

**SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNDEN PROBİYOTİK
BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU
VE TANIMLANMASI**

Tülay YİĞİT
Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Ocak-2009

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Tülay Yiğit'in “**Süt ve Süt Ürünlerinden Probiyotik Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması**” başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 18.12.2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Prof. Dr. MERİH KIVANÇ
Üye :	Prof. Dr. KIYMET GÜVEN
Üye :	Yard. Doç. Dr. BUKET KUNDUHOĞLU

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNDEN PROBİYOTİK BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE TANIMLANMASI

Tülay YİĞİT

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ
2009, 150 sayfa

Günümüzde süt, peynir ve kefir gibi probiyotik içeren gıdalara ve içerdikleri probiyotik strainlere olan ilgi artmıştır. Bu çalışmada 9 peynir, 1 kefir, 1 çiğ süt, 1 pastörize süt ve 1 anne sütü örneğinden toplam 209 adet bakteri izole edilmiştir. İzole edilen strainlerin antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiştir. Yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren 73 izolat belirlenmiştir. Seçilen 73 izolatın morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler yanında riboprinter sistem ile de tanımlaması yapılmıştır. Riboprinter sisteme göre izolatların 58'i *Enterococcus faecium*, 1'i *Enterococcus faecalis*, 1'i *Enterococcus durans*, 1'i *Lactobacillus fermentum*, 4'ü *Lactobacillus reuteri*, 1'i *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei*, 7'si *Pediococcus acidilactici* olarak tanımlanmıştır. Seçilen izolatların tanımlanmasında kullanılan riboprinter sistem ile biyokimyasal test sonuçları 53 izolatta birebir örtüşürken, 20 izolatta ise farklı tanımlama yapılmıştır. Probiyotik özellik gösteren bakterilerin seçimindeki kriterlerden biri asidik ortamda gelişebilmeleridir. Buna göre 73 izolattan 68'i pH 3'te, 60'ı pH 2'de, 39'u ise pH 1'de gelişim göstermiştir. 13 izolat ise pH 2'de canlılıklarını 24 saat süresince devam ettirmiştir. Ayrıca 73 izolattan 22 tanesi % 0,4 fenolde gelişmiştir. Seçilen izolatlardan 11'i kullanılan Siprofloksasin, Penisilin-G, Gentamisin, Netilmisin Sülfat ve Sefaklor'a karşı dirençli bulunurken; 7 izolat test edilen antibiyotiklerin tümüne karşı duyarlı olarak bulunmuştur. Yapılan testler sonucunda 41 izolatın laktik asit, proteolitik aktivite ve hidrojen peroksit miktarları sırasıyla 0,18-18,41 mg/ml, 0,23-2,04 mg/ml, 0,29-2,50 µg/ml arasında değişmiştir.

Anahtar Kelimeler: Probiyotik Bakterileri, Süt ve Süt Ürünleri, İzolasyon, Antimikrobiyal Aktivite

ABSTRACT**Master of Science Thesis****ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PROBIOTIC BACTERIA IN MILK AND MILK PRODUCTS****Tülay YİĞİT****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program****Supervisor : Prof. Dr. Merih Kıvanç
2009, 150 pages**

Nowadays, the attention increased to foods containing probiotics such as milk, cheese and kefir and probiotic strains of them. In this study, totally 209 strains of bacteria were isolated from 9 cheese, 1 kefir, 1 pasteurized milk, 1 raw milk and 1 suck products. These isolates were tested for antimicrobial activity and determined 73 isolates having antimicrobial activity. The identification of these 73 isolates were performed with morphologic, biochemical tests and also riboprinter system. According to riboprinter system result, 58 *Enterococcus faecium*, 1 *Enterococcus faecalis*, 1 *Enterococcus durans*, 1 *Lactobacillus fermentum*, 4 *Lactobacillus reuteri*, 1 *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei*, 7 *Pediococcus acidilactici* isolates were determined. Riboprinter system and biochemical test results were same for 53 isolates but no other 20 isolates. One of the criterions used for choice of bacteria having probiotic characteric is able to growth in acidic environment. Regarding these results, 68 isolates grew in pH 3, 60 isolates in pH 2, 39 isoltes pH 1 of totally 73 isolates. 13 isolates kept livelines in pH 2 during 24 hours. In addition, 22 isolates of 73 have able to grow in % 0,4 phenol. 11 isolates chosen were found as resist against Ciprofloxacin, Penicillin-G, Gentamycin, Netilmycin Sulphate and Cefaclor; 7 isolates were found as sensitive against to all of the antibiotics tested. As a result of all performed tests, amount of lactic acid, proteolytic activity and hydrogen peroxide produced by 41 isolates were found between 0,18-18,41 mg/ml, 0,23-2,04 mg/ml, 0,29-2,50 µg/ml respectively.

Keywords: Probiotic Bacteria, Milk and Milk Products, Isolation, Antimicrobial Activity

TEŞEKKÜR

Bu çalışmamın gerçekleşmesi sırasında bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren hocam Prof. Dr. Merih Kıvanç'a, laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımcı olan Uzman Erdoğan Çakır'a, Dr. Burçin Mutlu'ya, Araş. Gör. Meral Yılmaz'a ve Araş. Gör. Rasime Demirel'e, bana destek olan aynı ortamı paylaştığım tüm arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışmamı Uludağ Üniversitesi'nde de sürdürebilmemi ve laboratuvarın her türlü imkânından yararlanmamı sağlayan Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu Müdür Yardımcısı, Yard. Doç. Dr. Süreyya Saltan Evrensel'e ve Yard. Doç. Dr. Nur Yüksek'e ve laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan Laboratuvar Sorumlusu Pınar Akpınar'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca laboratuvarlarındaki cihazları kullanma imkânı sağlayan Hayvan Hastanesi Mikrobiyoloji A.B.D. Başkanı K. Tayfun Çarlı'ya, Prof. Dr. Mihriban Ülgen'e, gerekli ilgi ve yardımı esirgemeyen Dr. Esra Büyükcangaz'a, Araş. Gör. Kaan Önat'a, Araş. Gör. Serpil Kahya'ya ve Laboratuvar Teknisyeni Ayşe Şerikoğlu'na çok teşekkür ederim.

Ayrıca beni yetiştiren, her koşulda bana destek veren anneme ve daima yanımda olan eşime sonsuz teşekkür ederim.

Tülay YİĞİT

Ocak-2009

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x

1. GİRİŞ	1
1.1. Süt ve Süt Ürünlerinde Starter Kültürlerin Kullanımı	2
1.2. Probiyotik Tanımı ve Tarihi	3
1.3. Probiyotik Olarak Kullanılan Bakteriler	4
1.4. Probiyotik Bakterilerinin Genel Özellikleri	6
1.5. Probiyotik Bakterilerinde Aranılan Özellikler	7
1.6. Prebiyotikler	9
1.7. Probiyotik Bakterilerinin İnsan Sağlığı Üzerine Bilinen Etkileri	10
1.7.1. Beslenme açısından yararları	10
1.7.2. Bağırsak sistemi üzerindeki etkileri	10
1.7.3. Mide üzerindeki etkileri	11
1.7.4. Laktoz intolerans üzerindeki etkileri	12
1.7.5. Karaciğer rahatsızlıklarına etkisi	12
1.7.6. Böbrek rahatsızlıklarını iyileştirme etkisi	13
1.7.7. İdrar yolları enfeksiyonu üzerine etkisi	13
1.7.8. Zehirlenme üzerine etkisi	14
1.7.9. Antibiyotik üzerine etkisi	14
1.7.10. Radyoaktivite zararları üzerine etkisi	14
1.7.11. Deri üzerine olumlu etkisi	15
1.7.12. Kolesterol düşürücü etkisi	15
1.7.13. Bağışıklık sistemine etkisi	16

1.7.14. Antikanserojenik etkisi	17
1.7.15. Antimikrobiyal etkisi	18
1.7.16. Protein metabolizmasını iyileştirme etkisi	19
1.7.17. Ömrün uzaması üzerine etkisi	19
1.7.18. Ağız ve diş sağlığı üzerine etkileri	20
1.8. Probiyotik Bakterilerinin Hayvan Sağlığı ve Beslemesi	
Üzerine Etkileri	20
1.9. Probiyotik Bakterileri Tarafından Üretilen Metabolik Ürünler	20
1.9.1. Laktik asit	20
1.9.2. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	21
1.9.3. Diasetil ve asetaldehit	22
1.9.4. Proteolitik aktivite	23
1.9.5. Lipolitik aktivite	23
1.9.6. Bakteriyosin üretimi	24
1.9.7. Ekstraselüler polisakkarit (EPS) üretimi	26
2. MATERYAL VE METOD	28
2.1. Materyal	28
2.1.1. Süt ve süt ürünü örneklerinin temini ve laboratuvara	
getirilmesi	28
2.1.2. Test mikroorganizmaları	28
2.1.3. Besi ortamları	29
2.1.3.1. Arjinin dihidrolaz broth (D2935 Fluka).....	29
2.1.3.2. Beyin kalp infusion (BHI) yumuşak agar (53286 Sigma).....	29
2.1.3.3. Mueller hinton agar (70191 Fluka).....	29
2.1.3.4. M17 agar (1.15108 Merck).....	30
2.1.3.5. Glikoz ilaveli M17 agar, laktoz ilaveli M17 agar, fruktoz	
ilaveli M17 agar ve sükröz ilaveli M17 agar	30
2.1.3.6. M17 agar % 6,0 tuz ilaveli	30
2.1.3.7. M17 agar % 7,5 tuz ilaveli	31
2.1.3.8. M17 agar % 10 tuz ilaveli	31
2.1.3.9. M17 broth	31

2.1.3.10. M17 broth % 0.4 fenol ilaveli	32
2.1.3.11. MRS agar (Lactobacillus Agar acc. To DEMAN, ROGOSA and SHARPE) (1.10660 Merck).....	32
2.1.3.12. Glikoz ilaveli MRS agar, laktoz ilaveli MRS agar, fruktoz ilaveli MRS agar ve sükroz ilaveli MRS agar	32
2.1.3.13. MRS agar–NNLP	33
2.1.3.14. MRS agar–LP	33
2.1.3.15. MRS agar % 6,0 tuz ilaveli	33
2.1.3.16. MRS agar % 7,5 tuz ilaveli	33
2.1.3.17. MRS agar % 10 tuz ilaveli	34
2.1.3.18. MRS broth (69962 Fluka)	34
2.1.3.19. MRS broth % 0.4 fenol ilaveli	34
2.1.3.20. MR-VP broth	35
2.1.3.21. Nutrient agar (N 9405 Sigma)	35
2.1.3.22. Glikoz ilaveli Nutrient agar, laktoz ilaveli Nutrient agar fruktoz ilaveli Nutrient agar ve sükroz ilaveli Nutrient agar	35
2.1.3.23. Nutrient agar–salicin	35
2.1.3.24. Nutrient agar % 6,0 tuz ilaveli	36
2.1.3.25. Nutrient agar % 7,5 tuz ilaveli	36
2.1.3.26. Nutrient agar % 10 tuz ilaveli	36
2.1.3.27. Nutrient broth (03856 Fluka)	36
2.1.3.28. Nutrient broth % 0.4 fenol ilaveli	37
2.1.3.29. Üç şekerli demir agar (1.03915 Merck)	37
2.1.4. Kullanılan Boyalar	38
2.1.4.1. Kristal violet	38
2.1.4.2. Safranin	38
2.1.4.3. Lugol	38
2.1.5. Kullanılan Çözeltiler	39
2.1.5.1. Fizyolojik tuzlu su	39
2.1.5.2. % 20'lik gliserol çözeltisi	39
2.1.5.3. Laktik asit miktar tayini için standart çözelti	39

2.1.5.4. Laktik asit miktar tayini için standart A çözeltisi	39
2.1.5.5. Laktik asit miktar tayini için standart B çözeltisi	40
2.1.5.6. Laktik asit miktar tayini için standart C çözeltisi	40
2.1.5.7. Laktik asit miktar tayini için renk ayırıcı	40
2.1.5.8. Proteolitik aktivite tayini için standart çözelti	40
2.1.5.9. 0,72 N Trikloroasetik asit çözeltisi	41
2.1.5.10. Na ₂ CO ₃ . Na ₄ P ₂ O ₇ çözeltisi	41
2.1.5.11. Fenol ayırıcı	41
2.1.5.12. Hidrojen peroksit tespiti için standart çözeltisi	41
2.1.5.13. 1 N H ₂ SO ₄ çözeltisi	42
2.1.5.14. Amonyum molibden çözeltisi	42
2.1.5.15. Potasyum iyodür çözeltisi	42
2.1.5.16. Sodyum fosfat tamponu	42
2.1.5.17. α-Naftol çözeltisi	43
2.1.5.18. % 40'lık NaOH çözeltisi	43
2.1.6. Kullanılan antibiyotikler	43
2.2. Metot	43
2.2.1. Süt ve süt ürünlerinden probiyotik bakterilerinin izolasyonu	43
2.2.2. İzole edilen laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktivite tespiti	44
2.2.3. İzolatların hücresiz filtratlarındaki antimikrobiyal madde üzerine bazı enzimlerin etkisi	45
2.2.4. Probiyotik bakteri izolatlarının tanımlanması	47
2.2.4.1. Gram boyama	47
2.2.4.2. Katalaz testi	47
2.2.4.3. % 6,0 % 7,5 ve % 10,0 NaCl'de gelişme	48
2.2.4.4. Farklı sıcaklıklarda gelişme.	48
2.2.4.5. pH 3,9'da gelişme	48
2.2.4.6. H ₂ S üretimi	49
2.2.4.7. Arjinin NH ₃ oluşumu	49
2.2.4.8. Voges-Proskauer testi	49
2.2.4.9. İzolatların API CHL50 ve API 20 Strep sistemiyle	

biyokimyasal testlerinin yapılması	50
2.2.4.10. İzolatların riboprinter sistem ile tanımlanması	51
2.2.5. Antibiyotik duyarlılık testi	52
2.2.6. Ekstraselüler polisakkarit (EPS) üretimi	53
2.2.7. Metabolik ürünlerin belirlenmesi	53
2.2.7.1. Laktik asit üretiminin tayini	54
2.2.7.2. Proteolitik aktivitenin tayini	55
2.2.7.3. Hidrojen peroksit üretiminin tayini	56
3. BULGULAR	57
3.1. Süt ve Süt Ürünlerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	57
3.2. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktivitesi	58
3.3. İzolatların Hücresiz Filtratlarındaki Antimikrobiyal Madde Üzerine Bazı Enzimlerin Etkisi	74
3.4. Süt ve Süt Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	86
3.5. Seçilen İzolatların API CHL50 VE API 20 Strep Sistemi ile Tanımlanması	88
3.6. İzolatların Riboprinter Sistem ile Tür Düzeyinde Tanımlanması	102
3.7. İzolatların Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi	111
3.8. Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları	114
3.7. EPS Üretimi	115
3.8. Süt ve Süt Ürünlerinden İzole Edilen Probiyotik Bakteri İzolatlarının Metabolik Ürünlerinin Tespiti	117
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	120
KAYNAKLAR	135

ŞEKİLLER DİZİNİ

3.1.	Saf filtratların <i>Bacillus subtilis</i> üzerine olan antimikrobiyal aktivitesi. Şekil üzerindeki: İ1, İ2, İ3, İ4, İ5, İ6, İ7, İ8, İ9, İ10	73
3.2.	Saf filtratların <i>Staphylococcus aureus</i> üzerine olan antimikrobiyal aktivitesi. Şekil üzerindeki: İ1, İ2, İ3, İ4, İ5, İ6, İ7, İ8, İ9, İ10	73
3.3.	Süt ve kefir örneklerine ait riboprinter sisteminden edilen bant profilleri ile yedi türe ait standart bant profilleri	103
3.4.	Peynir örneklerine ait riboprinter sisteminden elde edilen bant profilleri ile dört türe ait standart bant profilleri	104
3.5.	D25 (<i>Enterococcus faecium</i>), izolatının ışık mikroskopunda görüntüsü. Büyütme; 100X, Boyama yöntemi; gram boyama	109
3.6.	M47 (<i>Pediococcus acidilactici</i>), izolatının ışık mikroskopunda görüntüsü. Büyütme; 100X, Boyama yöntemi; gram boyama	109
3.7.	M41 (<i>Lactobacillus reuteri</i>) izolatının ışık mikroskopunun görüntüsü. Büyütme; 100X, Boyama yöntemi; gram boyama	110
3.8.	S82 (<i>Lactobacillus fermentum</i>) izolatının ışık mikroskopunun görüntüsü. Büyütme; 100X, Boyama yöntemi; gram boyama	110
3.9.	Laktik asit miktarı standart eğrisi (MRS 400nm)	117
3.10.	Proteolitik aktivite standart eğrisi (650nm)	118
3.11.	Hidrojen peroksit üretimi standart eğrisi (350 nm)	118

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1.	Probiyotik olarak kullanılan bakteriler (Yılsay ve Kural, 2000; Goktepe ve ark., 2006)	5
2.1.	Test mikroorganizmaları (NRRL: Northern Regional Research Laboratory of USDA, Peoria, Illinois, USA. ATCC: American Type Culture Collection, USA)	28
3.1.	Elde edilen izolatların kaynakları, sayıları ve gelişim gösterdikleri besiyerleri	57
3.2.	Laktik asit bakteri izolatlarına ait saf filtratların test mikroorganizmaları üzerine etkisi (sonuçlar mm cinsindedir. A: Dirençli strain var)	60
3.3.	Bazı enzimlerin antimikrobiyal aktivite gösteren madde üzerine etkisi	75
3.4.	Süt ve süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin bazı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri	89
3.5.	Seçilen izolatların EcoRI kullanılarak yapılan ribo grupları ve benzerlik oranları	105
3.6.	Seçilen izolatların riboprinter sistem ve biyokimyasal testlere göre yapılan tanımlanması	107
3.7.	Seçilen izolatların pH 1, 2, 3 ve % 0,4'lük fenolde gelişme durumu	112
3.8.	Seçilen izolatların antibiyotik duyarlılık testi (Sonuçlar mm cinsinde verilmiş demektir. R: dirençli demektir).....	114
3.9.	Farklı şeker içeren ortamlarda seçilen izolatların EPS üretme durumu	116
3.10.	Süt ve süt ürünlerinden izole edilen probiyotik bakteri izolatlarının metabolik ürünlerinin miktarı	119

1. GİRİŞ

Son yıllarda çalışan kesimin artması, geçim sıkıntısı, olumsuz çevre koşulları, kontrolsüz ve sağlıksız gıdaların kullanımıyla insanların yaşamları riske girmiştir. Kullanılan birçok ilaç ve antibiyotikler, canlıların sindirim sistemindeki mikro floradaki dengeyi bozmakta, birçok organda uzun sürede onarılamayacak birçok rahatsızlığa sebep olmaktadır. Potansiyel patojenler ortamda baskın duruma gelerek bağırsak, vajina, böbrek gibi önemli organlarda enfeksiyonların oluşumunu hızlandırmaktadır. Antibiyotiklere duyarlı olan laktik asit bakterilerinin sayısı azaldığından bağırsak reaksiyonu değişmekte, ortama patojen mikroorganizmalar hakim olmaktadır. Oysa gerek gelişme faktörü olarak, gerekse hastalıkların iyileştirilmesi amacıyla antibiyotiklerin yerine organizmadaki metabolik faaliyetleri olumlu yönde etkileyen, destekleyen doğal ürünler olan probiyotikler, bir alternatif olarak kullanılabilir. Böylece intestinal mikroflora stabilitesi sağlanarak, uygun şekilde yönlendirilerek, olumsuzluk ve sakıncaları teşvik etmeden antibiyotiklerin zararlı etkileri de engellenmiş olmaktadır (Kılıç, 2001).

Probiyotiklerin yararlı etkilerini içine alan mekanizmalar, antibakteriyel bileşikler üretilen besinler için veya kolonizasyon bölgeleri için yarışarak patojen bakterileri baskı altında tutmaktadırlar (Kılıç, 2001).

Probiyotik bakterilerinin gıda ve sağlık alanındaki önemi, bu bakterilerin süt ve süt ürünlerinde, doğal koşullarda yaygın olarak bulunması, antimikrobiyal özellik göstermesi ve bakteriyosin üretme potansiyellerinin yüksek olması gibi sebepler göz önüne alınarak bu çalışmada süt ve süt ürünlerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu; antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenip yüksek aktiviteye sahip olanların tanımlanması, probiyotik bakteri özelliği gösterebilecek izolatların seçimi hedeflenmiştir.

1.1. Süt ve Süt Ürünlerinde Starter Kültürlerin Kullanımı

Süt ürünlerinin, özellikle fermente sütlerin bilinmesi, antik çağlara dek uzanmaktadır. Başlangıçta fermente sütler çiğ süte bulaşan mikroorganizmalar ya da süt kaplarında kalan, sütün doğal florasını oluşturan bakterilerin etkisiyle oluşmuştur. Starter kültürlerin ilk kullanımının üzerinden yaklaşık 100 yıl geçmiştir. Storch, Kopenhag'da Weigmann, Kiel'de birbirlerinden bağımsız olarak ekşi krema ve peynir altı suyundan peynir üretiminde laktik asit ve diasetil üretiminden sorumlu olan mezofilik laktik asit bakterilerini izole etmeyi başarmışlardır. Günümüzde tüm dünya ülkelerinde fermente sütler, krema olgunlaştırma ve değişik peynir çeşitlerinin üretiminde dominant olarak laktokok türleri kullanılmakta, bazı peynir çeşitleri ile süt içeceklerinin yapımında mezofil laktobasillerden de yararlanılmaktadır. Bunlar asitlik oluşturdukları gibi proteolitik aktif bakterilerdir. Hatta bazıları probiyotik özelliğe de sahiptir (Kılıç, 2001).

Yapılan çalışmalarda *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* bakterilerinin çeşitli suşlarının destek kültür olarak cheddar peynirinde kullanımında olumlu sonuçlar verdiği görülmüştür (Gürsoy ve Kınık, 2006).

Yoğurt, tereyağı, peynir gibi süt ürünlerinin kendine özgü yapıları ile beğenilen tat ve aromalarının oluşmalarını sağlamak amacıyla kullanılan, istenen özelliklere sahip saf mikroorganizma kültürlerine saf kültür veya starter kültür denilmektedir (Kılıç, 2001).

Yoğurt ve benzeri ürünler ile sert ve pıhtısı pişirilen peynirlerin yapımında yararlanılan termofilik laktik kültürler ise *Lactobacillus delbruecki* spp. *bulgaricus* ve *Lactobacillus delbruecki* spp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus* ile *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus*'tan oluşmaktadır (Kılıç, 2001). Oumer (2001) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var *diacetylactis* ve *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* içeren ticari starter kullanılarak inek ve koyun sütü karışımından yarı sert bir İspanyol peyniri olan Hispanico peyniri üretmiştir.

Lactobacillus paracasei spp. *paracasei*, bir çok peynir türünün doğal laktik florasında başlıca laktik asit bakterisi olarak bulunabilmektedir. *L. paracasei* spp. *paracasei* suşları esas olarak probiyotik mikroorganizmalardır (Gürsoy ve Kınık, 2006).

Kefir kültüre edilmiş, birçok sağlık unsuru içeren ayran benzeri bir içecektir. Kefir, taneleri sütü fermente edici rol oynar, en önemli özelliği fermentasyon sonunda süzülerek tekrar kullanılabilmesidir. Çok karışık bir mikrobiyolojik yapıya sahiptir (Garotte ve ark., 2001).

1.2. Probiyotik Tanımı ve Tarihi

Probiyotikler, mide–barsak yolları mikroplarının metabolik aktivitesini ya da oluşumunu etkileyerek konakçı üzerinde olumlu etki bırakan, gıda maddeleri, canlı mikrobikler ya da diyet ekleridir. Probiyotikler, fermentasyon sonunda elde edilen diyetetik ve terapötik etkili ürünlerdir (Karahana ve Çakmakçı, 1996).

Probiyotik terimi, ilk kez Lilley ve Stilwell (1965) tarafından kullanılmış, Metchnikoff'un (1908) çalışmalarından ortaya çıkmıştır. Metchnikoff, Balkan köylülerinin belirgin bir şekilde uzun ömürlü olmasının nedeninin, *Lactobacillus delbrueckii* alt türü *bulgaricus* ile mayalanmış süt tüketmeleri olduğunu ortaya koymuştur (Arda ve ark., 1992; İnal, 1990; Yaman, 2000).

Probiyotik kelimesi bugün kullanıldığı anlamı ile ilk kez 1974 yılında Parker tarafından kullanılmıştır. Dr. R.Fuller ve Dr. C.B. Cole tarafından “Bağırsaklarda mikrobiyal dengeyi olumlu yönde arttırıcı etkileri olan canlı besin kaynağı” olarak tanımlanmıştır (Toklu, 1999). Fuller, probiyotikleri yeniden “konakçının intestinal mikroflorasının gelişimini teşvik eden canlı mikrobiyal katkı maddeleri” olarak tanımlamıştır. Bu tanımda güçlü bir probiyotik etki için canlı hücre varlığının önemi özellikle vurgulanmaktadır. Huisin't Veld ve Havenaer, bu tanımları genişletmişler ve probiyotik ürünlerin canlı mikroorganizma içermesi gerektiğini ve tüketilmeleri sonucunda ağızda, gastüregenital kanallarda, üst solunum kanallarında ya da üregenital kanallarda yararlı etkiler yapmak yoluyla konakçının sağlığında iyileşmeye neden olduklarını ifade etmişlerdir. Bu araştırmacılar probiyotikleri insan ya da hayvan tarafından alınan canlı tek ya da

karışım mikroorganizma kültürleri olarak tanımlamaktadırlar (Özer ve Akalın, 2000).

Probiyotik mikroorganizmaların bir kısmı insan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan fermente süt ürünlerinin (yoğurt, kefir, kımız, peynir gibi) yapımında starter kültür olarak kullanılmaktadır (Arda ve ark., 1992; İnal, 1990; Yaman, 2000).

İlk probiyotik yoğurt ürünleri 1980'lerin başında Avrupa'da piyasaya çıkarılmıştır. Gelişen gıda teknolojileri ile birçok gıda ürünlerine de ilave edilmeye (meyve suları, içilebilir süt, bazı peynir çeşitleri, dondurma, sakız, fermente süt ürünleri, kahvaltılık tahıllar, soya sütü ürünleri ... gibi) başlanmıştır (Karahana ve Çakmakçı, 1996; Kılıç, 2001; Goktepe ve ark., 2006).

1.3. Probiyotik Olarak Kullanılan Bakteriler

Probiyotikler esas olarak laktik asit bakterileridir. Yoğurt yapımında kullanılan mikroorganizmalar (*Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*) dışında tüm laktik asit bakterileri bağırsak florası elemanlarıdır. Bir probiyotik ürün, bu organizmalardan bir ya da birkaçını içerebilmektedir (Yılsay ve Kurdal, 2000).

Probiyotik olarak en sıklıkla kullanılan bakteriler laktik asit bakterileri (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*) ve *Bifidobacterium* strainleridir. Ancak bu türlerin tüm strainleri probiyotik olarak kullanmak için uygun değildir. Probiyotik bakteriler türe değil, suşa bağlıdır. Bir probiyotik bakterinin sağlık üzerine yararlı etkisi sadece o suşa aittir. Bunlar bağırsaklarda ve birçok fermente süt ürünlerinde doğal olarak bulunmaktadır. Gıda, insan ve hayvan kaynaklı izolatların çoğunlukla *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerini içerdiği görülmüştür. Güvenlik ve fonksiyonallite ile ilgili özelliklerin suşa spesifik olması nedeniyle gıda ya da probiyotik preparasyonların hazırlanmasında kullanılacak enterokokların suş bazında dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir (Kılıç, 2001; Vancanneyt ve ark., 2002).

Probiyotik olarak kullanılan bakteriler Çizelge 1.1.'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Probiyotik olarak kullanılan bakteriler (Yılsay ve Kurdal, 2000; Goktepe ve ark., 2006).

Lactobacillus türleri	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
	<i>Lactobacillus lactis</i>
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Lactobacillus reuteri</i>
	<i>Lactobacillus brevis</i>
	<i>Lactobacillus casei</i>
	<i>Lactobacillus curvatus</i>
	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
	<i>Lactobacillus helveticus</i>
	<i>Lactobacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	
Bifidobacterium türleri	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
	<i>Bifidobacterium breve</i>
	<i>Bifidobacterium infantis</i>
	<i>Bifidobacterium longum</i>
	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>
Bacillus türleri	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Bacillus pumilis</i>
	<i>Bacillus lentus</i>
	<i>Bacillus licheniformis</i>
	<i>Bacillus coagulans</i>
Pediococcus türleri	<i>Pediococcus cerevisiae</i>
	<i>Pediococcus acidilactici</i>
	<i>Pediococcus pentoseceus</i>
Streptococcus türleri	<i>Streptococcus cremoris</i>
	<i>Streptococcus thermophilus</i>
	<i>Streptococcus intermedius</i>
	<i>Streptococcus lactis</i>
	<i>Streptococcus diacetylactis</i>
Bacteriodes türleri	<i>Bacteriodes capillus</i>
	<i>Bacteriodes juis</i>
	<i>Bacteriodes ruminicola</i>
	<i>Bacteriodes amylophilus</i>
Propionibacterium türleri	<i>Propionibacterium shermanii</i>
	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
Leuconostoc türleri	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Enterococcus türleri	<i>Enterococcus faecium</i>
	<i>Enterococcus faecalis</i>

Probiyotik süt ürünlerinin hazırlanmasında en çok kullanılan bakteri türleri *L. acidophilus* ile *Bifidobacterium bifidus*, *Bifidobacterium longum* ve *Bifidobacterium breve*'dir (Kılıç, 2001; Goktepe ve ark., 2006).

1.4. Probiyotik Bakterilerinin Genel Özellikleri

Gram pozitif basil ve koklardan oluşan laktik asit bakterileri Firmicutes filumuna ait çeşitli bakteri cinslerinden oluşmaktadır. Spor oluşturmayan ve katalaz negatif olan bu grubun önemli cinsleri arasında *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weisella* yer almaktadır. Bütün laktik asit bakterileri anaerobik koşullar altında gelişebilmektedir. Pek çok anaerobik bakterinin tersine oksijene karşı duyarlı değildirler, oksijen varlığında da gelişebilmektedirler. Bu nedenle aerotolerant anaerob mikroorganizmalar olarak adlandırılmaktadır (Beasley, 2004; Gürsoy ve Kınık, 2005; Madigan ve Matrinko, 2006).

Çoğu mezofilik mikroorganizmalardır. Ancak bazıları 5 °C'nin altında, termofilik türleri ise optimum 45 °C gibi yüksek sıcaklıklarda gelişebilmektedirler. Bu mikroorganizmaların çoğu optimum 4-4,5 pH'da gelişebilmelerine rağmen 3,2 gibi düşük, 9,6 gibi yüksek pH'larda gelişebilmektedir. Bu mikroorganizmaların bazıları zayıf proteolitik ve lipolitik özelliğe sahiptir (Holt ve ark., 2000).

Fermentasyon sonucu ana ürün olarak laktik asit üreten bu bakterilerde enerji eldesi substrat düzeyinde fosforilasyon ile gerçekleşmektedir. Karbonhidrat metabolizmaları göz önüne alındığında homofermentatif ve heterofermentatif olarak iki alt gruba ayrılmaktadır. Homofermentatif türler glikozdan tamamen laktik asit oluştururken heterofermentatif türler ek olarak karbondioksit ve bazı organik asitler üretirler. Fenotipik özellikleri baz alınarak yapılan değerlendirmede *Thermobacterium*, *Streptobacterium*, *Betabacterium* şeklinde üç alt gruba ayrılır. Günümüzde gelişen moleküler biyoloji teknikleri 16S rRNA sekans analizlerinden laktik asit bakterileri için fenotip temelli sınıflandırmanın uygun olmadığı gözler önüne serilmektedir (Beasley, 2004; Gürsoy ve Kınık, 2005; Madigan ve Matrinko, 2006).

Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkisinin laktik asit, hidrojen peroksit, asetik asit, hidrojen sülfür, bakteriyosin ya da bakteriyosin benzeri maddelerden meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu nedenle de farklı türden

gıdaların besin değerinin arttırılmasında ve raf ömrünün uzatılmasında, medikal alanda da intestinal enfeksiyonların ve bazı kanser tiplerinin kontrolünde kullanımı son yıllarda giderek önem kazanmıştır (Gilliand, 1990; Lewus ve ark., 1991).

1.5. Probiyotik Bakterilerinde Aranan Özellikler

Probiyotik bakteriler bağırsaklarda canlılığını koruyabilen, insan sağlığına faydalı bakterilerdir. Bu bakteriler bağırsak yüzeyine tutunarak enterik enfeksiyon riskini azaltırlar ve metabolizmaya yardımcı olurlar. Bazı toksik gıda bileşenlerini parçalayarak ve istenmeyen mikroorganizmaların zararlı metabolitler oluşturmalarını önleyerek sağlıklı bir yaşamın devamını mümkün kılmaktadırlar. Ayrıca bu bakterilerin laktoz hidrolizi, serum kolesterol düzeyinin azaltılması, kolon kanserinin önlenmesi, bağışıklık sisteminin uyarılması gibi faydaları vardır. Temel besleyici özellikleri dışında vücudumuza fizyolojik yararlar sağlayan, kronik hastalıklar riskini azaltabilen besinlere fonksiyonel besinler adı verilmektedir. Probiyotik ilaveli gıdalarda bu kapsama alınmıştır. Fonksiyonel gıda çerçevesinde, gıda teknolojisi uzmanlarının besleyici özelliği artırılmış probiyotik ürünlerinin üretilmesine yönelik çalışmaları artmıştır (Erkmen, 2000). Bütün bu araştırmalar çerçevesinde probiyotik olarak kullanılan, bakterilerde aranan özellikler Yılsay ve Kurdal (2000) tarafından aşağıda belirtildiği şekilde sıralanmaktadır:

- Güvenilir olmalıdır, kullanıldığı insan ve hayvanda yan etki oluşturmamalıdır.
- Normal insan bağırsağı kökenli olmalıdır.
- Stabil olmalıdır, düşük pH ve safra tuzları gibi olumsuz çevre koşullarından etkilenmeden bağırsakta metabolize olmalıdır.
- Bağırsak hücrelerine tutunabilmeli ve kolonize olabilmelidir.
- Kanserojenik ve patojenik bakterilere antagonist etkili olmalıdır.
- Antimikrobiyal maddeler üretmelidir.
- Konakta hastalıklara direnç artışı gibi yararlı etkiler oluşturma yeteneğinde olmalıdır.

- Antibiyotiklere dirençli olmalıdır. Antibiyotiğe bağlı (diyare) ortaya çıkan hastalıklarda bağırsak florasını düzeltmek amacıyla kullanılabileceğinden, bağırsaktaki antibiyotiklerden etkilenmemelidir.
- Minimum etki dozları bilinmediğinden, canlı hücrelerde büyük miktarda bulunabilmelidir.
- Üretim ve depolama sırasında canlılığını ve aktivitelerini koruyabilmelidir.
- Kesinlikle patojenlerle kontamine olmaması ve patojenik özelliğe sahip olmaması gerekmektedir.

Yukarıdaki kriterler ırk seçimi için kullanılmış ya da kullanılması tavsiye edilmiştir. Tavsiye edilen probiyotik kültürün ürün içerisindeki minimum miktarının mililitrede 10^7 cfu olması istenmektedir (Ross ve ark., 2005; Gürsoy ve Kınık, 2006).

Probiyotikler, insan ve hayvanların bağırsak sisteminin mikrobiyal dengesini iyileştirerek yararlı etkiler göstermektedir. Bu mikroorganizmalar, büyük bir grup olan bağırsak sistemi florası ile rekabet etmek zorundadır. Bu sistemde bulunan mikrobiyal flora üzerine bir etki yapabilmek için mikroorganizmalar belli bir metabolizmaya sahip olmalıdır. Probiyotiklerin etkileri için özellikle üç mekanizma önerilmektedir (Yıldırım ve Yıldırım, 2000).

1. Patojen zararlı bakterilerin sayılarını azaltmak
 - a) Antimikrobiyal bileşikler üretmeleri
 - b) Besin elementleri için rekabet etmeleri
 - c) Kolonizasyon bölgeleri için rekabet etmeleri
2. Mikrobiyal metabolizmayı (enzimatik aktiviteyi) değiştirmek
 - a) Sindirim sistemine teşvik eden enzimlerin üretimi (örneğin laktaz)
 - b) Amonyak, amin veya toksik enzimlerin üretiminin azalması
 - c) Bağırsak duvarının fonksiyonlarını iyileştirmesi
3. Bağışıklık sistemini iyileştirmek
 - a) Antikor düzeyinin artması
 - b) Makrofaj aktivitenin artması

1.6. Prebiyotikler

Prebiyotikler, mide–barsak yollarındaki istenen konakçı organizmaların büyümesini tetikleyerek konakçıdan faydalanma potansiyeline sahip sindirilemeyen gıda maddeleridir. Barsak mikroflorasının bileşim ve aktivite ve aktivitesindeki olumsuz değişimleri minimum düzeye indirmek ve bunun bireye olan etkilerini sınırlamak için geliştirilen diyetetik yöntemler içinde öncelikle kullanılmaktadır. Prebiyotiklerin etkili olabilmesi için, sindirim sisteminin üst kısımlarında hidrolize ve absorbe olmaması, kalın bağırsağa geçerek orada barsak bakterileri tarafından kullanılabilmesi gerekmektedir (Akalin ve ark., 2000).

İnsan sütündeki oligosakkaritler (FOS) prebiyotiktir. Klinik deneyler göstermiştir ki mide–barsak yollarındaki bifidobakterileri tetiklemek için çeşitli oligosakkaritler kullanılabilir. İnülin, fruktooligosakkaritler (FOS), galaktooligosakkarit ve laktoz bu oligosakkaritlerin içerisinde yer almaktadır. Yapılan çalışmalara göre, oligosakkaritler göğüsten beslenen bebeklerin mide–barsak yollarındaki benzer düzeyde konakçı bifidobakterilerin büyümesini tetikleme potansiyeline sahiptir. İnülin ve FOS geniş çapta kullanılan prebiyotiklerdir. Bitkilerde büyük oranda görülen ve doğal olarak ortaya çıkan yaygın karbonhidrat bileşenleridir. Yüksek inülin konsantrasyonu içeren doğal kaynaklar arasında hindiba, enginar, soğan, sarımsak ve pırasa yer almaktadır. Oligosakkaritler yapısındaki prebiyotikler başta anne sütü olmak üzere birçok lifli gıdalarda (enginar, kereviz, pırasa, kuşkonmaz, muz) bulunmaktadır. Çoğu üretici ürünlere inülin ve FOS eklemektedir (İnanç ve ark., 2005).

Besin öğelerinin prebiyotik olarak kabul edilmesi için Yılmaz (2004) ve Yağcı (2005) tarafından aşağıda belirtildiği şekilde şu özellikleri taşıması gerekmektedir :

1. Mide ve ince bağırsakta hidrolize veya absorbe olmamalıdır.
2. Kolon mikroflorasındaki yararlı mikroorganizmalar için seçici olmalı ve çoğalmalarını uyarabilmelidir.
3. Florayı sağlıklı bir kompozisyon olacak şekilde değiştirmeli ve konak yararına olacak şekilde lokal ve sistemik etkiler yapmalıdır.

1.7. Probiyotik Bakterilerinin İnsan Sağlığı Üzerine Bilinen Etkileri

1.7.1. Beslenme açısından yararları

Bir gıdanın besleyici değeri içerdiği besin maddelerinin yeterli derecede sindirilebilir ve asimile olabilme özelliğine bağlıdır. Fermente süt ürünlerindeki besin maddeleri starter bakteriler tarafından bir ön fermentasyona uğradıklarından bunların besleyici değeri daha yüksek, sindirimleri süte göre daha kolaydır. Protein ve yağın kısmen parçalanması sindirilebilirliğini artırmaktadır. Fermente süt ürünlerinde bulunan kalsiyum ve bazı mineral maddelerin daha iyi absorbe edildiği ve çoğu ürünün folik asit, niasin, biotin, pantotenik asit, B6 ve B12 gibi B grubu vitaminleri açısından süte göre daha zengin olduğu belirlenmiştir. *Bifidobacterium* türlerinin tiamin, riboflavin ve K vitaminlerini sentezlediği tespit edilmiştir. *L. acidophilus* ve *Bf. bifidum* bakterileri içeren fermente süt ürünleri diğer ürünlerin çoğundan farklı olarak yüksek miktarda L (+) laktik asit içermektedir (Kılıç, 2001).

