

**TURŞU VE ZEYTİNDEN ANTAGONİSTİK VE PROBİYOTİK
ÖZELLİKTE LAKTİK STARTER KÜLTÜR ELDESİ**

**Pamukkale Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

Nihat KARASU

Danışman: Doç. Dr. Ahmet Hilmi ÇON


**Temmuz, 2006
DENİZLİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Nihat KARASU tarafından Doç.Dr. Ahmet Hilmi ÇON yönetiminde hazırlanan “**Turşu ve Zeytinden Antagonistik ve Probiyotik Özellikte Laktik Starter Kültür Eldesi**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Sebahattin NAS
Jüri Üyesi


Doç. Dr. Ahmet Hilmi ÇON
Jüri Üyesi

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

Prof. Dr. Mehmet Ali SARIGÖL
Müdür

TEŞEKKÜR

Tamamlanan bu çalışmanın; planlanmasında, yürütülmesinde ve sonuçların yorumlanmasında her türlü maddi ve manevi yardım ve kolaylığı esirgemeyen fikir ve düşünceleriyle yol gösteren değerli hocam Doç.Dr. Ahmet Hilmi ÇON'a,

Araştırmanın yürütülmesinde fikir, düşünce ve katkıları esirgemeyen bölüm başkanımız Prof. Dr. Aydın YAPAR ve dekanımız Prof. Dr. Sebahattin NAS ve tüm Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim elemanlarına,

Çalışmalarım boyunca manevi desteğini esirgemeyen ve sabırla beni destekleyen aileme,

Emeği geçen herkese,

Ve bu projeyi maddi olarak destekleyen "Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine" teşekkürlerimi sunarım.

Nihat KARASU

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza : 
Öğrenci Adı Soyadı : Nihat KARASU

ÖZET

TURŞU VE ZEYTİNDEN ANTAGONİSTİK VE PROBİYOTİK ÖZELLİKTE LAKTİK STARTER KÜLTÜR ELDESİ

Karasu, Nihat
Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği ABD
Tez Yöneticisi: Doç.Dr. Ahmet Hilmi ÇON

Temmuz 2006, 78 Sayfa

Araştırmanın amacı turşu ve zeytin üretiminde starter kültür olarak kullanılabilen antimikrobiyal aktivite gösteren ve probiyotik özelliğe sahip laktik asit bakterisi izole etmektir. Bu nedenle, endüstriyel işletmeler ve evlerden temin edilen turşu ve zeytin örneklerinin kimyasal, mikrobiyolojik özellikleri belirlenmiş ve bu örneklerden antimikrobiyal aktiviteye sahip laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Antimikrobiyal aktivite, indikatör mikroorganizma olarak *L.sake* Lb790, *L.monocytogenes* Li1, *L.monocytogenes* Li6, *E.coli*, *E.feacium*, *Y.lipolitica*, *P.vulgaris* ve *A.hydrophila* kullanılarak agar spot testi ile belirlenmiştir. Toplam 86 adet örnekten 4000'i aşkın laktik asit bakteri kolonisi antimikrobiyal aktivite testine tabi tutulmuş ve 32 adet izolat antimikrobiyal aktiviteye sahip bulunarak seçilmiştir. Tekrarlanan antimikrobiyal aktivite testleri sonucu 16 izolat ile çalışmaya devam edilmiş ve bunlardan 13 adedi *L.plantarum*, 3 adedi de *L.pentosus* olarak tanımlanmıştır.

Araştırmada kullanılan turşu örneklerinin pH değerleri 2.0-6.41 arasında ve ortalama 3.53, asitlik dereceleri %0.18-4.41 arasında ve ortalama %1.60, tuz değerleri de %0.39-9.89 arasında ve ortalama %3.96 olarak bulunmuştur. Zeytin örneklerinin pH değerleri 2.81-4.84 arasında ve ortalama 3.77, asitlik dereceleri %0.20-2.12 arasında ve ortalama olarak %0.91, tuz değerleri de %0.18-10.82 arasında ve ortalama %4.63 olarak bulunmuştur. Mikrobiyolojik analizler sonucu; turşu ve zeytin örneklerinin sırasıyla <3.00-7.77 log cfu/g ve <3.00-7.15 log cfu/g arasında laktik asit bakterisi; <3.00-8.28 log cfu/g ve 3.95-7.18 log cfu/g arasında toplam aerobik mezofilik bakteri; <3.00-7.85 log cfu/g ve <3.00-6.91 log cfu/g arasında maya küf içerdiği tespit edilmiştir. Turşu ve zeytin örneklerinin hiçbirinde *E.coli*'ye rastlanılmamıştır.

Seçilen bu izolatların probiyotik özellikleri açısından önemli olan safra ve gastrik suya, antibiyotiğe, alkole, dondurma ve liyofilizasyona dayanıklılıkları, hidrofobisite değerleri ve β -galaktozidaz üretim yetenekleri ile turşu ve zeytin üretimi açısından önemli olan toplam asit üretimi, farklı pH ve tuz konsantrasyonlarında gelişme ve plazmid DNA profilleri belirlenmiştir. Tüm bu testler sonucunda izolatlardan *L.plantarum* 9, 12, 22, 66 ve *L.pentosus* 13'ün en iyi probiyotik starter kültür özelliğine sahip olduğu ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Turşu, Zeytin, Laktik Starter Kültür, Probiyotik

Prof.Dr. Filiz ÖZÇELİK
Prof.Dr. Sebahattin NAS
Doç.Dr. Ahmet Hilmi ÇON

ABSTRACT**ANTAGONISTIC AND PROBIOTIC LACTIC STARTER CULTURES FROM PICKLE AND OLIVE**

Karasu, Nihat

M. Sc. Thesis in Food Engineering, Gıda Mühendisliği ABD

Supervisor: Assoc.Prof.Dr. Ahmet Hilmi ÇON

July 2006, 78 Page

In the present study, the main purpose was to obtain antagonistic and probiotic starter cultures used in the pickle and olive processes. Therefore, chemical and microbiological properties of pickles and fermented olives were analyzed. Moreover, putative lactic acid bacteria strains producing bacteriocin-like metabolites were isolated and identified from various homemade or industrial pickles and fermented olives. For the detection of antagonistic activity agar spot test was used and *L.sake* Lb790, *L.monocytogenes* Li1, *L.monocytogenes* Li6, *E.coli*, *E.feacium*, *Y.lipolitica*, *P.vulgaris* ve *A.hydrophila* were used as indicator microorganisms. From 86 samples, more than 4000 lactic acid bacteria colonies and 32 isolates with antimicrobial activity were chosen by antimicrobial activity test. As a result of reiterated antimicrobial activity tests, 16 isolates were used in further analysis, and 13 of these isolates were identified as *L.plantarum*, 3 as *L.pentosus*.

pH values of pickles were between 2.0-6.41 with the average of 3.53, and acidity level was between 0.18-4.41% with the average of 1.60%, and salt content of pickle samples was between 0.39-9.89% with the average of 3.96%. In the samples of fermented olives, pH values were between 2.81-4.84 with the average of 3.77, and acidity level was between 0.20-2.12% with the average of 0.91%, and salt contents was found between 0.18–10.82% with the average of 4.63%. Microbiological analysis results of the pickles and fermented olives were <3.00-7.77 log cfu/g and 3.00-7.15 log cfu/g for lactic acid bacteria, <3.00-8.28 log cfu/g and 3.95-7.18 log cfu/g for total mesophilic bacteria, <3.00-7.85 log cfu/g and <3.00-6.91 log cfu/g for mold and yeast, respectively. *E.coli* was undetected in any of samples.

The metabolic probiotic properties of these isolates, and bile and gastric juice tolerance, hydrophobicity, antibiotic susceptibility, freeze-drying tolerance and ability of β -galactosidase production and plasmid profiles of the selected strains were determined. In addition, properties which are important in pickle and fermented olive production such as total acid production, survival of microorganisms at different pH ranges and salt concentration values were also determined. Results of this study indicated that putative strains for pickles and olives processes, which may have the best potential as starter culture, were *L.plantarum* 9, 12, 22, 66 and *L.pentosus* 13.

Keywords: Pickle, Olive, Lactic Starter Cultures, Probiotics

Prof.Dr. Filiz ÖZÇELİK

Prof.Dr. Sebahattin NAS

Assoc.Prof.Dr. Ahmet Hilmi ÇON

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Yüksek Lisans Tezi Onay Formu	i
Teşekkür Sayfası	ii
Bilimsel Etik Sayfası	iii
Özet	iv
Abstract	v
İçindekiler	vi
Tablolar Dizini	viii
Şekiller Dizini	ix
1.GİRİŞ	1
2. MATERYAL VE METOT	16
2.1. Materyal	16
2.1.1. Turşu ve zeytin örnekleri	16
2.1.2. Araştırmada kullanılan besiyerleri ve bakteri suşları	16
2.2. Metot	17
2.2.1. Kimyasal analizler	17
2.2.1.1. Turşu ve zeytinden kimyasal analizler için örnek alınması	17
2.2.1.2. pH değeri	17
2.2.1.3. % Asitlik değeri	17
2.2.1.4. % Tuz miktarı	18
2.2.2. Mikrobiyolojik analizler	18
2.2.2.1. Turşu ve zeytinden mikrobiyolojik analizler için örnek alınması	18
2.2.2.2.Total aerobik mezofilik bakteri sayımı	18
2.2.2.3. Koliform grubu bakteri ve <i>E.coli</i> sayımı	19
2.2.2.4. Maya-küf sayımı	19
2.2.2.5. Laktik asit bakteri sayımı	19
2.2.2.6. Antimikrobiyal aktiviteye sahip laktik asit bakterilerinin izolasyonu	20
2.2.2.7. Antimikrobiyal aktivite spektrumunun belirlenmesi	20
2.2.2.8. Tanımlama testleri	21
2.2.2.9. Farklı sıcaklıklarda gelişme	22
2.2.2.10. Farklı pH değerlerinde gelişme	22
2.2.2.11. Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme	23
2.2.2.12. Proteolitik ve amilolitik aktivite	23
2.2.2.13. Toplam asit üretme yeteneği	24
2.2.2.14. β -Galaktosidaz testi	24
2.2.2.15. Hidrofobisite	25
2.2.2.16. Hidrojen peroksit dayanıklılık	25
2.2.2.17. Dondurma ve liyofilizasyona dayanıklılık	26
2.2.2.18. Safra tuzuna dayanıklılık	27
2.2.2.19. Gastrik suya dayanıklılık	27
2.2.2.20. Alkole dayanıklılık	28
2.2.2.21. Antibiyotiğe dayanıklılık	28
2.2.2.22. Plazmid DNA izolasyonu	28

3. BULGULAR VE TARTIŞMA	32
3.1. Kimyasal Analiz Bulguları	32
3.2. Mikrobiyolojik Analiz Bulguları	35
3.3. Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Tanımlanması ve Karakterizasyonu	37
3.3.1. Antimikrobiyal aktiviteye sahip laktik asit bakteri izolasyonu ve tanımlanması	37
3.3.2. Antimikrobiyal aktivite spektrumu	39
3.3.3. Farklı sıcaklıklarda gelişme	42
3.3.4. Farklı pH değerlerinde gelişme	43
3.3.5. Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme	44
3.3.6. Proteolitik ve amilolitik aktivite	44
3.3.7. Toplam asit üretim yeteneği	46
3.3.8. β -Galaktosidaz testi	48
3.3.9. Hidrofobisite	49
3.3.10. Hidrojen peroksite dayanıklılık	51
3.3.11. Dondurma ve liyofilizasyona dayanıklılık	52
3.3.12. Safra tuzuna dayanıklılık	54
3.3.13. Gastrik suya dayanıklılık	56
3.3.14. Alkole dayanıklılık	58
3.3.15. Antibiyotiğe dayanıklılık	59
3.3.16. Plazmid DNA izolasyonu	65
4. SONUÇ	68
KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ	78

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1.1 Türkiye’de zeytin üretim alanları ve miktarları	2
Tablo 1.2 Türkiyenin zeytin ithalat-ihracat ve üretim-tüketim miktarları	3
Tablo 1.3 Fermente sebze ürünlerinde bulunan laktik asit bakterileri	5
Tablo 1.4 Lactobacillus cinsinin sınıf ve temel özellikleri	5
Tablo 1.5 Starter kültürlerde istenen genel özellikler	7
Tablo 1.6 Sebze fermentasyonunda kullanılacak laktik asit bakterilerinde önemli kriterler	8
Tablo 2.1 Araştırmada kullanılan şahit ve indikatör bakteri suşları	17
Tablo 3.1 Turşu örneklerinin kimyasal ve mikrobiyolojik analiz sonuçları	32
Tablo 3.2 Zeytin örneklerinin kimyasal ve mikrobiyolojik analiz sonuçları	34
Tablo 3.3 İzolatların temel özellikleri ve izolasyon kaynakları.....	38
Tablo 3.4 İzolatların antimikrobiyal aktivite spektrumu	40
Tablo 3.5 İzolatların farklı sıcaklık, pH ve tuz değerlerinde gelişme sonuçları	43
Tablo 3.6 İzolatların proteolitik ve amilolitik aktivite değerleri	45
Tablo 3.7 İzolatların 7 günlük toplam asit üretimi	47
Tablo 3.8 İzolatların β -Galaktosidaz aktivitesi	49
Tablo 3.9 İzolatların hidrofobisite değerleri	50
Tablo 3.10 İzolatların hidrojen peroksit dayanıklılıkları	51
Tablo 3.11 İzolatların dondurma ve liofilizasyona dayanıklılıkları	53
Tablo 3.12 İzolatların oxbile içeren MRS agar ve brotda gelişme sonuçları ...	54
Tablo 3.13 İzolatların farklı oranda oxbile içeren besiyerinde farklı sürelerde saptanmış gelişme sonuçları	55
Tablo 3.14 İzolatların gastrik suya dayanıklılık sonuçları	57
Tablo 3.15 İzolatların alkole dayanıklılık sonuçları	59
Tablo 3.16 İzolatların antibiyotiğe dayanıklılık sonuçları	60
Tablo 3.17 İzolatların plazmid DNA sayıları ve moleküler büyüklükleri	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 3.1 <i>L.plantarum</i> 22, 24, 24a ve 66'nın antimikrobiyal aktivitesi	41
Şekil 3.2 Tirosin standart kurvesi.....	45
Şekil 3.3 Laktik asit bakterilerinin plazmid DNA jel görüntüsü	66

1.GİRİŞ

Turşu; sebze ve meyvelerin belirli tuz konsantrasyonlu salamura veya kendi öz suları içinde laktik asit bakterileriyle fermantasyona uğratılmaları ile oluşan, laktik asitin ve ortamdaki tuzun koruyucu etkisi sonucu uzun süre dayanıklılık kazanan ürünlere denilmektedir (Aktan vd 1999). Ancak günümüzde turşu tarifi içerisinde, sulandırılmış asetik asit içinde bekletilerek ve gerektiğinde çeşni maddeleri, katkı maddeleri ilave edilerek hazırlanmış ürünler de girmektedir (Anon 1993).

Fermentasyon kurutma ve tuzlama ile birlikte gıdaların saklanması 6000 yıldan fazla süredir kullanılan bir yöntemdir (Holzapfel 1997, 2002). Sebze ve meyvelerin salamura içinde laktik asit fermentasyonuna uğratılması, meydana gelen laktik asidin ve ortamda bulunan tuzun koruyucu etkisiyle dayanıklı hale getirilmesi sonucu; bol buldukları mevsimde fermente edilen meyve sebzeler az veya hiç bulunmadıkları dönemlere kadar muhafaza edilebilmektedir (Özçelik ve Ulu 2002). Aynı zamanda hammaddenin renk, tat ve kokusu ile kimyasal yapısında önemli değişiklikler meydana gelerek tümüyle değişik görünüş ve tada sahip bir ürün ortaya çıkmaktadır (Şahin 1997). Bu özelliklerinden dolayı günümüzde fermente gıdalar ile birlikte ürün çeşitliliği de artmıştır.

Ülkemizde ve diğer ülkelerde sebzelerin laktik asit fermentasyonu ile dayanıklı yapılmaları giderek önem kazanmaktadır. Bu işlem artık muhafaza amacı ile değil, çeşni elde etmek için uygulanmaktadır. Günümüzde fermente sebze üreten işletmelerin sayısı oldukça artmıştır. Ülkemizde iklim koşullarının uygunluğu sebebiyle değişik sebzeler üretilmekte; bu da fermente sebze ürün çeşitlerini arttırmaktadır. Bunların başında hıyar, lahana, biber, patlıcan, domates ve fasulye gelmektedir (Ova 2002, Aktan vd 1999). Ayrıca, ülkemizde farklı yöre veya bölgelerde değişik meyvelerden yapılmış turşulara rastlamak da mümkün olmaktadır (Şahin 1997).

Zeytin insan beslenmesinde önemli bir diğer fermente üründür. Yüksek oranda yağ (%33) ve buna ek olarak lifsi maddeler, protein, K, Ca, P gibi mineraller, organik asitler, fenolik maddeler, pektik maddeler ve karoten içermektedir. Bunların büyük kısmı zeytin meyvesinin büyüme ve olgunlaşma evrelerinde hem nitel, hem de nicel olarak değişikliğe uğramaktadır (Aktan ve Kalkan 2000).

Tane zeytin üretiminin %26.5'i sofralık zeytin olarak değerlendirilirken geri kalan kısmı zeytinyağına işlenmektedir. Dünya sofralık zeytin üretiminin %38'i yeşil, %33.8'i salamura siyah zeytin, %14.7'si sele zeytini ve %13.4'ü de diğer şekillerde değerlendirilmektedir (Anon 2006).

Dünyada 37 ülkede ekonomik anlamda zeytin üretimi yapılmaktadır. 9.8 milyon hektar dünya zeytin üretim alanlarının %95'i Akdeniz bölgesinde yer almaktadır. Bunun dışında ABD, Güney Afrika Cumhuriyeti, Arjantin, Şili, Brezilya, Peru, Uruguay ve Avustralya gibi güney ülkelerinde de zeytin üretimi gerçekleştirilmektedir (Anon 2006). Türkiye'de yıllara göre zeytin üretim alanları ve miktarları Tablo 1.1'de verilmiştir.

Tablo 1.1 Türkiye'de zeytin üretim alanları ve miktarları (Anon 2006)

Zeytin	1999	2000	2001	2002	2003
Üretim Alanı (hektar)	595	600	600	620	625
Sofralık Üretim (ton)	240 000	490 000	235 000	450 000	350 000
Yağlık Üretim (ton)	360 000	1 310 000	365 000	1 350 000	500 000

Dünya sofralık zeytin ticareti, 1996/97-1999/00 döneminde ortalama 1.181.800 tondur. Aynı dönem itibariyle üretimin %42'si AB ülkelerinde gerçekleşmektedir. Sofralık zeytin üretiminde AB ülkelerinin payı zeytinyağından daha azdır. Dünya üretiminin %28'ini İspanya, %14'ünü Türkiye, %9'unu ABD ve %8'ini Fas sağlamaktadır. Türkiye dünya sofralık zeytin üretiminde 2. sırada, siyah zeytin üretiminde ise 1. sırada yer almaktadır. Dünya üretiminin %26'sı (305.000 ton) ihracata konu olmaktadır. Dünya ihracatında AB'nin payı %50'dir. İhracatın%37'sini İspanya, %21'ini Fas ve %10'unu Yunanistan yapmaktadır. Bunu Türkiye izlemektedir (%9). Ülkemizde üretilen sofralık zeytinin %16'sı ihraç edilirken kalan kısmı yurtiçinde tüketilmektedir. Yurtiçi üretimimizin %88'ini siyah, %7'sini yeşil ve %5'ini rengi dönük zeytin tipleri oluşturmaktadır (Anon 2006).

Türkiye sofralık zeytin üretiminde dünyada ilk sıralarda yer almasına rağmen ihracatta arzu edilen düzeyde değildir (Tablo 1.2). Bu noktada istenilen düzeye ulaşmak

için, dış pazar taleplerine uygun üretim yapabilecek, yüksek kapasiteli (en az 1000 ton) modern, mekanizasyona dayalı, verimli entegre tesislerin kurulması teşvik edilmelidir (Anon 2006). Yeterli olmayan teşviklere rağmen, turşu ve zeytin üretiminde yeni olan sanayimiz son yıllarda önemli bir atılım yapmıştır. Avrupa ve Amerika pazarlarında doğrudan tüketiciye satış yapan marketlere üretim yapmaktadır. Ülkemizin bu sektörde payını daha da arttırması ve diğer ülkelerle rekabeti kaliteli üretimle mümkündür. Kaliteli fermente ürünlerin üretiminde temel faktör starter kültürdür. Starter kültür; çığ materyale eklenmesi ile fermente gıda üretiminde fermantasyonun hızlandırılması ve yönlendirilmesinde görev alan mikroorganizmalara verilen genel isimdir. Turşu ve zeytin gibi fermente sebze ürünlerinin üretiminde laktik asit bakterilerinden bu amaçla yararlanılmaktadır.

