckii* P3-3, *Lb. delbrueckii* E2-2, *Lb. delbrueckii* E3, *Lb. delbrueckii* F3, *Lb. delbrueckii* F6, *Lb. delbrueckii* B10-3, *Lb. delbrueckii* B12, *Lb. fermentum* Z1 izolatlarının % laktik asit değeri 0,9 ve 0,95 arasında bulunmuştur.

Laktik asit bakterilerin antibiyotiklere karşı duyarlılıkları analiz edilmiş ve bu amaçla 16 farklı antibiyotik diski kullanılmıştır. Analiz sonucunda eritromisin, teikoplanin, streptomisin, rifampisin, amfisilin, klindamisin, sefotaksim, kloramfenikol, tetrasiklin ve vankomisin antibiyotiklerine karşı duyarlılığın fazla olduğu, buna karşın izolatların çoğunlukla nalidiksik asit, siprofloksasin, ofloksasin, gentamisin ve trimetoprim sülfametoksazol antibiyotiklerine dirençli oldukları tespit edilmiştir.

İzolatların antimikrobiyal özelliklerinin tespit edilmesi amacıyla gıda patojeni olan *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *B. cereus* indikatör mikroorganizma olarak kullanılmış sonuç olarak izolatların çoğunluğu *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* patojenlerine karşı inhibe edici etki göstermezken, izolatların %97'si *S. Typhimurium*'a, %76'sı *E. coli* O157:H7 patojenine karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Nitel bir yöntemle tespit edilen diasetil üretim yeteneklerine göre izolatların yaklaşık %86'sının diasetil üretimi özeliğine sahip olduğu tespit edilmiştir.

İzolatların antimikrobiyal aktiviteleri, antibiyotiklere olan duyarlılıkları, asit üretimleri ve diasetil üretim yeteneklerine göre bazı izolatlar seçilmiş ve seçilen izolatların proteolitik aktivitelerine bakılmıştır. Analiz edilen izolatlardan *Lb. delbrueckii* P1, *Lb. delbrueckii* P3-2, *Lb. delbrueckii* P3-3, *Lb. delbrueckii* E3, *Lb. delbrueckii* E4 izolatları proteinaz aktivitesi göstermezken, *Lb. delbrueckii* D1 ve *Lb. delbrueckii* D2 izolatları 14 mm ile en büyük zon çapını ve *Lb. delbrueckii* D4 izolatı ise 8mm ile en küçük zon çapını göstermiştir.

Çalışmamızda araştırılan starter kültür özellikleri göz önünde bulundurularak *Lb. delbrueckii* P3-3, *Lb. delbrueckii* E2, *Lb. delbrueckii* E2-2, *Lb. delbrueckii* E3, *Lb. delbrueckii* ZA-3 ve *Lb. fermentum* Z1 izolatları starter kültür olarak kullanılabilir bulunmuştur.

Sonuç olarak bu çalışma ile geleneksel olarak üretilmiş olan yoğurtlardan izole edilmiş laktik asit bakterilerinin bazı stater kültür özelliklerine bakılmış ve üretime uygun olan yerel suşların seçimi hedeflenmiştir. Yerel starter kültür üretimi amacıyla bundan sonra yapılacak çalışmalar arasında; izolatların bakteriyofajlara dirençliliklerinin araştırılması, ürettiği aroma maddelerinin ve ikincil metabolitlerin kantitatif tespiti, seçilen izolatlarla yoğurtların üretilmesi, üretilen yoğurtların duyusal niteliklerinin ve reolojik özelliklerinin araştırılması, seçilen suşların liyofilizasyona dayanıklılıklarının tespit edilmesi konuları başta olmak üzere daha kasamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