Laktoz diğer şekerlerden farklı olarak fizyolojik üstünlüğe sahiptir. Laktozun yapısındaki galaktozun beyin oluşumundaki glikolipitlerin kaynağını oluşturması laktoza ayrı bir önem vermektedir. Beyin gelişimiyle o canlının sütündeki laktoz miktarı arasında bir ilişkinin olduğu kabul edilmektedir. Ayrıca laktoz bağırsaklardaki istenmeyen mikroorganizmaları inhibe ederek bağırsak florasını geliştirici etki yapmaktadır. Ayrıca kalsiyum ve fosfordan daha iyi yararlanılmasını da sağlamaktadır (Kılıç, 2001).

1.7.2. Bağırsak sistemi üzerindeki etkileri

Probiyotik bakterilerin bağırsak enfeksiyonlarının kontrol altına alınmasındaki etkisi bağırsak patojenlerine karşı gösterdiği antagonistik etki sayesinde gerçekleşmektedir (Kılıç, 2001).

Probiyotik bakterilerin hem sindirim sistemine tutunabilmesi hem de patojen mikroorganizmaların gelişmesini inhibe edebilmesi mide ve bağırsak

rahatsızlıklarına karşı koruyucu ve tedavi edici bir ürün olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Kılıç, 2001).

Günümüzde tüm enfeksiyon tipleri için çeşitli antibiyotikler kullanılmakta, sindirim sistemi enfeksiyonlarında ağız yoluyla alınan antibiyotikler mikroflora dengesini bozmaktadır (Kılıç, 2001).

Probiyotik bakteriler bağırsak yüzeyine tutunarak istenmeyen bakterilerin tutunmasını engelleyerek, ürettikleri antimikrobiyal maddelerle de (asitler, bakteriyosinler, reutein gibi) bu bakterilerin çoğalmalarını kontrol altına almaktadırlar (Erkmen, 2000).

Probiyotik bakterilerin antimikrobiyal etkisi laktik asit, hidrojen peroksit ve antibiyotik benzeri maddelerin üretiminden kaynaklanmaktadır. Laktik asit ortamın pH'sını düşürerek diğer bakteriler için uygun olmayan bir durum yaratmaktadır. *L. acidophilus* Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı etkili olan asidofilin ve laktosidin adı verilen antimikrobiyal bileşikler üretmektedir. *Bf. bifidum*'un bifidin adı verilen bir antimikrobiyal madde ürettiği belirlenmiştir (Kılıç, 2001).

1.7.3. Mide üzerindeki etkileri

Midenin asidik ortamı (pH 2-3) *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* ve *Candida* sp. gibi mikroorganizmaların ve mayaların da bulunduğu bir mikrobiyal floranın gelişmesi için uygun bir ortam oluşturmaktadır. *Mycobacteria* gibi aside karşı dirençli türler ve *Salmonella* gibi mikroorganizmalar korunabilir ve mideden hızla geçerlerse daha uzun süre yaşayabilmektedirler (Kart, 2000).

Ülser ve gastrit gibi durumlarda taze, düşük asitli yoğurtlar çok faydalıdır. Bu hastalar sütü hazmedemedikleri halde yoğurttan iyi bir şekilde yararlanmaktadırlar. Yoğurt ülserin üzerinde bir tabaka oluşturarak hidroklorik asit etkisini azaltmaktadır. Yoğurtta fermentasyon esnasında üretilen antibiyotik ve antikanserojenik bileşenlerin mide kanseri tedavisinde de etkili olduğu belirtilmiştir. Nestle Araştırma Merkezi'nde LC 1 mayasının fizyolojik etki gösterebilmesinin koşulu olan mide asidi ve safra kesesi tuzlarına karşı

dayanıklılığının analizler sonucunda arttığı görülmüştür, bu mayanın mide-bağırsak sisteminde hayatta kalma oranının çok yüksek olduğunu ispatlamıştır (LC 1 mayası: *Lactobacillus johnsonii* La 1) (Akyıl, 1999).

1.7.4. Laktoz intolerans üzerindeki etkileri

Sütün başlıca karbonhidratı olan laktoz ya da süt şekeri yalnız sütte bulunur. Laktoz, glikoz ve galaktoz gibi iki monosakkarit birleşmesinden meydana gelmiş bir disakkarittir. İnce bağırsakta β -galaktosidaz denen laktaz enzimi ile kendisini oluşturan bu şekerlere parçalanmaktadır (Kılıç, 2001).

Laktaz enzimi sentezlenmediği zaman laktoz bağırsaklarda parçalanamaz ve kalın bağırsağa geçerek burada bulunan mikroorganizmaların etkisiyle parçalanır. Bu durum sindirim bozukluklarına, diyare, karın ağrısı ve kramplara ve hatta gaz oluşmasına neden olmakta ve literatürde laktoz intoleransı, laktoz malabsorpsiyonu ya da laktaz eksikliği gibi tanımlarla belirtilmektedir (Yılsay ve Kurdal, 2000).

Fermente süt ürünlerinde laktozun inkübasyon sırasında fermente olması ve starter olarak kullanılan bakteriler tarafından enzimin sentezlenmesi bu problemin büyük ölçüde ortadan kalkmasına neden olmaktadır (Özer ve Akalın, 2000).

Yoğurt bakterilerinde β -galaktosidaz enzimi mevcut olmasına rağmen, bu bakterilerin safraya dayanıklılığı olmadığı için bağırsaklarda yaşamaları ve gelişmeleri beklenmemektedir. Ancak safra hücre geçirgenliğini arttıracak β -galaktosidaz enziminin açığa çıkmasını ve laktozun hidrolize edilmesini sağlamaktadır. *L. acidophilus* ve *Bifidobacterium* türleri safra tuzlarına dayanıklı olduklarından, bağırsaklarda kolonize olabilmektedirler ve kolaylıkla laktozu metabolize etmektedirler (Kılıç, 2001).

1.7.5. Karaciğer rahatsızlıklarına etkisi

Probiyotik mikroorganizmaların karaciğer üzerine etkisi bilinmemektedir. Özellikle *Lactobacillus* türleri dalak, karaciğer ve akciğerde uzun süre canlı

kalabilmekte ve böylece *Salmonella* türlerinin sayısını azaltmaktadırlar (Karahan ve Çakmakçı, 1996).

Sindirim sistemindeki amonyak, fenoller, indol ve aktif aminler idrara karışmadan önce karaciğer tarafından ayrıştırılmaktadır. Karaciğer hastalandığı zaman bu işlemi yapamayacağından bu ürünler sirkülasyona girerek beyin için zararlı olabilecek düzeylere ulaşabilmektedir. Karaciğer fonksiyonunu yapamadığı durumda bu maddelerin vücuda alınması gerekmektedir. Probiyotik bakterilerin pH'yı düşürmesi amonyak ve fenol miktarının da düşmesine neden olmaktadır. Düşük pH'da bağırsaklardaki amonyak absorbe edilemeyen NH^{+4} (amonyum) halinde bulunmaktadır (Kılıç, 2001; Akalın ve ark., 2000).

1.7.6. Böbrek rahatsızlıklarını iyileştirme etkisi

Böbrek fonksiyonundaki aksaklıklar metabolik anormalliklerde (örneğin; amonyak ve aminlerde) bir artışa neden olmaktadır. Böbrek sirozu hastalarına uzun bir periyot bifidus süt verildiği zaman bifidobakterilerin sayısının artmasıyla kanda amonyak, dışkıda fenol ve üre miktarının önemli derecede azaldığı bulunmuş ve bu hastaların kilo aldığı gözlemlenmiştir (Akalın ve ark., 2000).

1.7.7. İdrar yolları enfeksiyonu üzerine etkisi

İdrar yolları enfeksiyonlarına *Lactobacillus* türlerinin olumlu etkisi yapılan araştırmalarla belirlenmiştir. Bakteriyal enfeksiyon sırasında vajinal flora değişmektedir. Orta yaşlı kadınlar arasında idrar yolları enfeksiyonu meydana getiren mikroorganizmalar *Escherichia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* ve *Candida albicans* olarak bilinmektedir (Kılıç, 2001).

Wood ve ark. (1987) çeşitli *Lactobacillus* türlerinin in vitro koşullarda vajina epitel hücrelere bağlanabildiğini ve bu bağlanmada suşlar arasında farklılık olmadığını tespit etmişlerdir.

İdrar yolları patojenlerine engel olmada; tüm canlı *Lactobacillus* hücre duvarlarına ait analizler, bu mikroorganizmaların idrar yolları epitel hücrelerine bağlanmasından lipoteikoik asidin sorumlu olduğunu göstermiştir. Epitelyumu

kaplayan *Lactobacillus* türleri patojenlerin reseptörlere ulaşmasını önlemekte, idrar yollarına ait normal floranın patojenlere karşı korunmasını sağlamaktadır (Raffle ve ark., 1956).

1.7.8. Zehirlenme üzerine etkisi

Bazı iz elementlerden ileri gelen zehirlenme olaylarında hastaya süt içirmenin veya yoğurt yedirmenin yararlı olduğu bilimsel olarak kabul görmüştür. Süt proteinleri bakır ve demir gibi maddelerle kompleksler oluşturup bu maddelerin kana geçmesini önleyerek zehirlenmeye engel olmaktadır (Yaygın, 1981).

1.7.9. Antibiyotik üzerine etkisi

Günümüzde tüm enfeksiyon tipleri için çeşitli antibiyotikler kullanılmakta, sindirim sistemi enfeksiyonlarında ağız yoluyla alınan antibiyotikler mikroflora dengesini bozmakta, hatta sonuçta kolit (kalın bağırsak iltihabı) oluşumuna sebep olmaktadır. Antibiyotik alınması durumunda yoğurt gibi fermente süt ürünlerinin fazla tüketilmesi, antibiyotiklerin bağırsak florasına yapabileceği olumsuz etkileri azaltabilmekte veya önleyebilmektedir (Gönç ve Akalın, 1995; Yılsay ve Kural, 2000).

1.7.10. Radyoaktivite zararları üzerine etkisi

1957 yılında Tokyo'da yapılan Atom Enerjisi Konferansı'nda Prof. Higuşi, radyoaktivitenin neden olduğu hastalıkların iyileştirmesinde yoğurdun mükemmel bir ilaç olduğunu bildirmiştir. Prof. Higuşi bu durumu fareler ve insanlar üzerinde yaptığı denemelerde sürekli olarak bir yıl atom ışınlarının etkisinde kalan ve bu süre içinde yoğurdun esas teşkil ettiği yiyeceklerle beslenen kimselerde radyoaktiviteden ortaya çıkan arızalara rastlanmadığını belirtmiştir (Yaygın, 1981).

1.7.11. Deri üzerine olumlu etkisi

Yoğurdun yanıkları ve derideki bazı yaraları tedavi ettiği belirlenmiştir. *L. bulgaricus* ve *L. acidophilus* kültürlerinin liyofilize edilmiş şekli olan Latinex adlı ilaç olarak satılan preparat, egzama ve oral enfeksiyonlar için başarı ile kullanılmaktadır (Yaygın, 1981).

1.7.12. Kolesterol düşürücü etkisi

Kolesterol hayvanlar alemindeki tüm canlıların hücre membranında bulunan ve insan metabolizmasında önemli rol oynayan organik bir maddedir. Kanda kolesterol miktarının artması organizmada bazı rahatsızlıklara yol açmakta ve fazla miktarda süt yağı ve hayvansal yağ tüketimi ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Yüksek kolesterol düzeyinin kronik kalp hastalığını teşvik eden temel faktörlerden biri olduğu ileri sürülmektedir. Hastanın bir takım yan etkileri olan ilaçlara bağlı kalarak yaşaması çeşitli olumsuzluklara neden olabileceğinden yüksek kolesterolün tedavisinde bireyin yeme alışkanlıklarında önemli bir değişiklik gerektirmeyen etkili bir gıda maddesinin daha uygun olduğu düşünülmekte, diyetle yer alan bazı fermente süt ürünlerinin de kolesterolü düşürmede önemli bir etkisi bulunduğu kabul edilmektedir (Akyıl, 1999; Kılıç, 2001).

Laktik asit bakterilerinin serum kolesterolünü düşürücü etkisinin araştırıldığı bir çalışmada *Lactobacillus casei*'nin dört suşunun kolesterolü önemli derecede asimile edebildiği tespit edilmiştir. Bunun yanında *Lactobacillus plantarum*'un da kolesterol asimilasyonunu gerçekleştirebilme kabiliyetinin olduğu yapılan diğer bazı çalışmalarla ortaya konmuştur (Kılıç, 2001).

L. acidophilus içeren fruktooligosakkarit ve bitkisel yağ ilave edilmiş yoğurt kültürleri içeren fermente üründen 21 gün boyunca, günde 3 kez 125 g beslenen 30 kişide toplam kolesterol ve LDL kolesterolü düzeylerinde azalma olduğu görülmüştür. Harrison ve Peat'ın 1989'da yaptığı çalışmada hem *L. acidophilus*, hem de sodyum bikarbonat eklenmiş mama ile beslenmiş bebeklerin serum kolesterol seviyelerinde önemli derecede azalma gözlenmiştir (Kılıç, 2001).

Bifidobacterium türlerine ait bakterilerin serum kolesterolünü azaltmadaki rolleri henüz açıklanamamıştır (Kılıç, 2001).

Probiyotik bakterilerle üretilen fermente süt ürünlerinin veya bu bakterilerin canlı hücreleri yenmesi, insanlarda düşük kolesterol düzeyinin oluşması, olası dört faktörden kaynaklanabilmektedir (Erkmen, 2000). Bunlar şu şekilde sıralanabilir;

1. Beta-galaktosidaz enziminin fermente süt ürünlerinde bulunması,
2. Bazı bağırsak bakterilerinin yiyeceklerle alınan kolesterolü metabolize etme yeteneğinde olması,
3. Bakterilerin bağırsaklarda kolesterol prokürsörlerini veya kolesterolü azaltması,
4. Bazı *Lactobacillus* türlerinin safra tuzlarını parçalamasıyla safra tuzlarının karaciğer tarafından emilmesinin engellenmesi, safra tuzu sentezlemek için fazla miktarda serum kolesterolünün kullanılması sonucunda serumda kolesterol miktarı azalmaktadır.

1.7.13. Bağışıklık sistemine etkisi

Probiyotik bakterilerin canlı hücrelerinin bağırsaklarda bulunmaları halinde, bağışıklık sistemini uyardıkları ve kuvvetlendirdikleri belirtilmiştir. Spesifik laktik asit bakteri suşları ile fermente edilen süt ürünlerinin tüketilmesiyle bağışıklığı artıran peptidlerin üretiminde artış olduğu ve bunlardan bazılarının antitümör etkinliğe sahip oldukları belirtilmiştir. Bağışıklık sisteminin uyarılmasıyla serumda Ig A gibi antikorların artması virüs, *Clostridium*, *E. coli* gibi patojenlere karşı vücudun dirençliliğini artırmıştır (Mitsuoka, 1990).

Kliniksel açıdan çok dikkati çeken bir probiyotik, *Lactobacillus rhamnosus GG* (Lb. GG)'dur. Bu bakterinin izolasyonu doğal seleksiyonu ile sağlanmaktadır. Güçlü adesif özelliği belirlenen bu bakterinin, serbest kalsiyumu bağlama kapasitesine sahip ve Ca Co₂ hücrelerine en iyi tutunabilen bir laktobasil türü olduğu saptanmıştır. Bu bakterinin intestinal mikrofloranın modifikasyonu, permeabilite eksikliğini azaltılması, enfeksiyonlu ve

antibiyotikle ilişkili diyarelerin önlenmesi şeklinde sağlık açısından potansiyel yararları vardır (Kılıç, 2001).

1.7.14. Antikanserojenik etkisi

Probiyotik bakterilerin gösterdiği antikanserojenik veya antimutajenik aktivite, organizmaların gelişmeleri sırasında ürettiği bileşiklerden kaynaklandığı gibi aynı zamanda bu organizmaların prokansinojenleri kanserojenlere çeviren organizmalara karşı gösterdikleri antagonistik etkiyle de açıklanabilmektedir. Gıdaları işlemede kullanılan nitritlerin bağırsak sisteminde kanserojen nitrozaminlere dönüştüğü, bazı probiyotik bakterilerin ise bu bileşiklerin sentezini enzimatik yolla yavaşlattığı belirtilmektedir (Kılıç, 2001).

Metabolizmada bulunan fekal enzimler (azorodüktaz, β -galaktosidaz ve nitroredüktaz) prokanserojenlerin kanserojen maddelere dönüşmesini sağlamakta ve bu yüzden bu enzimler mukoza kanserinin teşhisinde kullanılmaktadır. Bağırsak bakterileri ise (probiyotik) fekal enzimlerin aktivitelerini önleyerek kanserojen maddelerin oluşumunu geciktirmektedir (Kılıç, 2001).

İnsan midesi düşük pH'sı nedeniyle dimetilaminin nitrozasyonu ve dimetilnitrozamin ile birlikte diğer nitrozaminlerin meydana gelmesine uygun bir ortam oluşturmaktadır. Ancak *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleri oluşan sekonder amin ve nitritlerin miktarlarını azaltmada da etkili olmaktadır (Özbaş, 1993).

L. acidophilus'un bağırsak florasının dağılımında ve fekal enzimlerin metabolik aktivitesi üzerinde yararlı etkileri olduğu, böylece intestinal putrifikasyon düzeyini indirgeyerek kolon kanser olasılığını azalttığına işaret edilmektedir. *Bifidobacterium* türlerinde antitümör aktivitenin hücre duvarındaki muramilpeptinaz gibi bileşiklerle ilgili olduğu düşünülürken, *L. acidophilus*'ta bu etki iki başlık altında açıklanmaya çalışılmıştır. Bunlardan ilki bağırsak sistemindeki kanserojenik bileşiklerin oluşumlarının engellenmesi, diğeri ise kanser oluşumunun baskılanması ya da konakçının bağışıklık özelliklerinin artırılmasıdır (Özbaş, 1993).

Lozan Üniversitesi'nde yapılan bir araştırmada *L. johnsonii* mayasının mide kanserine yol açan *Helicobacter pylori* bakterisinin gelişimini önlediği klinik çalışmalarda ortaya konulmuştur (Michetti, 2001).

1.7.15. Antimikrobiyal etkisi

Fermente süt ürünlerinin antimikrobiyal özellikler taşıdığı eskiden beri bilinmektedir. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkisi; laktik asit, hidrojen peroksit ve antibiyotik üretmelerinden kaynaklanmaktadır. Laktik asit ortam pH'sını düşürerek diğer bakteriler için uygun olmayan bir durum oluşturmaktadır. *L. acidophilus* tarafından üretilen hidrojen peroksidin bağırsak patojenlerine karşı oluşturulan antagonistik etkide rol oynadığı belirlenmiştir (Collins ve Aramaki, 1980).

L. acidophilus'un çeşitli gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı etkili olan mikrobiyal bileşikler ürettiği bilinmektedir. Bu bileşikler, asidofilin, laktosidin, asidolin, laktolin ve laktosin B olarak bildirilmektedir. Bir çalışmada *L. acidophilus*'un da bifidin adı verilen antibakteriyel madde ürettiği belirlenmiştir. *Bifidobacterium* türleri şekerlerin fermentasyonu ile asetik asit, formik asit ve laktik asit üretmektedirler. Bu asitler bağırsak pH'sını düşürmekte, bazı patojen bakterilerin gelişmesini engellemektedir. pH kontrolü aynı zamanda bakteri toksinlerinin, fenol ve aminlerin üretimini de kısıtlamaktadır. Bunun yanında asetik asidin gram negatif bakterilere karşı laktik asitten daha inhibe edici olduğu belirlenmiştir (Gönç ve Akalın, 1995).

Yapılan çalışmalar *L. johnsonii* La 1 (L C 1)'in bağırsaklarda zararlı bakterilerle rekabet ederek, onlardan önce bağırsak hücrelerine tutunduğunu ve böylece rahatsızlıkları önlediğini göstermiştir. Bu etki, L C 1'in zararlı bakterilerden önce veya aynı anda ortama verilmesiyle daha yüksek olmaktadır. Bu sonuçlar sindirim sisteminde görülen *E. coli* ve *Salmonella* gibi patojenlerin yol açtıkları hastalıklardan bu tür probiyotik ürünlerinin tüketilmesi ile korunmanın mümkün olduğunu düşündürmektedir (Akyıl, 1999).

1.7.16. Protein metabolizmasını iyileştirme etkisi

Gıdalarla alınan proteinler ne kadar kolay parçalanıp organizma tarafından yararlanılıyorsa o kadar yüksek kalitelidir, demektir. *Bifidobakterium* türleri fosfo protein fosfataz aktivitesine sahip olduklarından insan sütünde bulunan kazeini parçalayabilmekte, süt proteinlerinin absorpsiyonuna katkıda bulunmaktadır (Yıldırım ve Yıldırım, 2000).

Proteinlerin biyolojik değeri olarak tanımlanan absorbe edilip vücut tarafından yararlanabilme özelliği, süt ve fermente ürünlerde oldukça yüksektir. Fermente süt ürünlerindeki proteinin hazmolabilirliğinin artması iki sebebe bağlanabilir :

1. Fermentasyon süresince ortamdaki süt proteinlerinin bir kısmı ön sindirim olarak niteleyebileceğimiz bir parçalanma sonucu peptitlere ve serbest aminoasitlere dönüşmektedir.
2. Laktik asit oluşumunu sağlayan laktik asit bakterileri ortamdaki proteinin ince dispers halde koagüle olmasını sağlamakta, böylece sindirim enzimleri daha geniş bir yüzeyi etkileyerek proteinlerin daha çabuk parçalanabilmesine neden olmaktadır (Renner ve Saldamlı, 1983).

1.7.17. Ömrün uzaması üzerine etkisi

Probiyotik mikroorganizmaların insan ömrüne de katkısı vardır. Yapılan araştırma sonuçlarına göre erken ihtiyarlık, çoğu kez görülen sıkıntılı yaşlılık, bağırsaklarda yaşayan mikroorganizmalar tarafından çıkarılan toksinlerin dokuları yavaş yavaş zehirlenmesi ile meydana gelmektedir. Sürekli yoğurt yenildiği zaman, süt asidinin etkisi ile bağırsaklarda asit bir ortam oluşmakta ve bu durumda kokuşma yapan bakterilerin faaliyetleri durdurularak doku zehirlenmesi önlenmekte ve ömrün uzamasında temel teşkil etmektedir (Yaygın, 1981).

1.7.18. Ağız ve diş sağlığı üzerine etkileri

Bağırsak sistemine özgü probiyotikler olarak kullanılan bazı *Lactobacillus* türleri diş çürümelerine neden olan bakterileri inhibe ederek (antibakteriyal madde üretimi ve diş yüzeyindeki tutunma bölgeleri için rekabet gibi mekanizmalarla) etki göstermektedirler (Foriester ve ark., 2001).

1.8. Probiyotik Bakterilerinin Hayvan Sağlığı ve Beslemesi Üzerine Etkileri

Probiyotikler bağırsak mikroflorasını yararlı mikroorganizmalar lehine değiştirerek yemden yararlanmayı arttırmaktadırlar. Ayrıca, probiyotikler stres halleri, beslenme bozukluğu veya yetersizliği, hijyenik olmayan ortamlar gibi nedenlerle doğal mikroflora dengesini bozan durumlarda etkili olmaktadır. Laktik asit bakteri ve laktik asit bakteri+enzim karışımının silajların kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerini olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir. Laktik asit bakterileri katılarak yapılan silajın ineklerde süt verimini artırdığı, yemden yararlanmayı arttırdığı bilinmektedir (Filya, 2002).

1.9. Probiyotik Bakterileri Tarafından Üretilen Metabolik Ürünler

1.9.1. Laktik asit

Laktik asit kokusuz, ekşi tatta bir organik asit olup mikroorganizmaların üzerinde olumsuz etki yapmaktadır. Mikroorganizmaların membran yapısını bozarak, hücrenin substrat taşıma özelliğini yok etmektedir. Endüstride kullanılan laktik asit renksizden açık sarıya kadar değişen renkte olup kokusuz ve saydam bir özelliğe sahiptir.

Fermente süt ürünlerinin antimikrobiyal özellikler taşıdığı ve bu özelliklerin ortamda yer alan ve gıdaları mikrobiyal bozulmalara karşı koruyan laktik asit üretimine bağlı olarak gerçekleştiği ve özellikle ince bağırsakta yaşayan Gram negatif bakterilere karşı daha etkili olduğu ortaya konulmuştur. Laktik asit bakterileri, laktozun bir kısmını L (+), bir kısmını ise D (-) formunda laktik aside

dönüştürmektedirler. Fizyolojik olarak L (+) laktik asit, D (-) laktik asit formunda çok daha iyi metabolize edilmektedir. Bundan dolayı özellikle çocukların ve gençlerin beslenmesinde son derece önem kazanmaktadır (Kılıç, 2001).

Yapılan araştırmalar sonucunda pH'nın düşmesine bağlı antimikrobiyal özelliğe sahip laktik asidin, Gram negatif bakterilerinin yaşamını kaybetmesine yol açan lipopolisakkaritlerin serbest bırakılmasına ve bunun sonucunda dış membranın geçirgen olmasına neden olan bir madde olduğunu bildirmişlerdir (Kılıç, 2001).

Lactobacillus türlerinin pH'yı 3.2-3.5'e kadar düşürebildiklerinden dolayı asitliğe karşı daha dayanıklı olduğu gerçeği ortaya çıkarılmıştır Yapılan araştırmalar sonucunda araştırmacılar laktik asit bakterilerinde laktik asit üretiminin cins, tür ve suşlar arasında farklılık gösterdiğini tespit etmişlerdir (Aslım, 1994; Kılıç, 2001).

1.9.2. Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Oluşturulan hidrojen peroksit miktarının laktik asit bakterilerinin cins, tür ve hatta suşlarına göre farklılık gösterdiği ve pek çok mikroorganizma üzerinde inhibitör etkisine sahip olduğu belirlenmiştir. Hidrojen peroksit termodinamik bakımdan kararsız bir bileşik olup su ve oksijene ayrışmaktadır (Daeschel, 1989; Lewus ve ark., 1991; Muriana ve Klaenhammer, 1991).

Araştırmacılar bazı bakterilerin patojen mikroorganizmaların üremesini kontrol eden çeşitli antimikrobiyal maddeler oluşturduğunu; laktik asit bakterileri tarafından üretilen antimikrobiyal maddelerin intestinal ve üriner sistem enfeksiyonlarında koruyucu rol aldığını tespit etmişlerdir. Örneğin; *L. lactis*'in hidrojen peroksit üretilip *E. coli*'nin üremesini durdurduğunu gözlemlemişlerdir (Kılıç, 2001).

Rahim kanserinin en büyük nedenlerinden biri olan HPV (Human Papilloma Virus) ile ilgili yapılan bir çalışma sonucunda hidrojen peroksit konsantrasyonu yüksek olan ortamdaki hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümünün engellendiği, hatta laktik asit bakterilerinin oluşturduğu hidrojen

peroksidin kanserli hücreleri tekrar eski haline dönüştürdüğü düşünülmektedir (Bauer, 2001).

Gıda endüstrisinde ortamda mevcut diğer mikroorganizmaların inhibe edilebilmeleri açısından başlangıç aşamasında ortamda çözünen oksijen konsantrasyonuyla laktik asit bakterileri tarafından sınırlı miktarda üretilen hidrojen peroksit seçici bir ortam yaratmaktadır (Turantaş, 2007).

1.9.3. Diasetil ve asetaldehit

Yoğurt, tereyağı, kefir ve peynir gibi süt ürünlerinin kendine özgü tat ve aromasını oluşturan bileşikler genellikle ürünün yapımında kullanılan starter kültürlerin faaliyetleri sonucu meydana gelmektedir (Tzanetaki ve Mastrojiannaki, 1988; Tekinşen ve Atasever, 1994).

Asetaldehit üretimi *Lactobacillus* türlerine bağlı olarak değişmekle birlikte son derece önemlidir. Buna karşın *Streptococcus* türlerinde daha az asetaldehit üretilmektedir (Shimazu ve ark., 1985).

Oumer (2001) inek ve koyun sütü karışımından yarı sert bir İspanyol peyniri olan Hispanico peyniri üretmiştir. Üretimde bakteriyosin üreten destek kültür olarak peynir sütüne farklı oranlarda *E. faecalis* INIA 4 kültürü ilave edilmiştir. Destek kültür starter laktokokların canlılığını, proteoliz seviyesini ve aroma bileşikleri (diasetil ve asetoin) konsantrasyonunu önemli seviyede etkilemiştir.

Bazı araştırmacılar diasetilin bazı türler üzerindeki inhibe edici etkisi üzerinde durarak organizmanın diğer organizmalarla rekabet için, savunma mekanizması olarak diasetil ürettiğini savunmaktadırlar (Rushing ve Senn, 1960; Drinan ve ark., 1976).

Ticari bitkisel fermentasyon çalışmalarında asetik asidin laktik aside dönüşüm oranı incelenmiştir. Genel olarak toplamda yüksek miktarda asit üreten kültürlerde asetik asidin laktik aside dönüşüm oranı daha düşük bulunmuştur. Diasetil üretiminin bu organizmaların gelişimi için temel gereksinim olmadığına karar verilmiştir (Christensen ve ark., 1958; Rushing ve Senn, 1960).

1.9.4. Proteolitik aktivite

Barry ve Kolstad (1983) laktik asit bakterilerinde proteolitik sistemlerin, büyüme için protein ve peptid N'ların yapımında, gıdalara karakteristik ve organoleptik özellikler kazandıran gıdayı hazırlamada ve olgunlaştırma aşamasında son derece önemli role sahip olduğu gerçeğini vurgulamışlardır.

Laktik asit bakterilerinde peptit ve aminoasit metabolizması ile gerçekleştirilen proteolizis olayı çeşitli gıdalarda aroma oluşumunda ve straine özel antifungal metaboliklerin sentezinde anahtar rol oynamaktadır. Aminoasit katabolizmasında deaminasyon, dekarboksilasyon, transaminasyon ve dış zincir modifikasyonu gibi katabolik reaksiyonlarla keto asitler, amonyak, aminler, aldehitler, asitler ve alkoller gibi aroma ile ilgili bileşikler meydana gelebilmektedir. Özellikle süt içerisinde serbest aminoasitlerin ve peptitlerin konsantrasyonu düşük olduğu için süt ve süt ürünlerinde starter kültürün süt içerisindeki gelişimi kendi proteolitik sistemi ile yakından ilişkilidir (Smit ve ark., 2002; Gürsoy ve Kınık, 2005; Ganzle ve ark., 2007).

1.9.5. Lipolitik aktivite

Laktik asit bakterilerinde görülen lipolizis olayı metilketon ve çeşitli alkoller gibi aroma ile ilişkili bileşiklerin prekürsörleri olan serbest yağ asitlerinin oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Smit ve ark., 2002).

Laktik bakterilerin metabolik sistemleri ile ilgili olarak yapılan çalışmalara bakıldığında lipolitik–esterolitik aktivitelerinin diğer bir ifade ile lipaz–esteraz sistemlerinin daha az dikkate alındığı görülmektedir. *L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* gibi starter olarak kullanılan zorunlu homofermentatif laktobasiller de laktokoklar gibi esterazlar üretebilmektedirler. Fakültatif heterofermentatif olan ve birçok peynir çeşidinin starter olmayan mikrofloralarındaki dominant laktobasiller olarak tespit edilen *L. casei*, *L. paracasei* ve *L. plantarum* gibi laktobasillerin lipolitik aktiviteleri zayıftır. Suşa bağlı olmakla birlikte genel bir kabul olarak lipolitik aktiviteleri her ne kadar zayıf olsa da, laktobasiller bazı peynir çeşitlerinin lipolitik olgunlaşmasında son derece

önemli rol oynamaktadırlar. Örneğin dondurarak şoklanmış *L. casei* T'nin lipolitik aktivitesinin yüksek olduğu ve Cheddar peynirinin olgunlaşmasında önemli olabileceği bildirilmektedir (Gürsoy ve Kınık, 2005).

Laktik asit bakterilerinin lipaz aktivitesi tür ve cinslere göre farklılık göstermektedir. Yapılan çalışmalarda *Leu. mesenteroides* spp. *dextranicum*'un en yüksek lipolitik aktiviteye sahip olan tür olduğu belirtilmiştir. Laktik bakterilerde lipolizis olayında ilk etapta trigliseritlerden digliseritler oluşmaktadır, digliseritlerden monogliseritler bunlardan da serbest yağ asitleri ve gliserin oluşmaktadır (Kılıç, 2001).

1.9.6. Bakteriyosin üretimi

Bakteriyosinler, protein veya protein kompleksleri olup bazı bakteri türleri tarafından üretilen potansiyel antimikrobiyal maddelerdir (Daeschel, 1989; Holzapfel, 2002).

Lactococcus, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus* ve *Enterococcus* gibi birçok mikroorganizma bakteriyosin üretmektedir. Ancak daha çok gıdalarda güvenli olduğu düşünülen laktik asit bakterileri tarafından sentezlenen bakteriyosinler üzerinde araştırma yapılmakta ve gıdalarda bu bakteriyosinler kullanılabilir. Bu nedenle de *Lactobacillus* ve *Lactococcus* tarafından sentezlenen bakteriyosinler (özellikle nisin) üzerinde durulmaktadır (Kurt ve Zorba, 2005).

Tagg ve ark. (1976) tarafından belirtilen kriterlere göre, bakteriyosinler protein yapısında antagonistik maddeler olup sınırlı sayıda bakterilere, özellikle de bakteriyosin üreten bakteriye yakın türlere karşı bakteriyosidal veya bakteriyostatik aktiviteye sahip bileşiklerdir. Bu tanım birçok bakteriyosin için geçerli olmasına karşın, günümüzde bazı bakteriyosinlerin gıdalarda bozulmaya neden olan bakteriler ile gıda kaynaklı patojenlere karşı inhibisyon etkisine sahip olduğu belirlenmiştir.

Laktik asit bakterilerinin pek çok üyesinin bakteriyosin ürettiği bilinmektedir. Antibakteriyal etki *L. acidophilus* tarafından üretilen asidofilin ve laktosidin, *L. plantarum* tarafından üretilen laktolin ya da *Lactococcus lactis*

tarafından üretilen nisin gibi antibiyotik ve antibiyotik benzeri maddeler üzerinden tanımlanmıştır. Üretilen bakteriyosinler aracılığıyla bakteriyosinin türüne bağlı olarak özellikle *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* gibi gıda kökenli patojen bakteriler inhibe edilebilmekte, hatta bazı gram negatif bakteriler üzerinde de etkili olduğu bildirilmektedir (Lewus ve ark., 1991; Messi ve ark., 2001).

Laktobasiller tarafından üretilen, laktosin 27, laktasin B, helvetisin J, plantasin B ve plantasin A gibi bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddelerle ilgili pek çok araştırma bulunmaktadır (Schillinger ve Lücke, 1989).

Bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak tercih edilmeleri sonucunda, süt ve süt ürünlerinin biyolojik olarak korunması da sağlanabilmektedir. Özellikle patojen ve bozulma etkeni mikroorganizmalar üzerine etkili olan bakteriyosinler daha fazla uygulama alanı bulmaktadır. Son zamanlardaki çalışmalar, bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak soğutulmuş fermente gıdaların muhafazasında kullanımı üzerinde yoğunlaşmıştır (Geisen ve ark., 1992).

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler için farklı sınıflandırmalar yapılabilmesine rağmen, genel olarak Klaenhammer'in Gram pozitif bakteriler için yaptığı sınıflandırma (molekül büyüklüğü, ısı stabilitesi, kimyasal yapı ve etki mekanizması temel alınarak) kullanılmaktadır (Kurt ve Zorba, 2005). Birinci grup antibiyotiklerdir. Yapılarında bilinen aminoasitlerin yanı sıra lantionin ve metillantionin içermektedirler. İkinci grup düşük sıcaklıklı stabil peptitlerdir. Bunlar lantionin içermezler ve bazıları 121 °C'ye kadar olan sıcaklıklara karşı yapısını koruyabilmektedir. Üçüncü grup ısıya karşı duyarlı peptitlerden oluşmaktadır. Genellikle moleküler ağırlıkları büyüktür. Dördüncü grup bakteriyosinler ise bakteriyosin aktivitesini sergileyebilmek için karbonhidrat ya da lipid ilavesine gereksinim duyan kompleks proteinlerden oluşmaktadır (Caplice ve Fitzgerald, 1999; Zhu ve ark., 2000; Kurt ve Zorba, 2005). Bunun yanı sıra yapılan çalışmalar ikinci gruba ait olan bakteriyosinler için alt sınıflandırmanın yapılmasının zorunlu olduğunu göstermiştir. Özellikle de alt sınıflandırmada yer alan sınıf 2a bakteriyosinleri *Listeria* türlerine karşı güçlü inhibitör aktivitesine sahip olduğu için gıda endüstrisinde önemli yer tutmaktadır

(Eijsink ve ark., 1998).

Özelikle gıdalarda kullanımlarından dolayı bu kadar popüler hale gelmiş olan laktik asit bakterilerinin antibakterisidal özelliklerinin çalışılması ve gıda sistemlerindeki etkinliklerinin belirlenmesi için bakteriyosinlerin çok miktarda ve saf olarak elde edilmesi gerekmektedir. Şu an en yaygın olarak kullanılan metot hücrelerden arındırılmış bakteriyosin içeren sıvı kültürden amonyum sülfat presipitasyonu ile yapılan saflaştırma yöntemidir. Bu metot *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactococcus* spp. türlerinin ürettiği bakteriyosinler için kullanılmaktadır, ancak bu yolla elde edilen ürünler içerisinde diğer proteinleri de barındırdığı için çok takdir görmemektedir. (Yang ve ark, 1992).

E. faecium ve *E. faecalis* enterosinler olarak adlandırılan çeşitli bakteriyosinleri üretme yeteneğine sahiptirler. Enterokokların en bilinen enterosinleri, enterosin A, enterosin B, Enterosin P, Enterosin 50, Bakteriosin 31 ve AS-48 Sitolisinler'dir (Franz ve ark., 2003; Kavas ve Kınık, 2003).

L. plantarum, *Leu. mesenteroides* ve *E. faecium* türlerinin bakteriyosin üreten suşlarının hepsinin Gram (+) bakterilerden *E. faecalis*, *L. casei*, *Streptococcus pneumoniae* ile Gram (-) bakterilerden *E.coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın gelişimini durdurdukları gözlemlenmiştir (Todorov ve Dicks, 2005).

Reuterin, *L. reuteri* tarafından sentezlenen düşük moleküler ağırlıklı bir bileşiktir. Ganzle ve Vogel (2003) hamur mayasından *Lactobacillus reuteri* LTH2584 strainini izole etmişler ve bu izolatın reuterisin adında bir antibiyotik ürettiğini bildirmişlerdir.

1.9.7. Ekstraselüler polisakkarit (EPS) üretimi

Ekzopolisakkaritler, uzun zincirli polisakkaritlerdir. EPS'nin fiziksel karakteristikleri birçok mikroorganizmanın mukoid özelliğinden sorumludurlar. Çoğu laktik asit bakterisi asidifikasyon, şeker metabolizmasının meydana gelmesi, mikrobiyal kontaminasyona ilave olan sınırlayıcılar gibi koruyucu etkilerinden dolayı, gıda hazırlamada kullanılmaktadır. Laktik asit bakterilerinin EPS

ürettikleri de bilinmektedir. EPS'ler yoğunlaştırıcı özellik sağlamalarının yanında süt ürünlerinin yapısını geliştirmek için de önemli bir faktördür (Hugenholtz ve ark., 2000; Faber ve ark., 2001; Jolly ve Stingle, 2001; Marshall ve ark., 2001).