Tablo 1.2 Türkiye'nin zeytin ithalat-ihracat ve üretim-tüketim miktarları (1000 ton) (Anon 2006)

Yıllar	Üretim	İthalat	Tüketim	İhracat
1980-84	116.0	0.0	112.1	6.8
1985-89	104.0	0.0	100.7	6.0
1990-94	128.0	0.0	104.4	15.4
1995-99	151.4	0.0	133.4	25.0
2000/01	224.0	0.0	125.0	32.0
2001/02	75.0	0.0	100.0	25.0

Turşu ve zeytin üretiminde starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterileri bu proseslerde en önemli görevi üstlenmektedir. Bunlar laktik asit ve organik asitlerin üretimi ile çığ materyalde hızlı asit birikimini sağlamaktadırlar. Bunun yanında; aroma maddeleri, bakteriyosin ve EPS'de üretmektedir. Üretilen bu maddelerle gıdaların raf ömrü, mikrobiyal güvenliği, tekstürü ve albenisi artmaktadır (Holzapfel 1997, Leroy ve de Vuyst 2004). Fermantasyonla elde edilen turşular, kalın bağırsak başta olmak üzere insanlarda sağlığı koruyucu etkiye sahip kabul edilmektedir (Şahin ve Akbaş 2001). Bu etkisini toksik maddeleri yok etmesinden almaktadır. Ayrıca; vitamin, esansiyel aminoasit ve proteinlerin biyosentezini sağlayarak beslenme açısından da önem taşımaktadır (Giraffa 2004).

Turşu ve zeytin üretiminde, bahsedilen önemlerine rağmen halen starter kültür kullanımı yaygın değildir ve sebze-meyveler uygun konsantrasyonda tuz içeren salamuraya konularak, yüzeylerinde bulunan doğal mikroflora ile fermente edilmektedir. Bu mikroflora içerisinde fermantasyonda gelişmesi istenilen mikroorganizma grubu daha önce de belirtildiği gibi, starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterileridir.

Mikrobiyoloji bilim dalının doğuşu ile birlikte tabiatta çok yaygın olduğu bilinen laktik asit bakterileri ile ilgili çalışmalar başlamıştır. İlk kez 19.yy sonlarında sütte fermantasyona ve koagülasyona yol açan bakteriler laktik asit bakterileri (LAB) olarak isimlendirilmiş ve sonraki yıllarda *Lactobacillaceae* familyası içerisinde sınıflandırılmışlardır (Çon ve Gökalp 2001). Laktik asit bakterilerinin farklı cinslere ayrımları geniş ölçüde morfoloji, glukoz fermentasyon şekli, farklı sıcaklıklarda büyüme, üretilen laktik asidin konfigürasyonu, yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişme yeteneği ile asit ve baza toleransına dayanılarak yapılmaktadır. Son yıllarda hücre duvarının yağ asit kompozisyonu ve içeriği gibi kemotaksonomik belirteçler ile nükleik asit probteknigi, polimeraz zincir reaksiyonu ve rRNA gen dizisinin belirlenmesi gibi yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır (Özyıldız 2001).

Morfolojik açıdan çok değişken özellik gösteren familya üyeleri fizyolojik açıdan oldukça benzerlik göstermektedirler. Tüm üyeler; Gram (+), katalaz (-), *Sporolactobacillus inulinus* hariç spor oluşturmeyen fakültatif anaerobik, *Pediococcus* cinsi hariç tek düzlemde bölünen ve bazı istisnalar hariç hareketsiz, çubuk veya kok şeklinde bakteriler olarak tanımlanmaktadır. Mutlak fermantatiftirler ve asıl fermantasyon ürünü olarak laktik asit üretmektedirler. Hem grubu içermeksizin oksijen varlığında gelişebilen nadir mikroorganizmalardır. Doğal habitatları süt ve süt mamülleri, işlenmemiş, taze veya çürümüş bitkiler, insan ve hayvanların bağırsak mukoza ve içerikleridir (Çon ve Gökalp 2002).

Fermente sebze ürünlerinde önemli olan laktik asit bakterileri Tablo 1.3'de; en yaygın rastlanılan *Lactobacillus* cinsinin temel özellikleri de Tablo 1.4'de verilmiştir. Bu cinsler içerisinde *Lactobacillus plantarum* asite en dayanıklı tür olması nedeniyle tüm fermantasyon boyunca baskındır ve çoğu kez fermantasyon bu bakterinin etkinliğiyle tamamlanmaktadır (Daeschel vd 1988).

Tablo 1.3 Fermente sebze ürünlerinde bulunan laktik asit bakterileri (Caplice ve Fitzgerald 1999)

Ürün	Ülke	Mikroorganizma	Hammadde
Sauerkraut	Uluslararası	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus sake</i>	Lahana
Turşu	Uluslararası	<i>Pediococcus cerevisiae</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	Salatalık
Zeytin	Akdeniz Ülkeleri	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	Zeytin

Tablo 1.4 *Lactobacillus* cinsinin sınıf ve temel özellikleri (Klein vd 1998)

Gruplar	Fermantasyon Yolu	Gelişme Sıcaklığı
Alt Cinsler		
Thermobacterium	Homofermentatif	15°C(-) 20°C(-) 45°C(+)
Streptobacterium	Homofermentatif	15°C(+) 45°C(-)
Betabacterium	Heterofermentatif	Genel kural yok
Moleküler Temelli Alt Gruplar		
A Grubu	Obligat homofermantatif	Belirtilmemiş
B Grubu	Fakültatif heterofermentatif	Belirtilmemiş
C Grubu	Obligat heterofermentatif	Belirtilmemiş

Turşu üretiminde, fermantasyonun başlangıç aşamasında taze üründe bulunan fakültatif veya mutlak anaerobik mikroorganizmalar gelişirler. Çeşitli Gram (+) ve Gram (-) bakteriler bu grubun içinde yer alır. Fermantasyonun ilerlemesi ile birlikte ortama laktik asit bakterileri hakim olarak pH'nın düşmesini sağlar ve Gram (-) ve sporlu bakterilerin gelişimini engellerler (Giraffa 2004). Bu mikroorganizmaların çoğalmaları ortamdaki şekerin tamamen kullanılması veya oluşan asitle inhibisyonları meydana gelinceye kadar devam eder. Takip eden dönemde düşük pH nedeni ile ancak bazı fermentatif mayalar gelişebilirler. Ortamda karbon kaynağının tükenmesi ve oluşan anaerobik şartlar nedeni ile ambalajlı üründe herhangi bir mikrobiyal gelişme gözlenmez. Ancak salamura yüzeyi havayla temas ederse oksidatif mayalar, küfler ve

bozulmaya neden olan bazı bakteri türleri gelişebilmektedir (Holzapfel 1997, Aktan vd 1999, Giraffa 2004).

Zeytin üretiminde de fermantasyonun başlangıcında floraya *Enterobacteriaceae* familyasına ait Gram (-) bakteriler hakimdir (Panagou ve Katsaboxakis 2006). Fermantasyonun ilk saatlerinde *L.mesenteroides* hızlı bir şekilde gelişir (Aktan ve Kalkan 2000, Brenes 2004). Takiben Gram (-) bakteriler azalır, maya ve laktik asit bakterilerinin sayısında artış olur. Ortama homofermantatiflerden *L.plantarum*, heterofermantatiflerden ise *L.brevis* hakim olur (Aktan ve Kalkan 2000, Panagou ve Katsaboxakis 2006). Son aşamada ise ortama *L.plantarum* hakim hale gelir (Panagou ve Katsaboxakis 2006).

Fermantasyonun başlarında laktik asit bakterilerinin hızla çoğalıp bozulmaya sebep olan mikroorganizmalara baskın olmasını sağlamak için başlangıç salamurasının asitliği organik asit ilavesi ile düşürülüp, saf laktobasil kültürlerinin eklenmesi önerilmektedir (Özyıldız 2001, Panagou ve Katsaboxakis 2006). Özellikle üretim esnasında istenmeyen mikroorganizma, maya ve küflerin gelişmesi, istenen tat ve aroma bileşenleri oluşturan mikroorganizmaların gelişmemesi durumunda, kaynağından izole edilmiş mikroorganizmalar starter kültür olarak kullanılmalıdır (Giraffa 2004). İlk saf starter kültür 1890 yılında eş zamanlı olarak Danimarka ve Almanya’da *Lactococcus lactis* türünden üretilerek, peynir ve ekşi süt üretim amaçlı fermantasyonda kullanılmıştır. Bugün gıda endüstrisinde bazı alanlarda yaygın kullanım alanı bulan starter kültürlerde aranan genel özellikler Tablo 1.5’de verilmiştir.

Fermente gıdalarda starter kültür olarak kullanılacak mikroorganizma türlerinin seçiminde; spontan fermantasyondan izole edilmiş olmasına, çiğ materyale ve prosese kolay uyum sağlamasına, patojenik ve toksijenik olmamasına, gıdanın duyu kalitesini ve raf ömrünü geliştirmesine, gıdaların hazırlama basamaklarındaki zaman ve enerji kaybını en aza indirmesine, gıda kaynaklı patojenlerin gelişmesini inhibe etmesine, probiyotik özelliğe sahip olmasına ve gıdada uzun süre canlı kalarak beklenen faydaları uzun süre gösterebilmesine dikkat edilmektedir. Bakterilerin probiyotik özelliğinin belirlenmesinde aranan önemli kriterler; adhezyon, mide asitliğine dayanıklılık, safra tuzuna dayanıklılık ve liyofilizasyona dayanıklılık gibi özelliklerdir. Ayrıca, seçilen starter kültür bakteriyofajlara dayanıklılığı, protoolitik aktivitesi, sitrat fermantasyonu,

polisakkarit üretimi gibi özellikleri ile muhafaza yöntemlerine dayanıklılığı da dikkate alınmalıdır. Özel olarak turşu ve zeytin fermantasyonunda kullanılacak starter kültürlerde aranılan özellikler ise Tablo 1.6’da verilmiştir.

Tablo 1.5 Starter kültürlerde istenen genel özellikler (Buckenhüskes 1993)

GÜVENLİK	
1	Starter kültür olarak kullanılacak mikroorganizmalar herhangi patojenik veya toksik bir aktivite göstermemelidir.
2	Hazırlanan bu kültürler hijyenik açıdan güvenilir olmalıdır.
TEKNOLOJİK ETKİLERİ	
1	Starter mikroorganizmalar fermantasyon boyunca diğer mikrofloraya karşı baskın olmalıdır.
2	İstenen metabolik aktiviteyi göstermelidir.
3	Teknolojik özellikleri açısından infekte olmamalıdır.
EKONOMİK YÖNÜ	
1	Çoğalma hızı uygun düzeyde olmalıdır.
2	Starter kültürler dondurma ve liyofilizasyonla saklamada yüksek oranda canlı kalabilmelidirler.
3	Uzun aylar sürebilecek depolama esnasında canlılıklarını koruyabilmelidirler.
4	Elde etmesi kolay ve masrafsız olmalıdır.

Belirtilen niteliklere sahip bir starter kültür kullanımı ile standart ve kaliteli gıda üretimi sağlanması yanında, antinutrisyonel bileşenlerin parçalanması, protein sindirimini ve mikro besleyici komponentlerin yararlılığının artırılması, esansiyel aminoasitlerin, proteinlerin ve vitaminlerin biyosentezi ile gıdanın beslenme değerinin de artırılması sağlanmaktadır. Ayrıca yine, toksik bileşenlerin detoksifikasyonu, mikotoksinlerin degradasyonu sağlanmakta (Holzapfel 1997, 2002) ve antimikrobiyel aktivite ile üründen kaynaklanabilecek sağlık riskleri de azaltılmaktadır. Yüksek oranda ürettikleri antimikrobiyal maddelerle; gıdaların aromasını bozarak istenmeyen tat oluşumuna sebep olan florayı inhibe ederek gıdaların raf ömrünü de uzatmaktadır (Ross vd 2002).

Tablo 1.6 Sebze fermentasyonunda kullanılacak laktik asit bakterilerinde önemli kriterler* (Buckenhüskes 1993)

Önemli Starter Kriterleri	Sauerkraut	Hıyar	Zeytin
Teknolojik Açıdan			
Hızlı ve predominant gelişimi	++	++	++
Homofermantatif metabolizma	-	++	++
Tuza tolerans	+	++	++
Asit üretimi ve toleransı	++	++	++
Düşük sıcaklıkta gelişim	++	++	++
Fenolik glikozidazlara tolerans	0	0	++
Dekstan oluşturma	-	-	-
Pektinolitik aktivite	-	-	-
Bakteriyosin oluşturma	+	+	+
Bakteriyofaj direnci	0	+	+
Duyusal Açıdan			
Heterofermantatif	++	-	-
Aroma bileşenleri üretmesi	++	++	+
Besinsel Fayda Açısından			
Nitrati nitrite reduksiyonu	+	0	0
L (+) laktat üretimi	+	+	0
Biyojen amin üretimi	-	-	-

*: ++, Önemli; +, Faydalı; 0, İlgili değil; -, Zararlı

Karovicova vd (1999) *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus delbrueckii*'nin sauerkraut fermantasyonunda en düşük nitrat konsantrasyonunu sağladığını bildirmişlerdir. Holzapfel (2002) tarafından belirtildiğine göre, bazı LAB ve maya suşlarının da, fitik asit ve fenolik bileşenler gibi beslenme değerini düşürücü maddelerin oluşmasını önlediği, böylece beslenme değerini yükseltici etkide bulunduğu, ayrıca protein sindirilebilirliği ve mikro beslenme bileşenlerinin değerlendirilebilirliğini artırdığı, esansiyel aminoasit ve vitaminlerin biyosentezini gerçekleştirerek ürünleri daha yararlı hale getirdiği belirtilmektedir.

Leroy ve de Vuyst (2004) fermente gıdaların üretimi için son yıllarda piyasaya sunulan laktik asit bakterilerinin, organik asitler ve antimikrobiyel bileşikler üreterek gıda güvenliğini artırdığını, şeker polimerleri, tatlandırıcı aromatik bileşenler, vitaminler ve faydalı enzimler üreterek probiyotik özellikler gösterdiğini bildirmektedir. Tolonen vd (2004) tarafından da starter kültür kullanımı ile fermente gıda üretiminde kısa zamanda, istenilen kalitede ve standart ürün elde etmenin mümkün olduğu belirtilmiştir.

Turşularda starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin yukarıda sayılan faydalarına ilaveten; iç boşalması, yumuşaklık ve renk kaybı gibi bozulmaların önüne geçerek ekonomik kayıpları da düşürdükleri belirtilmektedir. Turşu ve zeytin üretiminde starter kültür olarak kullanılan önemli mikroorganizmalar, *L.plantarum*, *Leu.mesentroides ssp. mesentroides* ve *Pediococcus cerevisiae* olarak belirtilmektedir.

***Lactobacillus plantarum*:** 3-8 µm uzunlukta, tekli, ikili veya kısa zincir şeklinde bulunmaktadır. Anaerobik olup, yüzeyde gelişen kolonileri 3 mm çapta, yuvarlak, mat, kompakt, beyaz, seyrek olarak açık veya koyu sarıdır. Gelişme ortamında yoğun bulanıklık oluşturulur. Glukonatlı besiyerinde CO₂ oluşturarak gelişir. Optimum gelişme sıcaklığı 30-35°C'dir (Kılıç 2001, Carr vd 2002). Bu mikroorganizma starter kültür özelliğine ilaveten; probiyotik, zararlı mikroorganizmaların gelişimini engelleme ve bakteriyosinlerle bozulma yapan mikroorganizmaları inhibe etme özelliklerine sahiptir (Quan Li vd 2005). Tüketici sağlığı açısından güvenilir mikroorganizmalardandır. Son zamanlarda yapılan incelemeler *L.plantarum* suşlarının intestinal bariyeri geçtiklerinde dahi herhangi bir enfeksiyon göstermediğini ortaya çıkarmıştır (De Vries vd 2006).

***Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides*:** İkili ve genellikle kısa zincir oluşturur. Sakkarozdan dekstran oluşturur. Heterofermantatif olup çok az asit oluşturur. Sitrik asidi fermente eder. Optimum gelişme sıcaklığı 20-30°C dir.

***Pediococcus cerevisiae*:** Kok şeklinde olan mikroorganizma agarda yüzeyde gelişme göstermez. Anaerob koşulları tercih ederler. Gelişim için CO₂'ye ihtiyaç duyarlar. Optimum gelişme sıcaklığı 25°C dir.

Çeşitli gıdalarda doğal olarak bulunan veya starter kültür olarak kullanılan bir çok laktik asit bakterisinin, gıdayı bozucu mikroorganizmalar ve/veya gıda kaynaklı patojenleri ihtiva eden bir grup mikroorganizmaya karşı gösterdiği antagonistik aktivite; organik asit, H₂O₂, asetaldehit, CO₂, diasetil, ethanol ile bakteriyosin ve benzeri ürünler oluşturmasıyla meydana gelmektedir (Caplice ve Fitzgerald 1999, Çon ve Gökalp 2002).

Laktik asit bakterileri bilindiği gibi glukozu parçalarken yan ürün oluşturmalarına göre homofermantatif ve heterofermantatif olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Carr vd 2002, Leroy ve de Vuyst 2004). Bu fermentasyonlar ile oluşturulan laktik, asetik ve propiyonik asitlerin antimikrobiyal etkisi olduğu bilinmektedir. Bu antimikrobiyal etki istenmeyen bakterinin sitoplazmik membranının içinde organik asitlerin aktivite göstererek, aktif transportu ve membran potansiyelini inhibe etmesi sonucu meydana gelmektedir (Caplice ve Fitzgerald 1999). Laktik asit pH 5'te maya ve küflere karşı etkisiz olmakla birlikte spor oluşturan bakterilere karşı iyi bir inhibitördür. Asetik asit de, koliformlar ve salmonellalar dahil çoğu bakteriye karşı antimikrobiyal etki göstermektedir (Çon ve Gökalp 2001).

Laktik asit bakterileri oksijen varlığında flavoprotein oksidaz vasıtasıyla farklı bakteriler üzerinde toksik etkisi olan H₂O₂ üretebilirler. Bakteri membranlarını bozmada etkin rol oynayan bu bileşiğe Gram negatif bakteriler en duyarlı bakterilerdir. Gerçekte kromozomal replikasyonu engelleyen nükleotidik bazları açığa çıkararak DNA zincirinde kırılmalara neden olur (Adams ve Nicolaides 1997, Kılıç 2001). İnhibisyon aynı zamanda membran lipidleri ve hücre proteinleri üzerine güçlü bir oksidasyon etkisi ile de meydana gelmektedir (Caplice ve Fitzgerald 1999). Yapılan bir çalışmada izole edilen *Lactobacillus* ve *Pediococcus* cinslerinin belirli türlerinin biyomoleküllerin oksidasyonunu başlatmaya yetecek kadar invitro H₂O₂ ürettiği tespit edilmiştir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ve besiyerinde biriken H₂O₂'in *S.aureus* ve *Pseudomonas spp.* gibi zararlı mikroorganizmalara karşı inhibitör etki için kullanıldığı bildirilmektedir (Adams ve Nicolaides 1997).

CO₂, heterofermantatif laktik asit bakterilerinin karbonhidratları fermente etmesi sonucu oluşur. Gıda kaynaklı aerobik mikroorganizmalara (genellikle oksidatif Gram negatif bakteriler) karşı toksik etkilidir. Direkt hücre membranlarına etki gösterir; internal ve eksternal pH'yı düşürür (Caplice ve Fitzgerald 1999, Adams ve Nicolaides 1997). CO₂'nin küfler üzerine etkisinin ise karboksilasyon/dekarboksilasyon veya TCA enzimlerinin inhibisyonuna bağlı olduğu belirtilmektedir (Çon ve Gökalp 2001).

Streptococcus, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* ve *Pediococcus* cinslerinin bazı tür ve suşları tarafından üretilen diasetil, hem gıda kaynaklı patojenler, hem de gıdayı bozucu mikroorganizmalar üzerine inhibitör etki göstermektedir. Diasetilin etkisi Gram

negatifler için lethal, Gram pozitifler için ise genellikle gelişmeyi durdurucu özelliğindedir (Çon ve Gökalp 2001). Diasetilin düşük konsantrasyonunun bile sıcaklığın düşük olması şartıyla etkili olabildiği belirtilmektedir (Adams ve Nicolaidis 1997).

Heterofermantatif laktik asit bakterileri tarafından üretilen alkol (Carr vd 2002), mikroorganizmalar üzerine bakterisit etkilidir. Bu etki konsantrasyonu, muamele süresi ve molekül ağırlığı ile ilişkilidir (Çon ve Gökalp 2001). Etil alkol, hücre proteinlerini denatüre edici etkisi yanında stoplazma zarındaki lipid yapıyı bozup zarın işlevine de etki edebilmektedir (Çon ve Gökalp 2002).