6. KAYNAKLAR

- Acar Soykut E ve Tunail N (2009) “Süt Endüstrisinde Sorun Yaratan Termofilik Fajlar”, Gıda/The Journal of Food, 34(2), 107-113.
- Ahi S (2011) Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Ekzopolisakkarit (Eps) Üretimi ile Antibiyotik Dirençliliklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Akoğlu A, Yaman H, Coşkun H ve Sarı K. (2017) “Mengen Peynirinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Moleküler Tanımlanması ve Bazı Starter Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi”, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 21(2): 453-459.
- Akyar I (2011) “Kütle Spektrometrisinin Mikrobiyolojide Kullanımı”, Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2:4.
- Alp D ve Öner Z (2014) “Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençlilikleri ve Aroma Maddeleri Oluşturma Özelliklerinin Belirlenmesi”, GIDA/The Journal of Food, 39(6).
- Al-Bayati AAK (2014) Isolation and Molecular Identification of Some Lactic Acid Bacteria From Traditionally Made Fermented Food, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Angelakis E, Million M, Henry M and Raoult D (2011) “Rapid and Accurate Bacterial Identification in Probiotics and Yoghurts by MALDI-TOF Mass Spectrometry”, Journal of Food Science, 76(8): M568-M572.
- Anhalt JP and Fenselau C (1975) “Identification of Bacteria Using Mass Spectrometry”, Analytical Chemistry, 47(2): 219-225.
- Aslım B, Beyatlı Y ve Halkman K (2000) “Yoğurt Starter Kültür Metabolitlerinin İnhibisyon Etkisi”, Turkish Journal of Biology, 24, 65-78.
- Aslım B ve Beyatlı Y (2004) “Antibiotic Resistance And Plasmid DNA Contents of Streptococcus Thermophilus Strains Isolated From Turkish Yogurts”, Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 28(2):257-263.
- Bayram M ve Yıldırım Z (2016) “Beyaz Peynirden Bakteriyosin Üreten Bakterinin (*Enterococcus faecium*) İzolasyonu ve Bakteriyosinin Karakterizasyonu”, Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi, (13):103-115.
- Bruker, MALDI Biotyper, In Food Microbiology, Speed and Accuracy Matter, https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/Separations_MassSpectrometry/Literature/Brochures/1862840_MBT_Food_brochure_01-2019_ebook.pdf 29 Mart 2019
- Bulut Ç (2003) Isolation and Molecular Characterization of Lactic Acid Bacteria From Cheese, Yüksek Lisans Tezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir.

- Busch U and Nitschko H (1999) "Methods for differentiation of microorganisms", Journal of Chromatography 722: 263- 278.
- Büyükörük S ve Soyutemiz GE (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 Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 7(2), 81-87.
- Caplice E and Fitzgerald GF (1999) "Food Fermentations: Role of Microorganisms In Food Production and Preservation", International Journal of Food Microbiology 50(1-2): 131-149.
- Chakraborty A and Bhowal J (2015) Isolation, Identification and Analysis of Probiotic Properties of *Lactobacillus* ssp. from Selected Regional Dairy Product. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci, 4(6), 621-628.
- Cogan TM, Beresford TP, Steele J, Broadbent J, Shah NP and Ustunol, Z. (2007) "Advances In Starter Cultures and Cultured Foods", J. Dairy Sci. 90: 4005-4021.
- Çakır İ (2003) Laktobasillus ve Bifidobakterlerde Bazı Probiyotik Özelliklerin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Çelik ES (2007) Determination of Aroma Compounds and Exopolysaccharides Formation by Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Yogurts, Yüksek Lisans Tezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir
- Çelikyurt G ve Arıcı M (2008) Gıda Koruyucusu Olarak Mikrobiyal Kaynaklı Organik Asitler ve Önemi, Türkiye, 10, 21-23
- Çetin Z (2017) Geleneksel Yoğurtlarda Mikrobiyel Floranın Belirlenmesi ve Başlatıcı Kültür Kombinasyonlarının Oluşturulması, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Çetinkaya E ve Ayhan K (2012) "Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler", Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi, 2(1): 53-62.
- Demirgöl F ve Sağdıç O (2017) "Laktik Starter Kültür Üretim Teknolojisi", Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi, 7(11), 27-37.
- Duškova M, Šedo O, Kšicová K, Zdráhal Z and Karpíšková R (2012) "Identification of *Lactobacilli* Isolated From Food by Genotypic Methods and MALDI-TOF MS", International Journal of Food Microbiology, 159(2), 107-114.
- Ergene E ve Avcı A (2016) "Mikrobiyel Ekzopolisakkaritler", Sakarya University Journal of Science, 20(2): 193-202.
- Erkuş O (2007) Isolation, Phenotypic and Genotypic Characterization of Yoghurt Starter Bacteris, Master's Thesis, Izmir Institute of Technology.