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'ler yeni ürünlerin gelişimi için önemli polimerlerdir. EPS'nin insan sağlığını koruma özelliği, antitümör, antiülser ya da kolesterol düşürücü özellikleri nedeniyle üzerindeki yoğunluk artmıştır. EPS üretimi türden türe farklılık göstermekte, hatta suşlar arasında bile farklılık görülmektedir. Mikroorganizmaların salgıladıkları EPS molekülleri fagositoz ve faj ataklarına, antibiyotiklere, toksik maddelere, ozmotik strese karşı hücreleri korumaktadır (Cerning ve Bouiillanne, 1992; Nakajima ve ark., 1992; Nagaoka ve ark., 1994).

EPS üreten laktik asit bakterilerinin büyük bir çoğunluğu *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* türlerine aittir. Bunun yanı sıra *Bifidobacterium* türlerine ait bazı strainlerin de biyopolimer ürettikleri bilinmektedir. *Leu. mesenteroides* tarafından sentezlenen dekstran 1948 yılında endüstriyel anlamda üretilmiş ilk biyopolimerdir. EPS üretimi için çok sayıdaki laktik asit bakterisi incelenmiştir. Bu çalışmalarda daha çok teknolojik özelliklerinden dolayı *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *S. thermophilus* gibi termofilik türler incelenmiştir. Bununla birlikte günümüzde *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. rhamnosus* gibi mezofilik bakteriler tarafından üretilen EPS'lere karşı ilgi de artmaktadır (Madedo ve Reyes–Gavilan, 2005).

2. MATERYAL VE METOD

2.1. MATERYAL

2.1.1. Süt ve süt ürünü örneklerinin temini ve laboratuvara getirilmesi

Çalışmamızda kullanılacak süt ve süt ürünleri örnekleri Eskişehir ve Bursa piyasasından temin edilmiş, steril kavanoz içerisine alınan örnekler + 4 °C'de laboratuvara getirilerek analize alınmıştır.

2.1.2. Test mikroorganizmaları

Çalışmamızda kullanılan test mikroorganizmaları Çizelge 2.1.2.'de verilmiştir. Test mikroorganizmaları uzun süre için – 80 °C'de % 20'lik gliserolde, kısa süre için ise + 4 °C'de Nutrient broth içinde saklanmıştır.

Çizelge 2.1.2. Test mikroorganizmaları (NRRL: Northern Regional Research Laboratory of USDA, Peoria, Illinois, USA. ATCC: American Type Culture Collection, USA).

Mikroorganizma	Kültürün Temin Edildiği Yer	Optimum Gelişme Sıcaklığı
<i>Bacillus cereus</i>	NRRL B - 3711	30 °C
<i>Bacillus subtilis</i>	NRRL B - 744	30 °C
<i>Escherichia coli</i>	NRRL B - 3704	37 °C
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	37 °C
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Anadolu Üniv. Fen Fak.	30 °C
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC - 7644	30 °C
<i>Listeria monocytogenes</i> 1	Gazi Üniv. Fen Fak.	30 °C
<i>Listeria monocytogenes</i> 2	Gazi Üniv. Fen Fak.	30 °C
<i>Proteus vulgaris</i>	NRRL B - 123	37 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	30 °C
<i>Salmonella typhimurium</i>	NRRL B - 4420	37 °C
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	30 °C
<i>Yersinia enterocolicita</i>	Gazi Üniv. Fen Fak.	37 °C
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NRRL B - 4496	30 °C
<i>Lactobacillus buchneri</i>	NRRL B - 1837	30 °C
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	NRRL B - 548	30 °C
<i>Lactobacillus paramesenteroides</i>	Anadolu Üniv. Fen Fak.	30 °C
<i>Streptococcus lactis</i>	Anadolu Üniv. Fen Fak.	30 °C

2.1.3. Besi ortamları

2.1.3.1. Arjinin dihidrolaz broth (D2935 Fluka)

Pepton	1 g
Sodyum klorür	5 g
Potasyum hidrojen fosfat	0,3 g
Fenol red	0,01 g
L-arjinin HCL	10 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $7,4 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve $121^{\circ} C$ 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.2. Beyin kalp infusion (BHI) yumuşak agar (53286 Sigma)

Sığır kalbi	5 g
Dana beyni	12,5 g
Di sodyum hidrojen fosfat	2,5 g
Glikoz (D+)	2 g
Pepton	10 g
Sodyum klorür	5 g
Agar	7 g
Distile su	1000 ml.

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $7,4 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve $121^{\circ} C$ 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.3. Mueller hinton agar (70191 Fluka)

Sığır eti–kalp ekstraktı	4 g
Kazein hidrolizat	17,5 g
Nişasta	1,5 g
Agar	17 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $6,8 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.4. M17 agar (1.15108 Merck)

Soya peptonu	5 g
Et peptonu	2,5 g
Kasein peptonu	2,5 g
Maya ekstraktı	2,5 g
Et ekstraktı	5 g
D (+) laktoz	5 g
Askorbik asit	0,5 g
Na-B-gliserolfosfat	19 g
Magnezyum fosfat	0,25 g
Agar	2,75 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $7,2 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.5. Glikoz ilaveli M17 agar, laktoz ilaveli M17 agar, fruktoz ilaveli M17 agar ve sükroz ilaveli M17 agar

M17 agarın (1.15108 Merck) içeriğindeki maddeler ayrı ayrı tartılarak hazırlanan besiyeri içindeki D (+) laktoz yerine glikoz, fruktoz, laktoz ve sükroz ayrı ayrı ilave edilerek besi ortamları hazırlanmıştır.

2.1.3.6. M17 agar % 6,0 tuz ilaveli

Daha önce içeriği verilmiş olan M17 agar (1.15108 Merck) ortamı içerisine 60 gr/1000 ml. olacak şekilde sodyum klorür ilavesi yapılmış, içerik distile suda çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Holt ve ark., 2000).

2.1.3.7. M17 agar % 7,5 tuz ilaveli

Daha önce içeriği verilmiş olan M17 agar (1.15108 Merck) ortamı içerisine 75 gr/1000 ml. olacak şekilde sodyum klorür ilavesi yapılmış, içerik distile suda çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Holt ve ark., 2000).

2.1.3.8. M17 agar % 10 tuz ilaveli

Daha önce içeriği verilmiş olan M17 agar (1.15108 Merck) ortamı içerisine 100 gr/1000 ml. olacak şekilde sodyum klorür ilavesi yapılmış, içerik distile suda çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Holt ve ark., 2000).

2.1.3.9. M17 broth (1.15029 Merck)

Soya peptonu	5 g
Et peptonu	2,5 g
Kasein peptonu	2,5 g
Maya ekstraktı	2,5 g
Et ekstraktı	5 g
D (+) laktoz	5 g
Askorbik asit	0,5 g
Na-B-gliserolfosfat	19 g
Magnezyum fosfat	0,25 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 7,2 ± 0,2'ye ayarlanmış ve 121° C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.10. M17 broth % 0,4 fenol ilaveli

Daha önce verilmiş olan M17 broth (1.15029 Merck) distile suda çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ortam içerisine % 0,4 olacak şekilde fenol ilavesi yapılmıştır (Xanthopoulos ve ark., 2000).

2.1.3.11. MRS agar (Lactobacillus Agar acc. To DEMAN, ROGOSA and SHARPE) (1.10660 Merck)

Diamonyum hidrojen sitrat	2 g
Dipotastum hidrojen fosfat	2 g
Glikoz	20 g
Magnezyum sülfat	0,2 g
Mangan sülfat	0,04 g
Et ekstraktı	8 g
Pepton	10 g
Sodyum asetat	5 g
Maya ekstraktı	4 g
Tween® 80	1 ml
Agar	14 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $5,4 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.12. Glikoz ilaveli MRS agar, laktoz ilaveli MRS agar, fruktoz ilaveli MRS agar ve sükroz ilaveli MRS agar

MRS agar (1.10660 Merck) içeriğindeki maddeler ayrı ayrı tartılarak hazırlanan ortam içine glikoz, fruktoz, laktoz ve sükroz ayrı ayrı ilave edilerek besi ortamları hazırlanmıştır.

2.1.3.13. MRS agar-NNLP

Daha önce içeriği verilmiş olan MRS agar (1.10660 Merck) ortamı distile suda çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra NNLP [100 mg L⁻¹ neomisin sulfat, 200 mg L⁻¹ paromomisin sulfat, 15 mg L⁻¹ nalidiksik asit, 3 g L⁻¹ LiCl (Janssen chimica, Beerse, Belgium)] dispoisible filtreden geçirilerek ortama katılmıştır (Castele ve ark., 2006).

2.1.3.14. MRS agar-LP

Daha önce içeriği verilmiş olan MRS agar (1.10660 Merck) ortamı distile suda çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavlanıp steril edildikten sonra LP [% 0,05'lik L-cystein. HCL, % 0,3'lük LiCl, % 0,9 sodyum propiyonat (Sigma–Aldrich)] dispoisible filtreden geçirilerek ortama katılmıştır (Castele ve ark., 2006).

2.1.3.15. MRS agar % 6,0 tuz ilaveli

Daha önce içeriği verilmiş olan MRS agar (1.10660 Merck) ortamı içerisine 60 gr/1000 ml. olacak şekilde sodyum klorür ilavesi yapılmış, içerik distile suda çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Holt ve ark., 2000).

2.1.3.16. MRS agar % 7,5 tuz ilaveli

Daha önce içeriği verilmiş olan MRS agar (1.10660 Merck) ortamı içerisine 75 gr/1000 ml. olacak şekilde sodyum klorür ilavesi yapılmış, içerik distile suda çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Holt ve ark., 2000).

2.1.3.17. MRS agar % 10 tuz ilaveli

Daha önce içeriği verilmiş olan MRS agar (1.10660 Merck) ortamı içerisine 100 gr/1000 ml. olacak şekilde sodyum klorür ilavesi yapılmış, içerik distile suda çözüldükten sonra 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Holt ve ark., 2000).

2.1.3.18. MRS broth (69962 Fluka)

Dipotasyum hidrojen fosfat	2 g
Glikoz	20 g
Magnezyum sülfat heptahidrat	0,2 g
Mangan sülfat tetrahidrat	0,05 g
Et ekstraktı	8 g
Pepton	10 g
Sodyum asetat trihidrat	5 g
Triamonyum sitrat	2 g
Yeast ekstraktı	5 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 6,2 ± 0,2’ye ayarlanmış, 1 ml Tween® 80 eklenmiş ve 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.19. MRS broth % 0,4 fenol ilaveli

Daha önce verilmiş olan MRS broth (69962 Fluka) distile suda çözüldükten sonra 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ortam içerisine % 0,4 olacak şekilde fenol ilavesi yapılmıştır (Xanthopoulos ve ark., 2000).

2.1.3.20. MR-VP broth

Pepton	7 g
Glikoz	5 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $6,9 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Tamer ve ark. 1989).

2.1.3.21. Nutrient agar (N 9405 Sigma)

Et ekstraktı	3 g
Pepton	5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $6,8 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.22. Glikoz ilaveli Nutrient agar, laktoz ilaveli Nutrient agar, fruktoz ilaveli Nutrient agar, sükroz ilaveli Nutrient agar

Daha önce içeriği verilmiş olan Nutrient agarın (N 9405 Sigma) birine glikoz, birine fruktoz, diğerine laktoz, öbürüne sükroz ilave edilerek besi ortamları hazırlanmıştır.

2.1.3.23. Nutrient agar-salicin

Daha önce içeriği verilmiş olan Nutrient agar (N 9405 Sigma) ortamı distile suda çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra % 0,5 oranında salicin (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany, S0625) dispozible filtreden geçirilerek ortama katılmıştır (Castele ve ark., 2006).

2.1.3.24. Nutrient agar % 6,0 tuz ilaveli

Daha önce içeriği verilmiş olan Nutrient agar (N 9405 Sigma) ortamı içerisine 60 gr/1000 ml. olacak şekilde sodyum klorür ilavesi yapılmış, içerik distile suda çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Holt ve ark., 2000).

2.1.3.25. Nutrient agar % 7,5 tuz ilaveli

Daha önce içeriği verilmiş olan Nutrient agar (N 9405 Sigma) ortamı içerisine 75 gr/1000 ml. olacak şekilde sodyum klorür ilavesi yapılmış, içerik distile suda çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Holt ve ark., 2000).

2.1.3.26. Nutrient agar % 10 tuz ilaveli

Daha önce içeriği verilmiş olan Nutrient agar (N 9405 Sigma) ortamı içerisine 100 gr/1000 ml. olacak şekilde sodyum klorür ilavesi yapılmış, içerik distile suda çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Holt ve ark., 2000).

2.1.3.27. Nutrient broth (03856 Fluka)

Et ekstraktı	3 g
Pepton	5 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 7,0 ± 0,2'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.28. Nutrient broth % 0,4 fenol ilaveli

Daha önce verilmiş olan Nutrient broth (03856 Fluka) distile suda çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ortam içerisine % 0,4 olacak şekilde fenol ilavesi yapılmıştır (Xanthopoulos ve ark., 2000).

2.1.3.29. Üç şekerli demir agar (1.03915 Merck)

Pepton (kazein den)	15 g
Pepton (et ten)	5 g
Et ekstraktı	3 g
Maya ekstraktı	3 g
Sodyum klorür	5 g
Laktoz	10 g
Sukroz	10 g
D (+) Glikoz	1 g
Demir 3 amonyum sitrat	0,5 g
Sodyum tiyosülfat	0,5 g
Fenol kırmızısı	0,024 g
Agar	12 g
Distile su	1000ml

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $7,4 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış, tam olarak homojen hale getirilmesi için besiyeri kaynatılmış ve test tüplerine 15 ml koyularak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Otoklavdan çıkan tüpler eğimli bir zemin üzerine yatırılarak dondurulmuş ve yatık agar şeklinde kullanılmıştır.

2.1.4. Kullanılan boyalar

2.1.4.1. Kristal violet

Kristal violet	2 g
Etil Alkol (% 95)	20 ml
Amonyum Oksalat	0,2 g
Distile su	20 ml

Kristal violet 10 ml etil alkol içerisinde çözüldükten sonra üzerine erlende 20 ml distile su içerisinde çözülmüş olan amonyum oksalat eklenmiştir. Karışım filtreden geçirilerek kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

2.1.4.2. Safranin

Safranin	0,25 g
Etil alkol (% 95)	10 ml
Distile su	100 ml

Safranin alkol içerisinde çözüldükten sonra distile su ilave edilmiş ve 24 saat sonrasında çözelti fitler kâğıdından geçirilerek süzülmüştür (Tamer ve ark., 1989).

2.1.4.3. Lugol

İyot	5 g
Potasyum iyodür (KI)	10 g
Distile su	100 ml

Potasyum iyodür 20–30 ml distile suda çözülmüş ve üzerine iyot eklenmiştir. Ardından çözelti distile su ile 100 ml.'ye tamamlanmıştır (Tamer ve ark., 1989).

2.1.5. Kullanılan çözeltiler

2.1.5.1. Fizyolojik tuzlu su

Sodyum klorür	85 g
Distile su	1000 ml

Fizyolojik tuzlu su çözeltisi sodyum klorür distile su içerisinde çözülerek kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

2.1.5.2. % 20'lik gliserol çözeltisi

Gliserol	15 ml
Distile su	85 ml

Gliserol ve distile su karıştırılıp 121 ° C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra kullanılmıştır (Akçelik ve ark., 1999).

2.1.5.3. Laktik asit miktar tayini için standart çözelti

Saf laktik asit solüsyonundan sırasıyla 1, 3, 8, 10, 12, 16 mg/ml olacak şekilde ayrı ayrı 5 ml'lik MRS broth ortamı içeren tüplere ilave yapılarak hazırlanmıştır (Mumcu, 1997).

2.1.5.4. Laktik asit miktar tayini için A çözeltisi

Baryum klorür	98,75
Distile su	1000 ml

Çözelti baryum klorür ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$) distile su içerisinde çözündürüldükten sonra kullanılmıştır (Mumcu, 1997).

2.1.5.5. Laktik asit miktar tayini için B çözeltisi

Sodyum hidroksit 26,4 g

Distile su 1000 ml

Sodyum hidroksit (NaOH) distile su içerisinde çözülerek 0,66 N NaOH hazırlanmıştır (Mumcu, 1997).

2.1.5.6. Laktik asit miktar tayini için C çözeltisi

Çinko sülfat 225 g

Distile su 1000 ml

Çözelti Çinko sülfat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) distile su içerisinde çözülerek kullanılmıştır (Mumcu, 1997).

2.1.5.7. Laktik asit miktar tayini için renk ayırıcı

Demir klorür 5 g

Hidroklorik asit 12,5 ml

Distile su 87,5 ml

Demir klorür 1 N, 12,5 ml hidroklorik asit (HCl) içerisinde çözdürülmüş ve karışım distile suyla 100 ml'ye tamamlanmıştır. Bu solüsyon stok olarak saklanmıştır.

Yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan stok çözelti ile renk ayırıcı çözeltisi hazırlanmıştır. Laktik asit miktar tayini için kullanılan renk ayırıcı, kullanılacağı zaman taze olarak hazırlanmıştır (Mumcu, 1997).

2.1.5.8. Proteolitik aktivite tayini için standart çözelti

Proteolitik aktivite tayininde standart eğri oluşturmak için sırasıyla 0,02, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1 mg tirozin/ml olacak şekilde tirozin standart çözeltisinden 5 ml'lik MRS broth ortamı içeren tüplere ilave yapılmıştır (Aslım, 1994).

2.1.5.9. 0,72 N Triklorasetik asit çözeltisi

Triklorasetik asit	118 g
Distile su	1000 ml

Triklorasetik asit (TCA) distile su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı ile çözülerek kullanılmıştır (Aslım, 1994).

2.1.5.10. Na_2CO_3 . $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ çözeltisi

Sodyum bikarbonat	150 g
Sodyum di fosfat	20 g
Distile su	1000 ml

Sodyum bikarbonat (Na_2CO_3) ve sodyum di fosfat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) uygun miktarlarda karıştırıldıktan sonra distile su içerisinde çözülerek kullanılmıştır (Aslım, 1994).

2.1.5.11. Fenol ayıracı

Folin Ciocalteus çözeltisi	50 ml
Distile su	100 ml

Fenol ayıracı 1 kısım Folin çözeltisi 2 kısım distile su ile karıştırılarak hazırlanmıştır. Bu çözelti kullanılacağı zaman taze olarak hazırlanmakta, stok solüsyonu oluşturulamamaktadır (Aslım, 1994).

2.1.5.12. Hidrojen peroksit tespiti için standart çözelti

0,1 ml saf (% 35) hidrojen peroksit alınıp distile su ilavesiyle 30 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra bu çözülden 1 ml başka bir erlene alınmış ve tekrar distile suyla 30 ml'ye tamamlanmıştır (Mumcu, 1997).

2.1.5.13. 1 N H₂SO₄ çözeltisi

Sülfürik asit 1,67 ml

Distile su 100 ml

Saf sülfürik asitten distile su ilavesiyle 1 N olacak şekilde çözelti hazırlanmıştır (Mumcu, 1997).

2.1.5.14. Amonyum molibden çözeltisi

Amonyum molibden 0,12 g

Distile su 100 ml

Çözelti amonyum molibden ((NH₄)₆Mo₇O₂₄) distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır (Mumcu, 1997).

2.1.5.15. Potasyum iyodür çözeltisi

Potasyum iyodür 16,6 g

Distile su 100 ml

Çözelti potasyum iyodür (KI) distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır (Mumcu, 1997).

2.1.5.16. Sodyum fosfat tamponu

Sodyum fosfat 0,70 g

Distile su 100 ml

Sodyum fosfat (NaH₂PO₄) distile su içerisinde çözüldükten sonra pH; 7,5'e ayarlanmıştır. Tampon çözelti + 4° C'de buzdolabı koşullarında saklanmıştır (Zhu ve ark., 2000).

2.1.5.17. α -Naftol çözeltisi

5 g α -naftol 100 ml % 95'lik etil alkol içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır. Bu çözelti kullanılacağı zaman taze olarak hazırlanmıştır (Tamer ve ark., 1989).

2.1.5.18. % 40' lık KOH çözeltisi

40 g KOH 75 ml distile suda çözündürülerek solüsyon bir süre oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından 0,3 g kreatin ilave edilerek iyi bir şekilde çözündürülüp üzerine 25 ml distile su ilave edilerek hazırlanmıştır (Tamer ve ark., 1989).

2.1.6. Kullanılan antibiyotikler

Sefaklor (CRO 30 μ g Oxoid)

Siprofloksasin (Cf 5 mcg/disk Himedia)

Penisilin-G (P 10 mcg/disk Himedia)

Gentamisin (G 10 mcg/disk Himedia)

Netilmisin sülfat (Nt 30 mcg/disk Himedia)

2.2. METOT

2.2.1. Süt ve süt ürünlerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu

Çalışmamızda kullanılan süt ve süt ürünleri örnekleri piyasadan temin edilerek steril kavanoz içerisinde + 4 °C'de laboratuara getirilerek analize alınmıştır.

Laktik asit bakterilerinin doğal olarak buldukları ortamlardan izole edilip saf kültürlerinin elde edilmesi sırasında MRS agar, M17 agar, Nutrient agar gibi çeşitli besi ortamlarından yararlanılmıştır. Ayrıca besi ortamlarına çeşitli

antibiyotikler ilave edilerek daha zor izole edilen bakterilerin izolasyonu yapılmaya çalışılmıştır.

Piyasadan temin edilen süt ve süt ürünleri örneklerinin steril su ile 10^{-1} 'den 10^{-3} 'e kadar dilüsyonları hazırlanmıştır.

Hazırlanan dilüsyonlar steril petrilere 1 ml oranında homojen bir şekilde aktarılarak ve bunun üzerine 45 °C'ye kadar soğutulmuş MRS agar, M17 agar, Nutrient agara spesifik maddeleri de eklenip dökülerek karıştırılmıştır. Daha sonra bu besiyerleri anaerobik jar içinde ve aerobik koşullarda MRS agar ve Nutrient agar içerenler 37 °C'deki ve 42 °C'deki; M17 agar içerenler de 30 °C'deki etüvlere 24-72 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır (Castele, 2006; Holt ve ark., 2000; Halkman, 2005).

İnkübasyon süreci tamamlandıktan sonra MRS, M17 ve Nutrient agar içeren petrilere; tek düşen, morfolojik olarak birbirinden farklı olan ve laktik asit bakterisi olduğu sanılan koloniler (mat, krem rengi, beyaz, küçük ve özellikle petrinin alt yüzeyinde bulunan koloniler) öze yardımıyla alınarak başka bir petriye çizgi ekim yöntemiyle aktarılmıştır. İnkübasyon sonunda elde edilen izolatlar saflaştırılmaya kadar pasajlanmıştır (Holt ve ark. 2000; Halkman, 2005; Castele, 2006).

Saflaştırılan izolatların ilk olarak gram boyama ve katalaz aktivitelerine bakılmış; antimikrobiyal aktivite ve ileriki testlerde kullanılmak için – 85 °C'de % 20'lik gliserol içerisinde stoklanmıştır (Holt ve ark., 2000; Halkman, 2005).

2.2.2. İzole edilen laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktivite tespiti

Laktik asit bakterilerinin süt ürünlerindeki önemli rollerinden birisi potansiyel patojenlerin inhibe edilmesidir. Bu inhibitör etki genel olarak laktik asit üretimi ve pH'nın düşüşü ile ilişkili olmakla beraber organik asitler, yağ asitler, hidrojen peroksit, bakteriyosinler ve bakteriyosin benzeri çeşitli antimikrobiyal maddeler üreterek de bu etkiyi gösterebilmektedir (Gürsoy ve Kınık, 2005).

Yapılan çalışmada izole edilen laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktivitelerini belirleyebilmek amacıyla şu yol izlenmiştir:

Analiz için; kültürler optimum gelişim gösterdiği broth (MRS broth, M17 broth, Nutrient broth) tüpleri içerisinde 48 saat geliştirilerek aktif hale getirilmiş ve bu aktif kültürlerden % 1 oranında alınarak tekrar broth içeren tüplere aktarım yapılarak 48 saat süreyle optimum gelişme koşullarında inkübasyona tabi tutulmuş ve bu kültürler çalışma için kullanılmıştır. Broth içerisinde gelişimini tamamlayan kültürlerin pH'ları ölçülmüş ve 121 °C' de 15 dakika tutulmuştur. Daha sonra bu izolatlar her biri steril kapaklı korning tüplerine aktarılarak 3000 rpm' de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Sodyum hidroksit çözeltisi ile pH'ları 5,5'e ayarlanmıştır. Daha sonra bu saf filtratlar 0,7 mm çaplı delme aletiyle delinerek çukur açılmış olan Mueller hinton agar petrilere 15'er µl damlatılmıştır. Damlatma işlemi tamamlanan test mikroorganizması ilaveli (25 µl) Beyin, kalp infüzyon yumuşak agar (laktik asit bakterileri içerenlere MRS yumuşak agar) petrilere yaklaşık 7 ml kadar dökülmüştür.

Petirler içerdikleri test mikroorganizmasının optimum gelişme sıcaklığı olan sıcaklıkta 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldıktan sonra sonuçlar, saf filtratların etrafında oluşan zonların çapları ölçülerek değerlendirilmiştir (Bhunja ve ark., 1988; Ryan ve ark., 1996; Choi ve ark., 1999; Zhu ve ark., 2000).

2.2.3. İzolatların hücresiz filtratlarındaki antimikrobiyal madde üzerine bazı enzimlerin etkisi

Antimikrobiyal aktivite tayini yapılan örnekler arasından yüksek aktivite sergilediği düşünülen izolatlar seçilmiş ve bu izolatların hücresiz filtratlarının gösterdiği antimikrobiyal aktivite üzerine çeşitli enzimlerin etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Seçilen izolatların hücresiz filtratlarının antimikrobiyal aktivitelerini belirleyebilmek amacıyla şu yol izlenmiştir:

Analiz için; kültürler optimum olarak geliştiği (MRS broth, M17 broth, Nutrient broth) tüpleri içerisinde 48 saat geliştirilerek aktif hale getirilmiş ve bu aktif kültürlerden % 1 oranında alınarak tekrar broth içeren tüplere aktarım yapılarak 48 saat süreyle optimum gelişme koşullarında inkübasyona tabi

tutulmuş ve bu kültürler çalışma için kullanılmıştır. Daha sonra bu izolatların her biri steril kapaklı korning tüplerine aktararak 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.

Hazırlanan hüresiz filtrat çeşitli enzimlerle muamele edilmiştir. Kullanılan enzimler ve miktarları aşağıda verildiği şekilde kullanılmıştır :

- 1- Filtratların içerisinde 5 µg/ml olacak şekilde katalaz ilave edilmiş ve filtratlar 37 °C'de 4 saat süreyle bekletilmiştir.
- 2- Proteinaz K; 0,05M sodyum–fosfat tamponu (pH 7,5) içerisinde çözölen proteinaz K'dan 1 mg/ml olacak şekilde filtratlara ilave yapılmış ve filtratlar 37 °C'de 4 saat süreyle bekletilmiştir.
- 3- Tripsin; 0,05M sodyum–fosfat tamponu (pH 7,5) içerisinde çözölen tripsin 2 mg/ml olacak şekilde filtratlara ilave yapılmış ve filtratlar 37 °C'de 4 saat süreyle bekletilmiştir.
- 4- Alfa kimotripsin; 0,05M sodyum–fosfat tamponu (pH 7,5) içerisinde çözölen alfa kimotripsin 5 mg/ml olacak şekilde filtratlara ilave yapılmış ve filtratlar 37 °C'de 4 saat süreyle bekletilmiştir.
- 5- Alfa amilaz; 0,05M sodyum–fosfat tamponu (pH 7,5) içerisinde çözölen alfa amilaz 1 mg/ml olacak şekilde filtratlara ilave yapılmış ve filtratlar 37 °C'de 4 saat süreyle bekletilmiştir.
- 6- lizozim; 0,01M sodyum klorür içerisinde hazırlanan lizozim stok solüsyonundan 1 mg/ml olacak şekilde filtratlara ilave yapılmış ve filtratlar 37 °C'de 4 saat süreyle bekletilmiştir.

Daha sonra patojen test mikroorganizması içeren tüplerden (10^8 kob/ml bulanıklıkta) 0,1 ml alınıp 10ml Beyin kalp infusion yumuşak agara aktarılıp iyice çalkalanmış ve Mueller hinton agar içeren petrilere steril koşullar altında dökölmüştür. Petri yüzeyinin kurumasından sonra yukarıda anlatıldığı gibi modifiye edilen filtratlardan 10'ar µl damlatılmıştır.

Petriler içerdikleri test mikroorganizmasının optimum gelişme sıcaklığı olan sıcaklıkta 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldıktan sonra sonuçlar, filtratların etrafında zon oluşup oluşmamasına göre + veya - biçiminde değerlendirilmiştir (Bhunja ve ark., 1988; Ryan ve ark., 1996; Choi ve ark., 1999; Zhu ve ark., 2000).

2.2.4. Probiyotik bakteri izolatlarının tanımlanması

2.2.4.1. Gram boyama

Christian Gram tarafından 1884 yılında geliştirilmiş diferansiyel bir boyama tekniği olan Gram boyama ile bakterilerin Gram reaksiyonu incelenmiştir. Saflığı sağlanan izolatların aktif kültürleri, optimum olarak geliştikleri steril 10 ml (MRS, M17, Nutrient) agar içeren petrilere çizgi ekimi yapılarak, aerobik/anaerobik koşullarda 24 saat süre ile aktive edilmiştir. Gram boyama işlemi, bu aktif kültürler ile yapılmıştır.

Katı besiyerindeki kültürden öze ile yaklaşık bir toplu iğne başı büyüklüğünde bir kısım alınarak, lam üzerine konulmuş bir damla su içerisinde emülsifiye edilip yüzeye öze ile yayılmıştır. Lam ilk olarak havada kurutulmuş, sonra bek alevinden 3 kez geçirilerek fiksasyon yapılmış ve soğutulmuştur. Preparat ilk önce kristal violet ile boyanarak 1 dakika beklenmiş ve fazla boya akıtılmıştır. Sonra iyot-lügol çözeltisi ile boyanarak 1 dakika beklemeye bırakılmıştır. Fazla boya akıtılarak, alkol ile 6 saniye muamele edilmiştir. Distile su ile alkol yıkanarak uzaklaştırılmış ve son olarak preparat safranin ile boyanarak 30 sn bekletilmiştir. Fazla boya distile su ile yıkanarak havada kendi halinde kurumaya bırakılmıştır. Preparata immersiyon yağı damlatıldıktan sonra 100'lük objektifte incelenmiştir. Mor renkli olan bakteriler Gram (+), pembe renkli olan bakteriler ise Gram (-) olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989; Akçelik ve ark., 1999).

2.2.4.2. Katalaz testi

Saflığı sağlanan izolatların aktif kültürleri, steril 10 ml optimum gelişim gösterdikleri (MRS, M17, Nutrient) broth içeren tüplere inokule edilerek, aerobik/anaerobik koşullarda 24 saat süre ile aktive edilmiştir. Bu aktif kültürler üzerine % 3 hidrojen peroksit damlatılarak gaz kabarcıklarının çıkıp çıkmadığı gözlenmiştir. Gaz kabarcığı görülen kültürler için test pozitif, gaz kabarcığı görülmeyen kültürler için ise test negatif olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

2.2.4.3. % 6.0, % 7.5 ve % 10.0 NaCl'de gelişme

MRS agar, M17 agar ve Nutrient agara % 6.0, % 7.5 ve % 10.0 oranlarında NaCl ayrı ayrı olmak üzere ilave edilmiş, 121 °C de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 24 saatlik aktif kültürler optimum gelişim gösterdikleri besiyerlerine ekilmiştir. Ardından aerobik/anaerobik koşullarda optimum gelişim sıcaklığında 2-7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda gelişim gösterenler pozitif, göstermeyenler negatif olarak değerlendirilmiştir (Holt ve ark., 2000).

2.2.4.4. Farklı sıcaklıklarda gelişme

Saflığı sağlanan izolatların aktif kültürleri steril 10 ml optimum gelişim gösterdikleri (MRS, M17, Nutrient) broth içeren tüplere inokule edilerek 4, 15, 45 °C'deki sıcaklıklarda aerobik veya anaerobik (optimum gelişimine göre) koşullarda 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bulanıklık görülen tüplerde üremenin olduğu kabul edilmiş ve test pozitif, üremenin görülmediği tüplerde ise test negatif olarak değerlendirilmiştir (Lewus ve ark., 1991).

2.2.4.5. pH 3.9'da gelişme

MRS, M17, Nutrient brothlar hazırlanarak pH'sı 1N HCl ile 3.9'a ayarlanmıştır. Besiyeri 10 ml 'lik hacimlerde tüplere paylaştırılmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 24 saat'lik aktif kültürler besiyerlerine ekilmiştir. Sonrasında aerobik ve anaerobik koşullarda optimum gelişme sıcaklıklarında 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda bulanıklığın görüldüğü tüplerde test pozitif, bulanıklık olmayan tüplerde ise test negatif olarak değerlendirilmiştir (Lewus ve ark., 1991).

2.2.4.6. H₂S üretimi

Optimum olarak geliştikleri (MRS, M17, Nutrient) brothlara ekilerek 24 saat süre ile aktive edilmiş olan kültürler, transfer iğnesi ile TSİ besiyerine dikine daldırma şeklinde ekilmiştir. Bütün tüpler aerobik/anaerobik koşullarda optimum gelişme sıcaklıklarında 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda besiyerinde bir siyahlaşma görülen tüplerde o organizma için test pozitif kabul edilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

2.2.4.7. Arjininden NH₃ oluşumu

İzolatların arjininden amonyak oluşturup oluşturmadıklarını tespit etmek için kapaklı tüplere arjinin dihidrolaz broth hazırlanmış ve 24-48 saat süresince MRS broth ortamında geliştirilmiş taze kültürlerden tüplere inokülasyon yapılmıştır. Tüplerin ağzı sıkı bir şekilde kapatıldıktan sonra kültürler optimum gelişme koşullarında 7-9 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Arjinin dihidrolaz broth ortamı içerisinde bulunan indikatör ortamda alkali madde bulunduğu zaman sarıdan kırmızımsıya doğru bir renk değişimi göstermektedir. Bu nedenle inkübasyon süreci sonunda kırmızı- pembe renkte olan tüpler pozitif, değişmeden sarı renkte kalan tüpler negatif olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989; Papamanoli ve ark., 2003).

2.2.4.8. Voges-Proskauer testi

Optimum olarak geliştikleri brotha ekilerek 24 saat süre ile aktive edilmiş olan kültürler, MR-VP broth içeren tüplere ekilerek, optimum gelişim (aerobik, anaerobik) koşullarında, optimum gelişim sıcaklıklarında 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda tüpler üzerinde 0,5 ml α -naftol çözeltisinden ve daha sonra 0,5 ml % 40'luk KOH çözeltisinden ilave edilerek çalkalanmış, 15-20 dakika sonra kırmızı renge doğru bir pembeleşme görülen tüpler pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

2.2.4.9. İzolatların API CHL50 ve API 20 Strep sistemiyle biyokimyasal testlerinin yapılması

API CHL50 ve API 20 Strep (bioMerieüx) sistemi karbonhidrat fermentasyon testleri göz önüne alınarak laktik asit bakterilerinin tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılan bir sistemdir. Test hazır olarak bulunan kitler aracılığıyla yönetici talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmekte ve mikroorganizmalar kullandıkları karbonhidrat kaynaklarına göre sınıflandırılmaktadır.

Tanımlanması yapılacak olan izolatlar üredikleri agar ortamında 24–48 saat süreyle tek koloni düşecek şekilde aktifleştirilmiştir. Katı besi ortamında geliştirilmiş olan kültürler steril kürdan yardımıyla 2 ml'lik API süspansiyon ortamına aktarılmıştır. 2 ml'lik API süspansiyon ortamında maksimum yoğunluk elde edildikten sonra ortam sıvısından 5 ml'lik API süspansiyon ortamına aktarım yapılmış ve bu ortamda BioMerieüx Mc. Farland 2 yoğunluğunu sağlayan sıvı miktarı tespit edilmiştir. Daha sonra 2 ml'lik API süspansiyon ortamından BioMerieüx Mc.Farland 2 yoğunluğunu sağlayan sıvı miktarının iki katı alınmış ve 10 ml API CHL50 ortamına aktarılarak ortama homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır (API 20 Strep sisteminde ise Mc.Farland 4 yoğunluğuna göre ayarlama yapılmıştır). Elde edilen süspansiyon, her bir kuyucuğu farklı karbon kaynağı içeren kitlere aktarılmıştır. Kuyucukların doldurulması işlemi gerçekleştirildikten sonra, yüzeyleri mineral yağ ile kaplanmış ve kapakları kapatılan kitler optimum gelişme sıcaklıklarında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sürecinde 24 ve 48. saatler sonunda kuyucuklarda meydana gelen renk değişimleri göz önünde bulundurularak sonuçlar değerlendirilmiştir. API 20 Strep testlerinde ise üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerekli reaktifler damlatıldıktan sonra gelişen renk değişimine göre değerlendirilmiştir. Tanımlanmaya çalışılan izolat kuyucuklarda bulunan karbon kaynağını kullandığı zaman mevcut indikatör nedeniyle renk değişimi meydana gelmektedir. Başlangıçta koyu mavi renkte olan kuyucuklardan sarıya dönenler pozitif, değişmeden kalanlar negatif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif ve negatif olarak

değerlendirilen sonuçlar yönetici firma tarafından optimize edilmiş olan veri tabanına girilerek tür tayinleri gerçekleştirilmiştir.

API CHL 50 testinde bulunanlar şunlardır: gliserol, eritritol, D-arabinoz, L-arabinoz, riboz, D-ksiloz, L-ksiloz, adonitol, inositol, galaktoz, glukoz, fruktoz, mannoz, sorboz, rhamnoz, dulcitol, salisin, sellobioz, maltoz, laktoz, melibioz, sukroz, trehaloz, inulin, melezitose, rafinoz, nişasta, glikojen, ksilitol, gentiobiose, D-turanoz, D-lyxose, D-tagatoz, eskulin, α -metil-D-mannosid, α -metil-D-glukozid, N-asetil-glukozamin, amigidalin, arbutin, D-arabitol, L-arabitol, glukonat, 2-keto-glukonat, 5-keto glukonat, mannitol, sorbitol, D-fukoz, L-fukoz, b-metil-D-ksilosid.

API 20 Strep testinde bulunanlar şunlardır: sodyum prüvat, hippürik asit, esculin, piroglutamikasitbetanastilamid, α -galaktosidaz, α -galaktosidaz, alkalın fosfataz, lösin amino peptidaz, arjinin dihidrolaz, D-riboz, L-arabinoz, D-mannitol, D-sorbitol, D-laktoz, L-arabinoz, D-mannitol, D-sorbitol, D-laktoz, D-trehaloz, inülin, D-rafinoz, nişasta, glikojen.