Mikroorganizmalar bakteriyosin denilen antimikrobiyal peptid ve proteinler üretmektedirler (Ross vd 2002). Antimikrobiyal etkiden sorumlu diğer bileşen bakteriyosinler ise üretici hücreler üzerinde öldürücü etki yapmayan, sınırlı sayıdaki bakterilere etkili olan protein tabiatındaki antagonistik maddelerdir. (Caplice ve Fitzgerald 1999). Bakteriyosinler genel olarak Gram pozitif bakterilere etkilidir. Az sayıda bakteriyosin Gram negatif bakterilere karşı etki göstermektedir. (Todorov ve Dicks 2005). Laktik asit bakterilerinin tüm cinslerinde bakteriyosin üretimi belirlenmiştir. Özellikle *Streptococcus* ve *Lactobacillus* cinslerinde bu metabolitin üretimi yaygındır (Çon ve Gökalp 2001).

Bakteriyosinler, etki şekli membraner seviyede K^+ iyonunun ve ATP'nin kaybına meydan veren membran potansiyelini değiştirerek sürdürür ve sonuçta hücreler intraselüler pH'larını koruyamazlar. Hedef hücreler logaritmik fazda durgun fazdakinden daha duyarlıdır (Kılıç 2001).

Yapılan bir araştırmada bozulmuş siyah zeytinlerden *L.plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* ve *Enterococcus faecium* türlerinin bakteriyosin üreten suşları izole edilmiştir. Bu bakteriyosin üreten suşların hepsinin Gram pozitif bakterilerden *Enterococcus faecalis*, *L.casei*, *Streptococcus pneumoniae* ile Gram negatiflerden *E.coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın gelişimini inhibe ettikleri gözlemlenmiştir. Bakteriyosinlerin etkisi bakteri türü ile yakından ilişkilidir. Laktik asit bakterilerinin ürettiği çok az bakteriyosin Gram negatif bakterilere etki göstermektedir. Bu bakteriyosinlerden bazıları da yukarıda bahsedilen üç suşun ürettiği bakteriyosinlerdir (Todorov ve Dicks 2005).

Endüstride laktik asit bakterileri gıda üretimi ve muhafaza kalitesini artırma yanında, probiyotik olarak da kullanılmaya başlanmıştır. Probiyotikler, intestinal sistemde doğal olarak bulunan, mikrobiyal dengeyi sağlayan ve insan sağlığına çeşitli yararları olan canlı gıda katkılarıdır (Mattila-Sandholm vd 2002, Can ve Özçelik 2003). Probiyotik olarak kullanılacak suş ve türlerin sahip olması gereken özellikler şunlardır:

- 1- İnsan orijinli olmalı
- 2- Gıda ve klinik kullanımlarda güvenli olmalı yani patojen olmamalı, toksin üretmemeli ve klinik çalışmalarda sağlık üzerinde olumlu etkileri ortaya konmuş olmalı
- 3- Antimikrobiyal bileşikler oluşturabilmeli ve patojenlere karşı antagonistik aktiviteye sahip olmalı
- 4- Canlı olarak bağırsak sistemine geçebilmeli, asit ve safra tuzlarına karşı dayanıklı olmalı
- 5- Bağırsak epitel hücrelerine tutunabilmeli, bağırsak sisteminde normal flora ile rekabet edebilmeli
- 6- Bağırsak florasını stabilize edebilmelidir (Yıldırım vd 2003).

Probiyotik ürünlerde kullanılan *Lactobacillus* cinsi üyeleri: *L.acidophilus*, *L.casei* subs. *rhamnosus*, *L.johnsonii*, *L.fermentum*, *L.plantarum*, *L.brevis*, *L.helveticus* ve *L.delbrueckii* türleridir (Collins vd 1998). Genelde fermente sebzelerde bulunan *Leuconostoc mesentroides* de probiotik ürünlerde kullanılabilir.

De Vries vd (2006) *L.plantarum*'un HCl (pH 2.0) ve safra tuzuna yüksek tolerans gösterdiğini belirlemiş ve Johansson vd'nin yaptıkları çalışmaya göre de *L.salivarius*, *L.reuteri*, *L.gasseri*, *L.acidophilus*, *L.casei* ve *L.agilis*'e göre daha iyi kolonizasyon oluşturduğunu belirtmiştir.

Probiyotik mikroorganizmalar; vitamin üretimi, minerallerin ve iz elementlerin yararlılığını artırma, β -galaktosidaz gibi önemli sindirim öğelerinin üretimi, antimutajenik ve antikansorenejik etki ve bağışıklılık sistemini güçlendirme (Collins vd 1998, Can ve Özçelik 2003), bağışıklık mekanizmasını olumlu yönde etkileme, normal

intestinal mikroflorayı koruma (Collins vd 1998, Holzapfel ve Schillinger 2002, Aytuna vd 2003) gibi özellikleri ile sağlık üzerine olumlu etkilere sahiptirler.

Probiyotik ürünlerden beklenen faydanın sağlanabilmesi için, ürünün bileşiminde bulunan probiyotik mikroorganizmaların raf ömrü boyunca canlılığını ve aktivitesini koruyabilmesi gerekmektedir (Aytuna vd 2003).

Turşu ve zeytin fermentasyonunda son basamaklarda baskın florayı oluşturan *L.plantarum* türünün, ürettiği plantaricin adlı antimikrobiyal maddeyle patojenlere karşı etkili olduğu bilinmektedir. Yine *L.plantarum* 299 V suşu ise marketlerde probiyotik olarak satılmaktadır. Bu suşun gastrointestinal hücrelere etkin şekilde yapıştığı ortaya konmuştur. Gastrointestinal sisteme yapışma kolonizasyon açısından çok önemlidir (Cebeci ve Gürakan 2003).

Laktik asit bakterilerinde teknolojik özelliklerin sağlanmasında rol alan bazı metabolitlerin üretimi plazmid DNA üzerinde yer alan gen ve gen sistemlerinde kodlanmıştır. Plazmidler hücrenin genetik bilgisini taşıyan bakteriyel kromozomdan bağımsız olarak çoğalan genetik yapılardır. Bakteri hücresinde otonom şekilde çoğalan ekstra kromozomal genetik elemanlardır diye de tanımlanmaktadır (Couturier vd 1988). Laktik asit bakteri plazmid DNA'ların uzunlukları birkaç ile yüz kb arasındadır. Bünyesinde endüstriyel özelliklere ait genleri IS elementleri, hücre bölünmesi ve plazmid çoğalmasını başlatıcı genleri içermektedir.

Laktik asit bakteri plazmidleri endüstriyel açıdan oldukça büyük önem taşımaktadır. Çünkü bu yapılar farklı şekerleri fermente ederek organik asit üretme yeteneği, proteolitik aktivite, antimikrobiyal maddelerin sentezlenmesi, faj enfeksiyonlarına dayanıklılık, antibiyotiklere ve ağır metal tuzlarına dayanıklılık, sitrat metabolizması ve ekzopolisakkarit üretimi gibi çok önemli olayları gerçekleştiren enzimleri kodlayan genleri içermektedir. Ayrıca bu yapılar aktarım işlemlerinde kullanılabilmesi dolayısıyla da büyük öneme sahiptir (McKay 1983, Pouwels ve Leer 1993, Venema 1993, Kılıç 2001, Beyatlı 1994).

Laktik asit bakterilerinin alt grubundan olan laktobasiller 0-6 arasında plazmid DNA içermektedir. Bu plazmidlerin boyutları 2-100 kb arasında değişmektedir. Laktokoklar da 2-82 kb büyüklüğünde, 2-14 arası sayıda plazmid içermektedir. Laktik asit

bakterilerin diğler üyelerinden leuconostoclar 1-7 arasında, pediokoklar ise 3-6 arasında plazmid içermektedir (Mc Kay 1983, Pouwels ve Leer 1993, Kılıç 2001).

Sano vd (1997), *L. acidophilus* TK8012 suşunun 6 adet plazmide sahip olduğunu belirlemiş ve bunları karakterize etmişlerdir. Mumcu (1997) ise araştırmasında *L. acidophilus* ZL1 suşunun 13.42, 7.02 ve 3.58 kb ağırlığında üç plazmid içerdiğini saptamıştır. Et ortamından izole edilmiş *L. plantarum*'un 7 izolatında ortak 4 plazmidin bulunduğu ve plazmid içeriklerinin 4-8 arasında değıştiğı belirlenmiştir (Von Husby ve Nes 1986). *L. plantarum* 1959 suşunda yapılan çalışmalarda 6 plazmid, Nes (1984) tarafından tespit edilmiştir. Charlotte ve Warner (1985), 6 *L. plantarum* izolatının plazmid DNA profillerini belirlemiş, suşların 1 ile 6 arasında plazmid içerdiğini tespit etmiştir. Bu izolatların içersinde de en fazla plazmid içeren 352 nolu izolatın plazmid boyutlarını 15, 10, 8.5, 7, 4 ve 2.8 kb olarak hesaplamıştır.

Ülkemizde ve tüm dünyada sevilerek tüketilen turşu ve zeytinin kalitesinin yükseltilmesi, yüksek kapasiteli üretimlerde spontan floradan kaynaklanabilecek fermentasyon risklerinden kurtulmak için, kontrollü fermentasyon şartları uygulamasına ve starter kültür kullanımına gerek duyulmaktadır. Bunun için öncelikle turşu ve zeytin üretimine özgü starter kültür geliştirmek şarttır. Bu doğrultuda ülkemizde bugüne kadar yapılmış ve uygulamaya aktarılmış çalışmalar bulunmamaktadır.

Bu durum dikkate alınarak, geleneksel olarak üretilen turşu ve zeytinlerden izole edilen laktik asit bakterilerinin bakteriyosin ve benzeri metabolitlerden ileri gelen antagonistik aktivitesinin araştırılması ve antimikrobiyal aktiviteye sahip suşların ürün kalitesi için önem arz eden çeşitli metabolitleri üretim yetenekleri ile probiyotik özelliklerinin belirlenmesi planlanmıştır. Böylece standart, kaliteli turşu ve zeytin üretim yöntemi için antimikrobiyal aktiviteye sahip ve aynı zamanda probiyotik özellikte laktik starter kültür belirlenmiş olacaktır. Bu yaklaşımla planlanıp yürütülen bu araştırmanın amacı;

- 1) Denizli ve Aydın yöresinden toplanan turşu ve zeytinlerin mikrobiyolojik ve kimyasal özelliklerinin tespit edilmesi,
- 2) Turşu ve zeytinin doğal laktik asit florası içerisinde bulunan ve antimikrobiyal karakterli metabolit üretenlerin izolasyon ve tanımlamalarının yapılması,

- 3) Antimikrobiyal aktiviteye sahip olanların, çeşitli gıda zararlısı ve/veya gıda kaynaklı patojen bakterilere karşı inhibisyon kabiliyetlerinin belirlenmesi,
- 4) Antibakteriyel aktiviteye sahip olanların asit üretim yeteneği, proteolitik aktivite, amilolitik aktivite, probiyotik özelliklerinin ve plazmid DNA profillerinin belirlenmesidir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Turşu ve zeytin örnekleri

Araştırmada; Aydın ve Denizli illerinde bulunan işletme ve evlerden temin edilen 70 adet turşu ile 16 adet zeytin örneği materyal olarak kullanılmıştır.

2.1.2. Araştırmada kullanılan besiyerleri ve bakteri suşları

Turşu ve zeytinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, tanımlanması, plazmid DNA izolasyonu ve muhafazasında, de Man, Rogosa, Sharpe (MRS, Merck 1.10661) besiyerinden yararlanılmıştır (de Man vd 1960, Sanchez vd 2000, Santos vd 2003). İzole edilen suşların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde %0.2 glukoz içeren MRS agar (MRS-0.2), %0.7 agar içeren MRS yarı katı agar, Trypton Soy Broth (Oxoid CM129)+Yeast Ekstrakt (Merck 1.03753) (TSBYE) yarı katı agar kullanılmıştır (Schillinger ve Lücke 1989, Çon 1995, Şimşek vd 2006).

Araştırmada suşların proteolitik aktivitesinin belirlenmesinde %10'luk Skim Milk kullanılmıştır (Şimşek 2003). Kullanılan tüm laktik asit bakterileri MRS Broth besiyerinde geliştirilmiş ve %15 gliserin içeren Skim Milk'te (Oxoid L31) -20°C de dondurarak (Sanchez vd 2000, Yüksekdağ vd 2004), MRS agarda +4°C'de batırma kültür olarak ve liyofilize edilerek muhafaza edilmiştir (Lewus vd 1991, Çon 1995, Yüksekdağ vd 2004).

Antimikrobiyal aktivitenin ve etki spektrumlarının belirlenmesinde Çizelge 2.1'de verilen şahit ve indikatör organizmalar kullanılmıştır. Araştırmada *L.sake* Lb706 suşu bakteriyosin üretici, *L.sake* Lb706-A bakteriyosin üretici olmayan organizma, *L.sake* Lb790, *L.monocytogenes* Li1, *L.monocytogenes* Li6, *E.coli*, *P.vulgaris*, *Y.lipolitica*, *A.hydrophila* ve *E.feacium* suşları ise indikatör organizmalar olarak kullanılmıştır.

Tablo 2.1 Araştırmada kullanılan şahit ve indikatör bakteri suşları

Bakteri Şuşu	Kullanım Amacı	Temin Edildiği Kurum
<i>Lactobacillus sake</i> Lb706	Şahit	Federal Et Araştırma Kurumu, Kulmbach
<i>Lactobacillus sake</i> Lb706-A	Şahit	Federal Et Araştırma Kurumu Kulmbach
<i>Lactobacillus sake</i> Lb790	İndikatör	Federal Et Araştırma Kurumu Kulmbach
<i>Listeria monocytogenes</i> Li6	İndikatör	Federal Et Araştırma Kurumu, Kulmbach
<i>E. faecium</i> NRRL B-2355 (ATCC 407)	İndikatör	Ege Üniv. Ziraat Fak. Süt Tek. Böl.
<i>Escherichia coli</i> ATCC39403	İndikatör	Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Araştırma Lab.
<i>P. vulgaris</i> RSSK 96025	İndikatör	PAÜ Müh. Fak. Gıda Müh. Böl.
<i>Yersinia lipolitica</i> NCAIM Y.00591	İndikatör	Ege Üniv. Ziraat Fak. Süt Tek. Böl.
<i>A. hydrophila</i> NRRL B-426	İndikatör	Ege Üniv. Ziraat Fak. Süt Tek. Böl.

2.2. Metot

2.2.1. Kimyasal analizler

2.2.1.1. Turşu ve zeytinden kimyasal analizler için örnek alınması

İşletme ve evlerden steril kavanozlarda alınmış turşu ve zeytin örnekleri aseptik koşullara dikkat edilerek, laboratuvarında açılmış ve paralelli olarak önce mikrobiyolojik daha sonra ise kimyasal analizler için örnek alınmıştır. Örnek alımından önce kavanozlar 20 kez ters-düz edilerek homojenizasyon sağlanmıştır.

2.2.1.2. pH değeri

Bu analiz için WTW marka pH-metre kullanılmıştır. Öncelikle pH-metre pH 4.0 ve 7.0 tamponunda standardize edilmiştir. Ölçüm için pH-metre'nin elektrodu fermente turşu ve zeytin örneklerinin salamurası içerisine daldırılmış ve oda sıcaklığında iki farklı okuma yapılmıştır (Tassou vd 2002, Şimşek 2003).

2.2.1.3. % Asitlik değeri

Örneklerin asitlik dereceleri Aktan ve Kalkan (2000) ve Cemeroğlu'na (1992) göre belirlenmiştir. Fermente turşu ve zeytin salamurasından 10 ml alınmış, daha sonra 3 damla %3'lük fenolfitalein damlatılarak 0.1 N NaOH ile pembe renk oluşuncaya kadar titre edilmiştir. Harcanan NaOH miktarı aşağıda verilen formülle hesaplanarak sonuç % asit olarak (asetik asit üzerinden) ifade edilmiştir. Analiz paralelli olarak yapılmıştır.

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

V: Harcanan 0.1 N NaOH miktarı, ml

F: Titrasyonda kullanılan bazın normalitesi

E: 1 ml 0.1 N NaOH'ın eşdeğeri asit miktarı, g (Asetik asit için 0.006)

m: Titre edilen örneğin gerçek miktarı, ml veya g (10 ml)

2.2.1.4. % Tuz miktarı

Örneklerin tuz tayinleri Aktan ve Kalkan'a (2000) göre yapılmıştır. Öncelikle örneklerden 10 ml salamura alınmış ve metil oranj indikatörü eklenerek 5 N NaOH ile renk portakaldan sarıya dönene kadar nötrleştirmek amacıyla titre edilmiştir. Tuz miktarının belirlenmesi için nötürleşmiş örnek 0.1 N AgNO₃ ile çözelti kiremit rengine dönünceye kadar titre edilmiştir. Örneklerin % tuz oranları titrasyonda harcanan AgNO₃ miktarından hareketle aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. Analiz paralelli olarak yapılmıştır.

$$\% \text{ Tuz} = \frac{[(0.00585 \times V)/m] \times 100}{m}$$

V : Harcanan 0.1N AgNO₃ miktarı

M : Örnek miktarı

2.2.2. Mikrobiyolojik analizler

2.2.2.1. Turşu ve zeytinden mikrobiyolojik analizler için örnek alınması

İşletme ve evlerden steril kavanozlarda alınmış turşu ve zeytin örnekleri aseptik koşullara dikkat edilerek, laboratuvarında açılmış ve paralelli olarak önce mikrobiyolojik daha sonra ise kimyasal analizler için örnek alınmıştır. Örnek alımından önce kavanozlar 20 kez ters-düz edilerek homojenizasyon sağlanmıştır. Mikrobiyolojik analiz için örneklerin steril fizyolojik su kullanılarak seyreltileri hazırlanmıştır.

2.2.2.2. Turşu ve zeytinde total aerobik mezofilik bakteri sayımı

Toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayımı için uygun dilüsyonlardan (10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ ve 10⁻⁷) Plate Count Agara (PCA, Merck 1.055463) 2'şer paralelli olarak dökme ekim yapılmış ve plaklar 30°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra sayım

gerçekleştirilmiştir (Lönner vd 1986, Corbo vd 2001, Tassou vd 2002, Şimşek ve Çon 2006).

2.2.2.3. Turşu ve zeytinde koliform grubu bakteri ve *E.coli* sayımı

Koliform grubu bakteri sayımı için uygun dilüsyonlardan (10^{-1} ve 10^{-2}) 2'şer paralelli olarak Violet Red Bile Mug Agar'a (VRB-Mug, Merck 1.01406) yayma ekim yapılmış ve plaklar 37°C 'de 24 saat inkübe edildikten sonra 0.5mm'den büyük çapa sahip kırmızı renkli koloniler koliform grup mikroorganizma olarak sayılmıştır. *E.coli* sayımı için koliform belirlenen petri kapları, UV ışık altında denenmiş ve parlak mavi renk veren koloniler tanımlama testlerine tabi tutulmuştur (Lönner vd 1986, Corbo vd 2001, Tassou vd 2002, Şimşek ve Çon 2006).

2.2.2.4. Turşu ve zeytinde maya-küf sayımı

Uygun dilüsyonlardan (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ve 10^{-7}) petri plaklarına 2'şer paralelli olarak 1'er ml aktarılmış, üzerine $45-48^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulmuş ve %10'luk tartarik asitle asitlendirilmiş Potato Dekstrose Agar'dan (PDA, Merck 1.10130) 13-15 ml dökülmüştür. Hazırlanan petri plakları 25°C de 3-5 gün inkübe edilerek sayımlar gerçekleştirilmiştir (Lönner vd 1986, Tassou vd 2002, Şimşek ve Çon 2006).

2.2.2.5. Turşu ve zeytinde laktik asit bakteri sayımı

Uygun dilüsyonlardan (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ve 10^{-7}) petri plaklarına 2'şer paralelli olarak 1'er ml aktarılmış ve MRS agar kullanılarak dökme ekim yapılmıştır. Aşılana plaklar 30°C 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda 30-300 koloni içeren petri kutularında sayım yapılmıştır. Sayım sonucu en az 10 koloni katalaz testine tabi tutularak kolonilerin LAB oldukları doğrulanmıştır. Elde edilen katalaz negatif koloni sayısı dilüsyon faktörü ile çarpılarak, toplam LAB sayısı belirlenmiştir (Lönner vd 1986, Corbo vd 2001, Tassou vd 2002, Şimşek ve Çon 2006, Budde vd 2003, Randazzo vd 2004).

2.2.2.6. Antimikrobiyal aktiviteye sahip laktik asit bakterilerinin izolasyonu

Uygun dilusyonlardan (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ve 10^{-7}) 0.1 ml örnek alınarak MRS-0.2 besiyeri içeren petri plaklarına yayma yöntemle ekim yapılmıştır. Plaklar 30°C'de anaerobik olarak 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu 5-100 koloni içeren petri kaplarının üzerine, *L.sake Lb790* indikatör suşu aşılansmış MRS yarı katı agar'dan 7 ml dökülmüş ve petriiler tekrar 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda etrafında berrak gelişmeme zonu bulunan koloniler MRS Broth'a aşılarak 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda Gram boyama, katalaz ve mikroskopik görünüm testlerine tabi tutulmuştur. Gram (+), katalaz (-), kok veya çubuk şekilli, spor oluşturmeyan bakterileri içeren sıvı besiyerlerinden MRS agara sürme usulü ekim yapılmış ve plaklar 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu tek düşmüş kolonilerden MRS Broth'a aşılansmış ve 30°C'de 24 saat daha inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda gram boyama, katalaz ve mikroskopik görünüm testleri tekrarlanmış ve saf görünümlü kültürlerin antimikrobiyal aktivitesi tekrar test edilmiş ve antimikrobiyal aktiviteye sahip, kok veya basil şeklindeki muhtemel laktik asit bakterilerini içeren kültürler seçilmiştir (Çon 1995).