- Ertürkmen P ve Öner Z (2015) “Beyaz Peynir Örneklerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Başlatıcı (Starter) Kültür Özelliklerinin Biyokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi”, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 19(3): 9-16.
- Franciosi E, Settanni L, Cavazza A and Poznanski E (2009) “Biodiversity and Technological Potential of Wild Lactic Acid Bacteria From Raw Cows' Milk”, International Dairy Journal, 19(1): 3-11.
- Fox PF (1989) “Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening”, Journal of Dairy Sciences. 72: 1379–1400.
- Fleming HP, Etchells JL and Costilow RN (1975) “Microbial İnhibition by An Isolate of *Pediococcus* from Cucumber Brines”, Appl. Environ. Microbiol., 30(6): 1040-1042.
- Gezginç Y (2010) Geleneksel Yoğurtlardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Plazmit İçeriği ve Biyojenik Amin Üretimi Bakımından Gıda Endüstrisinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması, Doktora Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- González L, Sandoval H, Sacristán N, Castro JM, Fresno JM and Tornadijo ME (2007) “Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated From Genestoso Cheese Throughout Ripening and Study of Their Antimicrobial Activity”, Food Control, 18(6): 716-722.
- Gürsoy O ve Kınık Ö (2011) “Peynir Üretiminde Probiyotik Bakterilerin Kullanımı: Probiyotik Peynir”, Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 12(1): 105-116.
- Hassan AN, Corredig M and Frank JF (2001) “Viscoelastic Properties of Yoğurt Made With Ropy And Non-Ropy Exopolysaccharides Producing Cultures”, Milchwissenschaft, 56(12): 684-686.
- Hebert EM, Raya RR, Tailliez P and de Giori GS (2000) “Characterization of Natural Isolates of *Lactobacillus* Strains To Be Used As Starter Cultures in Dairy Fermentation”, International Journal of Food Microbiology, 59(1-2): 19-27.
- Herdem A (2006) Farklı Yörelere Toplanan Geleneksel Yöntemle Üretilen Yoğurt Örneklerinin Bazı Niteliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Hoque MZ, Akter F, Hossain KM, Rahman MSM, Billah MM and Islam KMD (2010) “Isolation, Identification and Analysis of Probiotic Properties of *Lactobacillus* ssp. from Selective Regional Yoghurts”, World Journal of Dairy & Food Sciences, 5(1): 39-46.
- Horvath P, Coûté-Monvoisin AC, Romero DA, Boyaval P, Fremaux C and Barrangou R (2009) “Comparative Analysis of CRISPR Loci in Lactic Acid