2.2.4.10. İzolatların riboprinter sistem ile tanımlanması

Riboprinter sistemi 16 S rRNA'yı temel alarak mikroorganizmaların tür tayinlerini gerçekleştiren moleküler karakterizasyon sistemidir. Sistemin temelinde 16 S rRNA'nın EcoRI enzimi ile kesilmesi ve jelde yürütülmesi sonucunda oluşan bant büyüklüklerinin kullanılan marker ile kıyaslanarak sonuca varılması yatmaktadır. Tanımlama işlemleri kitler aracılığıyla, yönetici talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Sistemde tek bir kit kullanımı ile bir seferde 8 farklı örneğin karakterizasyonu gerçekleştirilebilmektedir. Riboprinter sistemi ile tür tayini için ilk etapta izolatlar optimum olarak geliştikleri agar (MRS, M17, Nutrient) ortamında tek koloni düşecek şekilde aktifleştirilmiştir. Katı ortamda gerçekleştirilen aktif kültürlerden steril çubuk yardımıyla 2-3 koloni olacak şekilde steril şartlar altında alınmış ve içerisinde 40 μ l tampon çözelti bulunan ependorf tüpüne aktarım yapılmıştır. Aktarım yapılan tüpler 5 saniye vorteks yardımı ile karıştırıldıktan sonra koloni alımı ve karıştırma işlemi bir kez daha tekrar edilmiştir. Vorteksleme işlemi tamamlandıktan sonra ependorflar içerisinde

bulunan örnekler sistemin bir parçası olan ependorf setine her tüpe bir örnek koymak kaydıyla 30 µl miktarında aktarılmıştır. Aktarım işlemi tamamlandıktan ve tüplerin kapakları kapatıldıktan sonra set 25 dakika süresince ısı ile muamele edilmiştir. 25 dakikanın sonunda ependorf seti cihazdan çıkarılarak her tüpün içerisinde 5 µl lysing A ve 5 µl lysing B ajanı eklenmiştir. Tüplerin kapakları kapatıldıktan sonra ependorf seti cihaz içerisinde uygun konuma yerleştirilmiştir. Ardından çalışmada kullanılan enzim olan EcoRI'yi içeren tüp çıkartılmış ve üzerine 18µl lactic agent ilave edilmiştir. Enzim içeren tüp de cihaz içerisine uygun konumda yerleştirildikten sonra sistemin çalışması için gerekli olan diğer parçalar (MP konjugat, MP prob ve MP substrattan oluşan MP ortamı; jel kaseti, jel membranı ve ultra saf su) yerleştirilmiş ve cihaz çalıştırılmıştır. Cihazın çalıştırılmasından yaklaşık 12 saat sonra oluşan bantlar ve belirlenen türler sistem içerisinde bulunan veri tabanı ile karşılaştırılarak bakteriler tanımlanmıştır.

2.2.5. Antibiyotik duyarlılık testi

Süt ve süt ürünlerinden izole edilen ve antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu düşünülen probiyotik bakterilerinin çeşitli antibiyotiklere karşı olan direnç ve duyarlılık durumlarını belirlemek için Kirby–Bauer Disk–Difüzyon Metodu kullanılmıştır. Çalışma esnasında kullanılan antibiyotiklerin seçiminde daha önce bu konuda yapılmış olan çalışmalar temel alınmıştır. Çalışma çift paralel olarak yapılmıştır.

Antibiyotik dirençlilik değerlendirmesi yapılacak olan izolatların uygun besiyeri içeren petrilere geliştirilmiş olan 24–48 saatlik aktif kültürlerinden alınarak 1 ml fizyolojik tuzlu su içerisinde dilüsyonları hazırlanmıştır. 1 ml fizyolojik tuzlu su ile Mc Farland No: 0,5 (10^8 kob/ml) bulanıklığına ayarlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonların her birinden 0,5 ml alınarak daha önceden hazırlanmış ve petrilere aktarılmış olan Müller Hinton agar ortamına, steril koşullarda, kapakları açık biçimde 10–15 dakika süreyle bekletilerek yüzeylerinin kurumaması sağlanmıştır. Ardından ticarî olarak satılan antibiyotik diskleri petrilere steril koşullarda, aralarında en az 1,5 cm boşluk olacak şekilde yerleştirilmiştir (her petride 5 farklı antibiyotik diski olacak şekilde). Disklerin yerleştirilmesi

işleminde sonra petripler 15–20 dakika süreyle bekletilmiş ve sonrasında test organizmasının optimum gelişme koşullarında 24–48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu petriplerde oluşan inhibisyon zon çapları ölçülüp değerlendirme yapılmıştır (Rollins ve Joseph, 2000; Halami ve ark., 2000).

2.2.6. Ekstraselüler polisakkarit üretimi (EPS)

Probiyotik bakterilerinin EPS üretim yetenekleri, ortamda var olan şeker kaynağına göre değişiklik gösterebilmektedir. Mevcut izolatların ekstraselüler polisakkarit üretim yeteneklerinin belirlenmesi için aktifleştirilmiş taze kültürlerden optimum olarak geliştiği besi ortamı M17 agar ise glikoz ilaveli M17 agar, laktoz ilaveli M17 agar, fruktoz ilaveli M17 agar ve sükroz ilaveli M17 agara; MRS agar ise glikoz ilaveli MRS agar, laktoz ilaveli MRS agar, fruktoz ilaveli MRS agar ve sükroz ilaveli MRS agara; Nutrient agar ise glikoz ilaveli Nutrient agar, laktoz ilaveli Nutrient agar, fruktoz ilaveli Nutrient agar ve sükroz ilaveli Nutrient agara (bölüm 2.1.3.5., 2.1.3.12., 2.1.3.22.'de belirtildiği gibi hazırlanarak) inokülasyon yapılmış ve kültürler optimum gelişme koşullarında 24–48 saat süreyle inkübasyona tâbi tutulmuştur. İnkübasyon süresi sonunda gelişen kültürlerin morfolojik görünümleri incelenmiş, mat veya şeffaf renkte ve akışkan kıvamda (viskoz özellik gösteren kültürler) bulunan izolatlar (kürdan yardımıyla da incelenerek) EPS üretme yeteneğinde olan koloniler olarak belirlenmiştir (Bouzar ve ark., 1996; Tallon ve ark., 2003).

2.2.7. Metabolik ürünlerin belirlenmesi

Süt ve süt ürünlerinden izole edilerek, sahip oldukları antimikrobiyal aktiviteden dolayı tanımlanmış izolatların metabolik ürünlerinden laktik asit, proteolitik aktivite ve hidrojen peroksit üretimi tayinleri yapılmıştır.

Çalışma esnasında her örnek için 3 okuma yapılmış ve bulunan OD değerlerinin standart sapması aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\alpha = \sqrt{\frac{\sum_{I=1}^N (X_I - \bar{X})^2}{N-1}}$$

2.2.7.1. Laktik asit üretiminin tayini

Laktik asit üretimi tayin edilecek olan izolatlar 5 ml'lik optimum gelişim gösterdiği brothta geliştirilmiş ve bu aktif kültürden tüplere hazırlanmış olan 5 ml'lik optimum gelişim gösterdiği brothta % 1 oranında inokülasyon yapılmıştır. Kültürler 48 saat boyunca optimum gelişme koşullarında inkübasyona tabi tutulmuş ve laktik asit miktar tayininde bu kültürler kullanılmıştır. Çalışma çift paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

İnkübasyondan sonra kültürlerin üzerine sırasıyla önce 2 ml A çözeltisi, sonra 2 ml B çözeltisi, son olarak da 2 ml C çözeltisi ilave edilmiştir. Her çözelti ilavesi sonrası örnekler vorteks yardımıyla iyice karıştırılmıştır. Daha sonra örnekler Whatman 42 nolu filtre kağıdından süzümüştür. Elde edilen süzüntüden 1,5 ml alınıp ayrı bir erlen içerisine aktarılmış ve distile suyla 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti iyice karıştırıldıktan sonra bu çözeltden 10 ml alınarak ayrı bir tüp içerisine alınmıştır ve alınan çözelti üzerine 1 ml renk ayırıcı eklenmiştir. Ayıraç ilavesinden sonra örnekler tekrar vorteks yardımıyla karıştırılmış ve 5 dakika süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu sürecin sonunda berrak sarı renk alan örnekler spektrofotometre (Shimadzu, UV-2101 PC) yardımıyla 400 nm dalga boyunda okunmuştur. Elde edilen optik yoğunluk (OD) değerleri daha önceden hazırlanan standart eğriye göre mg/ml cinsinde laktik asit miktarına çevrilmiştir.

Standart eğrinin hazırlanması için laktik asit solüsyonu kullanılmıştır. Saf laktik asit solüsyonunda; 5 ml'lik MRS broth ortamı içeren tüplere sırasıyla 1, 3, 8, 10, 12, 16 mg/ml olacak şekilde ayrı ayrı laktik asit ilavesi yapılmış ve laktik asit miktarı gittikçe artan bir solüsyon serisi elde edilmiştir. Elde edilen serideki her tüp birer izolat gibi düşünülüp izolatlar için uygulanan işlemler bire bir standart çözeltilere de uygulanmış ve yine 400 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir. Daha sonra elde edilen OD

değerleri ve bu değerleri sağlayan laktik asit konsantrasyonları grafik üzerinde yerleştirilerek standart eğri oluşturulmuştur (Mumcu, 1997).

2.2.7.2. Proteolitik aktivitenin tayini

Proteolitik aktivite tayininde, oluşan aminoasitlere eş değer trosin aminoasidi temel alınmıştır. Proteolitik aktiviteleri belirlenecek olan izolatlar 5 ml optimum gelişim gösterdiği broth ortamında geliştirilmiş ve bu aktif kültürden tüplere hazırlanmış olan 5 ml optimum gelişim gösterdiği broth ortamına % 1 oranında inokülasyon yapılmıştır. Kültürler 48 saat boyunca optimum gelişme koşullarında inkübasyona tâbi tutulmuş ve proteolitik aktivite tayininde bu kültürler kullanılmıştır. Çalışma çift paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

48 saat süreyle geliştirilmiş kültürler üzerine önce 1 ml distile su, sonra da 10 ml 0,72 N trikloro asetik asit (TCA) ilave edilmiş ve örnekler iyice çalkalanmıştır. Karıştırılan örnekler oda sıcaklığında 10 dakika süreyle bekletilmiş ve bu süreç sonunda örnekler Whatman 1 nolu filtre kâğıdından geçirilerek süzölmüştür. Elde edilen süzüntüden 2,5 ml ayrı bir tüp içerisine alınmış ve üzerine 5 ml $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ çözeltisinden koyulup karıştırılmıştır. Daha sonra örneklerin üzerine 1,5 ml Fenol ayıracı eklenmiş ve örnekler koyu mavi renk oluşuncaya kadar karıştırılmıştır. Renk oluşumu gerçekleştikten sonra örnekler 8000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte oluşan berrak mavi sıvı alınarak 650 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Shimadzu, UV-2101PC) optik yoğunlukları belirlenmiştir. Elde edilen değerler daha önceden, proteolitik aktivite için çıkarılan standart eğriye göre, mg/ml cinsinden değerlendirilmiştir (Aslım, 1994).

Proteolitik aktivite tayininde standart eğri oluşturmak için tirozin aminoasidi kullanılmıştır. 5 ml'lik MRS broth ortamı içeren tüplere sırasıyla 0,02, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ve 1 mg/ml olacak şekilde trosin ilave yapılarak standart çözelti serisi elde edilmiştir. Elde edilen serideki her tüp birer izolat gibi düşünülüp izolatlar için uygulanan işlemler bire bir standart çözeltilere de uygulanmış ve yine 650 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir. Daha

sonra elde edilen OD değerleri ve bu değerleri sağlayan tirozin konsantrasyonları grafik üzerinde yerleştirilerek standart eğri oluşturulmuştur (Aslım, 1994).

2.2.7.3. Hidrojen peroksit üretiminin tayini

Hidrojen peroksit üretimi tayin edilecek olan izolatlar 5 ml optimum olarak geliştiği broth ortamında geliştirilmiş ve bu aktif kùltürden tüplere hazırlanmış olan 5 ml optimum olarak geliştiği broth ortamına % 2 oranında inokùlasyon yapılmıştır. Kùltürler 48 saat boyunca optimum gelişme koşullarında inkùbasyona tâbi tutulmuş ve hidrojen peroksit miktar tayini bu kùltürler üzerinden yapılmıştır. Çalışma çift paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

İnkùbasyon süresi sonunda kùltürlerin üzerine 5 ml distile su eklenmiş ve kùltürler 5000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifùj edilmiştir. Santrifùj sonrası üste oluşan berrak sıvı alınmış ve Whatman 42 nolu filtre kâğıdından süzùlmüřtür. Süzme işleminden elde edilen filtratın 4 ml'si ayrı bir tüpe alınmıştır. Alınan bu filtratın üzerine sırasıyla 0,5 ml sülfürik asit, 0,5 ml amonyum molibden ve 0,5 ml potasyum iyodür çözeltilisi ilave edilmiş, her kimyasal ilavesinden sonra örnekler manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice karıştırılmıştır. Tüm bu işlemler gerçekleştirildikten sonra elde edilen sıvının 350 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Shimadzu, UV-2101PC) optik yoğunlukları belirlenmiştir. Elde edilen optik yoğunluk (OD) değerleri; daha önceden hazırlanan, standart eğriye göre µg/ml cinsinde hesaplanmıştır (Mumcu, 1997).

Hidrojen peroksit tayininde kullanılan standart eğrinin oluşturulabilmesi için; 0,1 ml saf (% 35) hidrojen peroksit alınıp distile su ilavesiyle 30 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiliden 1 ml başka bir erlene alınmış ve tekrar distile suyla 30 ml'ye tamamlanarak standart çözeltili hazırlanmıştır. Elde edilen çözeltili bir izolat gibi düşünülüp izolatlar için uygulanan işlemler bire bir standart çözeltiliye de uygulanmış, bu sayede hidrojen peroksit standart eğrisi çıkarılmıştır. Standart eğriden 1 µg/ml hidrojen peroksite karşılık gelen hidrojen peroksit değeri hesaplanmış ve bu sayede izolatların okunan değerleri standart ile kıyaslanarak µg/ml cinsine çevrilmiştir (Mumcu,1997).

3. BULGULAR

3.1. Süt ve Süt Ürünlerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Eskişehir ve Bursa'daki süthane ve marketlerden temin edilmiş 9 peynir, 1 kefir, 1 çiğ süt, 1 pastörize süt ve 1 anne sütü örneğinden laktik asit bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir. MRS agar, M17 agar ve Nutrient agar üzerinde küçük, mat, krem rengi ya da beyaz renkteki laktik asit bakterisi olası olan koloniler rasgele seçilerek saflaştırma yapılmıştır. Gram boyama ve katalaz aktivitesi sonucuna bakılarak, probiyotik bakterisi olma ihtimali yüksek bulunan izolatlar ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere ependorf tüp içerisinde % 20'lik gliserolde -85 °C'de stoklanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda toplamda 209 adet laktik asit bakterisi izole edilmiştir. Elde edilen izolatlardan 100 tanesi peynir örneklerine, 24 tanesi kefir örneğine, 37 tanesi çiğ süt örneğine, 28 tanesi pastörize süt örneğine ve 20 tanesi anne sütü örneğine aittir (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Elde edilen izolatların kaynakları, sayıları ve gelişim gösterdikleri besiyerleri

İzolat Kaynağı	İzolat Sayısı	Gelişim Koşullarına Göre İzolat Sayısı									
		MRS Agar 30 °C Aerob	MRS Agar 30 °C Anaerob	MRS Agar 42 °C Anaerob	MRS-LP Agar 37°C Anaerob	MRS-NNLP Agar 37°C Anaerob	MRS-Clindamycine Agar 37°C Anaerob	M17 Agar 42°C Aerob	M17 Agar 30 °C Aerob	M17 Agar 30°C Anaerob	Nutrient Agar Salicin 37 °C Anaerob
Peynir	100	1	22	17	20	19	7	-	8	4	2
Çiğ Süt	37	-	-	-	9	10	-	14	-	-	4
Pastörize Süt	28	-	-	-	23	-	-	-	-	-	5
Anne Sütü	20	-	-	-	-	-	-	18	-	-	2
Kefir	24	-	-	-	19	-	-	2	-	-	3

3.2. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktivitesi

Süt ve süt ürünlerinden elde edilen 209 laktik asit bakteri izolatının tamamı antimikrobiyal aktivitenin ortaya konması için bölüm 2.2.2’de anlatıldığı yöntemle Çizelge 2.1.’de verilen 18 test bakterisine karşı test edilmiştir. Test edilen izolatların hepsinin bir veya daha fazla sayıda test bakterisine karşı etkili olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2.’de gösterilmiştir.

Elde ettiğimiz izolatların hücresiz filtratları en az 1 veya daha fazla test bakterisine karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. Seksen sekiz izolata ait hücresiz filtrat *Listeria monocytogenes*’e karşı etkili olmuştur. Bunlardan 50’si peynir, 8’i kefir, 12’si çiğ süt, 11’i pastörize süt, 7’si anne sütü örneklerine aittir. 102 izolat ise *L. monocytogenes*’lere karşı etki etmiş ancak bunlara karşı dirençli strainlerin olduğu görülmüştür. On dokuz izolatın hücresiz filtratları *Pseudomonas aeruginosa*’ya karşı etkili olmuştur. Bunlardan 17’si peynir, 1’i kefir, 1’i çiğ süt örneklerine aittir. 31 peynir, 14 kefir, 12 çiğ süt, 7 pastörize süt, 7 anne sütü örneklerine ait toplam 71 izolatın hücresiz filtratları *Enterococcus faecalis*’e karşı etkili olmuştur. 17 peynir, 5 kefir, 7 çiğ süt, 5 pastörize süt, 7 anne sütü örneklerine ait toplam 41 izolatın hücresiz filtratları *Proteus vulgaris*’e karşı etkili olmuştur. Yirmi izolatın hücresiz filtratları *Bacillus cereus*’a karşı etkili olmuştur. Bunlardan 6’sı peynir, 14’ü çiğ süt örneklerine aittir. 11 peynir, 1 pastörize süt örneklerine ait toplam 12 izolatın hücresiz filtratları *Escherchia coli*’ye karşı etkili olmuştur. 6’sı peynir, 8’i kefir, 11’i çiğ süt örneklerine ait toplam 25 izolatın hücresiz filtratları *Bacillus subtilis*’e karşı etkili olmuştur. Çiğ süt örneklerindeki bazı izolatların hücresiz filtratlarının *Bacillus subtilis*’e karşı etkisi Şekil 3.1.’de verilmiştir. On sekiz izolatın hücresiz filtratları *Klebsiella pneumoniae*’ye karşı etkili olmuştur. Bunlardan 13’ü peynir, 5’i çiğ süt örneklerine aittir. Otuz bir izolatın hücresiz filtratları *Salmonella typhimurium*’a karşı etkili olmuştur. Bunlardan 5’i peynir, 8’i kefir, 12’si çiğ süt, 5’i pastörize süt, 1’i anne sütü örneklerine aittir. 17 peynir, 1 çiğ süt, 1 anne sütü örneklerine ait toplam 19 izolatın hücresiz filtratları *Yersinia enterocolitica*’ya karşı etkili olmuştur. Kırk dört izolatın hücresiz filtratları *Staphylococcus aureus*’a karşı etkili olmuştur. Bunlardan 21’i peynir, 15’i çiğ süt, 2’si kefir, 6’sı anne sütü

örneklerine aittir. Çiğ süt örneklerindeki bazı izolatların hücresiz filtratlarının *Staphylococcus aureus*'a karşı etkisi Şekil 3.2.'de verilmiştir. Peynir örneklerinden izole edilen 22 izolatın hücresiz filtratları *S. lactis*'e karşı etkili bulunmuştur. Buna karşılık süt ve kefir örneklerinden elde edilen izolatlara ait hücresiz filtratların antimikrobiyal aktivite göstermediği görülmüştür. 20 peynir, 6 kefir, 1 çiğ süt, 8 pastörize süt örneklerine ait toplam 35 izolat *L. plantarum*'a karşı antimikrobiyal aktivite gösterirken 23 izolatın hücresiz filtratları (15'i peynir, 3'ü kefir, 4'ü çiğ süt, 1'i pastörize süt) *Leu. paramesenteroides* üzerine etkili olmuştur. On dokuz izolatın hücresiz filtratları *Lactobacillus bulgaricus*'a karşı etkili olmuştur. Bunların 15'i peynir, 4'ü pastörize süt örneklerine aittir. On sekiz izolatın hücresiz filtratları *Lactobacillus buchneri*'ye karşı etkili olmuştur. Bunların 5'i peynir, 3'ü çiğ süt, 2'si kefir, 4'ü pastörize süt, 4'ü anne sütü örneklerine aittir.

Çizelge 3.2. (Devam) Laktik asit bakteri izolatlarına ait saf filtratların test mikroorganizmaları üzerine etkisi (sonuçlar mm cinsindedir. A: Dirençli strain var)

İzolat Numaraları	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherchia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes 1</i>	<i>Listeria monocytogenes 2</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
D21	-	-	-	-	-	-	-	12A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9A	-	10A	-	-	-	-	-	-
D23	-	-	-	-	-	-	9A	-	-	10	-	10A	-	-	-	-	-	-
D24	-	-	-	-	-	-	9A	-	-	11	-	10A	-	-	-	-	-	-
D25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	11A	-	-	-	-	-	-
D26	-	-	-	-	-	-	11A	-	-	10	-	11A	-	-	-	-	-	-
D28	-	-	-	-	-	-	12A	-	-	13	-	11A	-	10	-	-	-	-
D29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	10A	-	9	-	-	-	-
D30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	10A	-	9	-	-	-	-
D32	-	-	-	-	-	-	9A	-	-	15	10A	12A	-	-	-	-	-	-
D34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	11A	-	-	-	12A	12A	-	12
D36	11A	-	-	-	-	11A	11	-	-	20	10A	-	11A	11A	9A	-	11A	11A
E12 2	12	-	-	-	-	-	-	-	-	8A	8	-	-	8A	10A	8A	8A	8A
E15	-	-	-	-	-	-	10	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-
E34	12	-	-	20A	-	-	10	10A	-	15	15	11A	-	15	16	14	15A	15A
E50	12	-	-	12A	-	-	-	10A	-	16	13	12A	-	15	16	15	15A	15A
E66	8	-	-	12A	-	-	-	10A	-	16	12	10A	-	15	16	15	15A	15A

Çizelge 3.2. (Devam) Laktik asit bakteri izolatlarına ait saf filtratların test mikroorganizmaları üzerine etkisi (sonuçlar mm cinsindedir. A: Dirençli strain var)

İzolat Numaraları	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherchia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes 1</i>	<i>Listeria monocytogenes 2</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
G22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	-	-
G24	-	-	-	-	-	-	9A	9A	9	15A	-	-	-	10A	-	-	-	-
G26	-	-	-	-	-	-	9A	9A	9	12A	-	-	-	10A	-	-	-	-
G30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10A	-	-	-	-	-	-	-
G32	-	-	-	-	-	-	9A	9A	-	11A	-	-	-	8A	-	-	-	-
G33	-	-	-	-	-	-	10	9A	9	12A	-	-	-	8A	-	-	-	-
G34	-	-	-	-	-	-	10	10	-	12A	-	-	-	8A	-	-	-	-
G35	-	-	-	-	-	-	10A	11	-	12A	-	-	13A	9A	-	-	-	-
G36	-	-	-	-	-	-	10A	9	-	13A	-	-	12A	9A	-	-	-	-
G37	-	-	-	-	-	-	10A	9	9	14A	-	-	11A	10A	-	-	-	-
G38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-
G39	-	-	-	-	-	-	9A	-	9	12A	-	-	-	10A	-	-	-	-
G40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-
G41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	10A	10	-	-	-	-	-
İ1	8A	16	-	20	10A	13A	-	15A	16	10A	-	-	13A	-	-	-	-	-
İ2	8A	16	-	20	10A	13A	-	15A	17	10A	-	-	13A	-	-	-	-	-
İ3	8A	16	-	20	10A	13A	-	15A	17	10A	-	-	13A	-	-	-	-	-

Çizelge 3.2. (Devam) Laktik asit bakteri izolatlarına ait saf filtratların test mikroorganizmaları üzerine etkisi (sonuçlar mm cinsindedir. A: Dirençli strain var)

İzolat Numaraları	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherchia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes 1</i>	<i>Listeria monocytogenes 2</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
İ4	8A	16	-	19	10A	13A	-	15A	18	10A	-	-	14A	-	-	-	-	-
İ5	8A	15	-	19	10A	13A	-	15A	19	10A	-	-	14A	-	-	-	-	-
İ6	8A	16	-	20	10A	13A	-	15A	18	10A	-	-	14A	-	-	-	-	9A
İ7	8A	17	-	20	10A	13A	-	15A	16	10A	-	-	14A	-	-	-	-	10A
İ8	8A	17	-	20	10A	13A	-	15A	17	10A	-	-	13A	-	-	-	-	9A
İ9	8A	17	-	20	10A	13A	-	15A	18	10A	-	-	14A	-	-	-	-	9A
İ10	8A	16	-	19	10A	14A	-	15A	17	10A	-	-	14A	-	-	-	-	-
İ12	-	-	-	-	12A	-	9A	11A	-	9A	-	-	11A	9A	10	9	-	10A
İ13	-	16	-	20	10A	8	-	15A	17	10A	-	-	15A	-	-	-	-	-
İ14	-	-	10A	-	12A	-	9A	11A	-	9A	-	-	11A	9A	9A	9	-	10A
İ15	12A	11A	10A	8	11A	10A	8	-	11A	-	-	9A	11A	-	-	-	-	-
İ16	12A	11A	10A	8	11A	10A	8	-	11A	-	-	9A	11A	-	-	-	-	-
İ17	12A	11A	12A	8	13A	12A	8	-	13A	-	-	9A	13A	-	-	-	-	-
İ18	-	-	9A	-	-	-	-	-	-	-	-	10A	11	11A	10A	9A	10A	10A
İ21	12A	11A	12A	8	13A	12A	8	-	13A	-	9A	9A	13A	-	-	-	-	-
İ22	12A	11A	12A	8	13A	12A	8	-	13A	-	9A	9A	13A	-	-	-	-	-
İM1	-	-	-	-	-	8	9A	-	8	-	-	-	-	10A	9A	8A	9A	9A

Çizelge 3.2. (Devam) Laktik asit bakteri izolatlarına ait saf filtratların test mikroorganizmaları üzerine etkisi (sonuçlar mm cinsindedir. A: Dirençli strain var)

İzolat Numaraları	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherchia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes 1</i>	<i>Listeria monocytogenes 2</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
İM2	9A	-	-	-	-	8	9A	-	-	-	10A	-	-	10A	9A	8A	9A	9A
İM3	9A	-	-	-	-	8	9A	-	-	-	10A	-	-	10A	9A	8A	9A	9A
İM4	9A	-	-	-	-	8	9A	-	-	-	10A	-	-	10A	9A	9	9A	9A
İM5	9A	-	-	-	-	8	9A	-	-	-	10A	-	-	10A	9A	9	9A	9A
İM6	8	-	-	-	-	-	9	-	8	-	-	9	-	8A	8A	8A	8A	8
İM7	8	-	-	-	-	-	9	8	8	-	-	9	-	8A	-	8A	8A	8
İM8	8	-	-	-	-	-	9	-	8	-	8	9	-	8A	8A	8A	8A	8
İM9	9A	8	-	-	-	8	9A	-	-	-	10A	-	-	9A	9A	8A	9A	9A
İM10	9A	8	-	-	9	8	9A	-	-	-	9	-	-	9A	9A	8A	9A	9A
İM11	9A	8	-	-	9	8	9A	-	-	-	9	-	-	10A	9A	8A	9A	9A
İM12	9A	-	-	-	8	8	9A	-	-	-	9	-	-	10A	9A	9A	9A	10A
İM13	9A	-	-	-	8	8	10A	-	-	-	9	-	-	10A	9A	9A	10A	9A
İM14	9A	-	-	-	8	8	10A	-	-	-	9	-	-	10A	9A	9A	10A	10A
İN1	8	-	-	-	-	-	8	-	-	8	8	-	-	-	-	-	9A	-
İN2	8	-	-	-	-	-	8	-	-	8	8	-	-	-	-	-	9A	-
İN3	8	-	-	-	-	-	8	-	-	8	8	-	-	-	-	-	9A	-
İN4	8	-	-	-	-	-	8	-	-	8	8	-	-	-	-	-	9A	-

Çizelge 3.2. (Devam) Laktik asit bakteri izolatlarına ait saf filtratların test mikroorganizmaları üzerine etkisi (sonuçlar mm cinsindedir. A: Dirençli strain var)

İzolat Numaraları	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherchia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes 1</i>	<i>Listeria monocytogenes 2</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
K2	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	8A	8A	-
K3	12A	11A	11A	8	13A	10A	8	-	13A	-	-	9A	12A	-	-	-	-	-
K4	-	-	10A	-	12A	12A	-	-	-	-	10A	10A	10	11A	-	10A	11A	-
K5	13A	11A	12A	8	13A	10A	8	-	13A	-	-	9A	12A	-	-	-	-	-
K6	-	-	-	10	12A	-	-	11A	-	9A	-	-	-	-	10	8	-	9A
K7	-	-	10A	10	11A	-	-	11A	-	9A	-	-	9A	-	9	8	-	9A
K8	-	-	10A	10	12A	-	8	10A	-	9A	-	-	-	9A	9	9	-	9A
K9	12A	11A	12A	8	13A	10A	8	-	13A	-	-	9A	12A	-	-	-	-	-
K10	12A	11A	12A	8	13A	10A	8	-	13A	-	9A	9A	12A	-	-	-	-	-
K12	-	-	-	-	11A	-	8	14A	-	9A	-	-	10A	9A	9	-	-	9A
K13	10A	11A	12A	8	13A	10A	8	-	13A	-	9A	9A	12A	-	-	-	-	-
K14	-	-	10A	-	12A	11A	-	-	-	-	-	9A	11A	9A	10A	9A	10A	-
K15	-	-	10A	-	11A	-	8	14A	-	9A	-	-	11A	-	9	-	-	9A
K16	-	-	10A	-	11A	-	8	12A	-	9A	-	-	9A	-	-	-	-	9A
K17	-	-	10A	-	10A	11A	-	-	-	-	-	9	12A	9A	10A	9A	10A	-
K18	-	-	10A	-	10A	11A	-	-	-	-	-	9	13A	-	10A	9A	10A	-
K19	-	-	10A	-	10A	11A	-	-	-	-	-	9	12A	-	10A	9A	10A	-

Çizelge 3.2. (Devam) Laktik asit bakteri izolatlarına ait saf filtratların test mikroorganizmaları üzerine etkisi (sonuçlar mm cinsindedir. A: Dirençli strain var)

İzolat Numaraları	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherchia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes 1</i>	<i>Listeria monocytogenes 2</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
K20	-	-	10A	-	10A	-	-	-	-	-	-	-	10A	-	11A	9A	10A	-
K21	-	-	10A	-	10A	-	-	-	-	-	-	9A	10A	-	11A	9A	10A	-
KM5	8	-	-	-	-	-	9	-	8	9	8	9	-	8A	8	8A	8A	8
KM6	8	-	-	-	-	-	9	-	8	-	-	9	-	8A	8A	8A	8A	8
KN2	8	-	-	9A	-	-	8	-	-	8	8	-	-	-	-	8A	-	-
KN3	8	-	-	9A	-	-	8	-	-	8	8	-	-	-	-	8A	-	-
KN4	8	-	-	10A	-	-	8	-	-	8	8	-	-	-	-	-	-	-
M1	9	11A	-	-	-	10A	10	10	9	8	-	8	12	8A	8	8A	11A	8A
M2	-	9	12	9	-	-	-	-	-	9	9	-	-	-	-	-	-	-
M6	12A	-	-	-	-	-	12	-	11	14	12	10	-	15	16	14	14	15A
M7	12A	-	-	-	10	-	-	-	-	-	11	10	-	-	-	-	-	-
M8	-	9	12	9	11	-	-	-	-	9	9	-	-	-	-	-	-	-
M9	12A	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-
M14	12A	-	-	-	10	-	12	-	12	12	12	11	9A	14	15	15	14	15A
M17	12	9A	-	-	-	10A	8	11	8	-	9	8	9	8A	-	-	11	8
M21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	11	11	-	-	-	-	-	-
M29	12A	-	-	-	-	-	11	-	11	12	-	-	-	13	14	13	13	13

Çizelge 3.2. (Devam) Laktik asit bakteri izolatlarına ait saf filtratların test mikroorganizmaları üzerine etkisi (sonuçlar mm cinsindedir. A: Dirençli strain var)

İzolat Numaraları	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherchia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes 1</i>	<i>Listeria monocytogenes 2</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
M79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10A	-	-	-	-	-
M80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10A	-	-	-	-	-
P2	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	8A	8A	-
P3	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	8A	8A	-
P4	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	8A	8A	-
P5	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	8A	8A	-
P6	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	8A	8A	-
P7	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	8A	8A	-
P8	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	8A	8A	-
P9	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	8A	8A	-
P10	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	8A	8A	-
P11	-	-	-	-	-	9	9A	11A	-	-	-	-	11A	-	9	-	9	9A
P12	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	8A	8A	-
P13	-	-	10A	-	10A	-	-	-	-	-	-	9	10A	9A	10A	9A	9A	-
P15	-	-	8	-	-	8	9A	11A	-	-	8	-	-	-	9	-	10	9A
P16	-	-	-	-	-	9	9	11A	-	-	8	-	11A	-	9	-	9	9
P17	-	-	-	9A	-	8	9	11A	-	-	9	-	11A	-	9	-	-	9

Çizelge 3.2. (Devam) Laktik asit bakteri izolatlarına ait saf filtratların test mikroorganizmaları üzerine etkisi (sonuçlar mm cinsindedir. A: Dirençli strain var)

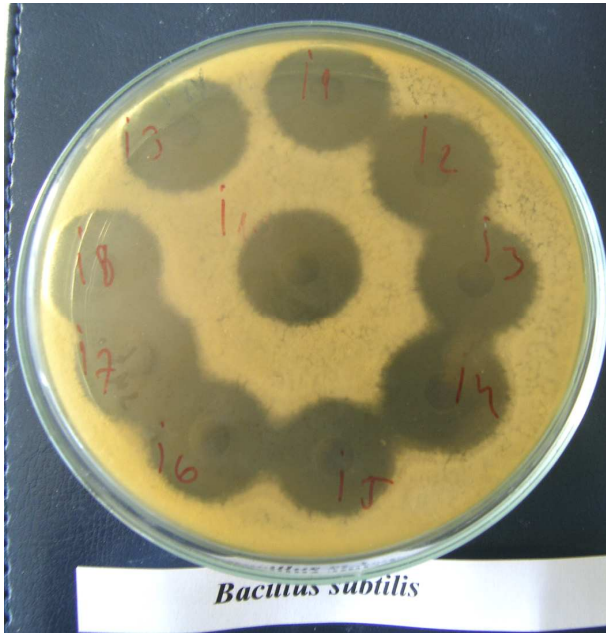
İzolat Numaraları	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherchia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes 1</i>	<i>Listeria monocytogenes 2</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
P18	-	-	-	-	-	9	10A	11A	-	8A	-	-	9A	8A	9A	-	9	9
P19	-	-	10A	-	10A	-	-	-	-	-	-	9	10A	-	10A	9A	10A	-
P20	-	-	-	-	-	-	10A	11A	-	8A	-	-	9A	8A	-	9	9	9
P21	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	8A	8A	-
P22	-	-	10A	-	10A	-	-	-	-	-	-	10A	10A	9A	10A	-	11A	10A
P23	-	-	10A	-	10A	-	-	-	-	-	-	9	12A	9A	10A	11A	-	11A
P24	-	-	11A	-	10A	-	-	-	-	-	-	10A	12A	9A	11A	11A	11A	11A
P25	-	-	-	-	12A	-	9A	10A	-	9A	-	-	9A	-	-	9A	-	9A
PN2	8	-	-	12A	-	-	8	-	-	8	8	-	-	-	8	-	8A	8A
PN3	8	-	-	-	-	-	8	-	-	8	8	-	-	-	8	-	8A	8A
PN5	8	-	-	9A	-	-	8	-	-	8	8	-	-	-	8	-	8A	8A
PN6	8	-	-	-	-	-	8	-	-	8	8	-	-	8A	-	-	8A	8A
PN7	8	-	-	-	-	-	8	-	-	8	8	-	-	-	8	-	8A	8A
S14	10A	-	-	-	12A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S16	12A	-	-	-	12A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S79	-	-	-	-	-	-	-	10	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-
S82	-	-	-	-	-	-	8A	-	-	-	8	9	-	9	8	8	8	8

Çizelge 3.2. (Devam) Laktik asit bakteri izolatlarına ait saf filtratların test mikroorganizmaları üzerine etkisi (sonuçlar mm cinsindedir. A: Dirençli strain var)

İzolat Numaraları	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherchia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes 1</i>	<i>Listeria monocytogenes 2</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S88	-	-	-	-	-	-	-	10	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-
S92	10A	-	13A	-	12A	-	-	-	-	-	-	-	11A	-	-	-	-	-
TM1	9A	-	-	-	-	-	9A	-	-	-	10A	-	-	8A	8A	8A	9A	10A
TM2	9A	-	-	-	-	-	9A	-	-	-	10A	-	-	8A	8A	8A	9A	10A
TM3	9A	-	-	-	-	-	9A	-	-	-	10A	-	-	8A	8A	8A	9A	10A
TM4	9	-	-	-	-	-	9A	-	-	-	10A	-	-	8A	8A	8A	9A	10A
TM5	9A	-	-	-	-	-	9A	-	-	-	10A	-	-	8A	8A	8A	9A	10A
TM6	9A	-	-	-	-	-	9A	-	-	-	10A	-	-	10A	8A	8A	9A	10A
TM7	9A	-	-	-	-	-	9A	-	-	-	10A	-	-	10A	8A	8A	9A	10A
TM8	9A	-	-	-	-	-	9A	-	-	-	10A	-	-	10A	8A	8A	9A	10A
TM9	8	-	-	-	-	-	9	-	8	-	9	9	-	8A	8A	8A	8A	8
TM10	8	-	-	-	-	-	9	-	8	9A	9	9	-	8A	8A	8A	8A	8
TM11	9A	-	-	-	-	-	9A	-	-	-	10A	-	-	10A	8A	8A	9A	10A
TM12	-	-	-	-	-	-	9	-	8	-	9	9	-	8A	8A	8A	8A	8A
TM13	9A	-	-	-	-	-	9A	-	-	-	10A	-	-	10A	9A	8A	10A	10A
TM14	8	-	-	-	-	-	9	-	8	-	-	9	-	8A	8A	8A	9A	8
TM15	9A	-	-	-	-	-	9A	-	-	-	10A	-	-	10A	9A	8A	10A	11A

Çizelge 3.2. (Devam) Laktik asit bakteri izolatlarına ait saf filtratların test mikroorganizmaları üzerine etkisi (sonuçlar mm cinsindedir. A: Dirençli strain var)

İzolat Numaraları	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherchia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes 1</i>	<i>Listeria monocytogenes 2</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
TM16	8	-	-	-	-	-	9	8	8	-	9	9	-	8A	8A	8A	9A	8
TM17	9A	-	-	-	-	-	9A	-	-	-	10A	-	-	10A	9A	8A	10A	10A
TM18	9A	-	-	-	-	8	9A	-	9	-	10A	-	-	10A	9A	8A	9A	9A
TN3	8	-	-	11A	-	-	8	-	-	8	8	-	-	8A	8A	9A	8A	8A
TN4	8	-	-	10A	-	-	8	-	-	8	8	-	-	8A	8A	10A	8A	8A



Şekil 3.1. Saf filtratların *Bacillus subtilis* üzerine olan antimikrobiyal aktivitesi
Şekil üzerindeki: İ1, İ2, İ3, İ4, İ5, İ6, İ7, İ8, İ9, İ10



Şekil 3.2. Saf filtratların *Staphylococcus aureus* üzerine olan antimikrobiyal aktivitesi
Şekil üzerindeki: İ1, İ2, İ3, İ4, İ5, İ6, İ7, İ8, İ9, İ10

3.3. İzolatların Hücresiz Filtratlarındaki Antimikrobiyal Madde Üzerine Bazı Enzimlerin Etkisi