2.2.2.7. Antimikrobiyal aktivite spektrumunun belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivite spektrumunun belirlenmesinde Schillinger ve Lücke (1989) tarafından bildirilen "Agar Spot Testi" uygulanmıştır. Antimikrobiyal aktivitesi test edilecek bakteri suşunun bir gecelik kültüründen 10 µl alınmış ve bir gün önce hazırlanmış MRS-0.2 plaklarına birbirinden en az 30 mm aralıklı olacak şekilde (bir petri kutusuna 4 adet) aktarılmış ve plaklar 25-28°C'de 24 saat anaerobik şartlarda inkübe edilmiştir.

İndikatör mikroorganizmalar $OD_{600} = 0.2-0.3$ oluncaya kadar geliştirilerek %3 oranında MRS-0.2 veya TSBYE yarı katı besiyerinin 7 ml sine aşılansmış ve denenecek üretici suşun daha önce geliştirildiği plaklar üzerine ikinci bir katman olarak dökülmüştür. Besiyeri katılaştıktan sonra plaklar 30°C'de 24 saat aerobik/anaerobik koşullarda inkübe edilmiş ve denenen suşun kolonileri etrafındaki çoğalma olmayan, berrak alanlar ölçülmüştür. Denemelerde *L.sake Lb790*, *P.vulgaris*, *E.coli*, *L.monocytogenes Li1*, *L.monocytogenes Li6*, *Y.lipolitica* ve *A.hydrophila* indikatör

mikroorganizma olarak kullanılmıştır. Denemelerde negatif kontrol olarak *L.sake Lb706-A*, pozitif kontrol olarak *L.sake Lb706* kullanılmıştır.

2.2.2.8. Tanımlama testleri

Gram Boyama: İzolatların 18-24 saatlik genç kültürlerinden Şimşek (2003) tarafından bildirilen metoda göre yapılmış, menekşe renkli bakteriler gram pozitif olarak değerlendirilmiştir. Testte *L.sake Lb790* ve *E.coli* şahit olarak kullanılmıştır.

Katalaz Testi: MRS agarda geliştirilmiş koloniler üzerine H₂O₂ damlatılmış ve binoküler altında gözlenen kolonilerin etrafında gaz habbeciklerinin görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Kim vd 2001, Carr vd 2002). Analizde pozitif indikatör olarak *Staphylococcus aureus* kullanılmıştır.

Glukozdan Gaz Üretimi: Sitrat içermeyen MRS broth'a ters çevrilmiş Durham tüpleri konulmuştur. 18 saatlik kültürlerle aşılana sıvı besiyerleri 30°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon süresince Durham tüplerinde gaz oluşumu takip edilmiştir. Durham tüpleri içerisinde gaz görülen kültürler pozitif olarak tanımlanmıştır (Çon 1995, Randazzo vd 2004).

Arginin Hidroliz Testi: Ornithine decarboxilase/arginin dihidrolase temel besiyerine (Merck1.06934.0500) arginin monohydrochloride (5g L-arginine monohydrochloride /1000ml) ilave edilerek hazırlanan besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri 18 saatlik kültürlerle aşılansmış ve 30°C'de 1 hafta inkübe edilmiştir. L-Arginin monohydrochloride içeren tüplerde eflatundan sarıya dönen rengin tekrar eflatuna dönmesi ve aynı izolataın aşılansı kontrol tüplerinde (L-arginin monohydrochloride içermeyen) ise oluşa sarı rengin değişmeksizin kalması pozitif olarak kabul edilmiştir. Kontrol tüpleri ile birlikte L-arginin monohydrochloride içeren tüplerde rengin sarı olarak kalması da negatif olarak kabul edilmiştir (Çon 1995, Anon 2005).

Karbonhidrat Fermantasyon Testleri: İzolatların çeşitli karbonhidrat kaynaklarını kullanım kabiliyetleri API50 CH test kiti (bioMeriux sa 69280 Marcy I'Etoile France) kullanılarak belirlenmiştir. Denenecek suşlar, biyokimyasal özelliklerin stabilitesi için, MRS buyyonda 3 kez ardı ardına (30°C'de 24 saat) geliştirilmiş ve tekrar MRS buyyona

aşılarak 30°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra sıvı kültürler 5000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet 5 ml steril fizyolojik su içerisinde çözülmüş, homojenize edilmiş ve sanrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılarak yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bir kez daha yıkama yapıldıktan sonra elde edilen pellet, 2 ml steril fizyolojik su içerisinde homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenizattan, 5 ml saf suya, 550 nm’de 0.50-0.75’lik optik dansite değerini elde etmek için ne kadar ilave edilmesi gerektiği belirlenmiş ve bu miktarın iki katı 10 ml CHL ortamına aşılacaktır. Test kullanım kitapçığında belirttiği şekilde hazırlanan inkübasyon tepsisinin kapağı açılıp stripteki 50 kuyu içerisine taşmayacak şekilde, aşılacak CHL medium Pasteur pipeti ile ilave edilmiş ve kuyular mineral yağ ile doldurulmuştur. Böylece iyi bir anaerob ortam sağlanan striplerin bulunduğu tepsinin kapağı kapatılmış ve 30°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 24 ve 48. saatlerinde asit üretimi olup olmadığına brom krezol purple içeren besiyerinde sarı renk oluşumu (esculin hariç diğer tüm karbonhidrat kaynaklarında), esculin içeren tüpte ise siyah renk oluşumu gözlenerek karar verilmiştir. Sonuçlar reaksiyonun intensitesine göre 0-5 arası puanlar verilerek test kitinin özel hazırlanmış kartlarına işlenmiştir. Negatif reaksiyon 0, pozitif reaksiyon 5 olarak alınmış, aradaki reaksiyonlara ise 1, 2, 3 ve 4 gibi puanlar verilmiş ve sonuçlar BioMerieux firmasının Türkiye temsilciliğinde API 50 CH’ye ait bilgisayar programı ile değerlendirilmiştir.

2.2.2.9. Farklı sıcaklıklarda gelişme

MRS broth besiyerinde çoğaltılmış 18 saatlik kültürlerden tekrar MRS broth’a aşılarak 10°C, 15°C ve 45°C’de minimum-maksimum termometre eşliğinde inkübe edilmiştir. Gelişme gösterenler pozitif, gelişme göstermeyenler ise negatif olarak işaretlenmiştir (Tassou vd 2002, Şimşek 2003).

2.2.2.10. Farklı pH değerlerinde gelişme

Analiz için 3.0, 3.5, 4.0 ve 9.6 pH değerlerine ayarlanmış MRS broth besiyerlerine 18 saatlik kültürlerden %1 ekim yapılmış ve 30°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişme olan örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir (G-Allegria vd 2003).

2.2.2.11. Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme

Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme testi için %3, 5, 6.5, 8 ve 9 oranında NaCl ilave edilmiş MRS broth besiyerlerine 18 saatlik kültürlerden %1 oranında ekim yapılmış ve 30°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası gelişme tespit edilen tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Sanchez vd 2000, Randazzo vd 2004).

2.2.2.12. Proteolitik ve amilolitik aktivite

Proteolitik aktivite testi için 5 ml steril skim milk (%10'luk) besiyerine 18 saatlik kültürden %1 oranında aşılanmış ve 30°C'de 42 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örneklere 1 ml destile su ve 10 ml 0.72 N Triklorasetik Asit (TCA) ilave edilerek karıştırılmış ve 10 dakika bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda örnekler Whatman 1 filtre kağıdından süzülmüştür. Filtratlardan 5 ml alınıp üzerine 10 ml Na₂CO₃, Na₄P₂O₇ çözeltisinden konulup karıştırılmıştır. Ardından bunu üzerine 3 ml fenol ayırıcı konularak mavi renk oluşana kadar sürekli karıştırılmıştır. Bu işlem sonunda örnekler 4500 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda üstte kalan berrak mavi kısım alınarak spektrofotometrede 550nm dalga boyunda OD ölçümleri yapılmıştır. Örneklerin proteolitik aktiviteleri standarda göre hesaplanmıştır. Proteolitik aktivitelerin tespiti için, oluşan aminoasitlere eşdeğer olarak tirozin aminoasiti esas alınmış ve hesaplama buna göre yapılmıştır (Aslım 1994, Yüksekdağ 2004).

Proteolitik Aktivite Standardının Hazırlanması: 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.15 ve 0.20 mg/ml tirozin içecek şekilde hazırlanmış 5 ml steril skim milk (%10'luk) besiyerine metotta belirtilen aynı işlemler yapılarak standard kurve çizilmiştir.

Proteolitik Aktivitenin Tespitinde Kullanılan Diğer Çözeltilerin Hazırlanması:

Fenol Ayırıcı: 1 kısım Folin Ciocalteus çözeltisi, 2 kısım suyla karıştırılarak her seferinde taze olarak hazırlanmıştır.

Triklorasetik Asit (TCA): 0.72 N TCA hazırlanmıştır.

Na₂CO₃, Na₄P₂O₇ : 75 gr Na₂CO₃ ve 10 gr Na₄P₂O₇ destile suda çözülerek 500 ml'ye destile suyla tamamlanmıştır.

İzolatların amilolitik aktivitesinin tespiti API 50CH test kitiyle çeşitli karbonhidrat kaynaklarını kullanım kabiliyetleri testi modifiye edilerek belirlenmiştir. Bu testte CHL medium içerisinde bulunan nişastanın laktik asit bakterilerince kullanılması saptanmıştır. Test, bundan önceki başlıklarda anlatılan karbonhidrat fermantasyon testi ile aynı şekilde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan, içerisinde %1 nişasta bulunan 10 ml CHL mediuma 550 nm'de 0.50-0.75'lik OD değerini elde edecek şekilde aşılmalıdır. Aşılana besiyeri 30°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmış, inkübasyon sonucu mor rengin sarıya dönmesi pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir.

2.2.2.13. Toplam asit üretme yeteneği

10 ml MRS sıvı besiyeri (pH 6.2±0.2) içeren 7 ayrı tüpe 18 saatlik kültürden aşılama yapılmış ve 30°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince her gün bir tüpte pH ölçümü ve 0.1 N NaOH ile pH 6.2'ye kadar elektrometrik olarak (WTW Model pH meter) titrasyon yapılmıştır. Böylece her suşun dışarıdan herhangi bir etki yapılmadan oluşturabileceği asitlik, pH ve % laktik asit cinsinden o suşun asit oluşturma yeteneği olarak değerlendirilmiş ve aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Evren 1991).

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

V: Harcanan 0.1 N NaOH miktarı, ml

F: Titrasyonda kullanılan bazın normalitesi

E: 1 ml 0.1 N NaOH'ın eşdeğeri asit miktarı, g (Laktik asit için 0.009)

m: Titre edilen örneğin miktarı, ml ve g (10 ml)

2.2.2.14. β-Galaktosidaz testi

Glukoz yerine laktoz içeren MRS besiyerinde geliştirilmiş olan kültürden bir öze dolusu alınarak 0.25 ml fizyolojik tuzlu su ile süspanse edilmiştir. Bu süspansiyonun üzerine 0.25 ml Ortho Nitrofenol-D-Galaktopronosid (ONPG) Peptonlu Su besiyeri ilave edilerek optimum sıcaklıkta 3-4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda tüplerde sarı rengin meydana gelmesi pozitif, renk değişikliğinin olmaması ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Anon 2005).

ONPG Peptonlu Su hazırlamak için; (a) çözeltisi olarak 100 ml distile su içinde 10.0 g Tripton ve 5.0 g NaCl eritilerek pH 7.5'e ayarlanır ve 121°C'da 15 dakika süre ile sterilize edilir, (b) Çözeltisi O-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosidden 0.6 gram alınarak 100 ml 0.01 M Sodyum Fosfat Tamponda (pH 7.5) çözülür ve 0.45 µm porlu filtreden geçirilerek sterilize edilir. Daha sonra 30.0 ml (a) ve 10.0 ml (b) çözeltisinden karıştırılarak aseptik koşullar altında steril tüplere 2'şer ml dağıtılır (Anon 2005).

2.2.2.15. Hidrofobisite

MRS brothda 24 saat inkübe edilmiş kültürler 7000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen izolatlar 50 mM K₂HPO₄ (pH 6.5) çözeltisinden 3 ml koyularak vortekslenmiş, yine 7000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu yıkama işlemi bir kere daha uygulanmış ve sonra 2 ml K₂HPO₄ ile resüspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonunun A₅₆₀ değeri, 1.0 olacak şekilde aynı çözelti ile ayarlanmıştır. A₅₆₀ =1.0 olan hücre süspansiyonundan 3 ml alınmış ve üzerine 0.6 ml n-hekzadekan eklenip, 120 saniye vortekslenmiştir. 37°C'de bekletilerek separe edilen süspansiyonda 2 faz oluşmuştur. Bu fazlarda sulu faz dikkatle alınarak, spektrofotometrede A₅₆₀ değeri ölçülmüştür. Sulu fazdaki absorbans değerindeki düşüşten hidrofobisite % olarak hesaplanmıştır (Vinderola ve Reinheimer 2003).

$$H (\%) = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$$

A₀: Kültürün A₅₆₀ değeri

A : n-Hekzadekan uygulanmış örneğin A₅₆₀ değeri

2.2.2.16. Hidrojen peroksite dayanıklılık

Hidrojen peroksite dayanıklılık testi Shimamura vd (1992) tarafından bildirilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir.

MRS brothda 24 saat inkübe edilen izolatlar 7000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen izolatlar 50 mM K₂HPO₄ (pH 6.5) çözeltisinden 3 ml koyularak vortekslenmiş, yine 7000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş, bu işlem bir kere daha devam ettikten sonra son olarak 2 ml K₂HPO₄ ile resüspanse edilmiştir. Sonra hücre süspansiyonu A₅₆₀ değeri =1.0 olacak şekilde aynı çözelti ile ayarlanmıştır. Elde edilen bakteri süspansiyonundan 0.5 ml alınarak 3 adet boş tüpe konmuştur. Bu

süspansiyonların her birisine sırasıyla 2000, 10000 ve 20000 ppm konsantrasyonlarına sahip 4.5 ml H₂O₂ ilave edilmiş ve 1 dakika 37°C'de bekletilmiştir. Takiben bu tüplerden 0.1 ml alınarak 9.9 ml katalaz çözeltisine aktarılmıştır. Hazırlanmış bakteri süspansiyonundan H₂O₂ uygulanmadan önce ve uygulandıktan sonra yayma yöntemiyle aşağıdaki dilüsyon oranlarına göre ekim yapılarak mikroorganizma sayımı gerçekleştirilmiş ve elde edilen verilerden aşağıdaki formül ile H₂O₂'e dayanıklılık düzeyleri (% canlı kalan mikroorganizma) hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Canlı Kalan Mikroorganizma} = (X / X_0) \times 100$$

X₀: Kültürün Başlangıç Canlı Mikroorganizma Sayısı

X : H₂O₂ Uygulama Sonrası Canlı Mikroorganizma Sayısı

2000 ppm için : Direkt	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶
10000 ppm için : Direkt	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻⁴	
20000 ppm için : Direkt	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻⁴	
Şahit için	: 10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸

2.2.2.17. Dondurma ve liyofilizasyona dayanıklılık

Dondurma ve liyofilizasyona dayanıklılık testinde G-Allegria vd (2004) tarafından verilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. 18 Saatlik MRS broth kültürlerinden 25µl alınarak 3 ml MRS broth besiyerine aktarılmıştır. Hücreler 30°C'de 24 saat inkübe edilerek geliştirilmiş ve takiben 2000 rpm'de 15 dakika santrifuj edilmiştir (Hettich Universal 30R). Supernatant kısmı dökülerek elde edilen pelletler 0.5 ml skim milk besiyeri ile süspansiyon edilmiş ve -70°C'de dondurulmuştur. Dondurulan kültürlerden 2 vial -70°C'de muhafaza edilmiş, 4 vial ise liyofilizatörde (Thermo Savant ModulyoD) -55°C'de 16 saat vakum altında liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon tamamlandıktan sonra viallerin kapağı vakum altında kapatılmıştır. Elde edilen liyofilize kültürler +5°C'de saklanmıştır.

Skim milk besiyerinde bulunan canlı hücreler MRS agarda yayma yöntem ile ekim yapılarak, dondurma öncesi ve sonrası sayım sonuçlarından dondurmaya dayanıklılık; dondurma öncesi ve liyofilizasyon sonrası sayım sonuçlarından liyofilizasyona dayanıklılık değeri aşağıda verilen formüle göre (% canlı kalan mikroorganizma) hesaplanmıştır.

% Canlı Kalan Mikroorganizma = $(X / X_0) \times 100$

X_0 : Kültürün Başlangıç Canlı Mikroorganizma Sayısı

X : Dondurma/Liyofilizasyon Sonrası Canlı Mikroorganizma Sayısı

2.2.2.18. Safra tuzuna dayanıklılık

Farklı safra tuzu oranlarında gelişme, var-yok testi ve % gelişme oranının belirlenmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir. Var-yok testi için 18 saatlik kültürlerden eş zamanlı olarak MRS agar, MRS agar+%1 oxbile, MRS agar+%4 oxbile besiyerlerine her petriye 4 adet olacak şekilde 10'ar µl; MRS Broth, MRS Broth+%1 oxbile, MRS Broth+%4 oxbile, MRS Broth+%5 oxbile ve MRS Broth+%7 oxbile besiyerlerine öze ile ekim yapılmıştır. Aşılana bütün tüpler 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Katı besiyerinde koloni gelişimi, sıvı besiyerinde ise bulanıklık meydana gelmesi gelişme varlığı olarak değerlendirilmiştir (Cebeci ve Gürakan 2003).

Diğer yöntemde ise; MRS Broth, MRS Broth+%1 oxbile ve MRS Broth+%4 oxbile besiyerlerine aynı kültürden %2 oranında ekim yapılmış ve besiyerleri 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. MRS broth ile oxbile içeren MRS broth + oxbile besiyerlerinde gelişen kültürlerde inkübasyonun 10, 20 ve 30. saatlerinde spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmıştır. Oxbile içeren MRS brothda elde edilen gelişme, şahit MRS brothda (oxbile içermeyen) elde edilen gelişme ile karşılaştırılarak % gelişme oranları hesaplanmıştır (Vinderola ve Reinheimer 2003).

2.2.2.19. Gastrik suya dayanıklılık

Mide suyuna dayanıklılığı ölçmek için %0.3 (w/v) pepsin ve %0.5 (w/v) NaCl içeren bir solüsyon hazırlanmış ve HCl ile pH 2 ve pH 3'e ayarlanmıştır. 18 Saat geliştirilmiş izolatlar (10ml) 5°C'de 6000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı dökülmüştür. Pelletler 50 mM K₂HPO₄ (pH 6.5) tamponuyla iki kere yıkanmıştır. Pelletler yine aynı tamponun 3 ml'siyle resüspanse edilmiştir. Tampon ile hazırlanmış hücre süspansiyonundan 2 tüpe ayrı olarak 1'er ml alınmış ve +5°C'de 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelletlerden birisinin üzerine 2.0 pH değerinin üzerine 3.0 pH değerine sahip gastrik solüsyonundan 10'ar ml eklenmiş ve

37°C 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyona koymadan hemen önceki hücre sayısı ile, 3 saat inkübasyondan sonraki canlı hücre sayısı arasındaki fark plak sayım yöntemi ile belirlenerek, gastrik suya dayanıklılık (% Canlı Kalan Mikroorganizma) aşağıda verilen formül ile saptanmıştır (Gardiner vd 1999, Vinderola ve Reinheimer 2003).

$$\% \text{ Canlı Kalan Mikroorganizma} = (X / X_0) \times 100$$

X_0 : Kültürün Başlangıç Canlı Mikroorganizma Sayısı

X : Gastrik Su Uygulama Sonrası Canlı Mikroorganizma Sayısı

2.2.2.20. Alkole dayanıklılık

Alkol testi için G-Allegria vd (2003) tarafından verilen yöntem var-yok testi şeklinde modifiye edilerek uygulanmıştır. 18 saatlik kültürler %3, 7, 12, 13 ve 15 (v/v) oranında alkol içeren MRS broth besiyerlerine %1 oranında aşılmalı ve 30°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası gelişme olan tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

2.2.2.21. Antibiyotiğe dayanıklılık

Antibiyotik dayanıklılık testinde Charteris vd (1998) tarafından bildirilen metot modifiye edilerek kullanılmıştır. Hücreler MRS-sistein agarda geliştirilerek hücre konsantrasyonu peptonlu su ile 10^8 cfu/ml'ye ayarlanmıştır. Bu süspansiyondan 45°C'daki MRS soft agara %5 aşılmalı ve daha önceden 15 ml MRS agar dökülmüş petri kaplarına aşılmalı MRS soft agar 4'er ml ikinci katman olarak dökülmüştür. 15 dakika beklendikten sonra her bir petriye 4 adet antibiyotik diski yerleştirilerek, 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu inhibisyon zonunun çapı ölçülerek izolatların denenen antibiyotiklere dayanıklılığı belirlenmiştir.