- Bacteria Genomes”, *International Journal of Food Microbiology*, 131(1): 62-70.
- Hummel AS, Hertel C, Holzapfel WH and Franz CM (2007) “Antibiotic Resistances of Starter and Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(3): 730-739.
- Hurst A (1981) “Nisin”, In *Advances in Applied Microbiology* 27: 85-123.
- İşleroglu H, Yıldırım Z ve Yıldırım M (2008) “Yöresel Peynirden Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip Laktik Asit Bakterisinin İzolasyonu ve Tanısı”, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2008(1): 1-6.
- Kanak EK ve Yılmaz SÖ (2018a) “Sakarya’da Geleneksel Olarak Üretilen Bazı Yöresel Peynirlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin MALDI-TOF MS Yöntemi ile Tanımlanması ve Antibiyotik Dirençlerinin Belirlenmesi”, *Sakarya University Journal of Science*, 22(3): 1055-1062.
- Kanak EK ve Yılmaz SÖ (2018b) “MALD-TOF Mass Spectrometry For The Identification and Detection of Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated From Local Cheeses”, *Food Science and Technology*, 1-8.
- Karakuş M (1994) “Beyaz Peynirden İzole edilen Laktik Asit Bakterilerinin Asit Oluşturma ve Proteolitik Aktiviteleri”, *Gıda/The Journal of Food*, 19(4).
- Kılıç S (2008) *Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri*, 2. Baskı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- Kıran F ve Osmanağaoğlu Ö (2015) “Laktik Asit Bakterilerinde Proteomik Çalışmalar”, *Gıda/The Journal of Food*, 38(1), 55-62.
- Kırmacı HA (2010) *Geleneksel Urfa Peynirinde Yer Alan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Moleküler Karakterizasyonu ve Starter Kültür Olarak Kullanım Olanakları*, Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Urfa.
- Klein G, Pack A, Bonaparte C and Reuter G (1998) “Taxonomy and Physiology of Probiotic Lactic Acid Bacteria”, *International Journal of Food Microbiology*, 41(2): 103-125.
- Korkmaz AG (2011) *Yoğurt ve Peynir İçin Starter Kültür Üretimi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Leroy F and De Vuyst L (2004) “Lactic Acid Bacteria As Functional Starter Cultures For The Food Fermentation Industry”, *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.
- Liu W, Pang H, Zhang H and Cai Y (2014) *Biodiversity Of Lactic Acid Bacteria* Springer, Dordrecht.
- Lourens-Hattingh A and Viljoen BC (2001) “Yogurt As Probiotic Carrier”, *Food International Dairy Journal*, 11(1-2): 1-17.
- Meral H ve Korukluoğlu M (2014) “Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Direnç Mekanizmaları”, *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28(2), 71-82.

- Mohania D, Nagpal R, Kumar M, Bhardwaj A, Yadav M, Jain S, Marotta F, Singh V, Parkash O and Yadav H (2008) “Molecular Approaches For Identification And Characterization of Lactic Acid Bacteria”, *Journal of Digestive Diseases*, 9(4), 190-198.
- Monica C (2002) *District Laboratory Practice In Tropical Countries*. Part II page 136–141.
- Nacef M, Chevalier M, Chollet S, Drider D and Flahaut C (2017) “MALDI-TOF Mass Spectrometry For The Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated From A French Cheese The Maroilles”, *International Journal of Food Microbiology*, 247, 2-8.
- NCBI (2019a), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1585&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> 29 Mart 2019
- NCBI (2019b), *Streptococcus thermophilus*
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1308&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> 29 Mart 2019
- Oberg CJ and Broadbent JR (1993) “Thermophilic starter cultures: another set of problems”, *J. Dairy Sci.*, 76: 2392-2406
- Osmanağaoğlu Ö ve Beyatlı Y (2002) “The Use of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria in Food Biopreservation”, *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 32: 295-306.
- Özden A (2008) “Yoğurdun tarihi”, *Güncel Gastroenteroloji Dergisi*, 12(2): 128-133.
- Özteber M (2013) Fermente Süt Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
- Özyurt Ş (2005) Doğal (Yerel) *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Suşlarında Endüstriyel Öneme Sahip Özelliklerin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- Pourahmad R, Assadi MM (2007) “Used Of Isolated Autochthonous Starter Cultures in Yogurt Production”, *Int. J. Dairy Technology*. 60: 259- 262.
- Peighambardoust SH, Tafti AG and Hesari J (2011) “Application of Spray Drying For Preservation of Lactic Acid Starter Cultures: A Review”, *Trends in Food Science & Technology*, 22(5): 215-224.
- Pektaş S (2014) Süt ve Süt Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Ekzopolisakkarit Üretim Yeteneklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