Çalışmamızda yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren 42 izolata ait hücresiz filtratlardaki antimikrobiyal aktivite gösteren madde üzerine katalaz, proteinaz K, tripsin, α -kimotripsin, lizozim, α -amilaz enzimlerinin etkisi araştırılmıştır. Bazı izolatların (A96, İ22, K15, KM5, M75) pH 5,5'e ayarlanmış saf filtratlarının antimikrobiyal etkisini kaybettiği gözlenmiştir. Seçilen 42 izolatın hücresiz filtratlarındaki etkili madde üzerine bazı enzimlerin etkilerine bakıldığında E50, TM4, PN2, M1, M8, İN2, İ22, İM13 ve İ2'ye ait hücresiz filtratlardaki antimikrobiyal maddenin test edilen bütün enzimler ile inaktive olduğu görülmüştür (Bunlar Çizelge 3.3.'te gösterilmemiştir). D11, D24, TM17, TM18, S82, M72, M75, M46, M2, İN4 izolatlarına ait hücresiz filtrattaki antimikrobiyal madde ise proteolitik enzimlere dirençli olarak bulunmuştur. E34, D11, D24, TM17, TM18, S82, M72, M75, M46, E68, M2, İN4 izolatlarına ait hücresiz filtratların lizozim ve α -amilaz enzimlerine karşı hassas olduğu görülmüştür. D12 izolatına ait hücresiz filtrata katalaz enzimi uygulandığında antimikrobiyal aktivite kaybolmuştur. İ21 izolatına ait hücresiz filtratlardaki antimikrobiyal maddenin katalaz ve diğer enzimlerin uygulanması ile etkisini kaybetmiştir. E66 izolatına ait hücresiz filtrattaki antimikrobiyal maddenin α -amilaz hariç diğer enzimlere karşı hassas olduğu görülmüştür. E68, E34, M2, İN4 izolatlarına ait hücresiz filtratların lizozim ve α -amilaz enzimlerine karşı hassas olduğu bulunmuştur. D23, TM15, TM13, M77, M47, M21, KN3 izolatlarına ait inhibitör maddeler proteolitik enzimler ile muamele edildiğinde aktivitelerini kaybetmişlerdir (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3. 3. Bazı enzimlerin antimikrobiyal aktivite gösteren madde üzerine etkisi

İzolot No	Enzimler	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
A96	Saf filtrat	-	-	-
	Katalaz	-	-	-
	Tripsin	-	-	-
	Alfa kimotripsin	-	-	+
	Lizozim	-	-	-
	Alfa amilaz	-	-	+
	Proteinaz K	-	-	+

İzolot No	Enzimler	<i>E. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i> I	<i>L. monocytogenes</i> 2
D11	Saf filtrat	-	+	+
	Katalaz	+	+	+
	Tripsin	-	+	+
	Alfa kimotripsin	-	+	+
	Lizozim	-	+	+
	Alfa amilaz	-	+	+
	Proteinaz K	-	+	+

İzolot No	Enzimler	<i>E. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i> I	<i>L. monocytogenes</i> 2
D12	Saf filtrat	+	-	+
	Katalaz	-	-	-
	Tripsin	-	+	-
	Alfa kimotripsin	-	+	+
	Lizozim	+	-	+
	Alfa amilaz	+	-	+
	Proteinaz K	-	-	+

Çizelge 3. 3. (Devam) Bazı enzimlerin antimikrobiyal aktivite gösteren madde üzerine etkisi

İzolot No	Enzimler	<i>E. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i> I	<i>L. monocytogenes</i> 2
D23	Saf filtrat	+	+	+
	Katalaz	-	+	-
	Tripsin	-	+	+
	Alfa kimotripsin	-	+	-
	Lizozim	-	-	-
	Alfa amilaz	-	+	-
	Proteinaz K	-	+	-

İzolot No	Enzimler	<i>E. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i> I	<i>L. monocytogenes</i> 2
D24	Saf filtrat	-	-	+
	Katalaz	+	-	+
	Tripsin	-	-	+
	Alfa kimotripsin	-	-	+
	Lizozim	-	-	+
	Alfa amilaz	-	-	+
	Proteinaz K	-	-	+

İzolot No	Enzimler	<i>P. vulgaris</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i> I
E34	Saf filtrat	-	-	+
	Katalaz	-	-	+
	Tripsin	-	-	+
	Alfa kimotripsin	-	-	-
	Lizozim	-	-	-
	Alfa amilaz	-	-	+
	Proteinaz K	-	-	+

Çizelge 3. 3. (Devam) Bazı enzimlerin antimikrobiyal aktivite gösteren madde üzerine etkisi

İzolot No	Enzimler	<i>P. vulgaris</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i> I
E66	Saf filtrat	-	-	+
	Katalaz	-	-	-
	Tripsin	-	-	-
	Alfa kimotripsin	-	-	-
	Lizozim	-	-	-
	Alfa amilaz	-	-	+
	Proteinaz K	-	-	-

İzolot No	Enzimler	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i> I
E68	Saf filtrat	+	+	+
	Katalaz	-	+	+
	Tripsin	+	+	+
	Alfa kimotripsin	-	-	+
	Lizozim	-	-	-
	Alfa amilaz	-	+	-
	Proteinaz K	-	+	+

İzolot No	Enzimler	<i>E. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i> I	<i>L. monocytogenes</i> 2
E114.1	Saf filtrat	-	+	+
	Katalaz	-	+	+
	Tripsin	-	+	+
	Alfa kimotripsin	-	+	-
	Lizozim	-	+	-
	Alfa amilaz	-	+	+
	Proteinaz K	-	+	-

Çizelge 3. 3. (Devam) Bazı enzimlerin antimikrobiyal aktivite gösteren madde üzerine etkisi

İzolot No	Enzimler	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L.monocytogenes</i> I
İ18	Saf filtrat	-	-	+
	Katalaz	-	-	+
	Tripsin	-	-	+
	Alfa kimotripsin	-	-	-
	Lizozim	-	-	-
	Alfa amilaz	-	-	-
	Proteinaz K	-	-	-

İzolot No	Enzimler	<i>E. faecalis</i>	<i>L.monocytogenes</i> I	<i>L.monocytogenes</i> 2
İ21	Saf filtrat	-	-	+
	Katalaz	-	-	+
	Tripsin	-	-	-
	Alfa kimotripsin	-	-	-
	Lizozim	-	-	-
	Alfa amilaz	-	-	-
	Proteinaz K	-	-	-

İzolot No	Enzimler	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>K. pneumoniae</i>
İ22	Saf filtrat	-	-	-
	Katalaz	-	-	-
	Tripsin	+	-	-
	Alfa kimotripsin	-	-	-
	Lizozim	-	-	-
	Alfa amilaz	+	-	-
	Proteinaz K	-	-	-

Çizelge 3. 3. (Devam) Bazı enzimlerin antimikrobiyal aktivite gösteren madde üzerine etkisi

İzolot No	Enzimler	<i>E. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i> I	<i>L. monocytogenes</i> 2
İN4	Saf filtrat	-	+	+
	Katalaz	-	+	+
	Tripsin	-	+	+
	Alfa kimotripsin	-	+	+
	Lizozim	-	-	-
	Alfa amilaz	-	+	-
	Proteinaz K	-	+	+

İzolot No	Enzimler	<i>B. subtilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
K6	Saf filtrat	-	-	+
	Katalaz	-	-	+
	Tripsin	-	-	+
	Alfa kimotripsin	-	-	-
	Lizozim	-	-	-
	Alfa amilaz	-	-	-
	Proteinaz K	-	-	-

İzolot No	Enzimler	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
K15	Saf filtrat	-	-	-
	Katalaz	-	+	-
	Tripsin	-	-	-
	Alfa kimotripsin	-	-	-
	Lizozim	-	-	-
	Alfa amilaz	-	+	-
	Proteinaz K	-	+	-

Çizelge 3. 3. (Devam) Bazı enzimlerin antimikrobiyal aktivite gösteren madde üzerine etkisi

İzolot No	Enzimler	<i>E. faecalis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>L. monocytogenes</i> I
KM5	Saf filtrat	-	-	-
	Katalaz	-	-	-
	Tripsin	-	-	+
	Alfa kimotripsin	-	-	-
	Lizozim	-	-	-
	Alfa amilaz	-	-	+
	Proteinaz K	-	-	+

İzolot No	Enzimler	<i>E. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i> I	<i>L. monocytogenes</i> 2
KN3	Saf filtrat	-	+	-
	Katalaz	-	+	-
	Tripsin	-	-	-
	Alfa kimotripsin	-	+	-
	Lizozim	-	-	-
	Alfa amilaz	-	-	-
	Proteinaz K	-	-	-

İzolot No	Enzimler	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
M1	Saf filtrat	+	-	-
	Katalaz	-	-	-
	Tripsin	+	-	-
	Alfa kimotripsin	+	-	-
	Lizozim	-	-	-
	Alfa amilaz	+	-	-
	Proteinaz K	-	-	-

Çizelge 3. 3. (Devam) Bazı enzimlerin antimikrobiyal aktivite gösteren madde üzerine etkisi

İzolot No	Enzimler	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i> I
M2	Saf filtrat	+	-	+
	Katalaz	+	-	+
	Tripsin	+	-	+
	Alfa kimotripsin	-	-	+
	Lizozim	-	-	-
	Alfa amilaz	-	-	+
	Proteinaz K	+	-	+

İzolot No	Enzimler	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i> I	<i>L. monocytogenes</i> 2
M21	Saf filtrat	-	+	+
	Katalaz	+	+	+
	Tripsin	+	-	-
	Alfa kimotripsin	-	+	-
	Lizozim	-	+	-
	Alfa amilaz	-	+	-
	Proteinaz K	-	+	-

İzolot No	Enzimler	<i>B. cereus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>L. monocytogenes</i> 2
M41	Saf filtrat	+	-	+
	Katalaz	-	-	+
	Tripsin	-	-	-
	Alfa kimotripsin	-	-	+
	Lizozim	-	-	+
	Alfa amilaz	-	-	+
	Proteinaz K	-	-	+

Çizelge 3. 3. (Devam) Bazı enzimlerin antimikrobiyal aktivite gösteren madde üzerine etkisi

İzolot No	Enzimler	<i>P. vulgaris</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i> I
M46	Saf filtrat	-	-	+
	Katalaz	-	-	+
	Tripsin	-	-	+
	Alfa kimotripsin	-	-	+
	Lizozim	-	-	+
	Alfa amilaz	-	-	+
	Proteinaz K	-	-	+

İzolot No	Enzimler	<i>P. vulgaris</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i> I
M47	Saf filtrat	-	-	+
	Katalaz	-	-	+
	Tripsin	-	+	+
	Alfa kimotripsin	-	+	+
	Lizozim	-	-	+
	Alfa amilaz	-	-	+
	Proteinaz K	-	-	-

İzolot No	Enzimler	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i> I	<i>L. monocytogenes</i> 2
M72	Saf filtrat	+	+	+
	Katalaz	+	+	+
	Tripsin	+	+	+
	Alfa kimotripsin	-	+	+
	Lizozim	-	+	+
	Alfa amilaz	+	+	+
	Proteinaz K	+	-	+

Çizelge 3. 3. (Devam) Bazı enzimlerin antimikrobiyal aktivite gösteren madde üzerine etkisi

İzolot No	Enzimler	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>L. monocytogenes</i>
M75	Saf filtrat	-	-	-
	Katalaz	-	-	+
	Tripsin	-	-	+
	Alfa kimotripsin	-	-	+
	Lizozim	-	-	-
	Alfa amilaz	-	-	+
	Proteinaz K	-	-	+

İzolot No	Enzimler	<i>L. monocytogenes</i> I	<i>L. monocytogenes</i> 2	<i>Y. enterocolitica</i>
M77	Saf filtrat	+	+	+
	Katalaz	+	+	+
	Tripsin	-	-	-
	Alfa kimotripsin	+	-	+
	Lizozim	+	-	+
	Alfa amilaz	+	-	+
	Proteinaz K	-	-	-

İzolot No	Enzimler	<i>E.coli</i>	<i>L. monocytogenes</i> I	<i>P. aeruginosa</i>
P23	Saf filtrat	-	+	+
	Katalaz	-	+	-
	Tripsin	-	+	+
	Alfa kimotripsin	-	+	-
	Lizozim	-	+	-
	Alfa amilaz	-	+	-
	Proteinaz K	-	+	-

Çizelge 3. 3. (Devam) Bazı enzimlerin antimikrobiyal aktivite gösteren madde üzerine etkisi

İzolot No	Enzimler	<i>E. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i> I
PN2	Saf filtrat	+	-	-
	Katalaz	-	-	-
	Tripsin	-	-	-
	Alfa kimotripsin	-	-	-
	Lizozim	-	-	-
	Alfa amilaz	-	-	-
	Proteinaz K	-	-	-

İzolot No	Enzimler	<i>E. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i> I	<i>L. monocytogenes</i> 2
S82	Saf filtrat	-	+	+
	Katalaz	-	+	+
	Tripsin	-	+	+
	Alfa kimotripsin	-	+	+
	Lizozim	-	+	+
	Alfa amilaz	-	+	+
	Proteinaz K	-	-	+

İzolot No	Enzimler	<i>E. faecalis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>L. monocytogenes</i> I
TM13	Saf filtrat	-	-	+
	Katalaz	-	-	+
	Tripsin	-	-	+
	Alfa kimotripsin	-	-	+
	Lizozim	-	-	+
	Alfa amilaz	-	-	+
	Proteinaz K	-	-	-

Çizelge 3. 3. (Devam) Bazı enzimlerin antimikrobiyal aktivite gösteren madde üzerine etkisi

İzolot No	Enzimler	<i>E. faecalis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>L. monocytogenes</i> I
TM15	Saf filtrat	+	-	+
	Katalaz	-	-	+
	Tripsin	-	-	+
	Alfa kimotripsin	-	-	+
	Lizozim	-	-	+
	Alfa amilaz	-	-	+
	Proteinaz K	-	-	-

İzolot No	Enzimler	<i>E. faecalis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>L. monocytogenes</i> I
TM17	Saf filtrat	-	-	+
	Katalaz	-	-	+
	Tripsin	-	-	+
	Alfa kimotripsin	-	-	+
	Lizozim	-	-	+
	Alfa amilaz	-	-	+
	Proteinaz K	-	-	+

İzolot No	Enzimler	<i>E. faecalis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>L. monocytogenes</i> I
TM18	Saf filtrat	-	-	+
	Katalaz	-	-	+
	Tripsin	-	-	+
	Alfa kimotripsin	-	-	+
	Lizozim	-	-	+
	Alfa amilaz	-	-	+
	Proteinaz K	-	-	+

Çizelge 3. 3. (Devam) Bazı enzimlerin antimikrobiyal aktivite gösteren madde üzerine etkisi

İzolot No	Enzimler	<i>E. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i> I	<i>L. monocytogenes</i> 2
TN3	Saf filtrat	-	+	-
	Katalaz	-	-	-
	Tripsin	-	+	-
	Alfa kimotripsin	-	+	-
	Lizozim	-	-	-
	Alfa amilaz	-	+	-
	Proteinaz K	-	-	-

3.4. Süt ve Süt Ürünlerinden İzole Edilen Bakterilerinin Bazı Morfolojik, Fiziolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

İzole edilen 209 izolatın Gram boyama ve katalaz aktivitesi sonucuna bakıldığında, hepsinin gram (+) katalaz (-) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.4.).

Peynir örneklerine ait 100 izolattan 3'ünün (% 3) basil, 2'sinin (% 2) kokobasil, 95'inin (% 95) kok, kefirde 24 izolatın tamamının (% 100) kok, çiğ sütte 37 izolattan 2'sinin (% 5) basil, 35'inin (% 95) kok, pastörize süt ve anne sütüne ait izolatların tamamının (% 100) kok olduğu görülmüştür (Çizelge 3.4.). Şekil 3.5.'te D25 izolatının, Şekil 3.6.'da M47 izolatının, Şekil 3.7.'de M41 izolatının, Şekil 3.8.'de S82 izolatının mikroskopik görüntüsü verilmiştir.

Peynir örneklerine ait 100 izolattan 47'si (% 47) 4 °C, 15 °C ve 45 °C'de; 20'si (% 20) sadece 15 °C ve 45 °C'de; 7'si (% 7) sadece 45 °C'de gelişmiştir. Geri kalan 26'sı (% 26) ise 4 °C, 15 °C ve 45 °C'lerden bir veya birkaçında zayıf gelişim göstermiştir. 24 kefir izolatının 11'i (% 46) 4 °C, 15 °C ve 45°C'de; 5'i (% 21) sadece 15 °C ve 45 °C'de; 4'ü (% 17) sadece 45 °C'de gelişmiştir. Geri kalan 4'ü (% 17) ise 4 °C, 15 °C ve 45 °C'lerden bir veya birkaçında zayıf gelişim göstermiştir. Çiğ sütte 37 izolatın 19'u (% 51) 4 °C, 15 °C ve 45 °C'de; 2'si (% 5) sadece 15 °C ve 45 °C'de; 2'si (% 5) sadece 45 °C'de gelişmiştir.

Geriye kalan 14'ü (% 38) 4 °C, 15 °C ve 45 °C'lerden bir veya birkaçında zayıf gelişim göstermiştir. Pastörize sütte 28 izolattan 13'ü (% 46) 4 °C, 15 °C ve 45 °C'de; 1'i (% 3) sadece 15 °C ve 45 °C'de; 1'i (% 3) sadece 45 °C'de gelişmiştir. Geriye kalan 13'ü (% 46) 4 °C, 15 °C ve 45 °C'lerden bir veya birkaçında zayıf gelişim göstermiştir. Anne sütünde 20 izolattın tamamı (% 100) 4°C, 15 °C ve 45°C'de gelişim göstermiştir (Çizelge 3.4.).

Peynir örneklerine ait 100 izolattan 36'sı (% 36) % 6, % 7,5, % 10 NaCl'de; 28'i (% 28) sadece % 6, % 7,5 NaCl'de; 6'sı (% 6) sadece % 6 NaCl'de gelişmiştir. Geri kalan 30'u (% 30) ise % 6, % 7,5, % 10 NaCl'lerden bir veya birkaçında zayıf gelişim göstermiştir. Kefirde 24 izolattın 1'i (% 4) % 6, % 7,5, % 10 NaCl'de; 4'ü (% 17) sadece % 6, % 7,5 NaCl'de; 2'si (% 8) sadece % 6 NaCl'de gelişmiştir. Geri kalan 17'si (% 71) ise bir veya birkaçında zayıf gelişim göstermiştir. Çiğ sütte 37 izolattın 8'i (% 22) % 6, % 7,5, % 10 NaCl'de, 4'ü (% 17) sadece % 6, % 7,5 NaCl'de; 2'si (% 8) sadece % 6 NaCl'de gelişmiştir. 18'i (%75) % 6, % 7,5, % 10 NaCl'lerin hiçbirinde gelişmemiştir. Geri kalan 3'ü (% 8) ise % 6, % 7,5, % 10 NaCl'lerden bir veya birkaçında zayıf gelişim göstermiştir. Pastörize sütte 28 izolattan 7'si (% 25) % 6, % 7,5, % 10 NaCl'de, 3'ü (% 11) sadece % 6, % 7,5 NaCl'de; 3'ü (% 11) sadece % 6 NaCl'de gelişmiştir. Geri kalan 15'i (% 53) ise % 6, % 7,5, % 10 NaCl'lerden bir veya birkaçında zayıf gelişim göstermiştir. Anne sütünde 20 izolattan 1'i (% 3) % 6, % 7,5, % 10 NaCl'de, 1'i (% 3) sadece % 6, % 7,5 NaCl'de; 3'ü (% 11) sadece % 6 NaCl'de gelişmiştir. Geri kalan 15'i (% 53) ise % 6, % 7,5, % 10 NaCl'lerden bir veya birkaçında zayıf gelişim göstermiştir (Çizelge 3.4.).

Peynir örneklerine ait 100 izolattan 58'i (% 58) pH 3,9'da gelişmiş; 5'i (% 5) zayıf gelişim göstermiş, 37'si (% 37) hiç gelişim göstermemiştir. 24 kefir izolatından 8'i (%33) pH 3,9'da gelişmiş; 2'si (% 8) zayıf gelişim göstermiş,14'ü (% 14) hiç gelişim göstermemiştir. Çiğ sütte 37 izolattan 23'ü (% 62) pH 3,9'da gelişmiş; 14'ü (% 38) hiç gelişim göstermemiştir. Pastörize sütte 28 izolattan 12'si (% 43) pH 3,9'da gelişmiş; 16'sı (% 57) hiç gelişim göstermemiştir. Anne sütünde 20 izolattan tamamı (% 100) pH 3,9'da gelişim göstermiştir (Çizelge 3.4.).

Peynir örneklerine ait 100 izolattan 21'i (% 21) üç şekerli demir agarda siyahlaşma oluşturup hidrojen sülfür oluşturmuştur. 1'i (% 1) zayıf gelişim göstermiş, 77'i (% 77) hiç hidrojen sülfür oluşturmamıştır. Kefirde, çiğ sütte, pastörize sütte ve anne sütündeki izolatlar hiç hidrojen sülfür oluşturmamıştır (Çizelge 3.4.).

Arjininden amonyak oluşumu testinde tanımlanan 73 izolattan 72'si pozitif sonuç vermiştir. Sadece anne sütünden izole edilen TM17 izolatu gelişim göstermemiştir.

Voges-Proskauer testinde tanımlaması yapılan 73 izolattan 63'ü pozitif sonuç vermiştir. Peynir örneklerinden 52 izolattan 49'u (% 94) gelişim göstermiştir. E50, M46, M47 izolatlarında gelişim görülmemiştir. Kefir örneklerinden 4 izolattan 3'ü (% 75), gelişim göstermiştir. KM5 izolatında gelişim görülmemiştir. Çiğ sütte 7 izolattan 6'sı (% 86) gelişim göstermiştir. İM13 izolatında gelişim görülmemiştir. Pastörize sütte 4 izolatın hepsi (% 100) gelişim göstermiştir. Anne sütünde 6 izolattan 1'i (% 17) gelişim göstermiştir. TM4, TM13, TM15, TM17, TM18 izolatlarında gelişim görülmemiştir.

3.5. Seçilen İzolatların API CHL50 ve API 20 Strep Sistemi ile Tanımlanması

Yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren 73 izolat seçilerek bunların tanımlaması yapılmıştır. API CHL50 ve API 20 Strep sistemi ile yapılan tanımlamaya göre 73 izolattan 47 tanesi *E. faecium* (A4, A96, A105, D11, D12, D13, D14, D15, D16, D17, D18, D22, D23, D24, D25, D26, D28, D29, D30, E114.1, E114.2, E121.k 1, E121.k.2, E122.b.1, E122.b.2, İN2, İN4, K6, KM5, KN3, M2, M7, M8, M17, M21, M53, M75, M77, P2, P23, PN2, PN6, S16, S79, S88, S92, TN3), 1 tanesi *L. fermentum* (S82), 7 tanesi (A102, E34, E68, M14, M46, M47, M72) *P. acidilactici*; 2 tanesi (İ22, K15) *Pediococcus* spp.; 12 tanesi (M1, M6, İM13, TM4, TM13, TM15, TM17, TM18, E131.k.1, E131.k.2, İ2, İ18) *L. lactis* ssp. *lactis*; 4 tanesi (E50, E66, M41, İ21) *L. curvatus* olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 3. 4. Süt ve süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin bazı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri

İzolat Numaraları	Temin Edildiği Ürün	Gram Boyama	Hücre Morfolojisi	Katalaz	4 ° C'de Gelişim	15 ° C'de Gelişim	45 ° C'de Gelişim	% 6 NaCl'de Gelişim	% 7,5 NaCl'de Gelişim	% 10 NaCl'de Gelişim	pH 3,9'da Gelişim	H ₂ S Üretimi
A3	Peynir	+	basil	-	-	-	+	-	-	-	-	-
A4	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	-	-	+	-
A5 1	Peynir	+	kok	-	-	+	+	-	-	-	+	+
A5 2	Peynir	+	kok	-	-	-	+	-	-	-	+	+
A96	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	-	+	-
A102	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	+	+	-
A105	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	-	-	+	-
D11	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	-	+	-
D12	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	-	+	-
D13	Peynir	+	kok	-	±	+	+	+	+	-	+	-
D14	Peynir	+	kok	-	±	+	+	+	±	-	+	-
D15	Peynir	+	kok	-	±	+	+	+	+	-	+	-
D16	Peynir	+	kok	-	±	+	+	+	+	-	±	-
D17	Peynir	+	kok	-	±	+	+	+	±	-	+	-
D18	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	-	+	-
D19	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	-	-	+	+
D20	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	-	-	+	-

Çizelge 3. 4. (Devam) Süt ve süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin bazı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri

İzolat Numaraları	Temin Edildiği Ürün	Gram Boyama	Hücre Morfolojisi	Katalaz	4 ° C'de Gelişim	15° C'de Gelişim	45° C'de Gelişim	% 6 NaCl'de Gelişim	% 7,5 NaCl'de Gelişim	% 10 NaCl'de Gelişim	pH 3,9'da Gelişim	H ₂ S Üretimi
G22	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	+	-	-
G24	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	+	+	-
G26	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	+	-	-
G30	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	-	-	-
G32	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	-	-	-
G33	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	+	-	-
G34	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	+	-	-
G35	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	-	-	-
G36	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	-	-	-
G37	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	-	-	-
G38	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	-	-	-
G39	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	-	-	-
G40	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	-	-	-
G41	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	+	-	-
İ1	Çiğ süt	+	kok	-	-	±	+	-	-	-	-	-
İ2	Çiğ süt	+	kok	-	-	+	+	-	-	-	+	-
İ3	Çiğ süt	+	kok	-	-	±	-	-	-	-	-	-

Çizelge 3. 4. (Devam) Süt ve süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin bazı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri

İzolat Numaraları	Temin Edildiği Ürün	Gram Boyama	Hücre Morfolojisi	Katalaz	4 ° C'de Gelişim	15° C'de Gelişim	45° C'de Gelişim	% 6 NaCl'de Gelişim	% 7,5 NaCl'de Gelişim	% 10 NaCl'de Gelişim	pH 3,9'da Gelişim	H ₂ S Üretimi
İ4	Çiğ süt	+	kok	-	-	±	+	-	-	-	-	-
İ5	Çiğ süt	+	kok	-	-	±	-	-	-	-	-	-
İ6	Çiğ süt	+	kok	-	-	±	-	-	-	-	-	-
İ7	Çiğ süt	+	kok	-	-	±	-	-	-	-	+	-
İ8	Çiğ süt	+	kok	-	-	±	-	-	-	-	-	-
İ9	Çiğ süt	+	kok	-	-	±	-	-	-	-	-	-
İ10	Çiğ süt	+	kok	-	-	±	-	-	-	-	-	-
İ12	Çiğ süt	+	kok	-	-	+	+	+	+	-	+	-
İ13	Çiğ süt	+	kok	-	-	-	+	-	-	-	-	-
İ14	Çiğ süt	+	kok	-	+	+	+	+	+	+	-	-
İ15	Çiğ süt	+	kok	-	-	±	-	-	-	-	-	-
İ16	Çiğ süt	+	kok	-	-	±	+	-	-	-	-	-
İ17	Çiğ süt	+	basil	-	+	+	-	+	-	-	-	-
İ18	Çiğ süt	+	kok	-	-	+	-	-	-	-	+	-
İ21	Çiğ süt	+	basil	-	+	+	-	+	+	+	+	-
İ22	Çiğ süt	+	kok	-	-	-	+	-	-	-	+	-
İM1	Çiğ süt	+	kok	-	+	+	+	+	±	+	+	-

Çizelge 3. 4. (Devam) Süt ve süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin bazı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri

İzolat Numaraları	Temin Edildiği Ürün	Gram Boyama	Hücre Morfolojisi	Katalaz	4 ° C'de Gelişim	15° C'de Gelişim	45° C'de Gelişim	% 6 NaCl'de Gelişim	% 7,5 NaCl'de Gelişim	% 10 NaCl'de Gelişim	pH 3,9'da Gelişim	H ₂ S Üretimi
İM2	Çiğ süt	+	kok	-	+	+	+	+	+	+	+	-
İM3	Çiğ süt	+	kok	-	+	+	+	+	+	+	+	-
İM4	Çiğ süt	+	kok	-	+	+	+	+	+	+	+	-
İM5	Çiğ süt	+	kok	-	+	+	+	-	-	-	+	-
İM6	Çiğ süt	+	kok	-	+	+	+	+	+	+	+	-
İM7	Çiğ süt	+	kok	-	+	+	+	+	+	+	+	-
İM8	Çiğ süt	+	kok	-	+	+	+	+	+	+	+	-
İM9	Çiğ süt	+	kok	-	+	+	+	±	±	±	+	-
İM10	Çiğ süt	+	kok	-	+	+	+	±	±	±	+	-
İM11	Çiğ süt	+	kok	-	+	+	+	±	±	±	+	-
İM12	Çiğ süt	+	kok	-	+	+	+	±	±	±	+	-
İM13	Çiğ süt	+	kok	-	+	+	+	-	-	-	+	-
İM14	Çiğ süt	+	kok	-	+	+	+	-	-	-	+	-
İN1	Çiğ süt	+	kok	-	+	+	+	+	-	-	+	-
İN2	Çiğ süt	+	kok	-	+	+	+	+	+	-	+	-
İN3	Çiğ süt	+	kok	-	+	+	+	+	+	-	-	-
İN4	Çiğ süt	+	kok	-	+	+	+	+	+	-	+	-

Çizelge 3. 4. (Devam) Süt ve süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin bazı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri

İzolat Numaraları	Temin Edildiği Ürün	Gram Boyama	Hücre Morfolojisi	Katalaz	4 ° C'de Gelişim	15° C'de Gelişim	45° C'de Gelişim	% 6 NaCl'de Gelişim	% 7,5 NaCl'de Gelişim	% 10 NaCl'de Gelişim	pH 3,9'da Gelişim	H ₂ S Üretimi
K2	Kefir	+	kok	-	-	+	+	-	-	-	-	-
K3	Kefir	+	kok	-	-	+	+	-	-	-	-	-
K4	Kefir	+	kok	-	-	±	+	-	-	-	-	-
K5	Kefir	+	kok	-	+	±	-	-	-	-	-	-
K6	Kefir	+	kok	-	+	+	+	+	+	-	+	-
K7	Kefir	+	kok	-	+	-	+	-	-	-	+	-
K8	Kefir	+	kok	-	-	±	+	-	-	-	-	-
K9	Kefir	+	kok	-	-	-	+	+	+	-	+	-
K10	Kefir	+	kok	-	+	+	+	±	±	±	-	-
K12	Kefir	+	kok	-	-	+	+	-	-	-	-	-
K13	Kefir	+	kok	-	-	+	+	-	-	-	-	-
K14	Kefir	+	kok	-	+	+	+	±	±	±	-	-
K15	Kefir	+	kok	-	+	+	+	-	-	+	+	-
K16	Kefir	+	kok	-	-	-	+	+	+	-	+	-
K17	Kefir	+	kok	-	+	+	+	-	-	-	±	-
K18	Kefir	+	kok	-	-	-	+	-	-	-	-	-
K19	Kefir	+	kok	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Çizelge 3. 4. (Devam) Süt ve süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin bazı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri

İzolat Numaraları	Temin Edildiği Ürün	Gram Boyama	Hücre Morfolojisi	Katalaz	4 ° C'de Gelişim	15° C'de Gelişim	45° C'de Gelişim	% 6 NaCl'de Gelişim	% 7,5 NaCl'de Gelişim	% 10 NaCl'de Gelişim	pH 3,9'da Gelişim	H ₂ S Üretimi
K20	Kefir	+	kok	-	-	-	+	-	-	-	±	-
K21	Kefir	+	kok	-	-	+	+	-	-	-	-	-
KM5	Kefir	+	kok	-	+	+	+	+	+	+	+	-
KM6	Kefir	+	kok	-	+	+	+	+	+	-	+	-
KN2	Kefir	+	kok	-	+	+	+	+	-	-	-	-
KN3	Kefir	+	kok	-	+	+	+	+	+	-	+	-
KN4	Kefir	+	kok	-	+	+	+	+	-	-	-	-
M1	Peynir	+	kok	-	-	+	+	-	-	-	+	+
M2	Peynir	+	kok	-	-	+	+	+	+	+	+	-
M6	Peynir	+	kok	-	-	+	+	+	+	-	+	-
M7	Peynir	+	kok	-	-	+	+	+	+	-	+	+
M8	Peynir	+	kok	-	-	+	+	+	+	-	+	-
M9	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	+	+	-
M14	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	-	+	+
M17	Peynir	+	kok	-	-	+	+	+	+	+	+	-
M21	Peynir	+	kok	-	-	+	+	+	-	-	+	-
M29	Peynir	+	kok	-	-	+	+	+	+	-	±	-

Çizelge 3. 4. (Devam) Süt ve süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin bazı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri

İzolat Numaraları	Temin Edildiği Ürün	Gram Boyama	Hücre Morfolojisi	Katalaz	4 ° C'de Gelişim	15° C'de Gelişim	45° C'de Gelişim	% 6 NaCl'de Gelişim	% 7,5 NaCl'de Gelişim	% 10 NaCl'de Gelişim	pH 3,9'da Gelişim	H ₂ S Üretimi
M79	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	+	-	+
M80	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	+	-	-
P2	Pastör. Süt	+	kok	-	-	+	+	±	±	±	+	-
P3	Pastör. Süt	+	kok	-	+	+	+	±	±	±	+	-
P4	Pastör. Süt	+	kok	-	-	±	+	±	±	±	-	-
P5	Pastör. Süt	+	kok	-	-	±	+	±	±	±	-	-
P6	Pastör. Süt	+	kok	-	-	±	+	±	±	±	-	-
P7	Pastör. Süt	+	kok	-	+	+	+	±	±	±	-	-
P8	Pastör. Süt	+	kok	-	+	+	+	+	-	-	-	-
P9	Pastör. Süt	+	kok	-	-	±	-	-	-	-	-	-
P10	Pastör. Süt	+	kok	-	-	±	-	-	-	-	-	-
P11	Pastör. Süt	+	kok	-	-	-	+	-	-	-	+	-
P12	Pastör. Süt	+	kok	-	+	+	+	±	±	±	-	-
P13	Pastör. Süt	+	kok	-	-	-	+	±	±	±	-	-
P15	Pastör. Süt	+	kok	-	+	+	+	+	+	+	+	-
P16	Pastör. Süt	+	kok	-	+	+	+	+	+	+	+	-
P17	Pastör. Süt	+	kok	-	±	±	+	-	-	-	+	-

Çizelge 3. 4. (Devam) Süt ve süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin bazı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri

İzolat Numaraları	Temin Edildiği Ürün	Gram Boyama	Hücre Morfolojisi	Katalaz	4 ° C'de Gelişim	15° C'de Gelişim	45° C'de Gelişim	% 6 NaCl'de Gelişim	% 7,5 NaCl'de Gelişim	% 10 NaCl'de Gelişim	pH 3,9'da Gelişim	H ₂ S Üretimi
S88	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	+	+	+	-
S92	Peynir	+	kok	-	+	+	+	+	-	-	+	-
TM1	Anne sütü	+	kok	-	+	+	+	+	-	-	+	-
TM2	Anne sütü	+	kok	-	+	+	+	+	-	-	+	-
TM3	Anne sütü	+	kok	-	+	+	+	+	+	+	+	-
TM4	Anne sütü	+	kok	-	+	+	+	+	+	-	+	-
TM5	Anne sütü	+	kok	-	+	+	+	-	-	-	+	-
TM6	Anne sütü	+	kok	-	+	+	+	-	-	-	+	-
TM7	Anne sütü	+	kok	-	+	+	+	-	-	-	+	-
TM8	Anne sütü	+	kok	-	+	+	+	-	-	-	+	-
TM9	Anne sütü	+	kok	-	+	+	+	-	-	-	+	-
TM10	Anne sütü	+	kok	-	+	+	+	-	-	-	+	-
TM11	Anne sütü	+	kok	-	+	+	+	-	-	-	+	-
TM12	Anne sütü	+	kok	-	+	+	+	-	-	-	+	-
TM13	Anne sütü	+	kok	-	+	+	+	-	-	-	+	-
TM14	Anne sütü	+	kok	-	+	+	+	-	-	-	+	-
TM15	Anne sütü	+	kok	-	+	+	+	-	-	-	+	-

Çizelge 3. 4. (Devam) Süt ve süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin bazı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri

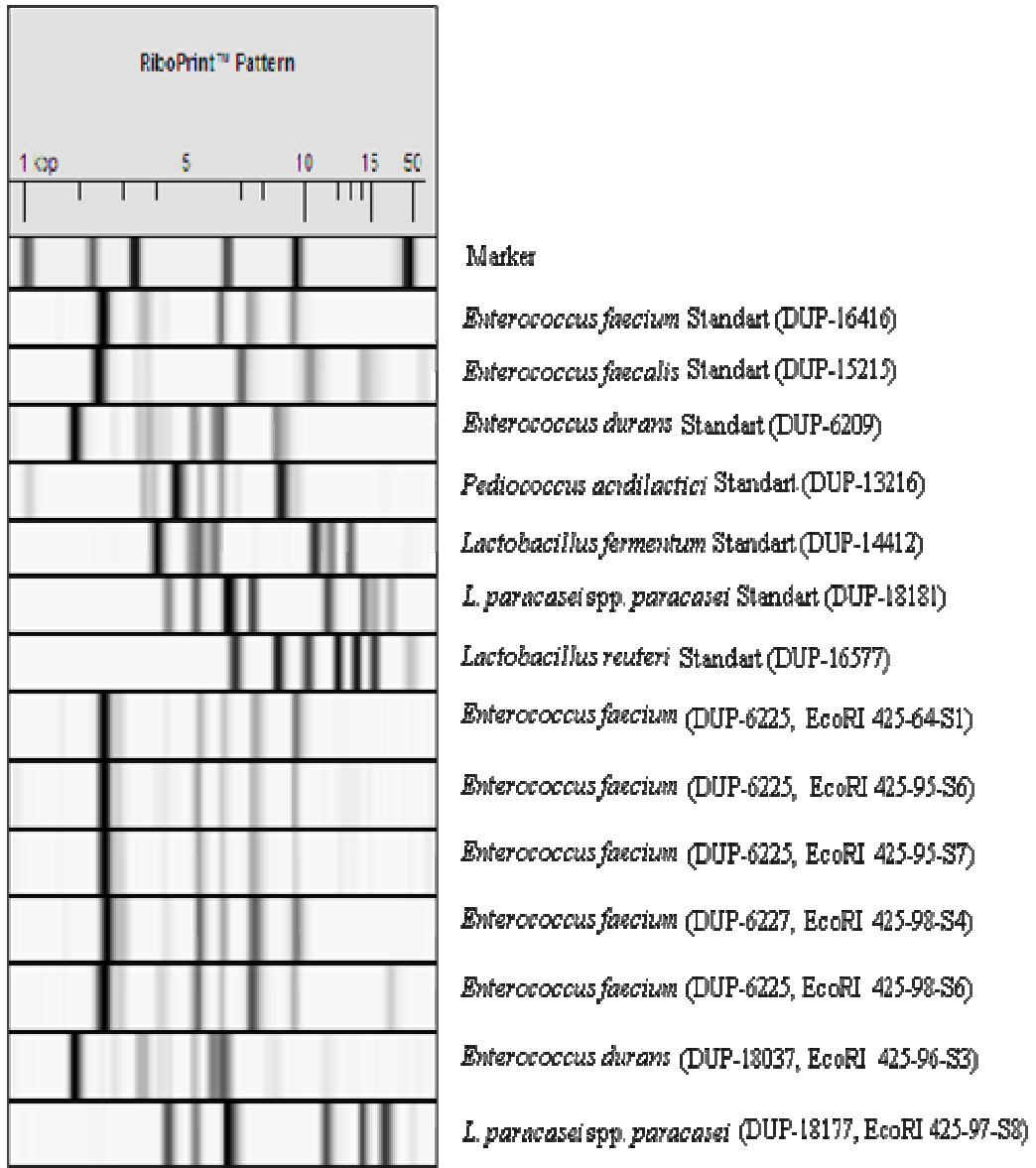
İzolat Numaraları	Temin Edildiği Ürün	Gram Boyama	Hücre Morfolojisi	Katalaz	4 ° C'de Gelişim	15° C'de Gelişim	45° C'de Gelişim	% 6 NaCl'de Gelişim	% 7,5 NaCl'de Gelişim	% 10 NaCl'de Gelişim	pH 3,9'da Gelişim	H ₂ S Üretimi
TM16	Anne sütü	+	kok	-	+	+	+	-	-	-	+	-
TM17	Anne sütü	+	kok	-	+	+	+	-	-	-	+	-
TM18	Anne sütü	+	kok	-	+	+	+	-	-	-	+	-
TN3	Anne sütü	+	kok	-	+	+	+	+	-	-	+	-
TN4	Anne sütü	+	kok	-	+	+	+	+	-	-	+	-

3.6. İzolatların Riboprinter Sistem ile Tür Düzeyinde Tanımlanması

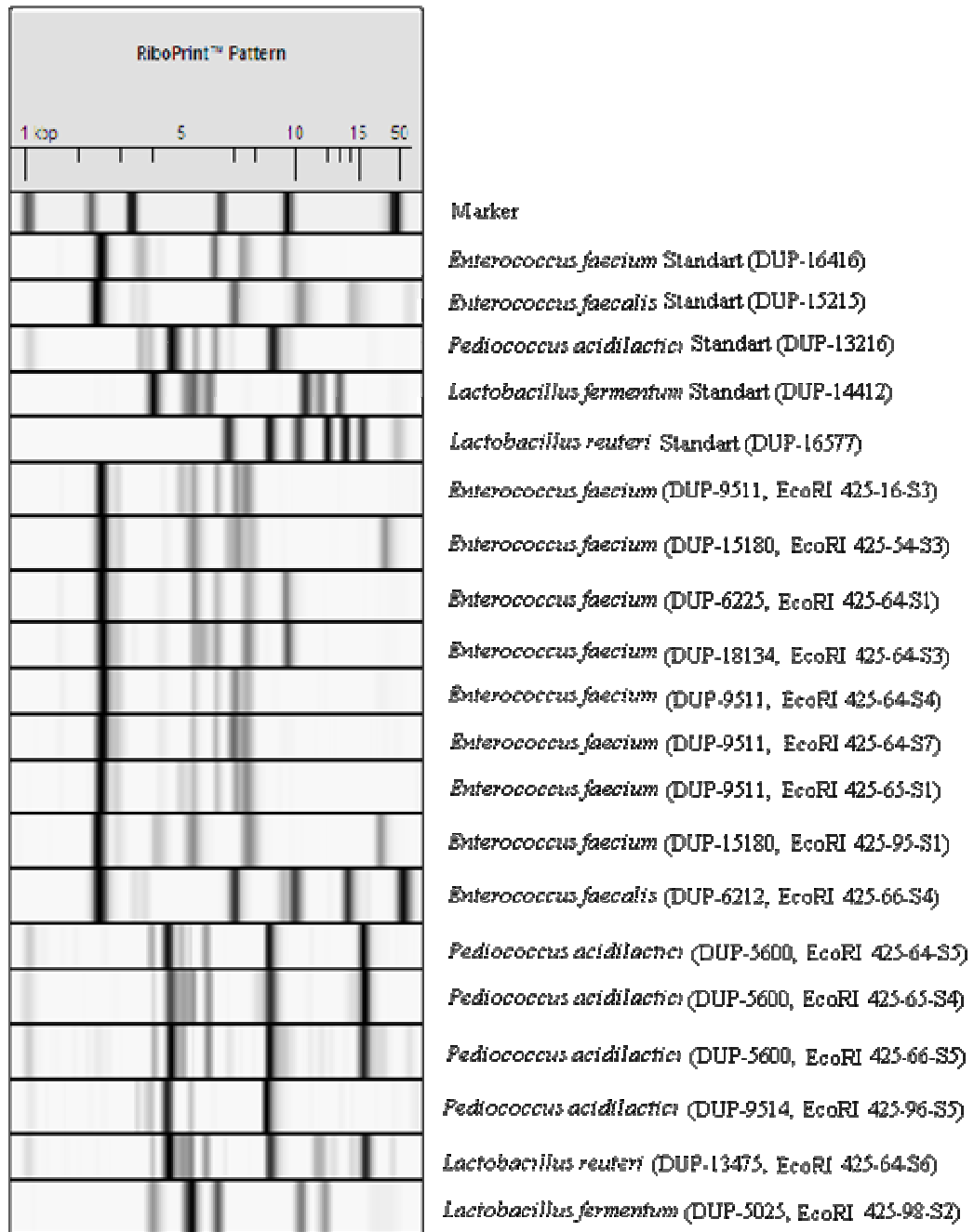
Otomatik riboprinter siteminde, EcoRI kullanılarak yapılan tanımlamada 21 farklı ribotip bulunmuştur. DUP-ID gruplarına göre ise 12 grup olarak belirlenmiştir. Bu gruplar arasındaki benzerlikler genellikle 0.86-1.00 arasında değişmiştir (Çizelge 3.5). Ancak M46, M41, M47, M14, A96, S16, S79, S82, E50, M6, E66, E68, E34, M72, S88 izolatlarına ait benzerlik oranları 0.85'den düşüktür.