2.2.2.22. Plazmid DNA izolasyonu

Antimikrobiyal aktiviteye sahip laktobasillerin plazmid DNA profilleri Anderson ve McKay (1983) tarafından bildirilen metot modifiye edilerek belirlenmiştir. 18 saat inkübe edilmiş kültürlerden taze MRS Broth'a %10 aşılansak 4 saat inkübe edilmiş ve

inkübasyon sonunda örnekler 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek pelletler toplanmıştır. Pelletler üzerine 380 ml sakkaroz çözeltisi (1) ilave edilip pelletlerin iyice çözülmesi sağlanmış ve örnekler 37°C'ye ısıtılmıştır. 120 µl lizozim çözeltisi (2) ilave edilerek elle yavaşça karıştırılmış ve su banyosunda 37°C'de 1 saat tutulmuştur. 50 µl Tris-EDTA 1 (3) ilave edilerek iyice karıştırılmış, takiben 35 µl SDS çözeltisinden (4) eklenerek 37°C'deki su banyosunda 15 dakika tutulmuş ve lizisin tamamlanması sağlanmıştır. Süre bitiminden sonra vortekste maksimum ayarında 30 saniye karıştırılmıştır. Taze hazırlanmış 3N NaOH çözeltisinden 30 µl eklenmiş ve elle yavaşça ters-düz ederek 10 dakika karıştırılmıştır. 50 µl Tris-Cl çözeltisinden (5) ilave edilmiş ve elle 3 dakika aralıksız karıştırılmıştır. 72 µl NaCl (+4°C) konulup elle iki kez ters-düz edilerek karıştırılmış ve 700 µl %3 NaCl ile doyurulmuş fenol çözeltisinden (6) ilave edilerek 13000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan üst faz, ara faz ile karıştırılmadan (yaklaşık 500 µl) yeni eppendorf tüpüne aktarılmış ve üzerine 700 µl kloroform-izoamilalkol (24/1) ilave edilip elle 5 dakika karıştırılmıştır. Buzdolabında 2 dakika bekletildikten sonra 11000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz karıştırılmadan yeni eppendorfa alınmıştır. Üzerine alınan miktar kadar (yaklaşık 500 µl) izopropanol ilave edilip, bir gece -20°C'de bekletilmiştir.

Bir gece bekletilen kültürler 13000 rpm'de 25 dakika santrifüj yapıp süpernatant dökülmüş, pelletler oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kuruyan pelletlere 20 µl EDTA 2 yükleme tamponundan (7) ilave edilerek iyice çözülmüş ve üzerine 4 µl RNAaz çözeltisi (8) ilave edilerek karıştırılmıştır. Su banyosunda 37°C'de yarım saat bekletildikten sonra 4 µl brom krezol purpur marker boya çözeltisi (9) ilave edilerek boyanmıştır. Tris-asetat tamponu (10) ile hazırlanan %0.7'lik agaroz jel elektroforeze, boyanmış örnekten 25 µl yüklenmiş ve 70V'da yaklaşık 3 saat yürütülmüştür. 5 µg/l konsantrasyonda ethidium bromide içeren boya çözeltisinde yarım saat boyanmıştır. Distile su içerisinde 10 dakika bekletilmiş ve takiben jel görüntüleme cihazında (Vilber Lourmat) 254 nm dalga boyundaki UV ışıkta bantlar görüntülenmiştir. Elde edilen görüntü bilgisayara aktararak saklanmıştır. Eş zamanlı olarak jelde yürütülen moleküler büyüklükleri bilinen marker DNA'ların elektroforetik hareketlilikleri ile, büyüklükleri arasındaki doğrusal ilişkiyi kullanarak belirlenen plazmid bantlarının yaklaşık büyüklükleri ifade edilmiştir.

Plazmid DNA İzolasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler:

Sakkaroz Çözeltisi (1)

Tris	0.6057 g	pH: 8.0
EDTA	0.0372 g	
Sakkaroz	6.70 g	
Destile Su	100 ml	

Oda sıcaklığında muhafaza.

Lizozim Çözeltisi (2)

Tris	0.03 g	pH: 8.0
Lizozim	0.20 g	
Destile su	10 ml	

-20°C'de muhafaza.

Tris-EDTA 1 Çözeltisi (3)

Tris	0.060 g
EDTA	0.931 g
Destile su	10 ml

Oda sıcaklığında muhafaza.

SDS Çözeltisi (4)

Tris	0.60 g	pH: 8.0
EDTA	0.74 g	
SDS	20.0 g	
Destile su	100 ml	

Oda sıcaklığında muhafaza.

Tris-Cl Çözeltisi (5)

Tris-Cl	31.52 g	pH: 7.0
Destile su	100 ml	

Oda sıcaklığında muhafaza.

% 3 NaCl ile Doyurulmuş Fenol Çözeltisi (6)

Fenol	100 g
NaCl	3.0 g
Hidroksiguinolin	0.1 g
Destile su	20 ml

100 g fenol üzerine 3 g NaCl ve 20ml steril saf su ilave edilmiş ve 45°C su banyosunda eritilmiştir. Çözeltiye koruma amaçlı olarak 0.1 g hidroksiguinolin ilave edilmiştir. Takiben 2 faz oluşuncaya kadar steril saf su ilave edilmiştir. Çalışma süresince oda sıcaklığında tercihen karanlıkta bekletilmiştir.

Tris-EDTA 2 Çözeltisi (7)

Tris	0.121 g	pH: 8.0
EDTA	0.037 g	
Destile su	100 ml	

Oda sıcaklığında muhafaza.

RNAaz Çözeltisi (8)

0.05 M Sodyum asetat çözeltisi hazırlanmış ve pH'sı asetik asit kullanılarak 5.0 pH'ya ayarlanmıştır. Bu çözeltiden 5 ml alınıp, 5 mg RNAaz ilave edilmiştir. Kaynar su içinde 5 dakika bekletildikten sonra, -20°C'de saklanmıştır.

Brom Krezol Purpur (Marker Boya) Çözeltisi (9)

Brom krezol purpur	0.25 g	pH: 8.0
Tris	0.6 g	
Gliserol (%50'lik)	100 ml	

Tris-Asetat Tamponu (10)

Tris	4.84 g	pH: 8.0
Na-Asetat	4.08 g	
EDTA	0.37 g	

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Kimyasal Analiz Bulguları

Araştırmada incelenen 70 adet turşu, 16 adet zeytin örneğinde pH, asitlik ve tuz analizleri yapılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 3.1 ve 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.1 Turşu örneklerinin kimyasal ve mikrobiyolojik analiz sonuçları

Örnek No	pH	% Asit	% Tuz	LAB (log cfu/g)	TAMB (log cfu/g)	Maya-Küf* (log cfu/g)	Koliform (log cfu/g)
11	3.21	0.98	3.54	3.74	4.09	3.65	-**
12	3.08	1.98	3.69	3.92	4.76	4.11	-
13	3.83	0.58	2.63	3.80	3.48	3.52	-
14	3.99	0.47	2.60	6.64	5.11	5.11	-
21	3.63	2.15	1.86	5.30	5.00	1.48	-
22	3.92	1.85	1.77	6.85	6.79	6.49	-
23	3.51	2.30	2.27	4.50	6.00	3.99	-
24	3.47	1.96	2.77	6.00	5.93	5.80	-
25	3.52	0.98	3.54	6.79	6.58	5.58	-
26	3.48	1.96	3.57	7.45	7.00	4.69	-
31	3.13	1.58	7.41	6.57	6.34	6.26	-
32	3.32	0.92	9.89	6.96	7.00	6.88	-
33	3.40	0.92	8.85	6.91	6.73	6.52	-
51	3.60	0.94	2.68	7.04	7.20	5.99	-
53	3.69	0.98	3.19	5.11	6.18	5.06	-
54	3.92	0.72	7.50	7.48	7.56	7.32	-
55	3.73	1.99	2.41	<3.00	4.26	<3.00	-
56	3.65	2.05	2.97	5.34	5.26	5.28	-
57	3.76	1.18	2.72	3.00	3.00	<3.00	-
58	4.13	2.08	1.81	<3.00	3.89	<3.00	-
59	3.76	3.01	3.06	6.08	6.04	6.04	-
510	3.75	1.14	3.12	7.80	8.27	7.00	-
61	3.37	2.12	4.72	5.54	4.85	5.72	-
62	3.26	1.95	4.69	<3.00	<3.00	<3.00	-
63	3.17	2.09	7.46	7.73	8.05	7.85	-
64	3.42	2.14	3.96	4.62	4.28	4.38	-
65	4.92	0.34	2.02	7.77	7.97	7.80	-
66	3.41	2.19	6.35	5.52	5.32	5.32	-
67	4.25	0.24	3.51	7.44	7.06	5.34	-
68	3.61	0.74	8.86	7.10	7.23	5.26	-
69	3.22	1.39	1.87	4.92	<3.00	4.59	-
81	3.14	1.49	2.50	5.38	5.26	5.13	-
82	2.79	1.71	3.54	5.00	5.15	4.83	-
83	3.24	1.87	0.72	5.38	5.48	5.26	-

Devam

Tablo 3.1 (Devam)

Örnek No	pH	% Asit	% Tuz	LAB (log cfu/g)	TAMB (log cfu/g)	Maya-Küf (log cfu/g)	Koliform (log cfu/g)
84	3.91	1.94	2.00	7.18	7.48	<3.00	-
85	2.00	0.58	3.45	7.46	6.95	5.73	-
86	3.16	1.40	4.05	6.83	6.93	7.11	3.85
87	3.20	1.67	4.01	<3.00	3.30	<3.00	-
88	3.46	4.41	2.46	4.15	3.30	<3.00	-
89	3.14	1.73	1.90	4.65	3.60	<3.00	-
810	3.66	1.57	0.57	4.78	3.30	4.92	-
91	3.20	2.21	2.73	3.60	4.30	3.00	1.48
92	3.12	1.82	2.35	4.04	4.30	4.08	1.00
93	3.51	1.96	4.33	6.11	5.74	<3.00	1.00
94	3.17	1.07	6.67	5.51	5.41	5.36	1.00
101	3.31	2.32	3.86	6.67	6.40	3.48	-
102	3.07	2.48	3.44	<3.00	<3.00	<3.00	-
103	3.02	2.35	3.79	<3.00	8.23	<3.00	-
104	3.26	2.63	2.82	5.54	3.00	<3.00	-
105	3.18	1.93	4.14	<3.00	8.28	<3.00	-
106	3.62	1.33	3.23	4.91	<3.00	<3.00	-
115	3.61	1.28	2.47	<3.00	3.30	<3.00	-
116	3.70	2.45	5.03	6.10	3.60	3.30	-
117	3.32	1.91	3.07	<3.00	<3.00	<3.00	-
121	4.18	0.35	6.26	4.85	4.66	4.23	-
122	2.71	1.29	6.58	<3.00	<3.00	3.00	-
123	3.05	1.31	6.83	6.22	6.19	6.10	-
124	3.52	2.41	3.19	6.91	5.01	4.51	-
125	3.70	1.20	7.27	4.67	4.15	4.72	-
126	5.36	0.18	1.14	5.61	5.70	5.03	-
131	3.19	0.35	0.39	5.40	5.82	5.32	-
132	3.29	0.36	3.69	6.46	5.61	6.41	-
133	2.90	2.05	7.63	4.04	4.04	4.04	2.30
134	2.82	1.74	3.83	6.43	6.38	6.30	-
135	3.40	2.45	2.68	<3.00	3.00	<3.00	-
136	5.75	0.39	3.45	5.52	5.46	5.34	2.15
137	2.90	2.65	5.09	<3.00	3.85	<3.00	-
138	3.26	1.92	4.71	<3.00	3.48	<3.00	-
139	3.50	1.13	3.51	6.83	6.68	6.46	-
1310	6.41	0.31	3.19	6.04	6.45	6.52	-
Ortalama***	3.53	1.58	3.96	5.79	5.48	5.24	1.83

* : Sayım Sonuçlarının tamamı maya kolonilerine aittir. Küf koloni gelişimi hiçbir örnekte olmamıştır.

** : Sayım değeri rakamsal olarak belirlenememiştir.

*** : Sayım değeri rakamsal olarak belirlenebilen örneklerin ortalamasıdır.

Toplanan turşu örneklerinin pH sonuçları 2.0-6.41 pH arasında ve ortalama 3.53 pH olarak belirlenmiştir. Örneklerin asitlik dereceleri ise %0.18-4.41 arasında ve ortalama %1.58 olarak hesaplanmıştır. Yine bu örneklerin tuz değerleri de %0.39-9.89 arasında

ve ortalama %3.96 olarak bulunmuştur. Johanningsmeimer vd (2004) ise yaptıkları çalışma sonucu turşu örneklerinde pH sonuçlarının 4.28-5.76 pH arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Tolonen vd (2004) de sauerkraut fermentasyonunda, starter kültür olarak *L.plantarum* kullanıldığında pH'nın fermantasyon sonunda 3.64, titrasyon asitliğinin ise 1.0'e ulaştığını belirtmişlerdir. Bu literatürlere göre çalışmada elde edilen pH değerleri örneklerin büyük kısmında beklenen düzeydedir.

Araştırma örnekleri arasında dağılımda ortaya çıkan ve literatür bilgilerine göre de oldukça büyük olan pH farklılığının, kullanılan turşu örneklerinin piyasa ve evlerden temin edilmiş olmasından kaynaklandığı kabul edilmektedir. Turşu örneklerinde pH-tuz, pH-asit ve asit-tuz korelasyonları önemsiz ($r<0.5$) bulunmuştur.

Türk Standartları Enstitüsü'nün Hıyar Turşusu (TS 11112) ve Lahana Turşusu (TS 4200) standartlarına göre, bu iki turşunun asitlik dereceleri çeşitlerine göre %0.5 ile %4 arasında, tuz ise hacmen en çok %7 olmalıdır (Anon 1990, Anon 1993). Bu değerlere göre, turşu örneklerinin %90'ının hem % asitlik, hem de tuz bakımından standartlara uygun olduğu görülmektedir.

Tablo 3.2 Zeytin örneklerinin kimyasal ve mikrobiyolojik analiz sonuçları

Örnek No	pH	% Asit	% Tuz	LAB (log cfu/g)	TAMB (log cfu/g)	Maya-Küf (log cfu/g)	Koliform (log cfu/g)
34z	3.85	1.73	5.32	6.32	5.66	5.32	-*
35z	3.94	0.71	5.73	6.61	6.56	6.60	1.60
36z	3.91	0.70	5.51	6.43	6.46	6.91	1.48
41z	3.31	1.04	4.53	7.15	7.18	6.79	-
42z	3.81	0.72	4.93	6.04	6.08	6.20	-
43z	4.13	0.27	3.12	6.96	6.48	6.43	1.48
44z	3.11	1.37	3.88	4.78	4.72	4.56	-
45z	3.86	0.65	6.92	5.99	5.74	5.71	-
46z	4.47	0.40	6.92	6.46	6.81	4.96	-
52z	4.84	0.40	10.82	<3.00	3.95	3.30	-
107z	3.87	0.76	5.88	6.79	6.86	5.24	-
108z	4.29	0.20	0.48	6.79	6.72	<3.00	-
111z	2.88	0.95	4.56	6.04	5.81	5.76	-
112z	4.26	0.53	0.18	5.52	5.94	5.62	-
113z	2.90	0.86	6.61	4.84	4.67	4.75	-
114z	2.81	2.12	3.23	6.23	6.48	5.99	-
Ortalama***	3.77	0.91	4.63	6.20	6.01	5.60	1.52

* : Sayım Sonuçlarının tamamı maya kolonilerine aittir. Küf koloni gelişimi hiçbir örnekte olmamıştır.

** : Sayım değeri rakamsal olarak belirlenememiştir.

***: Sayım değeri rakamsal olarak belirlenebilen örneklerin ortalamasıdır.

Zeytin örneklerinde pH sonuçları 2.81-4.84 pH arasında ve ortalama 3.77 pH olarak belirlenmiştir. Asitlik değeri ise %0.20-2.12 arasında ve ortalama olarak %0.91 olarak hesaplanmıştır. Son olarak bu örneklerde tuz değerleri %0.18–10.82 arasında değişmekte olup ortalama %4.63 olarak bulunmuştur. Montano vd (2003) yaptıkları araştırmada pH değerini 3.65-4.40; asitliği %0.35-1.41; tuz konsantrasyonunu ise %4.0-9.9 olarak tespit etmişlerdir. Marsillio vd (2005) ise yaptıkları araştırmada fermente yeşil zeytinin pH değerlerini starter kültüründe 3.9-4.3 pH arasında, kültürsüzde 4.2-4.7 pH arasında tespit etmişlerdir. Örneklerde belirlenen pH değerleri hem Montano vd (2003) hem de Marsillio vd (2005) tarafından elde edilenlere göre daha düşük çıkmıştır. Yine sonuçlara göre, Montano vd (2003) tarafından belirlenen tuz değerleri daha yüksek asitlik değerleri ise daha düşüktür. Asitlik değeri düşük olan ürünlerin tuz değerinin yüksek olması beklenen bir sonuçtur. Ancak bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre yapılan istatistik analizde asit-tuz ve pH-tuz korelasyonları anlamsızdır ($r < 0.5$). pH-asit korelasyonu anlamlı ve ters ilişkili ($r = -0.69$) olarak bulunmuştur.

Türk Standardları Enstitüsü'nün Sofralık Zeytin (TS 774) standartına göre, hermetik olmayan kaplardaki yeşil zeytinlerin asitlik dereceleri en az %0.4, tuz oranı en az %6 pH değeri de en yüksek 4.5 olmalıdır (Anon 1997). Bu değerlere göre; zeytin örneklerinin, asitlik bakımından %93.75'i, tuz bakımından %25'i, pH bakımından ise tamamı standarta uygun bulunmaktadır.

Araştırma sonuçlarından da anlaşıldığı üzere turşu ve fermente zeytinlerin çok farklı asit, pH ve tuz içeriğine sahip oldukları görülmektedir. Bu durum örneklerin bir kısmının geleneksel üretim için evlerde hazırlanmış olmasından kaynaklanmaktadır. Aynı zamanda farklı şartlarda muhafaza edilmeleri de bu sonuçların ortaya çıkmasında önemli bir etkidir.

3.2. Mikrobiyolojik Analiz Bulguları

Araştırmada turşu ve fermente zeytinlerde laktik bakteri sayısı ile genel mikrobiyolojik durum hakkında fikir edinmek için aerobik mezofilik bakteri, maya-küf ve koliform grubu bakteri sayımları yapılmıştır. Turşu örneklerinin sonuçları Tablo 3.1, fermente zeytin örneklerinin sonuçları da Tablo 3.2'de verilmiştir.

Fermente turşu örneklerinde laktik asit bakteri sayısı $3.00-7.80 \log \text{ cfu/g}$ arasında bulunmuş ortalama $5.79 \log \text{ cfu/g}$ olarak hesaplanmıştır. Toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı $3.00-8.28 \log \text{ cfu/g}$ arasında tespit edilmiş, ortalama sayı ise $5.48 \log \text{ cfu/g}$ olarak hesaplanmıştır. Örneklerin maya küf sayısı $3.00-7.85 \log \text{ cfu/g}$ arasında belirlenmiş, ortalama $5.24 \log \text{ cfu/g}$ bulunmuştur. Örneklerin 7 adedinde (örneklerin % 10'u) koliform grubu bakteriye rastlanılmış ve bunlarda ortalama sayı $1.83 \log \text{ cfu/g}$ olarak tespit edilmiştir. Johanningsmeimer vd (2004) yaptıkları çalışmada LAB sayısını incelenen altı turşu örneğinde $3.65-7.97 \log \text{ cfu/g}$ olarak, Özyıldız (2001) ise *L.plantarum* starter kültürlü turşuda 24 saat inkübasyon sonunda *L.plantarum* sayısını $8.44 \log \text{ cfu/g}$, Tolonen vd (2004) starter kültür olarak *L.plantarum* kullanılarak 6 gün süren fermentasyon sonunda turşuda LAB sayısını $9.40 \log \text{ cfu/g}$ olarak tespit etmiştir. Araştırmada elde edilen değer Johanningsmeimer vd (2004) ile uyumlu iken, Özyıldız (2001) ve Tolonen vd (2004) tarafından verilen değerlerden daha düşüktür. Özyıldız (2001) ve Tolonen vd'nin (2004) sonuçlarının yüksekliği örneklerin henüz fermentasyonun başlangıç safhasında olmasına bağlanabilir. Turşuda pH ve tuz içeriği nedeni ile depolama süresince mikrobiyal sayıda düşüşün görülmesi beklenen bir sonuçtur.