- Petti S, Tarsitani G and D'Arca AS (2001) "A Randomized Clinical Trial of The Effect of Yoghurt On The Human Salivary Microflora", Archives of Oral Biology, 46(8): 705-712.
- Radke-Mitchell L and Sandine WE (1984) "Associative Growth and Differential Enumeration of Streptococcus Thermophilus and Lactobacillus Bulgaricus: A Review", Journal of Food Protection, 47(3), 245-248.
- Randazzo LR, Restuccia C, Romaro DA and Caggia C (2004) "*Lactobacillus casei*, Dominant Species in Naturally Fermented Sicilian Green Olives", International Journal of Food Microbiology, 90: 9-14.
- Reddy G, Altaf MD, Naveena BJ, Venkateshwar M and Kumar EV (2008) "Amyolytic Bacterial Lactic Acid Fermentation-A Review", Biotechnology Advances, 26(1): 22-34.
- Sanlibaba P ve Çakmak GA (2016) "Exopolysaccharides Production by Lactic Acid Bacteria", Applied Microbiology, 2.2: 1000115.
- Salminen S and Von Wright A (2004) Lactic Acid Bacteria: Microbiological And Functional Aspects CRC Press, New York.
- Schwab C, Mastrangelo M, Corsetti A and Gänzle M. (2008) "Formation of Oligosaccharides and Polysaccharides by *Lactobacillus reuteri* LTH5448 and *Weissella cibaria* 10M in Sorghum Sourdoughs", Cereal Chemistry, 85(5): 679-684.
- Singh S, Goswami P, Rameshwar S, Heller KJ (2009) "Application of Molecular Identification Tools For Lactobacillus, with A Focus On Discrimination Between Closely Related Species: A Review", Food Science and Technology 42: 448- 457.
- Smitinont T, Tansakul C, Tanasupawat S, Keeratipibul S, Navarini L, Bosco M and Cescutti P (1999) "Exopolysaccharide-Producing Lactic Acid Bacteria Strains From Traditional Thai Fermented Foods: Isolation, Identification and Exopolysaccharide", Characterization International Journal of Food Microbiology, 51(2-3), 105-111.
- Soomro AH, Masud T and Anwaar K (2002) "Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health-A Review", Pakistan Journal of Nutrition, 1(1), 20-24.
- Soyuçok A, Teslime E ve Kılıç GB (2016) "Ekzopolisakkaritlerin Özellikleri ve Gıda Sanayindeki Önemi", Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi, 5, 332-344.
- Tabak R (2018) Geleneksel Yoğurtlardan Starter Bakterilerin İzolasyonu, Moleküler Tanımlanması ve Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Tavşanlı H (2015) Geleneksel Tekniklerle Üretilen Yoğurtlardan ve Doğadaki Bitkisel Örneklerden Yoğurt Kültürlerinin İzolasyonu İdentifikasyonu ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

- Temelli S and Çetin E (2011) “Gıdalarda Patojen Kontrolünde Bakteriyo faj Kullanımı /Use of Bacteriophages in Control of Food Pathogens”, Uludağ University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, 30(2), 45-52.
- Temiz A (1996) Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, Hatiboğlu Yayınları, Ankara.
- Tokatlı M (2013) Ankara Çubuk Yöresi Turşularından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmaları, Teknolojik ve Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi ve Starter Olarak Kullanılma Olanaklarının Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- Uzunsoy İ. (2018) Geleneksel Yoğurt Örneklerinden İzole Edilen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* suşlarının Endüstriyel Yoğurt Üretimine Uygunluğunun Saptanarak Starter Kombinasyonlarının Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Ünal Turhan E ve Erginkaya Z (2016) “Determination of Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria Isolates of Probiotic Foods”, Pamukkale University Journal of Engineering Sciences, 22(7), 620-624.
- Wieser A, Schneider L, Jung J and Schubert S (2012) “MALDI-TOF MS In Microbiological Diagnostics—Identification of Microorganisms and Beyond”, Applied Microbiology And Biotechnology, 93(3): 965-974.
- Wood BJ and Holzapel WHN (Eds.) (1992). The Genera of Lactic Acid Bacteria (Vol. 2). Springer Science & Business Media.
- Yaygın H (1981) “Yoğurdun Besleme Değeri ve Sağlıkla İlgili Özellikleri”, Gıda/The Journal Of Food, 6(5)
- Yerlikaya O (2014) “Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmasında Kullanılan Başlıca Fenotipik ve Moleküler Yöntemler”, Gıda ve Yem Bilimi-Teknolojisi Dergisi, 14:8-22
- Yetişemiyen A (2013) Süt Teknolojisi, 3. Baskı, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara
- Yılmaz R ve Temiz A (2003) “*Streptococcus salivarius* subs. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*’ un Klasik ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak Tanımlanması ve Karakterizasyonu”, Orta Mikrobiyol. Derg, 1(3), 19-42.
- Yılmaz S, Duyan S, Artuk C ve Diktaş H (2014) “Mikrobiyolojik Tanımlamada MALDI-TOF MS Uygulamaları”, TAF Preventive Medicine Bulletin, 13(5).
- Yörük G ve Güner A (2011) “Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması ve Weissella Türlerinin Gıda Mikrobiyolojisinde Önemi”, Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 6(2), 163-176.
- Yurdakök M (2013) “Pediatri Tarihi Yoğurdun Öyküsü, Probiyotiklerin Tarihi”, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 56: 43-60.