16 S rRNA'yı temel alan riboprinter sistem ile tanımlamada 73 izolattan 58 tanesi *E. faecium* (A4, A96, A105, D11, D12, D13, D14, D15, D16, D17, D18, D22, D23, D24, D25, D26, D28, D29, D30, E114.1, E114.2, E121.k.1, E121.k.2, E122.b.1, E122.b.2, E131.k.1, E131.k.2, İ2, İ18, İM13, İN2, İN4, K6, K15, KM5, KN3, M1, M2, M7, M17, M21, M53, M75, M77, P2, P23, PN2, PN6, S16, S79, S88, S92, TM4, TM13, TM15, TM17, TM18, TN3), 1 tanesi *E. faecalis* (M8), 1 tanesi *E. durans* (İ22), 1 tanesi *L. fermentum* (S82), 4 tanesi *L. reuteri* (E50, E66, M6, M41), 1 tanesi *L. paracasei* spp. *paracasei* (İ21), 7 tanesi *P. acidilactici* (A102, E34, E68, M14, M46, M47, M72) olarak tespit edilmiştir. Şekil 3.3. ve Şekil 3.4.'de izolatlara ait bant profilleri verilmiştir.

Riboprinter sistem yapılan tanımlama ile morfolojik ve fizyolojik özellikler ile biyokimyasal testlerinin sonucuna göre yapılan tanımlamalarda farklılıklar bulunmaktadır (Çizelge 3.6.). Riboprinter sistem ile E50, E66, M41 *L. reuteri* olarak tanımlanırken morfolojik ve fizyolojik özellikler ile biyokimyasal testlerinin sonucunda *L. curvatus*; M6 izolatu *L. reuteri* olarak tanımlanırken *L. lactis* spp. *lactis*; M8 izolatu *E. faecalis* olarak tanımlanırken *E. faecium*; İ21 izolatu *L. paracasei* spp. *paracasei* olarak tanımlanırken *L. curvatus*; İ22 izolatu *E. durans* olarak tanımlanırken *Pediococcus* spp.; K15 izolatu *E. faecium* olarak tanımlanırken *Pediococcus* spp.; E68 izolatu *P. acidilactici* olarak tanımlanırken *E. faecium* olarak tanımlanmıştır.



Şekil 3.3. Süt ve kefir örneklerine ait riboprinter sisteminden elde edilen bant profilleri ile yedi türe ait standart bant profilleri



Şekil 3.4. Peynir örneklerine ait riboprinter sisteminden elde edilen bant profilleri ile dört türe ait standart bant profilleri

Çizelge 3.5. Seçilen izolatların EcoRI kullanılarak yapılan ribo grupları ve benzerlik oranları

İzolat No	Dupond ID	Tanımlama	Benzerlik	Ribo Grup
S88	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,84	EcoRI 425-16-S3
E122.b.1	DUP-15180	<i>Enterococcus faecium</i>	0,97	EcoRI 425-54-S3
E122.b.2	DUP-15180	<i>Enterococcus faecium</i>	0,95	EcoRI 425-54-S3
M7	DUP-15180	<i>Enterococcus faecium</i>	0,96	EcoRI 425-54-S3
A105	DUP-6225	<i>Enterococcus faecium</i>	0,96	EcoRI 425-64-S1
M53	DUP-6224	<i>Enterococcus faecium</i>	0,98	EcoRI 425-64-S1
M75	DUP-6225	<i>Enterococcus faecium</i> ,	0,93	EcoRI 425-64-S1
M77	DUP-18134	<i>Enterococcus faecium</i>	0,94	EcoRI 425-64-S3
E50	DUP-13475	<i>Lactobacillus reuteri</i>	0,74	EcoRI 425-64-S3
M6	DUP-13475	<i>Lactobacillus reuteri</i>	0,77	EcoRI 425-64-S3
E66	DUP-13475	<i>Lactobacillus reuteri</i>	0,74	EcoRI 425-64-S3
E68	DUP-5600	<i>Pediococcus acidilactici</i>	0,71	EcoRI 425-64-S3
E34	DUP-5600	<i>Pediococcus acidilactici</i>	0,73	EcoRI 425-64-S3
M72	DUP-5600	<i>Pediococcus acidilactici</i>	0,74	EcoRI 425-64-S3
M17	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,93	EcoRI 425-64-S4
D14	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,97	EcoRI 425-64-S4
M46	DUP-5600	<i>Pediococcus acidilacti</i>	0,72	EcoRI 425-64-S5
M41	DUP-13475	<i>Lactobacillus reuteri</i>	0,63	EcoRI 425-64-S6
D11	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,97	EcoRI 425-64-S7
D12	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,98	EcoRI 425-64-S7
D13	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,97	EcoRI 425-64-S7
D15	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,95	EcoRI 425-64-S7
D16	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,98	EcoRI 425-64-S7
D17	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,96	EcoRI 425-64-S7
D18	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,99	EcoRI 425-64-S7
D22	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,96	EcoRI 425-64-S7
D23	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,97	EcoRI 425-64-S7
D24	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,97	EcoRI 425-64-S7
D25	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,96	EcoRI 425-64-S7
D26	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,98	EcoRI 425-64-S7
D28	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,91	EcoRI 425-64-S4
D29	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,98	EcoRI 425-64-S7
D30	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,98	EcoRI 425-64-S7
M1	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,97	EcoRI 425-64-S7
M2	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,97	EcoRI 425-64-S7
M21	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,97	EcoRI 425-64-S7
A4	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,88	EcoRI 425-65-S1
E114.1	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,89	EcoRI 425-65-S1
E114.2	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,89	EcoRI 425-65-S1
E121.k.1	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,87	EcoRI 425-65-S1
E121.k.2	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,87	EcoRI 425-65-S1
E131.k.1	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,89	EcoRI 425-65-S1
E131.k.2	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,87	EcoRI 425-65-S1
S92	DUP-9511	<i>Enterococcus faecium</i>	0,89	EcoRI 425-65-S1
M47	DUP-5600	<i>Pediococcus acidilactici</i>	0,69	EcoRI 425-65-S4
M8	DUP-6212	<i>Enterococcus faecalis</i>	0,94	EcoRI 425-66-S4

Çizelge 3.5. (Devam)

Seçilen izolatların EcoRI kullanılarak yapılan ribo grupları ve benzerlik oranları

İzolat No	Dupond ID	Tanımlama	Benzerlik	Ribo Grup
M14	DUP-5600	<i>Pediococcus acidilactici</i>	0,70	EcoRI 425-66-S5
A96	DUP-15180	<i>Enterococcus faecium</i>	0,70	EcoRI 425-95-S1
S16	DUP-15180	<i>Enterococcus faecium</i>	0,71	EcoRI 425-95-S1
S79	DUP-15180	<i>Enterococcus faecium</i>	0,78	EcoRI 425-95-S1
A102	DUP-9514	<i>Pediococcus acidilactici</i>	0,89	EcoRI 425-96-S5
S82	DUP-5025	<i>Lactobacillus fermentum</i>	0,62	EcoRI 425-98-S2
İ2	DUP-6225	<i>Enterococcus faecium</i>	0,95	EcoRI 425-64-S1
İ18	DUP-6225	<i>Enterococcus faecium</i>	0,95	EcoRI 425-64-S1
İM13	DUP-6225	<i>Enterococcus faecium</i>	0,95	EcoRI 425-64-S1
İN2	DUP-6225	<i>Enterococcus faecium</i>	0,95	EcoRI 425-64-S1
K6	DUP-6225	<i>Enterococcus faecium</i>	0,96	EcoRI 425-64-S1
K15	DUP-6225	<i>Enterococcus faecium</i>	0,96	EcoRI 425-64-S1
KM5	DUP-6225	<i>Enterococcus faecium</i>	0,94	EcoRI 425-64-S1
P2	DUP-6225	<i>Enterococcus faecium</i>	0,97	EcoRI 425-64-S1
P23	DUP-6225	<i>Enterococcus faecium</i>	0,98	EcoRI 425-64-S1
PN2	DUP-6225	<i>Enterococcus faecium</i>	0,96	EcoRI 425-64-S1
PN6	DUP-6225	<i>Enterococcus faecium</i>	0,95	EcoRI 425-64-S1
TM4	DUP-6225	<i>Enterococcus faecium</i>	0,97	EcoRI 425-64-S1
TM17	DUP-6225	<i>Enterococcus faecium</i>	0,96	EcoRI 425-64-S1
TM18	DUP-6225	<i>Enterococcus faecium</i>	0,91	EcoRI 425-64-S1
TN3	DUP-6225	<i>Enterococcus faecium</i>	0,89	EcoRI 425-95-S6
İN4	DUP-6225	<i>Enterococcus faecium</i>	0,91	EcoRI 425-95-S7
KN3	DUP-6225	<i>Enterococcus faecium</i>	0,93	EcoRI 425-95-S7
İ22	DUP-18037	<i>Enterococcus durans</i>	0,89	EcoRI 425-96-S3
İ21	DUP-18177	<i>Lb. paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	0,91	EcoRI 425-97-S8
TM15	DUP-6227	<i>Enterococcus faecium</i>	0,96	EcoRI 425-98-S4
TM13	DUP-6225	<i>Enterococcus faecium</i>	0,89	EcoRI 425-98-S6

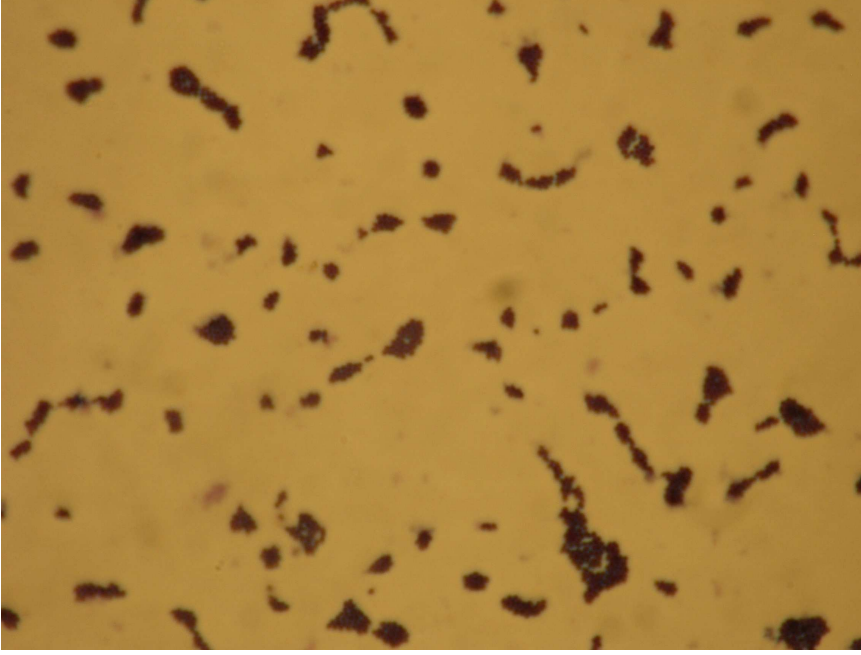
Seçilen izolatların tanımlanmasında kullanılan riboprinter sistem ile biyokimyasal test sonuçları 53 izolatta birebir örtüşürken, 20 izolatta (İM13, TM4, TM13, TM15, TM17, TM18, E131.k.1, E131.k.2, İ2, İ18, M1, E50, E66, M6, M8, M41, İ21, İ22, K15, E68) sonuçlar farklı çıkmıştır (Çizelge 3.6.).

Çizelge 3.6. Seçilen izolatların riboprinter sistem ve biyokimyasal testlere göre yapılan tanımlanması

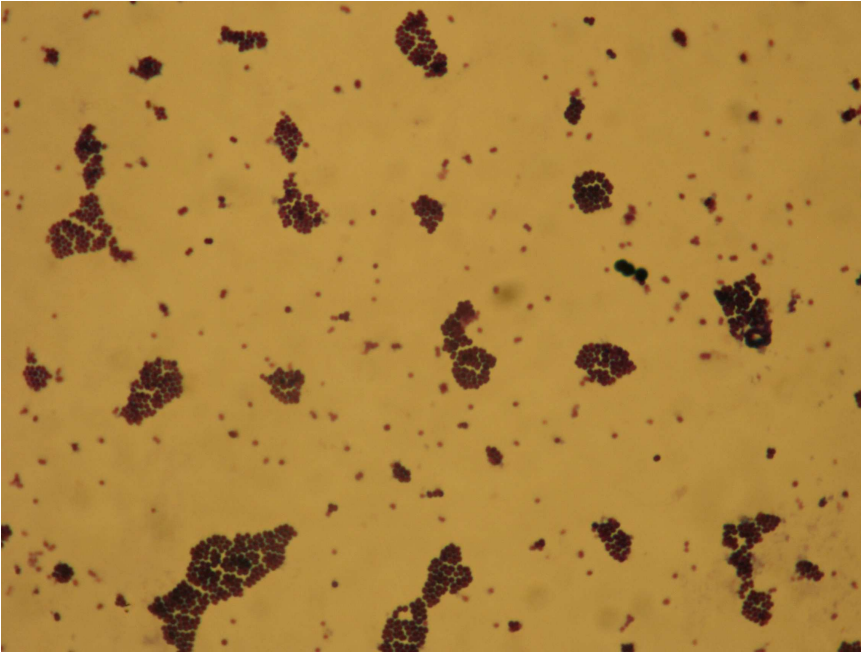
İzolat Numarası	Tanımlanan Tür	
	Riboprinter Sisteme Göre	Biyokimyasal testlere göre
A4	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
A96	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
A102	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pediococcus</i> sp.
A105	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
D11	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
D12	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
D13	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
D14	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
D15	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
D16	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
D17	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
D18	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
D22	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
D23	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
D24	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
D25	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
D26	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
D28	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
D29	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
D30	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
E34	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pediococcus</i> sp.
E50	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>
E66	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>
E68	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
E114.1	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
E114.2	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
E121.k.1	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
E121.k.2	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
E122.b.1	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
E122.b.2	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
E131.k.1	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>
E131.k.2	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>
İ2	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>
İ18	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>
İ21	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>
İ22	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Pediococcus</i> sp.
İM13	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>
İN2	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
İN4	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
K6	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
K15	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Pediococcus</i> sp.

Çizelge 3.6. (Devam) Seçilen izolatların riboprinter sistem ve biyokimyasal testlere göre yapılan tanımlanması

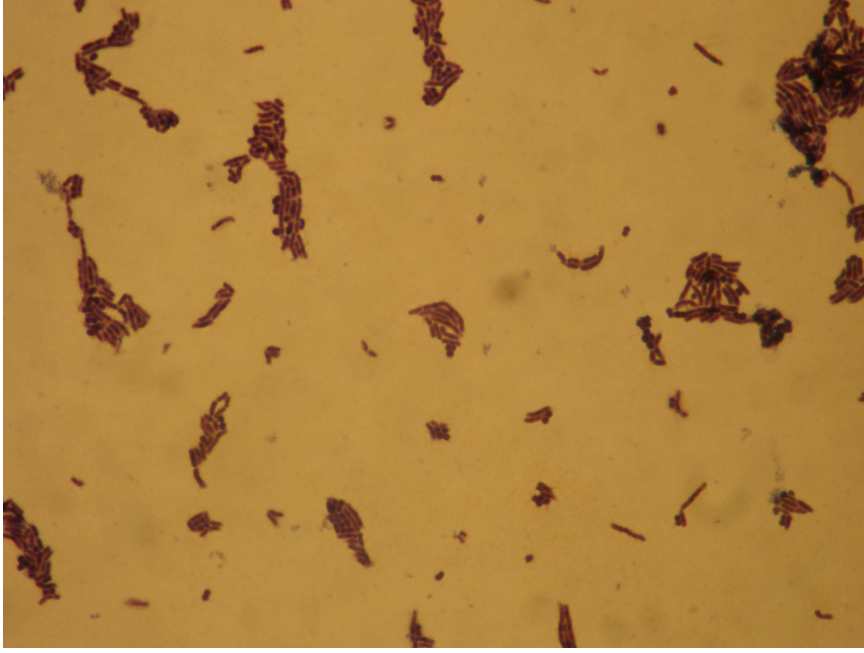
İzolat Numarası	Tanımlanan Tür	
	Riboprinter Sisteme Göre	Biyokimyasal testlere göre
KM5	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
KN3	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
M1	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>
M2	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
M6	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>
M7	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
M8	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
M14	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pediococcus</i> sp.
M17	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
M21	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
M41	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>
M46	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pediococcus</i> sp.
M47	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pediococcus</i> sp.
M53	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
M72	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pediococcus</i> sp.
M75	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
M77	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
P2	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
P23	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
PN2	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
PN6	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
S16	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
S79	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
S82	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
S88	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
S92	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
TM4	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>
TM13	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>
TM15	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>
TM17	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>
TM18	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>
TN3	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>



Şekil 3. 5. D25 (*Enterococcus faecium*), izolatının ışık mikroskopunda görüntüsü
Büyütme; 100X, Boyama yöntemi; gram boyama



Şekil 3. 6. M47 (*Pediococcus acidilactici*), izolatının ışık mikroskopunda görüntüsü
Büyütme; 100X, Boyama yöntemi; gram boyama



Şekil 3. 7. M41 (*Lactobacillus reuteri*), izolatının ışık mikroskopunda görüntüsü
Büyütme; 100X, Boyama yöntemi; gram boyama



Şekil 3. 8. S82 (*Lactobacillus fermentum*), izolatının ışık mikroskopunda görüntüsü
Büyütme; 100X, Boyama yöntemi; gram boyama

3.7. İzolatların Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

Probiyotik özellik gösteren bakterilerin seçimindeki kriterlerden biri asidik ortamda gelişebilmeleridir.

pH 3'te 73 izolattan 68'inin gelişme gösterdiği görülmüştür. 4 izolatta (A105, M14, TM4 VE TM17) zayıf bir gelişme görülürken 5 izolatta ise (D16, İ21, M53, S79, S88) hiç gelişme görülememiştir.

pH 2'de 73 izolattan 60'ında (A4, A96, A102, D11, D12, D13, D14, D15, D17, D18, D22, D23, D24, D25, D26, D28, E34, E50, E66, E68, E114.1, E114.2, E121.k.1, E121.k.2, E122.b.1, E122.b.2, E131.k.1, E131.k.2, İ2, İ18, İ22, İM13, İN2, İN4, K6, K15, KM5, KN3, M2, M6, M7, M17, M21, M41, M46, M47, M72, M75, M77, P2, P23, PN2, PN6, S16, S82, S92, TM13, TM15, TM18, TN3) gelişme görülmüştür. 4 izolatta (A105, M14, TM4 ve TM17) zayıf bir gelişim bulunmuştur.

pH 1'de 73 izolattan 39'unda (A4, D12, D22, D23, D24, D25, D26, D28, E34, E50, E66, E68, E114.1, E114.2, E121.k.1, E121.k.2, E122.b.1, E122.b.2, E131.k.1, E131.k.2 İM13, K15, KM5, KN3, M6, M7, M21, M46, M47, M72, M75, M77, P2, PN2, PN6, S82, S92, TM13, TM18) gelişme görülmüştür. A102, A105, M14, TM4 ve TM15, TM17 izolatlarında ise zayıf bir gelişim görülmüştür.

pH 2'de gelişim gösteren izolatlar katı besiyerine aktarılıp 24 saat sonra gelişimine bakıldığında, 13'ünde (D13, D14, D15, D18, D22, D23, D24, D25, D26, D28, E114.2, E121.k.1, S16) üreme gözlenmiştir (Çizelge 3.7.).

Tanımlanan izolatların % 0,4 fenolde gelişimleri incelenmiştir. Buna göre 73 izolattan 22 tanesinin (A4, A96, A102, D13, D14, D15, D16, D17, D18, D22, D29, D30, E122.b.2, İ18, İ21, İ22, K15, M77, S16, S79, S82, S92) 24 saat içinde broth içeren tüpte geliştiği gözlenmiştir. Buradan katı besiyerine yapılan ekimlerde 48 saat sonra hiçbir gelişme olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 3.7.).

Çizelge. 3. 7. Seçilen izolatların pH 1, 2, 3 ve % 0,4'lük fenolde gelişme durumu

İzolat Numarası	pH 1 Tüpte	pH 2 Tüpte	pH 3 Tüpte	pH 2 Petride	Fenol Tüpte	Fenol Petride
A4	+	+	+	-	+	-
A96	+	+	+	-	+	-
A102	±	+	+	-	+	-
A105	±	±	±	-	±	-
D11	-	+	+	-	-	-
D12	+	+	+	-	-	-
D13	-	+	+	+	+	-
D14	-	+	+	+	+	-
D15	-	+	+	+	+	-
D16	-	-	-	-	+	-
D17	-	+	+	-	+	-
D18	-	+	+	+	+	-
D22	+	+	+	+	-	-
D23	+	+	+	+	-	-
D24	+	+	+	+	-	-
D25	+	+	+	+	-	-
D26	+	+	+	+	-	-
D28	+	+	+	+	-	-
D29	-	-	+	-	+	-
D30	-	-	+	-	+	-
E34	+	+	+	-	-	-
E50	+	+	+	-	-	-
E66	+	+	+	-	-	-
E68	+	+	+	-	-	-
E114 1	+	+	+	-	-	-
E114 2	+	+	+	+	-	-
E121 k 1	+	+	+	+	-	-
E121 k 2	+	+	+	-	-	-
E122 b 1	+	+	+	-	-	-
E122 b 2	+	+	+	-	+	-
E131 k 1	+	+	+	-	-	-
E131 k 2	+	+	+	-	-	-
İ2	-	+	+	-	-	-
İ18	-	+	+	-	+	-
İ21	-	-	-	-	+	-
İ22	-	+	+	-	+	-
İM13	+	+	+	-	-	-
İN2	-	+	+	-	-	-

Çizelge. 3. 7. (Devam) Seçilen izolatların pH 1, 2, 3 ve % 0,4'lük fenolde gelişme durumu

İzolat Numarası	pH 1 Tüpte	pH 2 Tüpte	pH 3 Tüpte	pH 2 Petride	Fenol Tüpte	Fenol Petride
İN4	-	+	+	-	-	-
K6	-	+	+	-	±	-
K15	+	+	+	-	+	-
KM5	+	+	+	-	-	-
KN3	+	+	+	-	-	-
M1	-	-	+	-	-	-
M2	-	+	+	-	-	-
M6	+	+	+	-	-	-
M7	+	+	+	-	-	-
M8	-	-	+	-	-	-
M14	±	±	±	-	-	-
M17	-	+	+	-	-	-
M21	+	+	+	-	-	-
M41	-	+	+	-	-	-
M46	+	+	+	-	-	-
M47	+	+	+	-	-	-
M53	-	-	-	-	-	-
M72	+	+	+	-	-	-
M75	+	+	+	-	-	-
M77	-	±	+	-	+	-
P2	+	+	+	-	±	-
P23	-	+	+	-	±	-
PN2	+	+	+	-	-	-
PN6	+	+	+	-	-	-
S16	+	+	+	+	+	-
S79	-	-	-	-	+	-
S82	+	+	+	-	+	-
S88	-	-	-	-	+	-
S92	+	+	+	-	+	-
TM4	±	±	±	-	-	-
TM13	+	+	+	-	-	-
TM15	±	+	+	-	-	-
TM17	±	±	±	-	-	-
TM18	+	+	+	-	-	-
TN3	-	+	+	-	-	-

3.8. Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları

Süt ve süt ürünlerinden izole edilerek seçilmiş olan izolatların antibiyotik duyarlılık testi sonuçları Çizelge 3.8.'de gösterilmiştir. Çalışma için Siprofloksasin, Penisilin-G, Gentamisin, Netilmisin Sülfat, Sefaklor olmak üzere 5 farklı antibiyotik kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda izolatların dirençlilik ve duyarlılık durumları kültürden kültüre değişmekte olup 31 izolatın Siprofloksasin'e, 26 izolatın Penisilin-G'ye, 24 izolatın Gentamisin'e, 19 izolatın Netilmisin Sülfat'a, 17 izolatın ise Sefaklor'a karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. İzolatlardan A4, D12, D24, E66, İM13, KM5, TM4, TM13, TM15, TM17, TM18 kullanılan tüm antibiyotiklere karşı dirençli bulunurken; A102, PN2, M21, İN4, İ2, İ18, E50 numaralı izolatların ise antibiyotiklerin tümüne duyarlı olduğu saptanmıştır.

Çizelge 3. 8. Seçilen izolatların antibiyotik duyarlılık testi (Sonuçlar mm cinsinde verilmiştir. R: dirençli demektir).

İzolatlar	Siprofloksasin	Penisilin-G	Gentamisin	Netilmisin Sülfat	Sefaklor
A4	R	R	R	R	R
A96	R	13	15	16	11
A102	13	10	8	14	8
D11	R	15	R	R	12
D12	R	R	R	R	9
D23	R	9	R	9	9
D24	R	R	R	R	R
E34	R	R	R	R	9
E50	8	8	8	8	8
E66	R	R	R	R	R
E68	R	R	R	10	R
E114.1	R	R	R	9	9
İ2	8	10	9	9	9
İ18	8	10	9	9	8
İ21	R	10	9	9	9
İ22	R	R	10	10	R
İM13	R	R	R	R	R
İN4	20	21	21	20	16
K6	R	R	9	9	R
K15	R	R	R	R	10
KM5	R	R	R	R	R

Çizelge 3. 8. (Devam) Seçilen izolatların antibiyotik duyarlılık testi (Sonuçlar mm cinsinde verilmiştir. R: dirençli demektir).

İzolatlar	Siprofloksasin	Penisilin-G	Gentamisin	Netilmisin Sülfat	Sefaklor
KN3	R	R	R	10	R
M1	R	R	10	10	9
M2	R	10	R	R	13
M6	21	R	16	19	10
M8	R	16	10	R	15
M21	14	10	9	9	10
M41	R	8	10	R	10
M46	R	8	R	10	R
M47	8	11	R	R	9
M72	9	R	R	9	9
M75	R	11	R	9	R
M77	8	R	11	R	R
P23	R	R	11	13	14
PN2	20	20	20	14	14
PN6	13	R	18	18	13
S82	R	R	R	9	9
TM4	R	R	R	R	R
TM13	R	R	R	R	R
TM15	R	R	R	R	R
TM17	R	R	R	R	R
TM18	R	R	R	R	R
TN3	R	R	18	14	14

3.9. EPS Üretimi

Süt ve süt ürünlerinden izole edilerek seçilmiş olan izolatların farklı şeker içeren ortamlardaki EPS Üretme Durumları Çizelge 3.9.'da gösterilmiştir. İzolatların glikoz, fruktoz, laktoz ve sükroz içeren ortamlardaki EPS üretebilme durumları incelenmiştir. Bu çalışmaların sonucunda, izolatların EPS üretiminin zayıf olduğu görülmüştür. İzolatların hiçbirinin laktoz ve sükroz şekeri bulunan ortamda EPS üretmediği, fruktoz içeren ortamda sadece E68 izolatının, glikoz içeren ortamda da E68 ve S82 izolatlarının EPS üretme ihtimalinin olduğu gözlenmiştir.

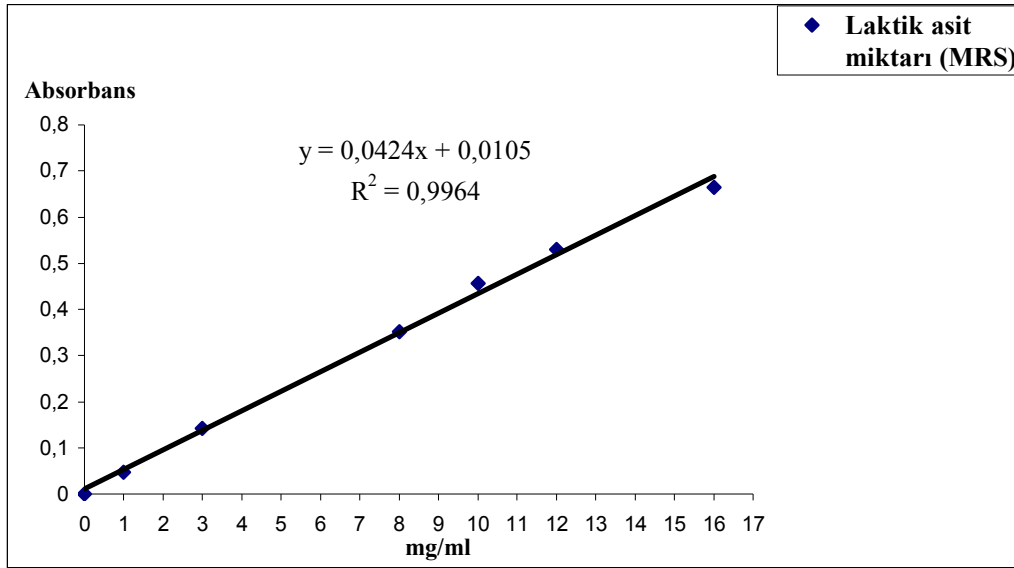
Çizelge 3. 9. Farklı şeker içeren ortamlarda seçilen izolatların EPS üretme durumu

İzolat Numarası	Glikoz	Fruktoz	Laktoz	Sükroz
A4	-	-	-	-
A96	-	-	-	-
A102	-	-	-	-
D11	-	-	-	-
D12	-	-	-	-
D23	-	-	-	-
D24	-	-	-	-
E34	-	-	-	-
E50	-	-	-	-
E66	-	-	-	-
E68	+	-	-	-
E114.1	-	-	-	-
İ2	-	-	-	-
İ18	-	-	-	-
İ21	-	-	-	-
İ22	-	-	-	-
İM13	-	-	-	-
İN4	-	-	-	-
K6	-	-	-	-
K15	-	-	-	-
KM5	-	-	-	-
KN3	-	-	-	-
M1	-	-	-	-
M2	-	-	-	-
M8	-	-	-	-
M21	-	-	-	-
M41	-	-	-	-
M46	-	-	-	-
M47	-	-	-	-
M72	-	-	-	-
M75	-	-	-	-
M77	-	-	-	-
P23	-	-	-	-
PN2	-	-	-	-
S82	+	+	-	-
TM4	-	-	-	-
TM13	-	-	-	-
TM15	-	-	-	-
TM17	-	-	-	-
TM18	-	-	-	-
TN3	-	-	-	-

3. 10. Süt ve Süt Ürünlerinden İzole Edilen Probiyotik Bakteri İzolatlarının Metabolik Ürünlerinin Tespiti

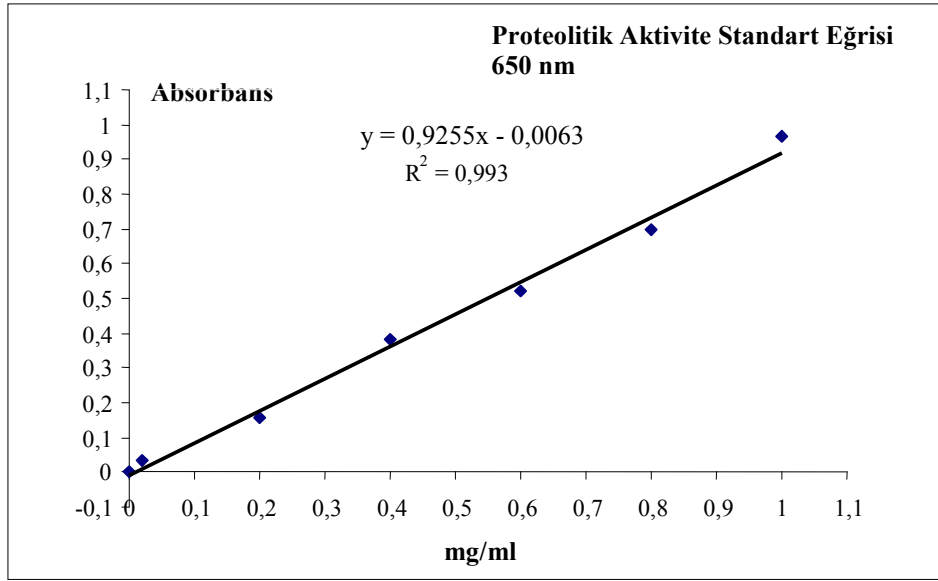
Yapılan testler sonucunda 41 izolatin laktik asit miktarları 0,18-18,41 mg/ml arasında; proteolitik aktivite miktarları 0,23–2,04 mg/ml arasında; hidrojen peroksit miktarları 0,29–2,50 µg/ml arasında bulunmuştur (Çizelge 3.10.). Şekil 3.9., Şekil 3.10., Şekil 3.11.’deki standart eğrilerden yararlanılarak değerler belirlenmiştir.

Seçilen 41 izolattan laktik asit üretim miktarı en yüksek olan izolat KN3, en düşük olanı ise E50 olarak bulunmuştur. İzolatların oldukça yüksek laktik asit değerlerine sahip olduğu görülmüştür. A96, İM13, TM13, TM15, TM17, TM18, M2, M75, S16, TN3, İN4, PN2, PN6, M75, E34, A105, D12 olan izolatların da oldukça yüksek laktik asit değerlerine (10mg/ml ve üzeri) sahip olduğu bulunmuştur.