Turşu örneklerinde LAB sayısı ile TAMB arasında ($r=0.67$), LAB sayısı ile MK arasında ($r= 0.80$) istatistiki olarak önemli ilişki bulunmuştur.

Fermente zeytinlerde LAB sayısı $3.00-7.15 \log \text{ cfu/g}$ arasında bulunmuş ortalama $6.20 \log \text{ cfu/g}$ olarak hesaplanmıştır. TAMB sayısı $3.95-7.18 \log \text{ cfu/g}$ arasında tespit edilmiş, ortalama sayı ise $6.01 \log \text{ cfu/g}$ olarak hesaplanmıştır. Örneklerin maya küf sayısı $3.00-6.91 \log \text{ cfu/g}$ arasında belirlenmiş ortalama $5.60 \log \text{ cfu/g}$ bulunmuştur. Örneklerin 3 adedinde (örneklerin %19'unda) koliform gruba rastlanılmış ve pozitif örneklerde ortalama sayı $1.52 \log \text{ cfu/g}$ olarak tespit edilmiştir. Zeytin ve turşu örneklerinin hiçbirisinde *E.coli*'ye rastlanılmamıştır. Panagou ve Katsaboxakis (2006) yaptıkları çalışmada, MK sayısını $3.0-4.5 \log \text{ cfu/g}$, LAB sayısını $2.8-4.2 \log \text{ cfu/g}$ olarak tespit etmişlerdir. Leal- Sanchez vd (2003) zeytinler üzerine yaptıkları çalışmada LAB sayısını $\sim 7.0 \log \text{ cfu/g}$ olarak tespit etmişlerdir. Marsillio vd (2005) de Greek tip fermente yeşil zeytinin, LAB sayısının *L.plantarum* kültürü kullanılanda $9.0 \log \text{ cfu/g}$ 'a kadar yükseldiğini; spontan fermentasyonda ise $6.0 \log \text{ cfu/g}$ 'da kaldığını belirtmişlerdir. Koliform bakteri ise Greek tip yeşil zeytinde bulunmamış, ancak

İspanyol tip yeşil zeytinde fermantasyonun başında ~ 4.0 log cfu/g iken, pH düşüşü ile giderek azalarak 2. ayda tespit edilebilir düzeyin altına düştüğü belirlenmiştir. Araştırmada elde edilen LAB sayısının bu araştırmacılar tarafından verilen değerleri içerecek şekilde dağılım gösterdiği, ortalama değer ise Panagou ve Katsaboxakis (2006) tarafından verilen değerden yüksek, Marsillio vd (2005) ile Leal- Sanchez vd (2003) tarafından verilen değerlere yakın olduğu görülmektedir. MK sayısı ise Panagou ve Katsaboxakis (2006) tarafından bildirilene göre daha geniş bir aralıkta değişmiş ve ortalama sayı da biraz daha yüksek bulunmuştur. Koliform grup bakteri varlığı ise Marsillio vd (2005) tarafından verilen sonuçlarla çelişmemektedir. İncelenen örneklerin üretim tarihleri tam belli olmadığı için daha kapsamlı bir karşılaştırma yapılamamıştır.

Sanchez vd'nin (2001) zeytinlerde yaptığı çalışmada; starter kültür kullanılan fermentasyonda, kullanılmayana göre, *Lactobacillus* popülasyonunun daha yüksek olduğunu, *Enterobacteriaceae* familyasına karşı olumsuz etkisinin olduğu ve bu etkinin sonucunda zeytinlerde gaz birikiminin ve bütirik asit bozulmasının önüne geçildiği belirtilmiştir. Bunu takiben maya gelişiminin tespit edilemediği, sadece inokulasyon esnasında maya gelişiminin meydana geldiği, fakat hemen sonra kaybolduğu bildirilmiştir.

Zeytin örneklerinde LAB sayısı ile TAMB arasında ($r=0.92$), LAB sayısı ile MK arasında ($r= 0.52$) ve MK sayısı ile koliform arasında ($r= 0.50$) istatistiki olarak önemli bir ilişki bulunmuştur. TAMB sayısı ile MK sayısı arasında ise ilişki önemsizdir ($r<0.5$) Aynı zamanda LAB sayısı ile tuz oranı arasında ($r=-0.52$) önemli ve ters ilişki bulunmuştur.

3.3. Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Tanımlanması ve Karakterizasyonu

3.3.1. Antimikrobiyal aktiviteye sahip laktik asit bakteri izolasyonu ve tanımlanması

Toplam 86 adet (70 adet turşu ve 16 adet zeytin) örnekten materyal-metot bölümünde belirtildiği şekilde MRS-0.2 besiyeri içeren petri plaklarına ekim yapılmış ve 30°C'de anaerobik inkübasyonu takiben 5-100 koloni içeren petri kaplarında *L. sake* *Lb790* indikatör suşu kullanılarak antimikrobiyal aktivite testi gerçekleştirilmiştir. Bu

yöntem ile 4000'i aşkın koloni agar spot testine tabi tutulmuştur. Agar spot testi sonucu indikatör bakteriyeye karşı 0.5 mm veya daha fazla inhibisyon zonu veren koloniler inhibitör aktiviteye sahip koloniler olarak belirlenmiştir. Belirlenen kolonilerden MRS Broth'da geliştirme ve çizgi usulü ekim yöntemleri ile saf izolatlar elde edilmiş ve bunlardan Gram (+), katalaz (-), kok veya çubuk şekilli, spor oluşturmeyen bakteriler, antimikrobiyal aktiviteli muhtemel laktik asit bakterileri olarak seçilmiş ve saklanmıştır (Çon 1995). Örnek alımları tamamlandıktan sonra tüm izolatlar, agar spot testi kullanılarak tekrar antimikrobiyal aktivite testine tabi tutulmuşlar ve içlerinden en iyi aktiviteye sahip 16 adedi seçilerek tanımlanmıştır.

İzolatların tanımlanması bölüm 2.2.8'de anlatılan yöntemlere göre yapılmıştır. Tanımlama testleri sonucu izole edilen 16 adet saf kültürün 13 tanesi *L.plantarum*, 3 tanesi *L.pentosus* olarak tanımlanmıştır. Bu antimikrobiyal aktiviteli 16 adet izolatın temel özellikleri ve izolasyon kaynağı Tablo 3.3'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre ülkemizde turşu florasında bulunan antimikrobiyal aktiviteli laktik asit bakterilerinin ağırlıklı olarak *L.plantarum*'dan oluştuğunu söyleyebiliriz. Zeytinden izole edilen antimikrobiyal aktiviteli tek bakteri ise *L.pentosus 6*'dır.

Tablo 3.3 İzolatların temel özellikleri ve izolasyon kaynakları *

İzolatlar	Gram Boyama	Katalaz	Arginin Hidrolizi	Glukozdan Gaz Üretimi	Morfoloji	İzolasyon Kaynağı
<i>L.plantarum 2</i>	+	-	-	-	basil	Kırmızıbiber Turşusu
<i>L.plantarum 3</i>	+	-	-	-	basil	Fasulye Turşusu
<i>L.pentosus 5</i>	+	-	-	-	basil	Karışık Turşu
<i>L.pentosus 6</i>	+	-	-	-	basil	Yeşil Zeytin
<i>L.plantarum 9</i>	+	-	-	-	basil	Sauerkraut
<i>L.plantarum 11</i>	+	-	-	-	basil	Sauerkraut
<i>L.plantarum 12</i>	+	-	-	-	basil	Sauerkraut
<i>L.pentosus 13</i>	+	-	-	-	basil	Pancar Dalı Turşusu
<i>L.plantarum 18</i>	+	-	-	-	basil	Hıyar Turşusu
<i>L.plantarum 19</i>	+	-	-	-	basil	Üzüm Turşusu
<i>L.plantarum 21</i>	+	-	-	-	basil	Sauerkraut
<i>L.plantarum 22</i>	+	-	-	-	basil	Karışık Turşu
<i>L.plantarum 24</i>	+	-	-	-	basil	Karışık Turşu
<i>L.plantarum 24a</i>	+	-	-	-	basil	Karışık Turşu
<i>L.plantarum 25</i>	+	-	-	-	basil	Biber Turşusu
<i>L.plantarum 66</i>	+	-	-	-	basil	Domates Turşusu

*: +: var; -: yok

Literatür verilerine göre *L.plantarum*, Sanchez vd (2001), Tassou vd (2002), Leal-Sanchez vd (2003) tarafından zeytin, Gardner vd (2001), Johanningsmeimer vd (2004) tarafından turşu örneklerinden, *L.pentosus* ise Sanchez vd (2001) tarafından zeytin örneğinden izole edilmiştir. Bu veriler araştırma sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

3.3.2. Antimikrobiyal aktivite spektrumu

Turşu ve fermente zeytin örneklerinden izole edilen ve antimikrobiyal aktivitesine göre seçilerek tanımlanan laktik asit bakterilerinin *L.sake Lb790*, *L.monocytogenes Li1*, *L.monocytogenes Li6*, *E.feacium*, *E.coli*, *Y.lipolitica*, *P.vulgaris* ve *A.hydrophila* indikatör mikroorganizmalarına karşı agar spot testi kullanılarak belirlenen antimikrobiyal aktivite spektrumu Tablo 3.4’de, bazı *L.plantarum* izolatlarının *L.sake Lb790* ve *L.monocytogenes Li1*’e karşı agar spot testi fotoğrafı ise Şekil 3.1’de verilmiştir.

Araştırmada seçilen *L.plantarum* izolatlarının *L.sake Lb790*’a karşı 7 adedi yüksek, 6 adedi orta düzeyde inhibitör aktivite, *L.pentosus* izolatlarının ise birisi yüksek, diğeri orta düzeyde inhibitör aktivite göstermiştir. Çalışmada *L.sake Lb790*’a karşı elde edilen inhibitör aktivite Şimşek (2003) tarafından ekşi hamurdan ve Yaman vd (1998) tarafından sucuktan izole edilen *L. plantarum* suşlarıyla benzer, Çon ve Gökalp (2000) tarafından sucuktan elde edilen *L.plantarum* izolatlarının gösterdiği inhibitör etkiden ise düşüktür.

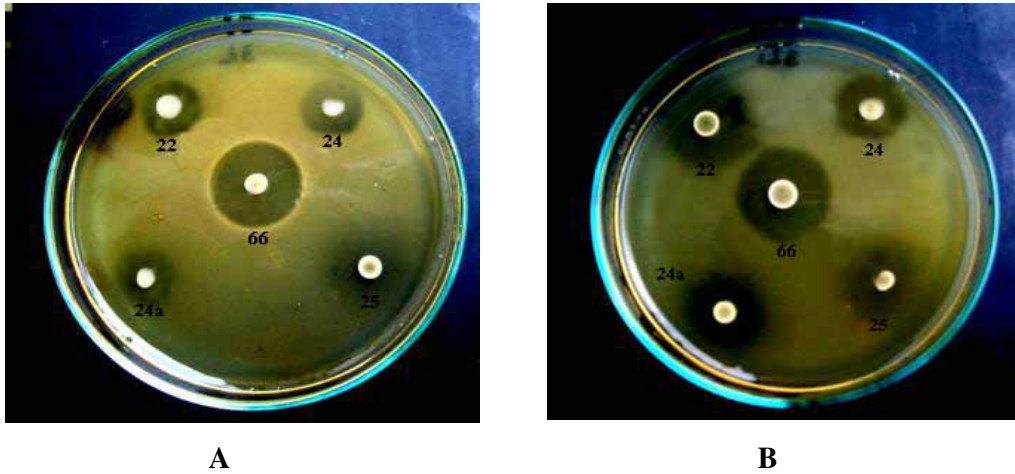
Turşu ve zeytinden izole edilen *L.plantarum* izolatlarının *L.monocytogenes Li1* indikatör suşuna karşı bir tanesi yüksek, bir tanesi zayıf, 11 tanesi orta, *L.monocytogenes Li6* suşuna karşı ise bir tanesi zayıf, diğerleri orta düzeyde inhibitör etki göstermiştir. *L.pentosus* izolatlarının üçü de *L.monocytogenes Li1* ve *Li6* suşlarına karşı orta düzeyde inhibitör etkili olarak saptanmıştır. Santos vd (2003) izole ettikleri *L.plantarum* suşlarının *L.monocytogenes*’e karşı inhibitör etki gösterdiğini, Klingberg vd (2005) *L.plantarum* izolatlarının birinin orta derecede inhibitör etkili, diğer *L.plantarum* izolatları ile *L.pentosus* izolatlarının ise düşük inhibitör etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Tablo 3.4 İzolatların antimikrobiyal aktivite spektrumu*

İzolatlar	<i>L.sake Lb790</i>	<i>L.monocytogenes Li1</i>	<i>L.monocytogenes Li6</i>	<i>E.feacium</i>	<i>E.coli</i>	<i>Y.lipolitica</i>	<i>P.vulgaris</i>	<i>A.hydrophila</i>
<i>L.plantarum 2</i>	+++	++	++	+	++	-	+	+
<i>L.plantarum 3</i>	+++	++	++	-	+	-	+	-
<i>L.pentosus 5</i>	+++	++	++	++	+	-	+	-
<i>L.pentosus 6</i>	++	++	++	+	-	-	+	-
<i>L.plantarum 9</i>	++	++	++	+	++	-	+	+
<i>L.plantarum 11</i>	++	++	++	+	++	-	+	-
<i>L.plantarum 12</i>	+++	++	++	+	+	-	++	-
<i>L.pentosus 13</i>	++	++	++	+	++	-	+	-
<i>L.plantarum 18</i>	++	++	++	+	++	-	+	-
<i>L.plantarum 19</i>	++	++	++	++	++	-	+	+
<i>L.plantarum 21</i>	++	++	++	++	++	-	+	+
<i>L.plantarum 22</i>	+++	++	++	++	++	-	++	+
<i>L.plantarum 24</i>	++	+	+	-	++	-	+	-
<i>L.plantarum 24a</i>	+++	++	++	+	++	-	+	+
<i>L.plantarum 25</i>	+++	++	++	++	+	-	+	+
<i>L.plantarum 66</i>	+++	+++	++	+++	-	-	+	++

*: -:<0.5 mm; +:0.5-1.0 mm arası (zayıf etki); ++:1.1-3.0 mm arası (orta etkili); +++:>3.0 mm (yüksek etkili)

Yaman vd (1998) tarafından izole ettikleri üç *L.plantarum* suşunun *L.monocytogenes* Li6'ya karşı agar spot tesitinde birisinin yüksek, ikisinin ise zayıf inhibitör etki gösterdiği, Çon ve Gökalp (2000) tarafından da *L.plantarum* izolatlarının *L.monocytogenes* Li6'ya karşı %16'sının orta dereceli, %79'unun düşük dereceli inhibitör etkili, %5'inin ise etkisiz olduğu belirtilmiştir. Araştırmada elde edilen sonuçlar; *L.plantarum*'un literatür verileri ile paralel olarak *L.monocytogenes*'e karşı az da olsa yüksek aktiviteli suşları bulunmakla birlikte, genelde orta ve düşük aktiviteli suşlara sahip olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 3.1 *L.plantarum* 22, 24, 24a, 25 ve 66'nın antimikrobiyal aktivitesi.

A: *L.sake* Lb790'a karşı; **B:** *L.monocytogenes* Lil'e karşı

Gıdalarda önemli indikatör bakterilerden olan *E.coli*'ye karşı *L.plantarum* izolatlarının 9 adedi orta, 3 adedi zayıf antimikrobiyal aktivite gösterirken 1 adedi ise etkisiz bulunmuştur. *L.pentosus* izolatlarından ise birisi orta, birisi zayıf inhibitör etkili diğeri ise etkisizdir. Bu sonuçlar izolatların inhibitör aktivitesinin Şimşek vd'nin (2006) *L.plantarum* suşlarında belirlediği inhibitör aktiviteden daha yüksek olduğunu, Çon ve Gökalp'in (2000) *L.plantarum* izolatları, Santos vd'nin (2003) *Lactobacillus* izolatları ile Klingberg vd'nin (2005) *L.plantarum* ve *L.pentosus* suşlarıyla benzer olduğunu göstermiştir.

Araştırmada turşu ve zeytinden izole edilen hiç bir *L.plantarum* ve *L.pentosus* *Y.lipolitica*'ya karşı inhibitör aktivite göstermemiştir. Diğer araştırmacılar tarafından ise *L.plantarum* ve *L.pentosus*'un *Y.enterocolitica*'ya karşı inhibitör aktivitesi test edilmiştir. Bu çalışmalarda, Klingberg vd (2005) tarafından, *L.plantarum* izolatlarının

Yenterocolitica'ya karşı bir tanesinin orta derecede inhibitör etki gösterirken, diğer *L.plantarum* ve *L.pentosus* izolatlarının düşük inhibitör etki gösterdiği belirtilmiştir. Çon ve Gökalp (2000) tarafından da sucuktan izole edilen *L.plantarum* suşlarının bu mikroorganizmaya karşı %48'inin düşük, %36'sının orta derecede inhibitör etkili, %16'sının etkisiz olduğu belirtilmiştir.

Turşu ve zeytinden izole edilen *L.plantarum*'ların *E.feacium*'a karşı 1 adedi yüksek, 4 adedi orta, 6 adedi zayıf inhibitör etkili, 2 adedi ise etkisiz, *P.vulgaris*'e karşı 2 adedi orta, 12 adedi zayıf inhibitör etkili, *A.hydrophila*'ya karşı da 1 adedi orta, 7 adedi zayıf inhibitör etkili, 6 adedi de etkisiz olarak saptanmıştır. *L.pentosus* izolatlarından ise *E.feacium*'a karşı birisi orta, ikisi zayıf, *P.vulgaris*'e karşı üçü de zayıf inhibitör etkili, *A.hydrophila*'ya karşı ise üçü de inhibitör etkisiz olarak belirlenmiştir.

3.3.3. Farklı sıcaklıklarda gelişme

Turşu ve zeytinden izole edilen *L.plantarum* ve *L.pentosus* izolatlarının 10, 15 ve 45°C'de gelişme yetenekleri Tablo 3.5'de verilmiştir. 10°C'de yalnızca *L.plantarum* 11 zayıf gelişme göstermiş, diğer izolatlar gelişmemiştir. 15°C'de sadece *L.plantarum* 18 zayıf olmak üzere tüm *L.plantarum* ve *L.pentosus* izolatlar gelişmiştir. 45°C'de ise 7 adet *L.plantarum* izolatu gelişmemiş, birisi zayıf olmak üzere diğer 6 izolat ise gelişmiştir. *L.pentosus* izolatlarının birisi gelişmemiş, diğer ikisi gelişmiştir.

Carr vd (2002) *L.plantarum* suşlarının 15°C'de gelişebildiğini, fakat 45°C'de gelişme göstermediklerini, Tamang vd (2005) fermente sebze ürünlerinden elde ettiği *L.plantarum* izolatlarının hepsinin 15°C'de geliştiğini fakat 45°C'de yalnızca %18'inin geliştiğini bildirmişlerdir. Sanchez vd (2000) çalışmasında izole edilen *L.plantarum* ve *L.pentosus* suşlarının 15°C ve 45°C'de gelişebildiklerini fakat 5°C'de gelişme göstermediğini, Badis vd (2004) de araştırmasında denediği 2 adet *L.plantarum* izolatının 10 ve 15°C'de geliştiğini, fakat 45°C'de gelişme göstermediğini belirtmişlerdir. Bu literatür verileri ile kıyaslandığında 15°C'de gelişme açısından tam bir uyum olduğu, ancak 45°C'de gelişme açısından bu çalışmada elde edilen *L.plantarum*'ların Carr vd (2002), Tamang vd (2005) ve Badis vd (2004) tarafından verilen değerlerden daha yüksek oranda gelişme gösterdikleri ortaya konulmuştur.

Tablo 3.5 İzolatların farklı sıcaklık, pH ve tuz değerlerinde gelişme sonuçları*

İzolatlar	Sıcaklık			pH Değeri				Tuz Oranı (%)				
	10°C	15°C	45°C	3.0	3.5	4.0	9.6	3.0	5.0	6.5	8.0	9.0
<i>L.plantarum 2</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	zayıf	-
<i>L.plantarum 3</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L.pentosus 5</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L.pentosus 6</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>L.plantarum 9</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>L.plantarum 11</i>	zayıf	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>L.plantarum 12</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>L.pentosus 13</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 18</i>	-	zayıf	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>L.plantarum 19</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>L.plantarum 21</i>	-	+	zayıf	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>L.plantarum 22</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 24</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>L.plantarum 24a</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>L.plantarum 25</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>L.plantarum 66</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

*: +: Gelişme Var; -: Gelişme Yok; zayıf: Zayıf Gelişme Var

3.3.4. Farklı pH değerlerinde gelişme

İzolatlar önceden hazırlanmış ve pH değeri 3.0, 3.5, 4.0 ve 9.6 pH'ya ayarlanmış MRS Broth besiyerlerine ekildikten sonra 30°C inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda pH 3.0, 3.5 ve 4.0'te bütün izolatlar, pH 9.6'da da *L.plantarum 12* ve *L.pentosus 6* numaralı izolatlar dışındaki bütün izolatlar gelişme göstermişlerdir (Tablo 3.5).