Yüce S (2017) Peynir ve Yoğurtlardan İzole Edilmiş Olan Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Teknolojik Özelliklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Burdur.

Zengin N (2012) Doğal Olarak Üretilen Yoğurtlardan İzole Edilen *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*'un Bakteriyosin Üretme Yeteneklerinin Belirlenmesi ve Ürettikleri Bakteriyosinlerin Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Zhou T, Huo R, Kwok LY, Li C, Ma Y, Mi Z and Chen Y (2019) “Effects of Applying *Lactobacillus Helveticus* H9 As Adjunct Starter Culture in Yogurt Fermentation and Storage”, Journal of Dairy Science, 102(1): 223-235.





EKLER

7. EKLER

EK A: CLSI Antibiyotik Kriterleri

Çizelge A.1. CLSI kriterlerine göre antibiyotik zon çapı standartları

Antibiyotik	Zon Çapları (mm)		
	Dirençli (R)	Orta Düzeyde Duyarlı (I)	Duyarlı (S)
Eritromisin	≤ 13	14-18	≥ 19
Trimethoprim	≤ 11	12-14	≥ 15
Nalidiksik asit	≤ 13	14-17	≥ 18
Siprofloksasin	≤ 13	14-18	≥ 19
Teikoplanin	≤ 10	11-13	≥ 14
Streptomisin	≤ 11	12-14	≥ 15
Rifampisin	≤ 14	15-17	≥ 18
Ampisilin	≤ 12	13-15	≥ 16
Sefotaksim	≤ 10	11-15	≥ 16
Ofloksasin	≤ 14	15-17	≥ 18
Klindamisin	14	15-20	21
Kloramfenikol	≤ 13	14-17	≥ 18
Tetrasiklin	≤ 14	15-18	≥ 19
Trimetoprim sülfametoksazol	≤ 11	12-14	≥ 15
Gentamisin	≤ 12	–	≥ 13
Vankomisin	≤ 14	15-16	≥ 17