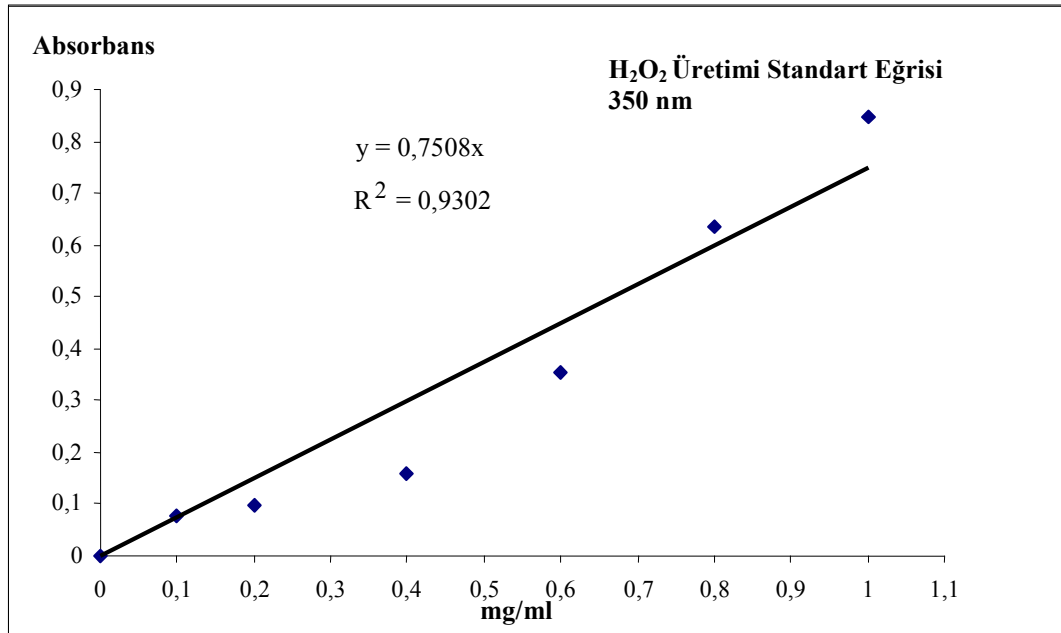
Şekil 3. 9. Laktik asit miktar tayininde kullanılan standart eğri (MRS 400 nm)

Seçilen 41 izolattan proteolitik aktivitesi en yüksek olan izolat E50, en düşük olanı ise TM15 olarak bulunmuştur. D12, E122b 2, M6, M8, M41, M46, M75, S92 izolatlarının da oldukça yüksek proteolitik aktivite değerlerine (1mg/ml ve üzeri) sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 3. 10. Proteolitik aktivite standart eğrisi (650 nm)

Seçilen 41 izolattan hidrojen peroksit miktarı en yüksek olan izolatlar İ22 ile P23, en düşük olanı ise PN6 olarak bulunmuştur. PN6 izolatu dışında diğer izolatların oldukça yüksek hidrojen peroksit üretim değerlerine (1µg/ml ve üzeri) sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 3.11. Hidrojen peroksit üretimi standart eğrisi (350nm)

Çizelge 3. 10. Süt ve süt ürünlerinden izole edilen probiyotik bakteri izolatlarının metabolik ürünlerinin miktarı

İzolat Numarası	Laktik Asit Miktarı mg/ml	Proteolitik Aktivite Miktarı Trosin mg/ml	Hidrojen peroksit Miktarı µg/ml
A96	12,49 ± 0,087	0,67 ± 0,018	1,29 ± 0,037
A105	12,92 ± 0,051	0,81 ± 0,022	1,90 ± 0,006
D11	10,84 ± 0,052	0,51 ± 0,003	1,83 ± 0,019
D12	14,36 ± 0,103	1,66 ± 0,005	1,97 ± 0,060
E34	12,39 ± 0,012	0,64 ± 0,007	1,37 ± 0,002
E50	0,18 ± 0,003	2,04 ± 0,036	1,83 ± 0,019
E66	8,22 ± 0,052	0,36 ± 0,002	1,79 ± 0,026
E114.1	8,19 ± 0,002	0,27 ± 0,002	1,21 ± 0,005
E121.k.2	7,88 ± 0,013	0,58 ± 0,001	1,26 ± 0,017
E122.b.2	0,63 ± 0,056	1,35 ± 0,015	1,83 ± 0,002
E131.k.1	1,86 ± 0,020	0,81 ± 0,007	1,83 ± 0,009
İ2	5,61 ± 0,088	0,81 ± 0,001	1,94 ± 0,024
İ22	8,63 ± 0,088	0,92 ± 0,001	2,50 ± 0,020
İM13	14,81 ± 0,024	0,65 ± 0,002	1,17 ± 0,001
İN4	14,05 ± 0,001	0,66 ± 0,021	1,02 ± 0,002
K6	7,32 ± 0,002	0,56 ± 0,003	1,86 ± 0,007
K15	7,93 ± 0,035	0,78 ± 0,017	2,36 ± 0,106
KN3	18,41 ± 0,027	0,77 ± 0,019	2,47 ± 0,100
M2	10,85 ± 0,017	0,24 ± 0,005	1,62 ± 0,011
M6	0,56 ± 0,012	1,22 ± 0,037	1,83 ± 0,022
M7	5,25 ± 0,032	0,93 ± 0,003	1,80 ± 0,009
M8	1,47 ± 0,014	1,13 ± 0,004	2,01 ± 0,030
M21	1,16 ± 0,001	0,78 ± 0,001	1,71 ± 0,002
M41	2,64 ± 0,041	1,24 ± 0,021	1,79 ± 0,021
M46	0,26 ± 0,002	1,06 ± 0,006	1,86 ± 0,002
M47	2,59 ± 0,003	0,74 ± 0,004	1,75 ± 0,045
M72	9,58 ± 0,028	0,91 ± 0,010	1,86 ± 0,015
M75	11,52 ± 0,099	1,84 ± 0,008	1,30 ± 0,003
P2	8,12 ± 0,005	0,66 ± 0,006	1,47 ± 0,022
P15	5,57 ± 0,001	0,81 ± 0,002	1,83 ± 0,019
P23	7,06 ± 0,017	0,68 ± 0,006	2,50 ± 0,013
PN2	13,85 ± 0,018	0,27 ± 0,001	1,18 ± 0,002
PN6	15,38 ± 0,004	0,65 ± 0,001	0,29 ± 0,002
S16	15,94 ± 0,027	0,75 ± 0,001	1,22 ± 0,029
S82	15,59 ± 0,029	0,40 ± 0,001	1,86 ± 0,017
S92	7,08 ± 0,012	1,04 ± 0,023	2,30 ± 0,200
TM13	14,33 ± 0,035	0,35 ± 0,031	1,24 ± 0,022
TM15	16,59 ± 0,037	0,23 ± 0,001	1,31 ± 0,041
TM17	13,33 ± 0,002	0,67 ± 0,006	1,09 ± 0,022
TM18	12,49 ± 0,007	0,96 ± 0,158	1,30 ± 0,001
TN3	13,88 ± 0,012	0,77 ± 0,026	2,17 ± 0,108

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Probiyotik sözcüğü, genellikle fermente süt ürünleri ya da diyet katkısı olarak alınabilen biyolojik aktiviteleri olan ve intestinal sistemde canlılıklarını sürdürme kabiliyeti olan *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. ve *Enterococcus* spp. gibi seçilmiş bakterileri ifade etmek için kullanılmaktadır. Laktobasiller, Bifidobakteriler ve Enterokoklar insanların sindirim sisteminde doğal olarak bulunmaktadırlar (Gibson, 2002; Guslandi, 2003). Probiyotikler esas olarak laktik asit bakterileridir. Gram pozitif, basil ve koklardan oluşan laktik asit bakterileri Firmicutes filumuna ait çeşitli bakteri cinslerinden oluşmaktadır. Spor oluşturmeyen ve katalaz negatif olan gruptur. Aerotolerant anaerob organizmalardır. Çoğu mezofilik mikroorganizmalardır. Ancak bazıları 5 °C'nin altında, termofilik türleri ise optimum 45 °C gibi yüksek sıcaklıklarda gelişebilirler. Bu mikroorganizmaların çoğu optimum 4-4,5 pH'da gelişebilmelerine rağmen 3,2 gibi düşük ve 9,6 gibi yüksek pH'larda gelişebilmektedirler (Holt ve ark., 2000).

Eskişehir ve Bursa'daki süthane ve marketlerden temin edilmiş 9 peynir, 1 kefir, 1 çiğ süt, 1 pastörize süt ve 1 anne sütü örneğinden laktik asit bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon için MRS, MRS-NNLP agar, MRS-LP agar, Nutrient-salicin agar, M17 agar ortamlarına ekim yapılmıştır. Bu besi ortamları üzerinde küçük, mat, krem rengi ya da beyaz renkteki laktik asit bakterisi olası olan koloniler rasgele seçilerek saflaştırma yapılmıştır. İzolasyon sonucunda toplam 209 izolat elde edilmiştir. Elde edilen izolatlardan 100 tanesi peynir örneklerine, 24 tanesi kefir örneğine, 37 tanesi çiğ süt örneğine, 28 tanesi pastörize süt örneğine ve 20 tanesi anne sütü örneğine aittir.

İzolatların Gram boyama ve katalaz aktivitesi sonucuna bakıldığında, hepsinin gram (+) katalaz (-) olduğu tespit edilmiştir. İzolatlardan peynir örneklerine ait 100 izolattan 3'ünün (% 3) basil, 2'sinin (% 2) kokobasil, 95'inin (% 95) kok olduğu; kefirde 24 izolattın tamamının (% 100) kok; çiğ sütte 37 izolattan 2'sinin (% 5) basil, 35'inin (% 95) kok; pastörize süt ve anne sütüne ait izolatların tamamının (% 100) kok şeklinde olduğu görülmüştür.

Saflaştırılan 209 izolat öncelikle antimikrobiyal aktivitesi belirlenmek üzere test edilmiştir. İzole edilen laktik asit bakterilerine ait hücresiz filtratlar bir veya daha fazla Gram (+) veya Gram (-) bakteriye karşı inhibitör aktivite göstermiştir. Barefoot ve Klaenhammer (1983) ile Holo (1991) laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktivitelerinin dar spektrumlu olduğunu bildirirken, Ogunbanwo ve ark. (2003) izole edilen *L. plantarum* F 1'e ait hücresiz filtratın geniş spektrumlu bir inhibisyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Daeschel ve ark. (1985), Sanni ve ark. (1999) Gram (+) bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin geniş spektrumlu olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda izolatlarımızın bazıları dar spektrumlu, bazıları da geniş spektrumlu aktivite göstermiştir. M1, M14, M17, M72, M77 izolatlarına ait hücresiz filtratların geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Carrasco ve ark. (2002) Arjantin süt ürünlerinden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin Gram (+) ve Gram (-) bakterilere etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bozulmuş siyah zeytinlerden izole edilen *L. plantarum*, *Leu. mesenteroides* ve *E. faecium* türlerine ait bakteriyosin üreten suşlarının hepsinin Gram (+) bakterilerden *E. faecalis*, *L. casei*, *S. pneumoniae* ile Gram (-) bakterilerden *E. coli* ve *P. aeruginosa*'nın gelişimini durdurdukları gözlemlenmiştir. Laktik asit bakterilerinin ürettiği çok az bakteriyosinin Gram (-) bakterilere etki gösterdiği bildirilmiştir (Todorov ve Dicks, 2005). Çalışmamızda da izolatlar çoğunlukla Gram (+) bakterilere karşı antimikrobiyal etki göstermekle beraber, Gram (-) bakterilere karşı da etkili olmuştur. M1, M17, M41, M46, M53, M72, M77 izolatlarına ait hücresiz filtratlar *P. aeruginosa* üzerine antimikrobiyal aktivite gösterirken M2, M8, M41, M72, M75, P15 izolatlarına ait hücresiz filtratlar *E. coli* üzerine etkili olmuştur. M7, M8, M14, M41, M75 izolatlarına ait hücresiz filtratlar *K. pneumoniae*, M41, M75, P15 izolatlarına ait filtratlar *S. typhimurium*, M1, M17, M41, M46, M47, M53, S79, S88 izolatlarına ait hücresiz filtratlar ise *Y. enterocolitica* üzerine etkili olmuştur. E34, E50, E114.1, E121.k.1, E121.k.2, E131.k.1, M46, M47, TM4 izolatlarına ait hücresiz filtratlar ise *P. vulgaris*'e karşı etkili olmuştur.

M2, M8 izolatlarına ait hücresiz filtratlar *B. cereus* ve *B. subtilis* üzerine etkili iken A4, A105, D11, D12, E34, E114.1, KM5, M1, M6, M14, M41, M46, M47, M53, M72, M77 izolatlarına ait hücresiz filtratlar *E. faecalis* üzerine etkili

olmuştur. E114.2, E122.b.2, E131.k.2, İ2, M1, M6, M14, M41, M46, M47, M72, M77, TM18 izolatlarına ait hücresiz filtratlar *S. aureus* 'a karşı etkili olmuştur.

M6, M14, M41, M46, M47, M72, S82 izolatlarına ait hücresiz filtratlar ise test edilen bütün laktik asit bakterilerini inhibe etmiştir.

Etki derecesi izolattan izolata farklılık göstermekle beraber elde edilen sonuçlara bakıldığında 35 izolatın (A105, D11, D12, D23, D24, D25, D26, D28, D29, D30, E34, E50, E66, E68, E114.1, E121.k.1, E121.k.2, E122.b.1, E122.b.2, İM13, KM5, M6, M7, M14, M17, M21, M41, M46, M47, M72, M75, M77, P17, S79, S88) saf filtratlarının *L. monocytogenes*, *L. monocytogenes* 1 ve *L. monocytogenes* 2'ye karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. Benzer olarak yapılan çalışmalarda da laktik asit bakterilerinin anti-listerial madde ürettikleri bildirilmiştir. Giraffa (1995), Giraffa ve ark. (1995a, b) sütte *Listeria* gelişimini önlemek için peynir üretiminde bakteriyosin üreten *E. faecium* strainlerinin kullanılmasını önermişlerdir. Callewaert ve ark. (2000) fermente et ürünlerinden izole ettikleri *Enterococcus* spp. türlerinin kuvvetli antilisterial aktiviteye sahip olduklarını saptamışlardır. Peynirden izole edilen *E. faecium*'un bizim bulgularımızdaki benzer olarak, *E. faecalis*, *Listeria* spp., *L. monocytogenes*, *B. cereus* ve *S. aureus* gibi bazı gıda patojenlerine ve gıdaları bozan bakterilere karşı etkili madde sentezlediği bildirilmiştir (Ghraiiri ve ark., 2008). Franciosi ve ark. (2009) 43 süttten izole edilen 63 laktik asit bakterisinin *Listeria innocua* ve *Lactobacillus sakei* üzerine inhibitör etki gösterdiklerini gözlemişlerdir. Izquierdo ve ark. (2009) *E. faecium* WHE 81'in peynirde *L. monocytogenes* üzerine etkili olduğunu ve bu bakterinin peynirde doğal olarak bulunduğu için ilave edilmesine gerek olmadığını bildirmişlerdir.

Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkisinin laktik asit, hidrojen peroksit, asetik asit, hidrojen sülfür, bakteriyosin ya da bakteriyosin benzeri maddelerden meydana geldiği bildirilmiştir (Gilliand, 1990; Lewus ve ark., 1991). İzolatlara ait hücresiz filtratların pH'ları 5,5'e ayarlandığı için izolatlarımızın göstermiş olduğu antimikrobiyal aktivite asit oluşumundan kaynaklanmamaktadır.

İzolatlardan peynir örneklerine ait 100 izolattan 21'i (% 21) üç şekerli demir agarda siyahlaşma oluşturup hidrojen sülfür oluştururken 1'i (% 1) zayıf gelişim göstermiş, 77'si (% 77) hiç hidrojen sülfür oluşturmamıştır. Kefirde, çiğ

sütte, pastörize sütte ve anne sütündeki izolatlar hiç hidrojen sülfür oluşturmamıştır.

Bu çalışmada kullanılan izolatların saf filtratlarının 121 °C'ye maruz bırakıldığı halde antimikrobiyal etki göstermiş olmaları onların yüksek ısıya dayanıklı antimikrobiyal maddeler içerdiğini düşündürmektedir. Antimikrobiyal aktivite gösteren maddenin ısı stabilitesi, özellikle gıda koruyucusu olarak kullanıldığında büyük önem taşımaktadır.

Çalışmamızda yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren 42 izolata ait hücresiz filtrattaki etkili madde üzerine katalaz, proteinaz K, tripsin, α -kimotripsin, lizozim ve α -amilaz enzimlerinin etkisi araştırılmıştır. E50, TM4, PN2, M1, M8, İN2, İ22, İM13 ve İ2 izolatlarına ait hücresiz filtratlardaki antimikrobiyal maddenin test edilen bütün enzimler ile inaktive olduğu görülmüştür. D11, D24, TM17, TM18, S82, M72, M75, M46, M2, İN4 izolatlarına ait hücresiz filtrattaki antimikrobiyal madde ise proteolitik enzimlere dirençli olarak bulunurken E66, İ21 ve M21 izolatlarına ait hücresiz filtratlardaki etken madde proteolitik enzimler ile inaktive olmuştur. Losteinkit ve ark. (2001) *E. faecium* N15'in proteinaz K, α -kimotripsin, lizozim, pepsin ve tripsin enzimleri ile inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Ponce ve ark. (2008) sebzelerden izole edilen *E. faecium*'a ait etken maddenin proteinaz K, α -kimotripsin ve tripsin enzimleri ile inhibe olduğunu, *L. lactis*'e ait etken maddenin ise tripsin enziminden etkilenmediğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise *E. faecium*'a ait D12, M47, TM13, TM15 ve TN3 izolatlarının hücresiz filtratlarındaki etken madde proteinaz K enzimi ile inaktive olurken E114.1, İ18, K6, P23 izolatlarına ait hücresiz filtratlardaki etken madde hem proteinaz K hem de α -kimotripsin ile inaktive olmuştur. Bu nedenle söz konusu izolatlarına ait inhibitör maddenin protein tabiatında olduğu düşünülmektedir. Çünkü bunlar proteolitik enzimler ile muamele edildiğinde aktivitelerini kaybetmişlerdir. Bakteriyosinlerin proteinaz K ve pankreas orijinli tripsin, α -kimotripsin gibi metabolik proteolitik enzimlerden etkilenebildiği bilinmektedir. Bakteriyosinler protein yapısında moleküller olduklarından enzimlere benzer şekilde sıcaklık ve ortamın pH değerlerinden etkilenmektedirler. Ancak sınıflandırmada dikkate alınan bu özellikler bakteriyosinin cinsine göre değişebilmektedir (Piard ve Desmazeaud, 1992).

Yapılan bir çalışmada fermente sosisten izole edilen *P. acidilactici* F' nin pediocin F olarak adlandırılan, proteolitik enzimlere karşı hassas, ısıya ve organik çözücülere karşı dayanıklı bir antimikrobiyal peptit ürettiği rapor edilmiştir (Osmanağaoğlu ve ark., 1998).

D23, İ18, İ21, K6, KN3 izolatlarına ait hüresiz filtratlardaki etken madde proteolitik enzimlerin yanında α -amilaz enziminden de etkilenmiştir. Bu durum ise bize antimikrobiyal aktivite gösteren maddenin sadece protein yapısında olmadığını aynı zamanda bu maddenin aktivite gösterebilmesi için karbonhidrat bir parçanın da bulunması gerektiğini göstermektedir. Benzer bulgular *Leu. mesenteroides*, *P. acidilactici* ve *E. faecium* N15 için de verilmiştir (Lewus ve ark., 1992; Schved ve ark., 1993; Losteinkit ve ark., 2001).

E34, D11, D24, TM17, TM18, S82, M72, M75, M46, E68, M2, İN4 izolatlarına ait hüresiz filtratların lizozim ve α -amilaz enzimlerine karşı hassas olduğu bulunmuştur. Bunların küçük bir kısmının protein tabiatında komponent olup diğer kısmının glikoprotein yapısında olduğu düşünülmektedir. Benzer olarak etten izole edilen laktik asit bakterilerine ait inhibitör maddenin protein yapısında olduğu, ancak bazılarının proteolitik enzimlerden etkilenmediği için glikoprotein yapısında olduğu bildirmiştir (Lewus ve ark., 1991). Liu ve Hansen (1990) nisin peptidinin kırılması sonucu 2 fragmentin meydana geldiğini aktivitede 10 kez azalma meydana gelirken tamamen inaktive olmadığını bildirmişlerdir. Ogunbanwo ve ark. (2003) laktik asit bakterilerine ait antimikrobiyal aktivite gösteren maddelerin proteolitik enzimler ile muamelesi durumunda aktivite kaybı görülmesine karşın katalaz, lizozim, α -amilaz muamelesinin aktivite kaybına yol açmadığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda proteolitik enzimlerin yanında lizozim, katalaz enzimlerinin uygulanması sonucunda seçilen izolatlara ait filtratlarda aktivite kaybı gözlenmiştir.

Bazı izolatların pH 5,5'e ayarlanmış saf filtratlarının antimikrobiyal etki göstermediği gözlenmiştir. İzolatın saf filtratının başlangıçta antimikrobiyal aktivite gösterirken (pH 5,5'e ayarlanmış ve 121 °C'de), sonradan aktivite gösterememesinin sıcaklığa bağlı olabileceğini; izolatın hüresiz filtratının yüksek sıcaklığın etkisiyle yapısında meydana gelebilecek bir değişikliğin sonucunda antimikrobiyal etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Bazı araştırmacılar 121

°C’de 15 dakika ısı ile muamelenin antimikrobiyal aktivitede kayba neden olduğunu bildirmişlerdir (Andersson, 1986). Ancak Dinçer (2007) et ve et ürünlerindeki laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkisini incelerken izolatların saf filtratlarında sıcaklığın etkisini araştırmış ve sıcaklığın yükseldikçe antimikrobiyal etkinin de arttığını tespit etmiştir.

D12 izolatına ait hücresiz filtratlarına katalaz enzimi uygulandığında antimikrobiyal aktivite kaybolduğu için bu izolatlara ait hücresiz filtratların hidrojen peroksit nedeniyle etkili olduğu düşünülmektedir. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktivitesinin onların hidrojen peroksit üretim yetenekleri ile yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (Eschehenbach ve ark., 1989). Araştırmacılar peynirden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktivitelerini araştırırken antimikrobiyal aktivite sergileyen izolatların etkilerinin hidrojen peroksit kökenli olup olmadığını belirlemek amacıyla filtratlara katalaz ilavesi yapmışlardır (González ve ark., 2007). Başka araştırmacılar da bozadan izole ettikleri *P. pentosaceus* ST18 suşunun ürettiği bakteriyosinin karakterizasyon çalışmalarında hidrojen peroksit üretiminin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacıyla katalaz kullandıklarını bildirmişlerdir (Todorov ve Dicks, 2005). Bir çalışmada izole elden *Lactobacillus* ve *Pediococcus* cinslerinin belirli türlerinin biyomoleküllerin oksidasyonunu başlatacak kadar invitro hidrojen peroksit ürettiği tespit edilmiştir. Hidrojen peroksidin *S. aureus* ve *Pseudomonas* spp. gibi zararlı mikroorganizmalara karşı inhibitör etki için kullanıldığı bildirilmektedir (Adams ve Nicolaidis, 1997).

Antimikrobiyal aktivitesi yüksek olan izolatlardan seçilen 73’ünün tanımlaması yapılmıştır. Peynir örneklerine ait 52 izolattan 2’sinin basil, 2’sinin kokobasil, 48’inin ise kok olduğu; kefirde 4 izolatın tamamının kok olduğu; süt izolatlarında 1 izolatın basil, 16 izolatın kok şeklinde olduğu görülmüştür. Peynir ve kefir örneklerine ait seçilen izolatların hepsi 45°C’de gelişirken süt örneklerine ait iki izolat (İ18 ve İ22) hariç diğerleri 45°C’de gelişme göstermişlerdir. Peynirden izole edilen 5 izolat (A4, D22, M46, M47, M53), süttten izole edilen İ22 izolatı ile kefirde izole edilen K15 ve KN3 izolatları hariç diğer izolatlar 15°C’de gelişmişlerdir. E131.k.1 ve E131.k.2, İ2, İ18, İ22, İM13 ve K15 izolatları hariç seçilen bütün izolatlar %6 tuzda gelişirken, peynir izolatlarının 22’si, süt

izolatlarının 4'ü (İ21, P2, P23, PN6) ve kefir izolatlarının 2'si (KM5, K15) %10 tuzda az veya çok gelişmişlerdir. A4, D16 ve M53 izolatları hariç seçilen bütün izolatlar pH 3.9'da gelişmişlerdir. Seçilen izolatların morfolojik ve fizyolojik özellikleri ile API CHL 50 ve API 20 Strep ile yapılan biyokimyasal özelliklerine göre Holt ve ark. (2000) tarafından düzenlenmiş olan "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" ve Balows ve ark. (1992) tarafından düzenlenmiş olan "The Prokaryotes" yararlanılarak yapılan tanımlamada büyük çoğunluğunun *E. faecium*'a ait olduğu görülmüştür. Bunun dışında *Pediococcus* sp., *L. curvatus*, *L. lactis* spp. *lactis*, *L. fermentum türlerine* ise daha düşük oranda rastlanılmıştır.

Otomatik riboprinter siteminde, riboprinter sisteminin data bankasında bulunan izolatlara 0.85'ten yüksek benzerlik gösteren izolatlar tanımlanmıştır. EcoRI kullanılarak yapılan tanımlamada 21 farklı ribotip bulunmuştur. Bu gruplar arasındaki benzerlikler 0.86-1.00 arasında değişmiştir. Bu ayırım değerinin uygun olduğunu düşünmekteyiz. Ancak 15 izolata ait benzerlikler ise 85'ten daha düşüktür.

16 S rRNA'yı temel alan riboprinter sistem ile tanımlamada 73 izolattan 58 tanesi *E. faecium* (A4, A96, A105, D11, D12, D13, D14, D15, D16, D17, D18, D22, D23, D24, D25, D26, D28, D29, D30, E114.1, E114.2, E121.k.1, E121.k.2, E122.b.1, E122.b.2, E131.k.1, E131.k.2, İ2, İ18, İM13, İN2, İN4, K6, K15, KM5, KN3, M1, M2, M7, M17, M21, M53, M75, M77, P2, P23, PN2, PN6, S16, S79, S88, S92, TM4, TM13, TM15, TM17, TM18, TN3), 1 tanesi *E. faecalis* (M8), 1 tanesi *E. durans* (İ22), 1 tanesi *L. fermentum* (S82), 4 tanesi *L. reuteri* (E50, E66, M6, M41), 1 tanesi *L. paracasei* spp. *paracasei* (İ21), 7 tanesi *P. acidilactici* (A102, E34, E68, M14, M46, M47, M72) olarak tespit edilmiştir.

Castele ve ark.(2006) *Bifidobacterium* sp., izolasyonu için MRS-NNLP agar ve MRS-LP agarı, Lankaphutra ve Shah (1996) *L. acidophilus* izolasyonu için Nutrient-salicin agarı kullanmışlardır. Çalışmamızda bu besiyerleri kullanılarak *Bifidobacterium* sp., *L. acidophilus* izolasyonu amaçlanmıştır. Ancak bu bakterilerin izolasyonu yapılamamıştır. Castele ve ark.(2006) Nutrient-salicin agar da *L. acidophilus* ticari strainlerini geri kazanamadıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar MRS-NNLP ve MRS-LP agarın *Bifidobacterium* sp.'nin peynirden izolasyonu için iyi birer ortam olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda izole

edilememesi örneklerdeki *Bifidobacterium* spp.'nin sayıca çok düşük olmasından kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir.

Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri ile yapılan tanımlamayı riboprinter sistem ile yapılan tanımlama ile karşılaştırdığımızda sonuçların büyük çoğunluğunun örtüştüğü görülmüştür. Ancak İM13, TM4, TM13, TM15, TM17, TM18, E131.k.1, E131.k.2, İ2, İ18, M1 izolatları riboprinter sistemle *E. faecium* olarak tanımlanırken, morfolojik ve fizyolojik özellikler ile biyokimyasal testlerinin sonucunda *L. lactis* spp. *lactis* olarak tanımlanmıştır. Bu izolatlara ait benzerlik oranları riboprinter ile yapılan tanımlamada 0.86 dan yüksektir. Bununla birlikte 45°C gelişme ve 6.5 tuzda gelişme durumlarına bakıldığında *L. lactis* spp. *lactis*'e daha yakın görülmektedir. *Lactococcus* spp. ile *Enterococcus* spp.'nin klasik yöntemlerle ayrılmasının oldukça zor olduğu bunların benzer özellikler gösterdiği bildirilmiştir (Elliott ve Facklam, 1996). Bu konuda diğer moleküler teknikler de uygulanılarak sonuca varılması daha uygun olacaktır. Riboprinter sistem ile E50, E66, M41 *L. reuteri* olarak tanımlanırken morfolojik ve fizyolojik özellikler ile biyokimyasal testlerinin sonucunda *L. curvatus*; M6 izolatu *L. reuteri* olarak tanımlanırken *L. lactis* spp. *lactis*; M8 izolatu *E. faecalis* olarak tanımlanırken *E. faecium*; İ21 izolatu *L. paracasei* spp. *paracasei* olarak tanımlanırken *L. curvatus*; İ22 izolatu *E. durans* olarak tanımlanırken *Pediococcus* spp.; K15 izolatu *E. faecium* olarak tanımlanırken *Pediococcus* spp.; E68 izolatu *P. acidilactici* olarak tanımlanırken *E. faecium* olarak tanımlanmıştır. Söz konusu izolatlara baktığımızda riboprinter sistemi ile tanımlamada benzerlik oranlarının 0.75 den düşük olduğunu görüyoruz. Bu benzerlik oranı ise düşüktür. Benzer olarak yapılan bir çalışmada Nigatu (2000) fenotipik özelliklerine göre *L. plantarum* olarak tanımlanan izolatu genetik olarak *L. gallinarum* olarak tanımlandığını bildirmiştir. Sing ve ark. (2009) *Lactobacillus* genusundaki üyelerin fenotipik özelliklerinin birbirine çok benzediğini bu nedenle taksonomisinde karışıklıkların ortaya çıktığını bildirmiştir. Van Reenen ve Dicks (1998) *L. plantarum* ve *L. pentosus*' un benzer API 50 CH profili verdiklerini bu nedenle bunların fenotipik özellikler ile ayıramayacağını bildirmişlerdir. Araştırmacılar *Lactobacillus* taksonomisinde fenotipik özelliklerin yeterli olmadığını genetik metotların kullanılması gerektiğini ortaya koymuşlardır

(Vandamme ve ark., 1996; Van Reenen ve Dicks, 1998; Nigatu, 2000). Gıdalardan izole edilen *Lactobacillus* türlerinin tanımlanmasında API 50 CH ile yapılan tanımlamanın yetersiz olduğu bunların *Lactobacillus* cinsinin fermantasyon durumunu ortaya koymada yararlı olduğu bildirilmiştir (Nigatu, 2000). Benzer yapılan çalışmalarda da *Lactobacillus* spp. ayırımında riboprinterin başarıyla kullanılabilceği gösterilmiştir (Ryu ve ark., 2001; Yansanjav ve ark., 2003).

Çalışmamızda etkili izolatlarla bakıldığında bunların büyük bir kısmının *E. faecium*'a ait olması süt ve süt ürünlerinde büyük önem taşımaktadır. Özellikle anti-listerial aktivite gösteren *E. faecium* strainlerinin sütte *Listeria* gelişimini önlemek için peynir üretiminde kullanılması önerilmektedir (Giraffa ve ark., 1995 a, b).

Enterokoklar, klinik ve çevresel mikrobiyolojide önemli roller üstlenen bir mikroorganizma grubunu oluşturmaktadır. *E. faecium* ve *E. faecalis* insanlarda ve özellikle süt ürünlerinde en çok rastlanan türler olarak görülmektedir (Foulquie ve ark., 2006; Valenzuela ve ark., 2009). İzolatlarımızın 53'ünde tanımlanan *E. faecium* türü bütün örneklerimizde bulunmuştur. İ22 izolatu olan *E. durans* çiğ sütte, M8 izolatu olan *E. faecalis* ise peynirde bulunmuştur. *Enterococcus* cinsi süt ve süt ürünlerinde yaygın olarak bulunmaktadır (Foulquie ve ark., 2006; Makhzami ve ark., 2008). Bu cins fermente süt ürünlerinde starter olarak önem taşımaktadır. Diğer taraftan ise fekal kontaminasyonun da bir göstergesidir (Giraffa, 2003). Koluman ve ark. (2009) Türkiye'de beyaz peynirlerde *Enterococcus* spp. bulunma oranını %70, krem peynirlerde %60 olarak vermişlerdir. Bu bakteriler çeşitli peynirlerde, pastörize sütlerde, inek sütlerinde bulunmakta ve peynirin kalitesinde önemli rol üstlenmektedir. Nitekim örneklerimizde de tanımladığımız izolatların büyük çoğunluğu *E. faecium* olarak bulunmuştur. Genellikle enterokoklardan *E. faecium* suşlarının gıda uygulamalarında probiyotik amaçlı olarak en çok kullanılan tür olduğu bildirilmiştir (Vael ve Goossens, 2002; Domann ve ark.2007).

E. faecium'un Fargo 688^R suşunun taşınmasında Cheddar peynirinin uygun bir taşıyıcı olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırmışlardır. Fargo 688^R suşunun Cheddar peynirinde 8 °C'de yapılan 15 aylık depolamadan sonra

4×10^8 seviyesinde canlılığını sürdürdüğü tespit edilmiştir. Araştırmacılarca enterokokların ilavesinin Cheddar peyniri aromasını geliştirmesi ve son ürünün probiyotik özellik göstermesi nedeniyle hem sağlık açısından hem de ekonomik açıdan daha avantajlı olduğu belirtilmiştir (Gardiener, 1999; Stanton ve Ross, 2000).

E. faecium SF68 suşunun düşük pH'ya dayanıklı, safra asitlerine duyarsız ve dış etkileri oldukça yüksek seviyede tolere edebildiği bildirilmiştir (Franz ve ark., 1999). Yapılan çalışmalarda İtalyan keçi sütünde bulunan 2 farklı *E. faecium* straini izole edilmiş ve bunların bakteriyosin üretim yeteneğinde olduğu bildirilmiştir (Cocolin ve ark., 2007). Enterokokların gıda sistemleriyle ilişkili birçok suşu ve özellikle de *E. faecium* ve *E. faecalis*'in enterosinler olarak adlandırılan bakteriyosinleri üretme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir. Enterokokların en bilinen enterosinleri, enterosin A, enterosin B, Enterosin P, Enterosin 50, Bakteriosin 31 ve AS-48 Sitolisinler'dir (Franz ve ark., 2003; Kavas ve Kınık, 2003). Bu enterosinler *L. monocytogenes*, *Clostridium* spp. ve *Vibrio cholerae*'ya karşı aktivite göstermektedir (Garde ve ark., 1997; Sarantinopoulou ve ark., 2002; Giraffa, 2003). Enterosinler, genellikle Sınıf 2 bakteriyosinler grubunun bir üyesidirler ve genelde güçlü anti-Listeriyal etkili, ısıya stabil antimikrobiyal maddelerdir. Bir gıda antimikrobiyal olmak için gerekli şartları sağlayan bu özelliklerin, enterosinlerin yaygın kullanımına imkan sağladığı saptanmıştır (Giraffa, 2003). Enterosinlerin süt teknolojisinde kullanımı için; sütte 30-37 °C'lerde enterokoklar tarafından üretilme ve stabilite, rennet ve ısıya karşı dayanım, starter laktik asit bakterileriyle uyum ve geniş bir pH aralığında stabilite gibi özelliklere sahip olmaları gerektiği sıklıkla bildirilmektedir (Giraffa, 1995, 2003). Çalışmamızda *E. faecium* olarak tanımladığımız suşların da ısıya dayanıklı, antimikrobiyal etkiye sahip ve genellikle düşük pH'da gelişim gösterebilen özellikte olduğu görülmüştür.

Biyokimyasal karakterizasyonla tanımlaması yapılmış 400 enterokoktan oluşan bir koleksiyonda gıda, insan ve hayvan kaynaklı izolatların genellikle *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerini içerdiği görülmüştür. Güvenlik ve fonksiyonallite ile ilgili özelliklerin suşa spesifik olduğu, gıda ya da probiyotik preparasyonların

hazırlanmasında kullanılacak enterokokların suş bazında dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır (Vancanneyt ve ark., 2002).

Yapılan çalışmalarda *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium* bakterilerinin çeşitli suşlarının destek kültür olarak cheddar peynirinde kullanımında olumlu sonuçlar verdiği görülmüştür (Gürsoy ve Kınık, 2006).

Çalışmamızda E50, E66, M6, M41 izolatları riboprinter sistemde *L. reuteri* olarak tanımlanmıştır. Antimikrobiyal etkisi bulunan reuterin, *L. reuteri* tarafından sentezlenen düşük moleküler ağırlıklı bir bileşiktir. Ganzle ve Vogel (2003) hamur mayasından *L. reuteri* LTH2584 strainini izole etmişler ve bu izolatın reuterisin adında bir antibiyotik ürettiğini bildirmişlerdir. Bakteriyosin üreticisi olan *L. reuteri* aynı zamanda insan ve hayvanların gastrointestinal sisteminde de bulunmakta ve probiyotik karakterler taşıması nedeniyle önem arz etmektedir. Çalışmamızda *L. reuteri* olarak tanımlanan 4 izolat da peynirden elde edilmiştir.

İ2, İ18, İM13, M1, TM4, TM13, TM15, TM17, TM18 izolatları fizyolojik, morfolojik, biyokimyasal testlere göre *L. lactis* subsp. *lactis* olarak tanımlanmıştır. *L. lactis* subsp. *lactis* fermente ürünlerde bulunan laktik asit bakterilerinden biri olup sıklıkla süt ve süt ürünlerinden izole edilmektedir. Bu türün sebzelerde de bulunduğu bildirilmiştir (Haris ve ark., 1992). Kore'de geleneksel fermente sebzelerden elde ettikleri *L. lactis* subsp. *lactis* A164 izolatının ısıya ve düşük pH derecelerine dayanıklı nisin benzeri bir bakteriyosin ürettiğini bildirmişlerdir (Choi ve ark., 2000).

S82 izolatı hem riboprinter sistemle hem de klasik yöntemlerle tanımlamada *L. fermentum* olarak tanımlanmıştır. *L. fermentum* zorunlu heterofermentatif laktobasillerdendir. Yani hegzozları laktik asit, asetik asit, etanol ve CO₂'ye pentozları laktik asit ve asetik aside fermente etmektedir (Kandler ve Weiss, 1986; Schleifer, 1987). *L. reuteri* ve *L. fermentum* insan gastrointestinal sisteminde bulunan en önemli heterofermentatif laktobasiller olarak tanımlanmıştır (Holzapfel ve Schilinger, 2002). *L. fermentum* süt ürünlerinde bulunan türlerden birisidir (Yaygın ve Kılıç, 1993).

Çiğ süttten izole edilen İ21 izolatı riboprinter sistem ile yapılan *L. paracasei* spp. *paracasei* olarak tanımlanmıştır. *L. paracasei* spp. *paracasei*,

birçok peynir türünün doğal laktik florasında başlıca laktik asit bakterisi olarak bulunabilmektedir. *L. paracasei* spp. *paracasei* suşları esas olarak probiyotik mikroorganizmalardır (Gürsoy ve Kınık, 2006). Gardiner ve ark. (1999) probiyotik etkili bir cheddar peyniri geliştirmede *L. paracasei*'nin karışık suşlarının starter kullanım için uygun olacağına karar vermiştir.

Çalışmamızda A102, E34, E68, M14, M46, M47, M72 izolatları riboprinter sistem ile *P. acidilactici* olarak tanımlanmıştır. *P. acidilactici* fermente süt ürünlerinden özellikle tereyağı, peynir ve yoğurta bulunmaktadır. Çalışmamızda *P. acidilactici* olarak tanımlanan 7 izolat da peynirden elde edilmiştir. *P. acidilactici* probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalardandır ve bazı strainlerinin antimikrobiyal bileşikler ürettiği hakkında çalışmalar bulunmaktadır. Pediocin PA1 ve pediocin AcH bilinen bakteriyosinlerindendir (Kılıç, 2001).

Probiyotik olma açısından bir tür yada suşta en başta aranan özelliklerden biri düşük pH'da gelişebilme özelliğidir. Çalışmamızda tanımlanan 73 izolatın pH 1, pH 2, pH 3'te gelişme durumları incelenmiştir

pH 3'te çoğu izolatın gelişim gösterdiği görülmüştür. Sadece D16, İ21, M53, S79, S88 izolatlarında gelişim görülmemiştir. A105, M14, TM4 VE TM17 izolatlarında ise gelişim zayıftır. Bu da bize, D16, İ21, M53, S79, S88, A105, M14, TM4 ve TM17 izolatları dışında diğer izolatların probiyotik özelliğinin yüksek olduğunu düşündürmektedir.

pH 2'de A4, A96, A102, D11, D12, D13, D14, D15, D17, D18, D22, D23, D24, D25, D26, D28, E34, E50, E66, E68, E114.1, E114.2, E121.k.1, E121.k.2, E122.b.1, E122.b.2, E131.k.1, E131.k.2, İ2, İ18, İ22, İM13, İN2, İN4, K6, K15, KM5, KN3, M2, M6, M7, M17, M21, M41, M46, M47, M72, M75, M77, P2, P23, PN2, PN6, S16, S82, S92, TM13, TM15, TM18, TN3 izolatlarının gelişim gösterdiği görülmüştür. A105, M14, TM4 ve TM17 izolatlarında ise gelişim zayıftır.

pH 1'de A4, D12, D22, D23, D24, D25, D26, D28, E34, E50, E66, E68, E114.1, E114.2, E121.k.1, E121.k.2, E122.b.1, E122.b.2, E131.k.1, E131.k.2, İM13, K15, KM5, KN3, M6, M7, M21, M46, M47, M72, M75, M77, P2, PN2,

PN6, S82, S92, TM13, TM18 izolatlarının gelişim gösterdiği görülmüştür. A102, A105, M14, TM4 ve TM15, TM17 izolatlarında ise gelişim zayıftır.

pH 2’de gelişim gösteren izolatların 24 saat sonra canlılığının devam edip etmediğine bakıldığında, D13, D14, D15, D18, D22, D23, D24, D25, D26, D28, E114.2, E121.k.1, S16 izolatlarında canlılığın devam ettiği gözlenmiştir.

Fernández ve ark. (2003) laktik asit bakterilerinden *L. acidophilus*’un ve *L. gasseri*’nin mide pH’sında (2-2,5) en az 90 dakika canlı kalabildiklerini, bu sürecin bağırsağın aktif bölgelerine ulaşmak için yeterli olduğunu bildirmişlerdir. Chang ve ark. (2001) laktik asit bakterilerinin bağırsağa ulaşması için geçen 90 dakikalık sürede canlı kalmasının o suşun probiyotik olarak seçilmesi açısından yeterli olduğunu belirtmişlerdir.