Santos vd (2003) ve Klingberg vd (2005) yaptıkları çalışmalarda *L.plantarum* suşlarının pH 2.5'de yaşamlarını sürdürebildiklerini, fakat çoğalamadıklarını saptamışlardır. G-Alegria vd (2004) çalışmalarında izole etikleri *L.plantarum* suşlarının tümünün pH 3.6, 3.3 ve 3.2'de kontrol örneğe göre %50'nin üzerinde çoğalma gösterdiğini saptamışlardır. Özyıldız (2001) *L.plantarum* suşunun 4.5, 6.5, 7.5 ve 8.5 pH'da, 20 saat sonunda gelişiminin birbirine çok yakın değerlerde olduğunu, McDonald vd (1990) de *L.plantarum* ve *L.mesenteroides*'in pH 4.5-7.0 arasında rahatlıkla gelişme gösterdiğini belirtmişlerdir.

Araştırmada turşu ve zeytinden elde edilen izolatların pH 3.0'e kadar tümünün gelişme göstermesi yukarıda verilen literatür bilgileri ile uyum içerisindedir. İzolatların elde edildikleri ve ileride starter kültür olarak kullanılması düşünülen turşu ve zeytin ortamları dikkate alındığında, düşük pH değerlerinde gelişebilmeleri beklenen ve istenen bir özelliktir.

3.3.5. Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme

İzolatlardan önceden hazırlanmış %3, 5, 6.5, 8, 9 oranında NaCl ilave edilmiş MRS Broth besiyerlerine %1 oranında ekim yapılmış ve 30°C inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda gelişim incelenmiş ve turşu ile zeytinden elde edilen tüm izolatların %3, 5, 6.5 tuz oranlarında rahatlıkla geliştikleri, %8 tuzda *L.plantarum* 24, 24a ve *L.pentosus* 6 suşlarının, %9 tuzda da bunlara ilaveten *L.plantarum* 2, 9, 11, 12, 18, 19, 21 ve 25 suşlarının gelişme gösteremedikleri saptanmıştır (Tablo3.5).

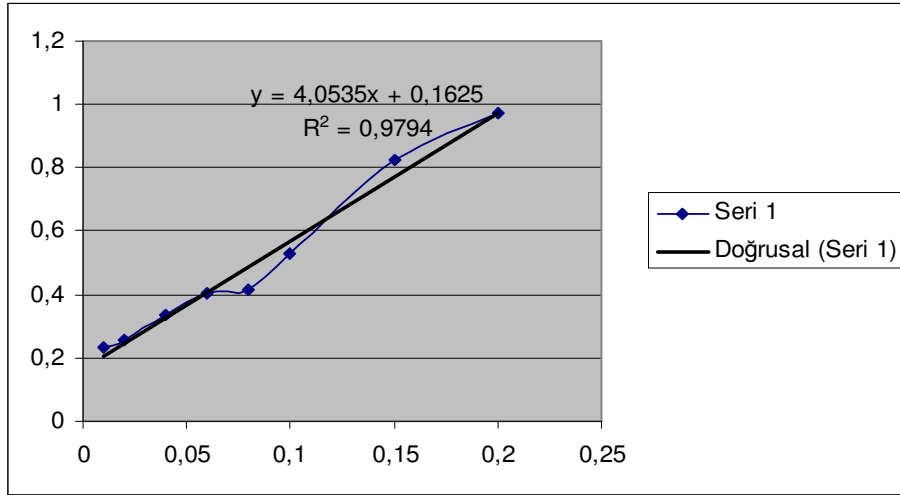
Sanchez vd (2000) tarafından izole edilen *L.plantarum* ve *L.pentosus* suşlarının %4, 6.5 ve 8 tuz oranlarında tümünün gelişme gösterdiği, Badis vd (2004) tarafından ise keçi sütünden izole edilen *L.plantarum* izolatlarının %2 ve %3 tuz konsantrasyonunda gelişme gösterdiği, fakat %4, %6.5 tuz konsantrasyonlarında gelişme göstermediği belirtilmiştir. Çalışmada izole edilen *L.plantarum* ve *L.pentosus* suşlarının tuza dayanıklılıkları benzer materyal kullanan Sanchez vd (2000) tarafından belirtilen değerlerle benzerlik göstermektedir.

Araştırmada elde edilen veriler turşu ve zeytin üretiminde önerilen %6-8 tuz oranında tüm izolatların rahatlıkla gelişebileceğini (*L.plantarum* 2, 24 ve 24a %8 tuzda gelişemiyor) göstermektedir. Bu durum izolatların turşu ve zeytin üretiminde starter olarak kullanılabilmesi için yeterlidir.

3.3.6. Proteolitik ve amilolitik aktivite

Proteolitik aktivite, mikroorganizmaların gelişmesi için gerekli aminoasitlerin protein ve peptidlerin parçalanması ile elde edilmesinde anahtar rol oynamaktadır. Ayrıca bu özellik sütçülük starter kültür özelliği içerisinde de önemli bir faktördür. Laktik asit bakterileri proteolitik aktivite açısından zayıftırlar (Kılıç 2001). Çalışmada izolatların

proteolitik aktivite sonuçları Şekil 3.2’de elde edilen standart kurveye göre hesaplanmış ve Tablo 3.6’da sunulmuştur.



Şekil 3.2 Tirosin standart kurvesi

Tablo 3.6 İzolatların proteolitik ve amilolitik aktivite değerleri *

İzolatlar	Proteolitik Aktivite (mg/ml tirosin)	Amilolitik Aktivite
<i>L.plantarum 2</i>	0.083	-
<i>L.plantarum 3</i>	0.063	-
<i>L.pentosus 5</i>	TE	TE
<i>L.pentosus 6</i>	0.060	-
<i>L.plantarum 9</i>	0.075	-
<i>L.plantarum 11</i>	0.060	-
<i>L.plantarum 12</i>	0.056	-
<i>L.pentosus 13</i>	0.069	-
<i>L.plantarum 18</i>	0.066	-
<i>L.plantarum 19</i>	0.056	-
<i>L.plantarum 21</i>	0.058	⊥
<i>L.plantarum 22</i>	0.073	⊥
<i>L.plantarum 24</i>	0.068	-
<i>L.plantarum 24a</i>	0.057	-
<i>L.plantarum 25</i>	0.066	-
<i>L.plantarum 66</i>	0.062	-

*: +: var; ⊥ : zayıf var; -: yok

İzolatlar içerisinde en yüksek proteolitik aktivite değerine *L.plantarum 2* suşunda (0.083 mg/ml tirosin) ulaşılmıştır. En düşük değer ise *L.plantarum 12* ve *19* izolatlarında (0.056mg/ml tirosin) bulunmuştur.

Çalışmada elde edilen proteolitik aktivite değeri Badis vd (2004) tarafından yapılan çalışmada *L.plantarum* için tespit edilen değerden (0.00256 mg/ml tirozin) oldukça yüksektir. Ancak Yüksekdağ vd (2004) tarafından kefirde izole edilen kok laktik asit bakterilerinin sahip olduğu proteolitik aktivite sınır değerleri (0.0-0.09 mg/ml tirozin) içerisinde bulunmaktadır. Yaman vd (1998) tarafından elde edilen *L.plantarum* izolatlarının proteolitik değerleri ise bu araştırma sonuçlarından (0.14-0.34 mg/ml tirozin) oldukça yüksek bulunmuştur.

Laktik asit bakterilerinin amilolitik aktivitesi, nişastadan enerji kaynağı olarak faydalanabilmesi açısından önem taşımaktadır. Bu özellik diğer mikroorganizmalarla enerji kaynağı açısından yarışmada LAB izolatlarına önemli bir avantaj sağlayabilmektir. Özellikle bağırsak sisteminde nişastayı parçalama yeteneğine sahip bakteriler diğerlerine göre avantajlı konuma sahip olurlar. Bu nedenlerle, şeker testlerinin gerçekleştirildiği temel sıvı besiyeri içerisinde karbon kaynağı olarak nişasta eklenerek bakterilerin nişastadan faydalanma yeteneği belirlenmiştir. Test sonucu; izolatlardan sadece *L.plantarum 21* ve *22* zayıf amilolitik aktiviteye sahip olarak tespit edilmiştir. Şimşek (2003) tarafından elde edilen üç *L.plantarum* izolatından ikisinde amilolitik aktivite görülmemiş yalnız bir adedinde aktivite tespit edildiği belirtilmiştir. Şimşek (2003) tarafından elde edilen değer oransal olarak bu çalışmada (%14.29) elde edilenden daha büyüktür. Bu durum, bahsedilen çalışmanın ekşi hamur izolatlarında yapılmış olmasıyla açıklanabilir.

3.3.7. Toplam asit üretme yeteneği

Turşu ve zeytinden elde edilen laktik asit bakterilerinin oluşturduğu toplam asit üretim miktarları ve pH değerleri Tablo 3.7’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre laktik asit bakteri izolatlarının 7. günde asit üretimleri (laktik asit cinsinden) en düşük %2.00 (*L.plantarum 2, 21, 22* ve *24*), en yüksek %2.15 (*L.plantarum 3,9,12* ve *L.pentosus 13*) olarak bulunmuş, tüm izolatların ortalaması ise %2.06 olarak hesaplanmıştır. Aynı günde pH değerleri ise en düşük 3.85 (*L.plantarum 2*), en yüksek 3.98 (*L.plantarum 19*), ortalama ise 3.94 olarak bulunmuştur. *L.plantarum 18* hariç (%78) diğer tüm izolatlar üretebilecekleri toplam asitliğin %80’den fazlasını 1. gün sonunda üretmişlerdir. Yine en düşük pH değerine de 1. gün sonunda ulaşılmıştır. Asitlik ise 7. gün de en yüksek değerine ulaşmıştır. İnkübasyonun son günlerinde asitlik değerinde

meydana gelen küçük düşüşlerin, ortamda gelişen mikroorganizmalarca üretilen tamponlama kapasitesine sahip metabolitler ve ölen hücrelerin otolizi sonucu ortama salıverilen hücre içeriğinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Tablo 3.7 İzolatların 7 günlük toplam asit üretimleri

İzolatlar	1.gün		2.gün		3.gün		4.gün		5.gün		7.gün	
	pH	%Asit	pH	%Asit	pH	%Asit	pH	%Asit	pH	%Asit	pH	%Asit
<i>L.plantarum 2</i>	3.25	1.90	3.60	1.95	3.79	1.90	3.93	1.95	3.92	1.85	3.85	2.00
<i>L.plantarum 3</i>	3.26	1.85	3.60	1.75	3.77	1.80	3.88	1.85	3.93	1.80	3.96	2.15
<i>L.pentosus 5</i>	TE*	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
<i>L.pentosus 6</i>	3.42	1.60	3.68	1.60	3.94	1.95	3.94	1.80	3.91	1.75	3.95	2.05
<i>L.plantarum 9</i>	3.28	1.95	3.58	1.75	3.76	2.00	3.91	1.95	3.93	1.85	3.93	2.15
<i>L.plantarum 11</i>	3.32	1.80	3.60	1.70	3.90	2.00	3.92	1.80	3.90	1.75	3.92	2.10
<i>L.plantarum 12</i>	3.26	1.80	3.61	1.55	3.90	1.95	3.90	1.75	3.94	1.70	3.94	2.05
<i>L.pentosus 13</i>	3.21	1.95	3.57	1.65	3.89	2.05	3.89	1.80	3.90	1.70	3.91	2.15
<i>L.plantarum 18</i>	3.25	1.60	3.60	1.55	3.93	2.00	3.93	1.80	3.94	1.70	3.95	2.05
<i>L.plantarum 19</i>	3.28	1.75	3.65	1.65	3.95	1.80	3.92	1.75	3.97	1.75	3.98	2.05
<i>L.plantarum 21</i>	3.28	1.80	3.61	1.65	3.93	1.90	3.93	1.75	3.95	1.65	3.95	2.00
<i>L.plantarum 22</i>	3.30	1.75	3.65	1.85	3.88	1.85	3.94	1.80	3.95	1.75	3.95	2.00
<i>L.plantarum 24</i>	3.74	1.75	3.64	1.30	3.94	1.90	3.95	1.45	3.97	1.45	3.97	2.00
<i>L.plantarum 24a</i>	3.27	1.80	3.23	1.40	3.93	1.95	3.94	1.75	3.96	1.70	3.97	2.05
<i>L.plantarum 25</i>	3.69	1.95	3.64	1.65	3.91	2.05	3.92	1.70	3.94	1.50	3.94	2.05
<i>L.plantarum 66</i>	3.32	1.70	3.61	1.55	3.94	1.65	3.96	1.70	3.98	1.55	3.97	2.10
Ortalama	3.34	1.80	3.59	1.64	3.89	1.92	3.92	1.78	3.94	1.70	3.94	2.06

*: TE: Tespit Edilmedi

Mumcu (1997) kefirde izole ettikleri *L.plantarum* suşlarının birinci gün % asit üretim miktarlarını 0.64, 0.26 ve 0.17(%) olarak bulmuştur. Şimşek ve Çon (2006) tarafından ekşi hamurdan izole edilen 3 *L.plantarum* izolatlarının 1.gün sonunda sırayla, 1.27, 1.00 ve 0.80(%); 7.gün sonunda ise 1.82, 1.77 ve 1.58(%) oranında asit ürettiğini belirtmişlerdir. Yaman vd (1998) tarafından sucuktan izole ettikleri 3 *L.plantarum* suşunun 1. günde laktik asit üretim miktarları 0.65, 1.02 ve 1.27(%); 7.gün sonunda ise 0.81, 1.44 ve 1.48(%) olarak tespit edilmiştir.

Sonuçlarımız literatür verileri ile değerlendirildiğinde, Mumcu'ya (1997) göre 1. gün oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum izolatların kaynağı ve özellikle test için aşılama oranındaki farklılıktan kaynaklanmış olabilir. Mumcu (1997) tarafından 7. gün sonuçları bulunmadığı için bir kıyaslama yapılamamıştır. Şimşek ve Çon (2006) ve Yaman vd (1998) verilerine göre elde edilen izolatların asitlik üretme

yetenekleri hem 1. hem de 7. gün daha yüksek bulunmuştur. Bu durumda izolatların kaynağının turşu ve zeytin olması nedeni ile doğal seleksiyona uğramalarından kaynaklanabilir. Turşu ve zeytinden elde edilen izolatların asit üretim hızı ve miktarının yüksek olması turşu ve zeytin üretimi için starter kültürde aranılan bu özelliklere sahip olduğunu göstermektedir.

3.3.8. β -Galaktosidaz testi

β -galaktosidaz intraselüler bir enzim olup, bakteri hücrelerinin ince bağırsaktan geçerken hücrenin otolize uğrayarak hücre duvarının parçalanması sonucu açığa çıkmaktadır (Cebeci ve Gürakan 2003). Laktozun sindiriminde görev alması nedeni ile özellikle laktoz intoleranslar için olmak üzere, metabolik önem taşımakta ve probiyotik bakterilerin seçiminde bir kriter olarak ele alınmaktadır. Bu araştırmada da turşu ve zeytinden elde edilen izolatların probiyotik değerinin ortaya konması için gerçekleştirilen β -galaktosidaz aktivite testi sonuçları Tablo 3.8’de verilmiştir. Elde edilen *L.plantarum* izolatlarının 9 tanesi ile *L.pentosus* 13 izolatının β -galaktosidaz aktivitesi pozitif, *L.plantarum* izolatlarının 3 tanesi zayıf pozitifdir. *L.plantarum* 3 ve *L.pentosus* 6 ise β -galaktosidaz aktivitesi bulunmamaktadır.

Papamanoli vd (2003) ile Randazzo vd (2004) elde ettikleri *L.plantarum* izolatlarının β -galaktosidaz aktivitelerini pozitif olarak tespit ettiklerini, Vinderola ve Reinheimer (2003) ise en fazla β -galaktosidaz aktivitesini *L.acidophilus* ve *L.delbrueckii subsp. bulgaricus*’un gösterdiğini belirtmişlerdir. Cebeci ve Gürakan (2003) ise yaptıkları çalışmada *L.plantarum* suşlarının β -galaktosidaz aktivitelerinin 0.005-2.854 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}/\text{cfu}$ arasında değiştiğini, *L.pentosus* suşunun ise 11.571 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}/\text{cfu}$ olduğunu saptamışlardır.

Çalışmada elde edilen sonuçlar Papamanoli vd (2003), Randazzo vd (2004) ve Cebeci ve Gürakan (2003) tarafından belirtilen literatür bilgileri ile paralellik göstermektedir.

Tablo 3.8 İzolatların β -Galaktosidaz aktivitesi

İzolatlar	B-Galaktozidaz Aktivitesi*
<i>L.plantarum 2</i>	+
<i>L.plantarum 3</i>	-
<i>L.pentosus 5</i>	TE
<i>L.pentosus 6</i>	-
<i>L.plantarum 9</i>	⊥
<i>L.plantarum 11</i>	⊥
<i>L.plantarum 12</i>	⊥
<i>L.pentosus 13</i>	+
<i>L.plantarum 18</i>	+
<i>L.plantarum 19</i>	+
<i>L.plantarum 21</i>	+
<i>L.plantarum 22</i>	+
<i>L.plantarum 24</i>	+
<i>L.plantarum 24a</i>	+
<i>L.plantarum 25</i>	+
<i>L.plantarum 66</i>	+

*: +: Var; -: Yok; ⊥ :Zayıf Aktivite; TE: Tespit Edilmedi

3.3.9. Hidrofobisite

Mikroorganizmaların intestinal epitel hücrelere yapışmasını açıklayan birkaç mekanizma vardır. Mikroorganizmaların en dıştaki yüzeyinin hidrofobik doğası o bakterinin konakçıya tutunması ile ilgilidir. Bu özellik, yarışmada avantaj sağlayabilmesi dolayısıyla bakterinin insan gastrointesitinal sisteminde varlığını devam ettirebilmesi için önemlidir. Mikroorganizmaların epitel hücrelere adezyonunu değerlendirmede bir araç olan, n-hekzadekana mikrobiyal adezyon geçerli bir kalitatif fenomonolojik yaklaşımdır (Vinderola ve Reinheimer 2003). Bu nedenle, probiyotik özelliklerin belirlenmesi için en önde gelen testlerden biri olan hidrofobisite analizi izolatlarımıza uygulanmış ve sonuçları Tablo 3.9’da verilmiştir.

Turşu ve zeytinden izole edilen laktik asit bakterilerinin hidrofobisite değerleri görüldüğü gibi %30.32 ve %80.07 arasında değişim göstermiştir. En yüksek hidrofobisite değerine *L.plantarum 3* (%80.07) sahiptir. Bu bakteriyi %77.01 ile *L.pentosus 13* ve %72.74 ile *L.plantarum 66* takip etmektedir. Vinderola ve Reinheimer (2003) tarafından yapılan çalışmada, izole ettikleri probiyotik suşların hidrofobisitesi %38.1 ve %68.7 arasında saptanmıştır. Bu çalışmadaki *L.acidophilus* (%38.1-%68.7) ve *B.bifidum* (%46.7-%64.7) suşlarının hidrofobik özellikleri elde ettiğimiz izolatların

aktiviteleri yakın olmakla birlikte, 5 adet izolatomuzun değerleri bu verilerden daha yüksektir. İzolatlar arasında en düşük hidrofobisite değerine sahip olan *L.plantarum 18* (%30.32) dahi Vinderola ve Reinhaimer'in (2003) izole ettiği *L.lactis* (%15.5-%31.3); *L.delbrueckii subsp.bulgaricus* (%5.86-%27.4), *Lc.casei* (%12.9-%24.1) ve *B.longum* (%22.5-%28.9) gibi probiyotik suşlardan daha yüksek hidrofobisite değerlerine sahiptir.

Tablo 3.9 İzolatların hidrofobisite değerleri

İzolat	% Hidrofobisite
<i>L.plantarum 2</i>	54.09
<i>L.plantarum 3</i>	80.07
<i>L.pentosus 5</i>	TE*
<i>L.pentosus 6</i>	45.70
<i>L.plantarum 9</i>	64.91
<i>L.plantarum 11</i>	49.98
<i>L.plantarum 12</i>	67.57
<i>L.pentosus 13</i>	77.01
<i>L.plantarum 18</i>	30.32
<i>L.plantarum 19</i>	33.33
<i>L.plantarum 21</i>	36.57
<i>L.plantarum 22</i>	59.95
<i>L.plantarum 24</i>	31.30
<i>L.plantarum 24a</i>	42.24
<i>L.plantarum 25</i>	52.66
<i>L.plantarum 66</i>	72.74

*: TE: Tespit Edilmedi

Savage (1992) tarafından insan, dana, fare, sıçan ve domuz sindirim sisteminden elde edilen laktik asit bakterilerinin hidrofobisite değerleri ortalama olarak; insan kaynaklı *L.acidophilus* suşları için %35, dana kaynaklı *L.reuteri* için %44, fare kaynaklı *L.fermentum* için %57.6, sıçan kaynaklı *L.murinus* için %81 ve domuz kaynaklı *L.acidophilus* ve *L.fermentum* için ise %17 olarak saptanmıştır. Ouwehand vd (1999) da ince bağırsaktan izole edilen *Lactobacillus* suşlarının yüksek hidrofobisite değerlerine sahip olduğunu bildirmiştir. Bu literatür verileri de, araştırmada elde edilen sonuçlardan biraz yüksek olmakla birlikte, diğer laktik asit bakterilerinin sonuçları ile çelişmediğini göstermektedir.