EK B: İzolatların Antimikrobiyal Aktiviteleri

Çizelge B.1. İzolatların patojenlere karşı oluşturduğu inhibisyon çapları

İzolat Adı	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>
<i>Lb. helveticus</i> A1	9	(-)	(-)	>	5
<i>Lb. helveticus</i> A2	3	37	3	>	7
<i>Lb. delbrueckii</i> P1	9	47	3	>	6
<i>Lb. plantarum</i> P2	12	4	18	>	7
<i>Lb. delbrueckii</i> P3	3	18	4	>	1
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-2	4	>	5	31	5
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-3	5	>	5	43	6
<i>Lb. plantarum</i> P4	1	>	11	23	1
<i>Lb. delbrueckii</i> C1	(-)	>	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> C2	2	>	(-)	4	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> C3	(-)	>	(-)	3	3
<i>Lb. delbrueckii</i> C4	(-)	>	(-)	6	5
<i>Lb. delbrueckii</i> D1	(-)	5	3	21	4
<i>Lb. delbrueckii</i> D2	(-)	5	(-)	7	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> D3	(-)	26	(-)	3	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> D4	(-)	5	1	1	2
<i>Lb. delbrueckii</i> D5	4	43	4	3	5
<i>Lb. delbrueckii</i> E2	6	>	6	13	1
<i>Lb. delbrueckii</i> E2-2	4	>	6	11	6
<i>Lb. delbrueckii</i> E3	4	>	4	21	5
<i>Lb. delbrueckii</i> E4	4	>	3	21	3
<i>Lb. delbrueckii</i> E5	2	>	(-)	9	6
<i>Lb. delbrueckii</i> F3	1	>	(-)	2	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> F5	(-)	>	(-)	2	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> F6	(-)	>	(-)	7	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B4	(-)	>	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B6	2	>	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B7	(-)	>	(-)	3	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B8	(-)	>	(-)	18	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B9	1	>	(-)	13	4
<i>Lb. delbrueckii</i> B9-2	(-)	>	(-)	26	(-)
<i>E. faecalis</i> B10-2	(-)	>	(-)	(-)	2
<i>Lb. delbrueckii</i> B10-3	(-)	>	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B11-2	(-)	>	(-)	1	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B12	(-)	>	(-)	43	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B14	3	>	5	18	5
<i>Lb. fermentum</i> B15-2	(-)	>	3	19	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Y1	1	>	(-)	2	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Y1-2	(-)	>	(-)	18	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Y2	(-)	>	(-)	21	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Y3-2	(-)	>	(-)	14	(-)

Çizelge B.1 (devam)

<i>Lb. delbrueckii</i> Y4-2	(-)	>	(-)	1	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Y5	(-)	>	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. fermentum</i> Y15	16	>	18	11	21
<i>Lb. fermentum</i> Z1	2	>	18	52	23
<i>Lb. delbrueckii</i> Z3-3	1	>	3	21	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z4	3	>	(-)	34	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z4-3	4	>	2	9	4
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5	(-)	>	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-2	(-)	>	1	31	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-3	(-)	>	2	28	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-4	(-)	>	(-)	14	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6	(-)	>	(-)	8	3
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-2	(-)	>	(-)	1	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-3	(-)	>	(-)	2	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-4	(-)	>	3	2	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z7	(-)	>	(-)	1	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z8	(-)	>	3	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z8-2	(-)	>	3	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br1	(-)	>	(-)	8	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br1-2	(-)	>	(-)	5	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br6	(-)	>	(-)	1	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br7-2	(-)	>	(-)	2	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br11	(-)	>	(-)	2	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br12	(-)	>	(-)	>	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br12-2	(-)	47	(-)	>	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br15	(-)	>	(-)	4	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17	(-)	>	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17-2	(-)	38	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17-3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br18-2	(-)	04	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22	(-)	26	(-)	26	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22-2	(-)	42	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22-3	(-)	12	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br23	(-)	6	(-)	6	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br23-2	(-)	39	(-)	3	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25	(-)	41	(-)	2	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25-2	(-)	43	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25-3	(-)	>	(-)	4	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br26	(-)	53	(-)	29	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br29	(-)	1	(-)	18	2
<i>Lb. delbrueckii</i> Br29-2	(-)	25	(-)	2	4
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks7	(-)	41	(-)	(-)	2
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks9	(-)	27	(-)	6	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks9-2	(-)	9	(-)	3	(-)

(-): zon oluşumu yok, (>): 6 cm ve üzeri zon oluşumu, zon çapları mm olarak ölçülmüştür.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Şeyma Betül Kuloğlu
Doğum Yeri ve Tarihi : Kadıköy/ İstanbul 16/02/1993
Lisans Üniversite : Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Elektronik posta : betulkuloglu@hotmail.com
İletişim Adresi :
Yayın Listesi :
Ödüller :