Arjininden amonyak oluşumu, arjinin deaminaz yolu düşük pH değerlerine sahip asidik ortamlarda mikroorganizmaları koruduğu için önem taşımaktadır (Rolan ve ark., 2003). Bu testte tanımlanan 73 izolattan 72’sinin pozitif sonuç vermesi, aranılan diğer özellikler de olduğu sürece probiyotik starter olarak kullanımları için olumlu bir özelliktir.

Seçilen izolatların vücuttaki zararlı maddeler, toksinler ve benzeri maddelere karşı direncini belirlemek amacıyla tanımlanan izolatların % 0,4 fenolde gelişimleri incelenmiştir. % 0,4 fenolde gelişmesi ve canlılığını devam ettirme özelliklerine bakıldığında, 73 izolattan 22 tanesinin (A4, A96, A102, D13, D14, D15, D16, D17, D18, D22, D29, D30, E122.b.2, İ18, İ21, İ22, K15, M77, S16, S79, S82, S92) fenol içeren besiyerinde geliştiği ancak canlılıklarını devam ettiremedikleri gözlenmiştir. Benzer olarak Xanthopoulos ve ark. (2000) *L. plantarum* suşlarının % 0,4’lük fenolde gelişimlerini incelemişlerdir.

Yapılan çalışmada 43 izolatın antibiyotik duyarlılık testi yapılmıştır. Sefaklor, Siprofloksasin, Penisilin- G, Gentamisin ve Netilmisin Sülfat olmak üzere 5 farklı antibiyotik kullanılmıştır. Antibiyotik dirençlilik ve duyarlılık durumları kültürden kültüre değişmekle beraber özellikle izolatların büyük çoğunluğunun antibiyotiklerin en az bir kaçına karşı dirençli, izolatlardan A4, D12, D24, E66, İM13, KM5, TM4, TM13, TM15, TM17, TM18 kullanılan tüm antibiyotiklere karşı dirençli bulunurken; A102, PN2, M21, İN4, İ2, İ18, E50 numaralı izolatların ise antibiyotiklerin tümüne karşı duyarlı olduğu saptanmıştır.

Genel olarak izolatların antibiyotiklerden Siprofloksasin'e karşı dirençli, Netilmisin Sülfat ve Sefaklor'a karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Laktik asit bakterilerinin çoğunun antibiyotiklere dirençli olduğu, bu dirençliliğin yapısal olduğu ve transfer edilemediği kabul edilmiştir. Bununla beraber *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. reuteri* gibi bazı laktik asit bakterilerinin plazmitler tarafından kodlanan antibiyotik dirençlilik genleri taşıdığı, antibiyotik dirençliliğinin patojen ve patojen olmayan bakterilere transferinin sağlık açısından ve probiyotiklerin güvenilirliği açısından büyük önem taşıdığı belirtilmiştir. Çünkü plazmitlerle taşınan antibiyotik dirençlilik özelliği gösteren suşların insan ve hayvanlarda probiyotik olarak kullanılmasının uygun olmadığı, transfer edilemeyen dirençliliğin uygulamalarda yararlı olabildiği bildirilmiştir (Ishiwa ve Iwata, 1980; Adams ve Marteau, 1995; Fons ve ark., 1997; Charteris ve ark., 1998; Salminen ve ark., 1998).

Çeşitli laktik asit bakterilerinin EPS ürettikleri bilinmektedir. EPS'ler özellikle yoğurt, ayran, peynir, kaymak ve sütlü tatlılar gibi fermente süt ürünlerinin üretiminde önemli rol oynamaktadır. *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* türlerinin suşlarından EPS üretiminin gerçekleştirildiği ve bu üretimin geliştirilmesi yolunda da çalışmaların sürdürüldüğü literatürlere geçmiştir (Kılıç, 2001). Özellikle *S. thermophilus* üretiminin artırılması için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. (Levander ve ark., 2002).

Bu çalışmada test edilen izolatların EPS üretiminin zayıf olduğu, laktoz ve sükroz şekeri bulunan ortamda hiçbirinin EPS üretmediği, fruktoz içeren ortamda sadece E68 izolatının, glikoz içeren ortamda da E68 ve S82 izolatlarının EPS üretme ihtimalinin olduğu gözlenmiştir. Buna göre EPS üretimini en çok destekleyen şeker kaynağının glikoz içeren ortam olduğu bulunmuştur.

Yapılan testler sonucunda 41 izolatın laktik asit miktarları 0,18-18,41 mg/ml arasında bulunmuştur. İzolatların laktik asit miktarları, genel olarak benzer çalışmalardaki değerlere göre oldukça yüksek bulunmuştur. Seçilen 41 izolattan laktik asit miktarı en yüksek olan izolat KN3, en düşük olanı ise E50 olarak bulunmuştur. A96, , İM13, TM13, TM15, TM17, TM18, M2, M75, S16, TN3, İN4, PN2, PN6, M75, E34, A105, D12 olan izolatların da oldukça yüksek laktik asit değerlerine (10 mg/ml ve üzeri) sahip olduğu görülmektedir.

Yapılan bu çalışmada proteolitik aktivite miktarları 0,23–2,04 mg/ml arasında bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada sütte bulunan *S. thermophilus* strainlerinin proteolitik aktivitesinin 0,21-1,0 mg/ml arasında olduğu tespit edilmiştir (Beyatlı ve Tunail, 1984). İzolatların proteolitik aktivite miktarları, genel olarak benzer çalışmalardaki değerlere göre oldukça yüksek bulunmuştur. Seçilen 41 izolattan proteolitik aktivite miktarı en yüksek olan izolat E50, en düşük olanı ise TM15 olarak bulunmuştur. D12, E122.b.2, M6, M8, M41, M46, M75, S92 izolatlarının da oldukça yüksek proteolitik aktivite değerlerine (1 mg/ml ve üzeri) sahip olduğu görülmüştür.

Yapılan bir çalışmada izole edilen *Lactobacillus* ve *Pediococcus* cinslerinin belirli türlerinin biyomoleküllerinin oksidasyonunu başlatacak kadar hidrojen peroksit ürettiği tespit edilmiştir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ve besiyerinde biriken hidrojen peroksitin *S. aureus* ve *Pseudomonas* spp. gibi zararlı mikroorganizmalara karşı inhibitör etki için kullanıldığı bildirilmiştir (Adams ve Nicholaidis, 1997).

Çalışmamızda hidrojen peroksit miktarları 0,29–2,50 µg/ml arasında bulunmuştur. Seçilen 41 izolattan hidrojen peroksit miktarı en yüksek olan izolatlar İ22 ile P23, en düşük olanı ise PN6 olarak bulunmuştur. PN6 izolatu dışında diğer izolatların oldukça yüksek hidrojen peroksit üretim değerlerine (1 µg/ml ve üzeri) sahip olduğu görülmüştür. Mumcu (1997) kefirde izole ettiği *Lactobacillus* suşlarının hidrojen peroksit üretim miktarını 0,04-0,019 µg/ml arasında bulmuştur. Yoğurttan izole edilen *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* izolatlarının hidrojen peroksit miktarlarının tespit edildiği bir çalışmada ise değerlerin 0,26-0,51 µg/ml arasında olduğu bulunmuştur (Aslım ve ark., 2000). Görüldüğü gibi çalışmamızdaki izolatların hidrojen peroksit miktarları, genel olarak benzer çalışmalardaki değerlere göre oldukça yüksek bulunmuştur.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar izole edilen ve yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olan izolatların probiyotik olarak kullanılabilme potansiyeli olduğunu düşündürmektedir. Tanımlanan izolatların büyük çoğunluğunun, birden fazla test mikroorganizmasına karşı etkili olması, yüksek ısıda da filtratlarının antimikrobiyal etkinliklerini sürdürebilmesi, düşük pH'da gelişebilmesi, %0,4 fenolde gelişebilmesi, arjininden amonyak oluşturabilmeleri, antibiyotiklere karşı

olan dirençleri, hidrojen peroksit, laktik asit ve proteolitik miktar tayinlerinin yüksek seviyelerde bulunuşu probiyotik olma açısından kayda değer özelliklerdir. Aynı zamanda gıdaların işlenmesi sırasında genellikle yüksek ısının uygulanıyor olması, izolatların ürettikleri antimikrobiyal bileşiklerin yüksek sıcaklık uygulamalarına dayanıklı olmaları büyük bir önem arz etmektedir. S82, S16, S92, A96, A102, A4, D13, D14, D15, D17 özellikle düşük pH ve fenole direnç açısından; D11, D12, D18, D22, D23, D24, E34, E50, E66, E68, E114.1, E114.2, E121.k.1, E121.k.2, E 121.k.2, E131.k.1, E131.k.2, İ18, İ22, K15, M7, M17, M41, M46, M47, M72, M75, M77 özellikle patojen bakterilere karşı geniş etki spektrumuna sahip olma açısından; TM13, TM18 özellikle antibiyotik dirençliliği açısından öne çıkan izolatlardır. S82 bütün bunların yanında, pankreatik enzimler olan tripsin, α -kimotripsin ile lizozim enzimlerine karşı dirençli olması ve EPS üretim potansiyeline sahip olması nedeniyle daha da öne çıkan bir izolattır. Ancak az sayıda test mikroorganizmasına etki etmesi ve antimikrobiyal etkisinin az olması nedeniyle ilgi özellikle daha yüksek antimikrobiyal etkiye sahip daha çok sayıda mikroorganizmaya etkili olan izolatlara kaymaktadır.

Bununla birlikte üretimde kullanılacak özellikte suşların seçimi için mevcut çalışmanın daha ileriki safhaya taşınması gerekmektedir. İzolatların safra tuzlarına olan dirençlerine ve Ca Co-2 hücrelerindeki adsorblanma durumlarına bakılması gerekmektedir. DNA sekans analizlerinin gerçekleştirilmesi ve suşun probiyotik olarak kullanılmasının uygun olduğunun kesin olarak ispatlanması gerekmektedir. Probiyotik üretimde tek suşlu preparattan ziyade farklı özellikleri birbirinden iyi olan suşların birlikte kullanılması probiyotiklerden beklenen faydayı daha iyi karşılayacaktır. Ancak karışık kültürlerde kullanılan suşların birbirlerine karşı inhibisyon etkisi göstermemesi gerekmektedir. Günümüzde hayvan besinlerinde de probiyotiklerin kullanımı oldukça yaygındır ve bu çalışmada tanımlanan türlerin çoğu probiyotik olarak satılmaktadır. İnsanlarda da kullanılması için öncelikle hayvan denemeleriyle probiyotik etkinin görülmesi, daha sonrasında da gönüllü bireyler kullanılarak yapılan denemelerle bu etkinin kanıtlanması gerekmektedir. Bu da disiplinler arası bir çalışmayı gerektirmektedir.

KAYNAKLAR

- Adams, M.R. ve Marteau, P. (1995), "On the safety of lactic acid bacteria from food," *Int. J. of Food Microbiol.*, **27**, 263-264.
- Adams, M.R. ve Nicolaides, L. (1997), "Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation," *Food Control*, **8** (5-6), 227-239.
- Akalın, S., Gönç, S. ve Senderya, S. (2000), "Probiyotik süt ürünleri ve probiyotikler," *VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu* (Ed: Demirci, M.), Tekirdağ, 29-35.
- Akçelik, M., Ayhan, K., Gürgün, V. ve Tunail, N. (1999), *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, Ankara.
- Akyıl, O. (1999), *Probiyotikler*, Lisans Bitirme Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fak. Gıda Mühendisliği, Isparta.
- Andersson R., (1986), "Inhibition of *Staphylococcus aureus* and spheroplasts of gram-negative bacteria by antagonistic compound produced by a strain of *Lactobacillus plantarum*," *Int. J. Food Microbiol.*, **3**, 149-160.
- Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N. ve Akay, Ö. (1992), *Özel Mikrobiyoloji*, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, Yay., No: 741.
- Aslım, B. (1994), *Lactobacillus bulgaricus ve Streptococcus thermophilus bakterilerinin metabolik ve antimikrobiyal aktiviteleri üzerine bazı fiziksel ve kimyasal mutajenlerin etkisi*, Doktora Tezi, Gazi Üniv., Ankara.
- Aslım, B., Beyatlı, Y. ve Halkman, K. (2000), "Yoğurt starter kültür metabolitlerinin inhibisyon etkisi," *Turk J. Biol.*, **24**, 65-78.
- Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. ve Schleifer, K.H. (1992), *The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, Volume II, Springer-Verlag, New York, 1483-1581.
- Barefoot, S.F. ve Klaenhammer, T.R. (1983), "Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*," *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1808-1815.
- Barry, A. ve Kolstad, J. (1983) "Proteolytic systems in lactic acid bacteria," *Antonie van Leeuwenhoek*, **49**, 225 – 245.

- Bauer, G. (2001), “*Lactobacilli*-mediated control of vaginal cancer through specific reactive oxygen species interaction,” *Med. Hypotheses*, **57** (2), 252–257.
- Beasley, S. (2004), *Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota*, Academic Dissertation in Microbiology, University of Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry Sciences, Finland.
- Beyatlı, Y. ve Tunail, N. (1984), “Relationship between lactic acid production and proteolytic activity of thermophilic lactic microorganisms isolated from yoghurt,” *J. Dairy Sci.*, **67** (1), 83-87.
- Bhunia, A.K., Johnson, M.C. ve Ray, B. (1988), “Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*,” *J. of Appl. Bacteriol.*, **65**, 261-268.
- Bouzar, F., Cerning, J. ve Desmazeaud, M. (1996), “Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by two kolonial variants,” *J. of Dairy Sci.*, **79** (2), 205-211.
- Callewaert, R., Hugas, M. ve De Vuyts, L. (2000), “Competitiveness and bacteriocin production of enterococci in the production of Spanish style dry fermented sausages,” *Int. J. of Food Microbiol.*, **57**, 33-42.
- Caplice, E. ve Fitzgerald, G.F. (1999), “Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation,” *Int. J. of Food Microbiol.*, **50**, 131-149.
- Carrasco, N.S., Scarinci H.E. ve Simonetta, A.C. (2002), “Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from Argentinan dairy products,” *Australian J. of Dairy Technol.*, **57** (1), 15-19.
- Castele, S.V., Vanheuverzwijn, T., Ruysen, T., Assche, V.P., Swings, J. ve Huys, G. (2006), “Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters,” *Int. Dairy J.*, **16**, 1470-1476.
- Cerning, J. ve Bouillanne, C. (1992), “Isolation and characterisation of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria,” *J. Dairy Sci.*, **75**, 692-699.

- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. ve Collins, J.K. (1998), "Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus tür*," *J. of Food Protect.*, **61**, 1636-1643.
- Chang, Y., Kim, J., Kim, H., Kim, W., Kim, Y. ve Park, Y. (2001), "Selection of a potential probiotic *Lactobacillus* strain and subsequent *in vivo* studies," *Antonie van Leewenhoek*, **80**, 193-199.
- Choi, H.J., Lee, H.S., Her, S., Oh, D.H. ve Yoon, S.S. (1999), "Partial characterization and cloning of leuconocin J, a bacteriocin produced by *Leuconostoc* sp. J2 isolated from the Korean fermented Vegetable Kimchi," *J. of Appl. Microbiol.*, **86**, 175-181.
- Choi, H.J., Cheigh, C.I., Kim, S.B. ve Pyun, Y.R. (2000), "Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi," *J. of Appl. Microbiol.*, **88**, 563-571.
- Christensen, M.D., Albury, M.N. ve Pederson, C.S. (1958), "Variation in the acetic acid-lactic acid ratio among the lactic acid bacteria," *Appl. and Environ. Microbiol.*, **6** (5), 316-318.
- Cocolin, L., Foschino, R., Comi, G. ve Fortina, M.G. (2007), "Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk," *Food Microbiol.*, unpublished article.
- Colins, E.B. ve Aramaki, K. (1980), "Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*," *J. Dairy Sci.*, **3**, 3-357.
- Daeschel, M.A. ve Klaenhammer T.R. (1985), "Association of a 13,6 megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin acidity," *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 1538-1541.
- Daeschel, M.A. (1989), "Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives," *Food Technol.*, **January**, 164-167.
- Dinçer, E. (2007), *Et ve et ürünlerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve bunların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi*, Y.L. Tezi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.
- Domann, E., Hain, T., Ghai R., Billion A., Kuenne, C., Zimmerman, K., ve Chakraborty, T. (2007), "Comparative genomic analysis for the presence

- of potential enterococcal virulence factors in the probiotic *Enterococcus faecalis* strain symbioflor 1,” *Int. J. of Med. Microbiol.*, **297**, 533-539.
- Drinan, D. F., Tobin, S. ve Cogan, T.M. (1976), “Citric acid metabolism in hetero- and homofermentative lactic acid bacteria,” *Appl. and Environ. Microbiol.*, **31** (4), 481– 486.
- Eijsink, V.G.H., Skeie, M., Middelhoven, P.H., Brurberg, M.B. ve Nes, I.F. (1998), “Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria,” *Appl. and Environ. Microbiol.*, **64** (9), 3275-3281.
- Elliott, J.A. ve Facklam R.R. (1996), “Antimicrobial susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* and proposed method to discriminate between them,” *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 1296-1298.
- Erkmen O. (2000), *Basic Methods for The Microbiological Analysis of Foods*, University of Gaziantep, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, 202-204.
- Eschenbach, D.A., Davick, P.R., Williams, B.L., Klebanoff, S.J., Young-Smith, K., Critchlow, C.M. ve Holmes, K.K. (1989), “Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* tür in normal women and women with bacterial vaginosis,” *J. of Clinical Microbiol.*, **27** (2), 251-256.
- Faber, E.J., Kameling, J.P. ve Vliegenthart J.P. (2001), “Structure of extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 291,” *Carbohydrate Research*, **331**, 183-194.
- Fernández, M.F., Boris, S., Barbés, C. (2003), “Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract,” *J. of Appl. Microbiol.*, **94**, 449-455.
- Filya, İ. (2002), “Laktik asit bakteri ve laktik asit+enzim karışımı silaj inokulantlarının mısır silajı üzerine etkileri,” *Türk Vet. Anim. Sci.*, **26**, 679-687.
- Fons, M., Hege, T., Ladire, M., Ralbaud, R., Duoluzeau, R. ve Maguin, E. (1997), “Isolation and characterization of plasmid from *Lactobacillus fermentum* conferring erythromycin resistance,” *Plasmid*, **37** (3), 199-203.

- Foerster, C., de Champs C. V., Vataoux, C. ve Joly, B. (2001), "Probiotic activities of *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties," *Research Microbiol.*, **152**, 167-173.
- Foulquie Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. ve De Vuyst, L. (2006), "The role and application of enterococci in food and health," *Int. J. of Food Microbiol.*, **106**, 1-24.
- Franciosi, E., Settanni, L., Carozza, A. ve Poznanski, E. (2009), "Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows milk," *Int. Dairy J.*, **19**, 3-11.
- Franz, C.M.A.P., Holzappel, W.H. ve Stiles, M.E. (1999), "Enterococci at the crossroads of food safety," *Int. J. Food Microbiol.*, **47**, 1-24.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H. ve Holzappel, W.H. (2003), "Enterococci in foods-a conundrum for food safety," *Int. J. Food Microbiol.*, **88**, 105-122.
- Ganzle, M.G. ve Vogel, R.F. (2003), "Contribution of reutericyclin production to the stable persistence of *Lactobacillus reuteri* in an industrial sourdough fermentation," *Int. J. of Food Microbiol.*, **80**, 31-45.
- Ganzle, M.G., Vermeulen, N. ve Vogel, R.F. (2007), "Carbonhydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough," *Food Microbiol.*, **24**, 128 -138.
- Gardiner, G.E., Ross, R.P., Wallace, J.M., Scanlan, F.P., Jagers, P.P.J.M., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K. ve Stanton, C. (1999), "Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of Cheddar cheese," *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4907-4916.
- Garde, S., Gaya, P., Medina, M. ve Nunez, M. (1997), "Acceleration of flavour formation in cheese by a bacteriocin-producing adjunct lactic culture," *Biotechn. Letters*, **19** (10), 1011-1014.
- Garrote, L.G., Abraham G.A. ve Antoni G.L. (2001), "Chemical and microbiological characterization of kefir grains," *J. of Dairy Research*, **68**, 639-652.
- Geisen, R., Lücke, K.K. ve Kröckel, L. (1992), "Starter and protective cultures for meat and meat products," *Fleischwirtsch.*, **72** (6), 894-898.

- Ghrairi, T., Free, J., Berjeaud J.M. ve Manai, M. (2008), "Purification and characterisation of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese," *Food Control*, **19** (2), 162-169.
- Gibson, G. (2002), "Probiotic: a growth industry," *Dairy Ind. Int.*, **January**, 18-20.
- Gilliand, S.E. (1990), "Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria," *FEMS Microbiol. Rev.*, **87**, 175-188.
- Giraffa, G. (1995), "Enterococcal bacteriocins: their potential use as anti-*Listeria* factors in dairy technology," *Food Microbiol.*, **12**, 551-556.
- Giraffa G., Carminati D. Torri ve Tarneli, G. (1995a), "Inhibition of *Listeria innocua* in milk by bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* 705," *J. Food Protect.*, **58**, 621-623.
- Giraffa G., Carminati D. ve Torri Tarrelli G., (1995b), "Production and stability of an *Enterococcus faecium* bacteriocin during Taleggio cheese making and ripening," *Food Microbiol.*, **12**, 301-307.
- Giraffa, G. (2003), "Functionality of enterococci in dairy products," *Int. J. Food Microbiol.*, **88**, 215-222.
- Goktepe, I., Juneja, K.V. ve Ahmedna, M. (2006), *Probiotics in Food Safety and Human Health*, A.B.D.
- González, L., Sadoval, H., Sacritán, N., Catro, J.M., Fresno, J.M. ve Tornadijo, M.E. (2007), "Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity," *Food Control*, **18**, 716-722.
- Gönç, S. ve Akalın, A.S. (1995), "Yoğurtta canlı olarak bulunan *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus bifidus*'un organizma ve sağlık üzerine etkileri," *Gıda Tekn. Derg.*, **20** (2), 75-79.
- Guslandi, M. (2003), "Probiotics for chronic intestinal disorders," *Am. J. Gastroentol.*, **98** (3), 520-521.
- Gürsoy, O. ve Kınık, O. (2005), "Laktobasiller ve probiyotik peynir üretiminde kullanım potansiyelleri," *Müh. Bil., Derg.*, **11** (3), 361-371.
- Gürsoy, O. ve Kınık, O. (2006), "Peynir üretiminde probiyotik bakterilerin kullanımı: Probiyotik peynir," *Müh. Bil. Derg.*, **12** (1), 105-116.

- Halami, P.M., Chandrashekar, A. ve Nand, K. (2000), “*Lactobacillus farciminis* MD, a new strain with potential for bacteriocin and antibiotic assay,” *Letters in Appl. Mikrobiol.*, **30**, 197-202.
- Halkman, A.K. (2005), *Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*, Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd. Şti. Ankara, 73-89, 250.
- Harris, L.J., Henry, P., Fleming, T. ve Klaenhammer, R. (1992), “Developments in nisin reseach,” *Food Research Int.*, **25** (1), 57-66.
- Holo, H., Nilssen, O. ve Nes I.F. (1991), “Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene,” *J. Bacteriol.*, **173**, 3879-3887.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T. ve Williams, S.T. (2000), *Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 527-567.
- Holzapfel, W.H. (2002), “Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries,” *Int. J. of Microbiol.*, **75**, 197–212.
- Holzapfel, W.H. ve Schillinger, U. (2002), “Introduction to pre- and probiotics,” *Food Research Int.*, **35** (2-3), 109-116.
- Hugenholtz, J., Looijesteijn, E., Starrenburg, M.ve Dijkema, C. (2000), “Analysis of sugar metabolism in an EPS producing *Lactococcus lactis* by ³¹P NMR,” *J. of Biotechnol.*, **77**, 17-23.
- Ishiwa, H., ve Iwata, S. (1980), “Drug resistance plasmids in *Lactobacillus fermentum*,” *J. of General and Appl. Microbiol.*, **26**, 71-74.
- Izquierdo, E., Marchioni, E., Aoude-Werner, D., Hasselman, C. ve Ennahar, S. (2009), “Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacterocin producer, against *Listeria monocytogenes*,” *Food Microbiol.*, **26**, 16-20.
- İnal T. (1990), *Süt ve Süt Ürünleri Hijyen ve Teknolojisi*, Final Ofset, İstanbul.
- İnanç, N., Şahin, H. ve Çiçek, B. (2005), “Probiyotik ve prebiyotiklerin sağlık üzerine etkileri,” *Erciyes Tıp Derg.*, **27**(3), 122-127.
- Jolly, L. ve Stingeale, F. (2001), “Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria,” *Int. Dairy J.*, **11**, 733-745.

- Kandler, O., Weiss, N. (1986), "Genus *Lactobacillus* Beijerinck," In *Bergey's Manual of systematic Bacteriology* (Ed.: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. And Holt, J.G.) Baltimore, MD: Williams and Wilkins, **2**, 1209-1234.
- Karahan, A.G. ve Çakmakçı, M.L.(1996), "Probiyotikler," *Gıda Dergisi*, **21** (4), 297-302.
- Kart, A. (2000), "Probiyotiklerin insan sağlığı üzerine etkileri," S.D.Ü. Ziraat Fak. Gıda. Müh., Yüksek Lisans Semineri, Isparta.
- Kavas, G. ve Kınık, Ö. (2003), "Hayvan beslenmesi ve gıda güvenliği açısından enterokoklar," *Türk Tarım*, **152**, 30-37.
- Kılıç S. (2001), *Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri Lactobacillus*, E. Ü. Ziraat Fak., Süt Teknolojisi Bölümü.
- Koluman, A., Akan, S. ve Çakıroğlu, F.P. (2009), "Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods," *Food Control*, **20**, 281-283.
- Kurt, Ş. ve Zorba, Ö. (2005), "Bakteriyosinler ve gıdalarda kullanım olanakları," *Yüzüncü Yıl Üniv. Vet. Fak. Derg.* **16** (1), 77-83.
- Lankaphutra, W.E.V. ve Shah, N.P. (1996), "A simple method for selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt supplemented with *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.," *Milchwissenschaft*, **51**, 446-451.
- Levander, F., Svenson, M. ve Radström, P. (2002), "Enhanced exopolysaccharide production by metabolic engineering of *Streptococcus thermophilus*," *Appl. and Environ. Microbiol.*, **68** (2), 784-790.
- Lewus, C.B., Kaiser, A. ve Montville, J.T. (1991), "Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat," *Appl. and Environ. Microbiol.*, **57** (6), 1683-1688.
- Lewus, C.B., Sun, S. ve Montville, J.T. (1992), "Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain," *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 143-149.
- Liu, W. ve Hansen, J. N. (1990), "Somechemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*," *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2551-2558.
- Losteinkit, C., Vchiyama, K., Ochi, S.H., Takaoka, T., Nagahisa, K. ve Shioga, S. (2001), "Characterization of bacteriocin N15 produced by *Enterococcus*

- faecium* N15 and cloning of related genes,” *J. of Biosci. and Bioengineer.*, **91** (4), 39-395.
- Madiedo, P.R. ve Reyes-Gavilan, C.G. (2005), “Invited review: methods for the sceeing, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria,” *J. of Dairy Sci.*, **88**, 843-856.
- Madigan, M.T. ve Matrinko, J.M. (2006), “Brock Biology of Microorganisms,” Pearson Education, Inc. Eleventh Edition, 375-378.
- Makhzami, S., Quence, P., Akary, E., Bach, C., Aigle, M., Delacroix-Buchet, A., Oiger, J.C. ve Serror, P. (2008), “In Situ gene expression in cheese matrices: Application to a set of enterococcal genes,” *J. of Microbiol. Methods*, **75**, 485-490.
- Marshall, V.M., Dunn, H., Elvin, M., M Lay, N., Gu, Y. ve Laws, A.P. (2001), “Structural characterisation of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* EU20,” *Carbohydrate Research*, **331**, 413-422.
- Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Batini, R. ve Manicardi, G. (2001), “Detection and preliminary chaacterisation of A bacteriocin (plantaricin 35d) produced by A *Lactobacillus plantarum* strain,” *Int. J. of Food Microbiol.*, **64**, 193-198.
- Michetti, P. (2001), “Lactobacilli for the management of *Helicobacter pylori*,” *Nutrition*, **17** (3), 268-269.
- Mitsuoka, T. (1990), “*Bifidobacteria* and their role in human health,” *J. Industrial Microbiol.*, **6**, 263-268.
- Mumcu, Z.N. (1997), *Kefirden İzole Edilen Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik, Antimikrobiyal ve Plazmit DNA'larının İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Muriana, P.M. ve Klaenhammer, T.R. (1991), “Purification and partial characterization of lactacin f, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088,” *Appl. and Environ. Microbiol.*, **57**, 114–121.
- Nagaoka, M., Hashimoto, S., Watanabe, T., Yokokura, T. ve Mari, Y. (1994), “Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell-wall polysaccharides,” *Bil. Pharh.*, **17**, 1012-1017.

- Nakajima, H., Suzuki, Y., Kauzu, H., ve Hirota, T. (1992), "Cholesterol-lowering activity of ropy fermented milk," *J. of Food Sci.*, **57**, 1327-1329.
- Nigatu, A. (2000), "Exaliation of numerical analyses of RAPD and API 50 CH patterns to differentiate *Lactobacillus plantarum*, *Lact. sake*, *Lact. parabuchneri*, *Lact. gallinarum*, *Lact. casei*, *Weisella minor* and related taxa isolated from kocho and tef mixed cultures in vegatable fermentations," *J. of Appl. Microbiol.*, **89**, 969-978.
- Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I. ve Onilude, A.A. (2003), "Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG 1," *African J. of Biotechnol.*, **2** (8), 219-227.
- Osmanağaoğlu, Ö., Ufuk, G., Beyatlı, Y. ve Çökmüş, C. (1998), "Purification and characterization of pediocin F, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* F," *Tr. J. of Biology*, **22**, 217-228.
- Oumer, A., Gaya, P., Fernandez-Garsia, E., Mariaca, R., Gadre, S., Medina, M. ve Nunez, M. (2001), "Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture," *J. Dairy Research*, **68**, 117-1219.
- Özbaş, Y. (1993), "Bifidobakterler ve *Lactobacillus acidophilus*: özellikleri, diyetetik amaçlar için kullanımları, yararlı etkileri ve ürün uygulamaları," *Gıda Tekn. Derg.*, **18** (4), 247-251.
- Özer, D. ve Akalın, M.S. (2000), "Probiyotik fermente süt ürünleri ve probiyotikler," *VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu* (Ed: Demirci, M.), Tekirdağ, 273-277.
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. ve Kotzekidou, P. (2003), "Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Grek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties," *Meat Sci.*, **65**, 859-867.
- Piard, J.C. ve Desmazeaud, M. (1992), "Inhibition factor produced by lactic acid bacteria 2. bacteriocins and other antibacterial substances," *Lait* **72**, 113-142.
- Ponce, A.G., Moreira, M.R., del Valle, C.E. ve Raura S.I. (2008), "Preliminary characterization of bacteriocin-like substances from lactic acid bacteria

- isolated from organic leafy vegetables,” *LWT-Food Sci. Technol.*, **41** (3), 432-441.
- Raffle, E.J Lancet, RefiRasic J.Lj. ve Kurmann, J.A. (1956), “*Yoghurt Scientific Grounds, Techonology, Manufacture and Preparations*” 1, 2, 206, Denmark.
- Renner, E. ve Saldamlı, İ. (1983), “Beslenme açısından fermente süt ürünleri,” *Gıda Derg.*, **8** (6), 297-308.
- Rollan, G., Lorca, G.L., Font, G. ve Valdez, F. (2003), “Arginine catabolism and acid tolarance responce in *Lactobacillus reuteri* isolated from sourdough,” *Food Microbiol.*, **20**, 313-319.
- Rollins, M., ve Joseph, S.W. (2000), BSCI 424-*Pathogenic Microbiology, Antibiotic Disk Susceptibilities (Kirby-Bauer Disk-Diffusion Method)*, <http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/LabMaterialsMethods/AntibioticDisk.htm>.
- Ross, R.P., Desmond, C., Fitzgerald, G.F. ve Stanton, C. (2005), “Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods,” *J. of Appl. Microbiol.*, **98**, 1410-1417.
- Rushing, N.B. ve Senn, V.J. (1960), “Effect of citric acid concentration on the formation of diacetyl by certain lactic acid bacteria,” *Appl. and Environ. Microbiol.*, **8** (5), 286–290.
- Ryan, M.P., Rea, M.C., Hill, C. ve Ross, R.P.(1996), “An application in cheddar cheese manufactura for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147,” *Appl. and Environ. Microbiol.*, **62** (2), 612-619.
- Ryu, C.S., Czajka, J.W., Sakamoto, M. ve Benno, Y. (2001), “Characterization of the *Lactobacillus casei* group and *Lactobacillus acidophilus* group by automated ribotyping,” *Microbiology and Immunology*, **45** (4), 271-275.
- Salminen, S., Von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Buassant, D., Vos de, W.M., Fonde’n, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E. ve Sandholm, T.M. (1998), “Demonstration of safety of probiotics-a review,” *Int. J. of Food Microbiol.*, **44**, 93-106.

- Sanni, A.I., Onilude A.A., Ogunbanwo, S.T. ve Smith, S.I. (1999), "Antagonistic activity of bacteriocin produced by *Lactobacillus* species from Ogi, an indigenous fermented food," *J. Basic Microbiol.*, **39**, 189-195.
- Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G. ve Tsakalidou, E. (2002), "Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Grek Feta cheese," *Int. J. Food Microbiol.*, **76**, 93-105.
- Schleifer, K.H. (1987), "Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria," *Microbiol. Rev.*, **46**, 201-203.
- Schillinger, U. ve Lücke, F.K. (1989), "Antibacterial activity of *L. sake* isolated from meat," *Appl. and Environ. Microbiol.*, **55**, 8, 1901-1906.
- Schved, F., Lalazar, A., Henis, Y. ve Juven, B.J. (1993), "Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus damnosus acidilactici*," *J. Appl. Bacteriol.*, **74**, 67-77.
- Shimazu, Y., Vehara, M. and Watanabe, M. (1985), "Transformation of citric acid to acetic acid, acetoin ve diacetyl by wine making lactic acid bacteria," *Agric. Biol. Chem.*, **49** (7), 2147-2157.
- Sing, S., Goswami, P., Singh, R. ve Heller, K.J. (2009), "Application of molecular identification tools for *Lactobacillus* with a focus on discrimination between closely related species," *LWT-Food Sci. and Technol.*, **42** (2), 448-457.
- Smit, G., Vliek, J.H., Smit, V.A. ve Ayad, E.H.E. (2002), "Fermentative formation of flavour compounds by lactic acid bacterial," *The Australian J. of Dairy Technol.*, **57** (2), 61-68.
- Stanton, C. ve Ross, R.P. (2000), *New Probiotic Cheddar Cheese*, End of Project Report, ISBN: 1 84170 122 X, ARMIS No. 4266, DPRC No. 29. Irish Agriculture and Food Development Authority, Dairy Products Research Centre Teagasc, Moorepark, Fermoy, Co., Cork, Ireland.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S. ve Wannamaker, L.W. (1976), "Bacteriocins of gram positive bacteria," *Bacteriol. Rev.*, **40**, 722-756.

- Tallon, R., Bressollier, P. ve Urdaci, M.C.(2003), "Isolation and characterization of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56," *Research in Microbiol.*, **154** (10), 705-712.
- Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursalıoğlu, M. ve Oğultekin, R. (1989), 3. ve 4. Sınıf Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu, Anadolu Üniversitesi, Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları, No. 74, Eskişehir, 23-25, 240.
- Tekinşen, O. C. ve Atasever M.(1994), *Süt Ürünleri Üretiminde Starter Kültür*, Selçuk Üniversitesi, Vet. Fak. Yayını, 150, Konya.
- Todorov, S.D. ve Dicks, L.M.T. (2005), "Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria," *Process Biochem.*, **40**, 365-370.
- Toklu, G.Ş. (1999), "Fermente süt ürünleri ve probiyotikler," *Gıda Bil. ve Tekn.*, **4** (2), 4-6.
- Turantaş, F. (2007), *Laktik Asit Bakterileri Tarafından Hidrojen Peroksit Üretimi*. <http://www.fulyaturantas.com/Bilimsel/H2O2.doc>
- Tzanetaki, E.L. ve Mastrojiannaki, A.V. (1988), "Diacetyl and acetaldehyde concentrations during ripening of kefalatyri cheese," *J. Food Scien.*, **53** (2), 663–664.
- Vael, C. ve Goossens, H. (2002), "Enterococci as probiotics: chances and challenges," Presentations: Enterococci in Foods: Functional and Safety Aspects, European Commission Project FAIR-CT97-3078, 30-31 May 2002, Berlin, Germany.
- Valenzuela, A.S., Omar, N., Abriouel, H., Lopez, R.L., Veljovic, K., Canamero, M.M., Topisirovic, M.K.L. ve Galvez, A. (2009), "Virulence factors, antibiotic resistance and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin," *Food Control*, **20** (4), 381-385.
- Vancanneyt, M., Tsakalidou, E., Kalantzopoulos, G., Holzapfel, W., Dellaglio, F., Cogan, T., De Vuyst, L., Lombardi, A., Kerster, K. ve Swings, J. (2002), "Genotypic characterization of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains and correlation with their origin and functional and safety

- properties,” Presentations: Enterococci in Foods: Functional and Safety Aspects, European Commission Project FAIR-CT97-3078, 30-31 May 2002, Berlin, Germany.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, P. De Vos, Kersters, K. ve Swing, S.(1996), “Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics,” *Microbiol. Rev.*, **60** (2), 407-438.
- Van Reenen, C.A., Dicks, L.M.T. ve Chikindas, M.L. (1998), “Isolation purification and partial characterization of plantericin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*,” *J. of Appl. Microbiol.* **84**, 1131-1137.
- Wood, J.R., Sweet, R.L., Catena, A., Hadley, W.K. ve Robbie M. (1987), “ In vitro adherence of *Lactobacillus* species to vaginal epithelial cells,” *Am. J. Obstet, Gynecol*, **153**, 740-743,
- Xanthopoulos, V., Litopoulou-Tzanetaki, E. ve Tzanetakis, N. (2000), “Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts,” *Food Microbiol.*, **17**, 205-215.
- Yağcı, R.V. (2005), “Probiyotik ve prebiyotikler,” *Güncel Gastroent.*, **9** (4), 223-225.
- Yaman, H. (2000), *Partial characterisation of lactobacilli isolated from commercial kefir grain*, PhD Thesis, Huddersfield University, Huddersfield, UK.
- Yang, R., Johnson, M.C. ve Ray, B. (1992), “Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria,” *Appl. and Environ. Microbiol.*, **58** (10), 3335-3359.
- Yansanjav, A., Svec, P., Sedlacek, I., Hellerova, I. ve Nemeč, M. (2003), “Ribo typing of lactobacilli isolated from spoiled beer,” *FEMS Microbiol. Letters*, **229**, 141-144.
- Yaygın, H. (1981), “Yoğurdun beslenme değeri ve sağlıkla ilgili özellikleri,” *Gıda Derg.*, **6** (5), 17-22.
- Yaygın, H. ve Kılıç, S. (1993), *Süt Endüstrisinde Saf Kültür*, Altındağ Matbaası, 108, İzmir.

- Yıldırım, Z. ve Yıldırım, M. (2000), "Probiyotik özellik gösteren bifidobakteriler," *VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu* (Ed: Demirci, M.), Tekirdağ, 266-271.
- Yılmaz, M. (2004), "Prebiyotikler ve Probiyotikler," *Güncel Pediatri*, **2**, 142-145.
- Yılsay, T.Ö. ve Kurdal, E. (2000), "Probiyotik süt ürünlerinin beslenme ve sağlık üzerindeki etkisi, *VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu* (Ed: Demirci, M.), Tekirdağ, 279-286.
- Zhu, W.M., Liu, W. ve Wu, D.Q. (2000), "İsolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7," *J. of Appl. Microbiol.*, **88**, 877-886.