Bu sonuçlara dayanarak, turşu ve zeytinden elde ettiğimiz tüm izolatlarn hidrofobisite yönünden probiyotik olarak kullanılmaya uygun olduğu ifade edilebilir.

3.3.10. Hidrojen peroksit dayanıklılık

Hidrojen peroksit bakteriosidal bir bileşik olması nedeni ile bu bileşiğe dayanıklılık probiyotik mikroorganizmalarda üzerinde önemle durulan bir özelliktir. Bu nedenle, izolatların H₂O₂'ye dayanıklılıkları sırasıyla 2000, 10000 ve 20000 ppm oranında H₂O₂ içeren ortamda belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 3.10'da verilmiştir. Araştırmada test edilen en düşük H₂O₂ konsantrasyonunda (2000 ppm) *L.plantarum 9* ve *2* izolatlarının, sırasıyla, %13.60 ve % 7.50 ile en yüksek, *L.plantarum 19*'un ise en düşük gelişme oranına (%0.50) sahip olduğu tespit edilmiştir. *L.plantarum 9* ve *2* izolatları tüm konsantrasyonlarda da en dayanıklı izolat olarak belirlenmiştir. *L.pentosus* izolatlarının ise genel olarak *L.plantarum*'dan daha hassas oldukları çalışma sonucu rahatlıkla söylenebilmektedir.

Tablo 3.10 İzolatların hidrojen peroksit dayanıklılıkları*

İzolatlar	H ₂ O ₂ Konsantrasyonu		
	2000ppm	10000 ppm	20000 ppm
<i>L.plantarum 2</i>	%7.50	%6.10	%5.00
<i>L.plantarum 3</i>	%0.80	%0.36	%0.00
<i>L.pentosus 5</i>	TE**	TE	TE
<i>L.pentosus 6</i>	%0.41	%0.17	%0.00
<i>L.plantarum 9</i>	%13.60	%5.00	%2.00
<i>L.plantarum 11</i>	%4.00	%1.60	%0.64
<i>L.plantarum 12</i>	%1.20	%0.01	%0.00
<i>L.pentosus 13</i>	%0.60	%0.19	%0.00
<i>L.plantarum 18</i>	%0.70	%0.27	%0.00
<i>L.plantarum 19</i>	%0.50	%0.40	%0.36
<i>L.plantarum 21</i>	%0.70	%0.03	%0.00
<i>L.plantarum 22</i>	%0.80	%0.37	%0.20
<i>L.plantarum 24</i>	%0.70	%0.20	%0.00
<i>L.plantarum 24a</i>	%2.40	%0.60	%0.40
<i>L.plantarum 25</i>	%1.00	%0.10	%0.04
<i>L.plantarum 66</i>	%1.20	%0.45	%0.42
Ortalama	%2.41	%1.06	%1.13

* : % Gelişme Oranı

** : TE: Tespit Edilmedi

Shimamura vd (1992) probiyotik özellikleriyle bilinen *Bifidobacterium* cinsinin üyelerinden *B.longum*'un 10000 ppm'de ~%1 canlı kalma oranıyla bu bileşiğe karşı en hassas, *B.infantis*'in ise aynı konsantrasyonda ~%99 canlı kalma oranıyla en dayanıklı suş olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışma sonuçlarına göre 3 *L.plantarum* (2, 9 ve 11

nolu izolatlar) izolatu probiyotik tür *B.longum*'dan daha dayanıklı bulunmuştur. Ancak, *B.infactis*'e göre turşu ve zeytinden elde edilen izolatların H₂O₂'in bakterosidal etkisine karşı çok düşük direnç gösterdikleri belirlenmiştir.

3.3.11. Dondurma ve liyofilizasyona dayanıklılık

Turşu ve fermente zeytinlerden izole edilen suşlar 8.37-11.72 log cfu/ml, ortalama 10.32 log cfu/ml içecek şekilde liyofilizasyon ortamına eklenmiş, takiben dondurulmuş ve liyofilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Dondurma öncesi, dondurma sonrası ve liyofilizasyon sonrası sayım yapılmış ve işlemler sonrası % gelişme oranları hesaplanarak dondurma ve liyofilizasyona dayanıklılık belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.11'de verilmiştir.

Dondurmaya dayanıklılık testinde *L.plantarum* izolatlarının gelişme oranları %79.02-104.09 arasında, ortalama %90.22 olarak tespit edilmiştir. Dondurmaya en dayanıklı izolatlar *L.plantarum* 3 ve 18'dir. Bu izolatlarda gelişme oranı %100 değerinin üzerindedir. Benzer sonuçlar G-Allegria vd (2004) tarafından yapılan çalışmada da ortaya konulmuştur. En hassas olan izolat *L.plantarum* 66'dır (%79.02). *L.pentosus* izolatlarından ise *L.pentosus* 6 %107.53 ile en dayanıklı izolat iken *L.pentosus* 13 %84.51 ile *L.plantarum*'ların zayıf gelişenlerine yakın bir değerdedir.

Yapılan çalışmada liyofilizasyon sonrası *L.plantarum*'larda gelişme oranları %72.11-108.29 arasında, ortalama %92.35 olarak tespit edilmiştir. Liyofilizasyona en dayanıklı izolatlar olan *L.plantarum* 3, 2 ve 18'de gelişme oranı %100 değerinin üzerindedir. Bu sonuca, G-Allegria vd (2004) tarafından yapılan çalışmada da ulaşılmıştır. En dayanıksız izolat ise *L.plantarum* 66'dır. Dondurmaya karşı hassas olan izolatların liyofilizasyona da hassas olarak belirlenmesi, beklenen ve çalışmayı doğrular nitelikte bir sonuçtur. G-Alegria vd (2004) tarafından yapılan araştırmada elde edilen suşların liyofilizasyona dayanıklılıkları %90 olarak bulunmuştur. Bu oran çalışmada elde edilen sonuçlarla benzerdir. *L.pentosus* izolatlarının ise liyofilizasyona dayanıklılıkları *L.plantarum*'lara göre biraz daha düşük olarak belirlenmiştir. İlginç bir sonuç olarak *L.plantarum*'larda dondurmaya dayanıklılık değeri ve liyofilizasyon dayanıklılık değeri birbirine oldukça yakın ve liyofilizasyonlar genelde daha yüksek

iken; *L.pentosus*'larda dondurmaya göre liyofilizasyon değeri %10'dan fazla düşüş göstermiştir.

Tablo 3.11 İzolatların dondurma ve liyofilizasyona dayanıklılıkları

İzolatlar	Şahit	Dondurma		Liyofilizasyon	
	(logcfu/g)	(logcfu/g)	% Gelişme	(logcfu/g)	% Gelişme
<i>L.plantarum 2</i>	10.31	9.35	90.69	10.92	105.92
<i>L.plantarum 3</i>	9.29	9.67	104.09	10.06	108.29
<i>L.pentosus 5</i>	TE*	TE	TE	TE	TE
<i>L.pentosus 6</i>	8.37	9.00	107.53	7.06	84.35
<i>L.plantarum 9</i>	9.99	8.70	87.09	9.81	98.20
<i>L.plantarum 11</i>	11.12	9.42	84.71	10.39	93.44
<i>L.plantarum 12</i>	11.62	9.44	81.24	10.13	87.18
<i>L.pentosus 13</i>	10.78	9.11	84.51	7.94	73.65
<i>L.plantarum 18</i>	9.59	9.63	100.42	9.70	101.15
<i>L.plantarum 19</i>	11.72	9.65	82.34	9.79	83.53
<i>L.plantarum 21</i>	10.53	9.34	88.70	9.19	87.27
<i>L.plantarum 22</i>	10.14	9.29	91.62	9.53	93.98
<i>L.plantarum 24</i>	9.29	9.28	99.89	8.85	95.26
<i>L.plantarum 24a</i>	10.79	10.01	92.77	9.95	92.22
<i>L.plantarum 25</i>	9.68	TE *	TE	7.94	82.02
<i>L.plantarum 66</i>	11.58	9.15	79.02	8.35	72.11
Ortalama	10.32	9.36	91.04	9.30	90.57

*: TE: Tespit Edilmedi

Dondurmaya ve liyofilizasyona dayanıklılık testi starter kültür veya probiyotik olarak kullanılması amaçlanan laktik asit bakterileri için çok önemli bir kriterdir. Klingberg vd (2005) yaptıkları çalışmada elde ettikleri liyofilize *L.plantarum* izolatlarının 37°C'de gelişme gösterdiğini belirtmişlerdir. Klingberg ve Budde (2006) da gönüllü insanlara liyofilize *L.plantarum* kültürlerinden yapılan fermente sucukların yedirilmesi sonucu bu insanların dışkısında canlı *L.plantarum* (cfu/g) sayısını; sucuklar yendikten 18 gün sonra ortalama 15.6×10^5 cfu/g, 24 gün sonra 9.5×10^5 cfu/g ve 30 gün sonra ise 5.8×10^5 cfu/g olarak saptamışlardır. Sonuç olarak; Klingberg ve Budde (2006) liyofilize iki *L.plantarum* suşunun insan gastrointesitnal sisteminde yüksek canlılık gösterdiğini, hatta konakçıya spesifik davranışlar gösterdiğini belirtmişlerdir. Zhao ve Zhang (2005) yaptıkları çalışmada *L.brevis* izolatını hızlı bir şekilde -65°C 'ye

soğutmuşlar ve %65.2 oranında canlı kaldığını, fakat yavaş bir şekilde -20°C 'ye soğutma ile %46.4 oranında canlı kaldığını tespit etmişlerdir. Araştırmada elde edilen veriler hem *L.plantarum* hem de *L.pentosus* izolatlarının dondurma ve liyofilizasyon yöntemleri ile rahatlıkla saklanabileceği ve probiyotik starter olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

3.3.12. Safra tuzuna dayanıklılık

İnsan safra içeriğinin fizyolojik konsantrasyonu %0.3-0.5 arasında değişim göstermektedir. Bundan dolayı safra tuzlarının probiyotik bakterilere etkilerinin incelenip, değerlendirilmesi önemli bir seçim kriteridir (Vinderola ve Reinheimer 2003). Probiyotik suşların seçiminde %0.3 safra tuzuna dayanıklılık ayırt edici bir özellik olarak vurgulanmaktadır (Klingberg vd 2005). Bundan hareketle izolatların katı ve sıvı besiyeri ortamlarında iki farklı yöntemle safra tuzuna (oxbile) dayanıklılıkları test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.12 ve 3.13'de verilmiştir.

Tablo 3.12 İzolatların oxbile içeren MRS agar ve brothda gelişme sonuçları*

İzolatlar	Katı Besiyerinin Oxbile İçeriği						Sıvı Besiyerinin Oxbile İçeriği				
	%0.3	%0.5	%1.0	%2.0	%3.0	%4.0	%2.5	%3.0	%4.0	%5.0	%7.0
<i>L.plantarum 2</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 3</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L.pentosus 5</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L.pentosus 6</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 9</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 11</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 12</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L.pentosus 13</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 18</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 19</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 21</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 22</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 24</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 24a</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 25</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 66</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*: +: Gelişme Var; -: Gelişme Yok

Farklı oranlarda oxbile içeren besiyerlerinde gerçekleştirilen inkübasyon sonunda tüm *L.plantarum* ve *L.pentosus* izolatlarının %7 oxbile içeren besiyerinde gelişebildiği saptanmıştır (Tablo 3.12).

Tablo 3.13 İzolatların farklı oranda oxbile içeren besiyerinde farklı sürelerde saptanmış gelişme sonuçları

İzolatlar	Oxbile İçeren Besiyerinde % Gelişme Oranları					
	10 saat		20saat		30saat	
	%1.0 oxbile	%4.0 oxbile	%1.0 oxbile	%4.0 oxbile	%1.0 oxbile	%4.0 oxbile
<i>L.plantarum 2</i>	72.54	21.99	103.04	87.47	106.79	99.90
<i>L.plantarum 3</i>	0.54	0.07	3.10	2.82	60.79	21.01
<i>L.pentosus 5</i>	0.39	0.06	29.19	7.27	82.58	75.74
<i>L.pentosus 6</i>	0.00	0.00	0.37	0.00	2.94	1.31
<i>L.plantarum 9</i>	79.58	48.78	108.51	90.24	110.50	100.70
<i>L.plantarum 11</i>	78.14	39.86	105.37	91.41	114.76	103.48
<i>L.plantarum 12</i>	117.54	50.58	106.98	87.86	111.05	98.55
<i>L.pentosus 13</i>	0.40	0.57	53.00	26.28	83.77	75.38
<i>L.plantarum 18</i>	57.02	43.89	95.36	86.99	106.79	99.18
<i>L.plantarum 19</i>	47.47	35.77	89.44	84.63	95.13	89.61
<i>L.plantarum 21</i>	66.12	42.29	101.99	87.79	110.22	98.52
<i>L.plantarum 22</i>	46.77	29.13	79.27	62.73	81.30	66.14
<i>L.plantarum 24</i>	7.89	0.87	62.34	0.24	73.74	2.56
<i>L.plantarum 24a</i>	26.34	15.33	72.52	48.55	85.44	77.80
<i>L.plantarum 25</i>	64.28	40.71	98.75	84.37	105.36	98.52
<i>L.plantarum 66</i>	14.71	0.33	48.78	39.68	65.72	48.88

Santos vd (2003) elde ettikleri probiyotik *L.plantarum* suşlarının her ikisinin de %0.3 safra tuzunda canlılıklarını sürdürebildiklerini fakat çoğalamadıklarını, Jin vd (1998) ile Klingberg vd (2005) izole ettikleri probiyotik suşların %0.3 safra tuzuna dayanıklı olduklarını belirtmişlerdir. Park vd (2006) de sindirim sisteminden izole edilmiş *L.acidophilus*'un %3 safra tuzunda rahatlıkla gelişebildiğini, fakat %5 konsantrasyonda mikroorganizma sayısında hızlı bir düşüş gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Papamanoli vd (2003) yaptıkları çalışmada safra tuzlarına en dayanıklı probiyotik suşun *L.plantarum* olduğunu belirtmişlerdir. Kim vd (2001) tarafından da probiyotik *L.acidophilus*'un sıcaklık, safra ve tuz gibi stres değerlerine durağan fazdaki kültürlerinin, logaritmik gelişme fazında olan kültürlerden daha dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Bu literatür verileri ışığında araştırmada elde edilen izolatların safra tuzuna dayanıklılıklarının probiyotik kültür için yeterli düzeyde olduğu söylenebilmektedir.

Elde edilen izolatların farklı oranda safra tuzu içeren ortamlarda gelişme kayıpları sıvı besiyerinde de belirlenmiştir. Tablo 3.13'de verilen sonuçlara göre; %1.0 ve %4.0

oxbile içeren besiyerlerinde 10. saatte *L.plantarum* 2, 9, 11, 12, 18, 19, 21, 22, 24a ve 25 diğerlerinden belirgin oranda yüksek gelişme göstermiştir. *L.plantarum* 3, 24 ve 66 ise az gelişme gösteren grubu oluşturmuştur. Aynı saatte *L.pentosus* izolatlarının üçünüde her iki oxbile konsantrasyonunda da iyi gelişemediği tespit edilmiştir.

20. saatte %1.0 ve %4.0 oxbile içeren besiyerlerinde yine *L.plantarum* 2, 9, 11, 12, 18, 19, 21, 22, 24a ve 25 belirgin şekilde diğerlerinden iyi gelişmiştir. Aynı saatte %1.0 oxbile'da *L.plantarum* 3 ve %4.0 oxbile'da da *L.plantarum* 3 ve 24 az gelişen grup içerisinde yer almıştır. *L.pentosus*'lar açısından değerlendirme yapıldığında; *L.pentosus* 5'in her iki oranda da iyi gelişemezken, diğer 2 *L.pentosus* izolatının %75'in üzerinde gelişme oranına sahip bulunduğu saptanmıştır.

30. saatte ise; %1 oxbile içeren besiyerinde tüm *L.plantarum* izolatları %60 değerinin üzerinde gelişme oranına sahip bulunmuşlardır. %4 oxbile'da da *L.plantarum* 3 ve 66 bu değer altında gelişme göstermiştir. Aynı saatte *L.pentosus* 5 her iki oranda da iyi gelişemezken, diğer 2 *L.pentosus* izolatı %75'in üzerinde gelişme oranına sahip bulunmuştur.

Vinderola ve Reinhemier (2003) tarafından yapılan araştırmada %1 safra tuzunda *L.acidophilus* izolatları ortalama %73.14, *L.casei* izolatları ortalama %51.70 ve *L.rhamnosus* izolatları ise %56.1 gelişme göstermiştir. Bu literatür verisi ile kıyasladığımızda %1 oxbile içeren besiyerinde gelişme oranının sadece 3 izolatta *L.acidophilus*'larda elde edilen maximum değer altında olduğu görülmektedir.

Araştırma sonucu gerek sıvı ve katı besiyerinde gelişme varlığı, gerekse de sıvı besiyerinde gelişme oranları sonuçlardan yola çıkarak, turşu ve zeytinden elde edilen izolatların tümünün safra tuzuna karşı literatür verilerine göre oldukça dayanıklı olduğu ve *L.pentosus* 6 dışındaki tüm izolatların safraya dayanıklılık açısından probiyotik olarak kullanılabilceği söylenebilmektedir.

3.3.13. Gastrik suya dayanıklılık

Her gün mide içinde bir çok mikroorganizmanın ölümüne sebep olan yaklaşık 2.0 pH'da 2.5 litre mide suyu salgılanmaktadır. Bundan dolayı insanlarda meydana gelen

gastrik taşımaya dayanıklılık probiyotik mikroorganizmaların seçiminde önemli bir kriter olmaktadır. Probiyotik bakterilerin mideden canlılıklarını koruyarak geçebilmeleri suşların çeşidine ve elde edilmiş yoluna bağlı bulunmaktadır (Vinderola ve Reinheimer, 2003). Bu bilgidен hareketle elde edilen izolatların mide suyuna dayanıklılıkları 2 pH ve 3 pH değerlerinde belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 3.14’de verilmiştir.

Araştırmada 3 pH’ya sahip gastrik solusyonda 3 saat inkübasyondan sonra yapılan ekimde izolatların %57.73-78.77’si gelişme göstermişlerdir. En yüksek gelişme oranına sahip izolat *L.plantarum 3*’tür. (%78.77). En az gelişme gösteren ise *L.plantarum 24a* (%57.73) izolatıdır. pH 3’te gelişme oranında meydana gelen düşüş incelendiğinde; 1.55-4.13 log cfu/g arasında bir azalma olduğu görülmektedir. Vinderola ve Reinheimer’da (2003) yaptıkları çalışmada en iyi değere sahip izolatları olan *L.acidophilus*’da aynı pH da meydana gelen düşüşün 0.9-3.3 log cfu/g olduğunu saptamışlardır. Bu değerler çalışmada elde edilen izolatların diğer probiyotik laktik asit bakterileri ile benzer değerlere sahip olduğunu göstermektedir.

Tablo 3.14 İzolatların gastrik suya dayanıklılık sonuçları

İzolatlar	Kontrol Besiyeri	Gastrik Su					
		3 pH			2 pH		
		Log cfu/g	Düşüş Değeri	% Gelişme	Log cfu/g	Düşüş Değeri	% Gelişme
<i>L.plantarum 2</i>	7.45	5.85	1.60	78.52	<1	>6.0	0.00
<i>L.plantarum 3</i>	7.30	5.75	1.55	78.77	<1	>6.0	0.00
<i>L.pentosus 5</i>	7.97	5.32	2.65	66.75	<1	>6.0	0.00
<i>L.pentosus 6</i>	7.72	4.95	2.77	64.12	<1	>6.0	0.00
<i>L.plantarum 9</i>	7.48	5.85	1.63	78.21	<1	>6.0	0.00
<i>L.plantarum 11</i>	7.85	6.12	1.73	77.96	<1	>6.0	0.00
<i>L.plantarum 12</i>	7.58	5.68	1.90	74.93	<1	>6.0	0.00
<i>L.pentosus 13</i>	7.65	5.66	1.99	73.99	2.97	4.68	38.82
<i>L.plantarum 18</i>	8.00	5.79	2.21	72.38	1.40	>6.0	17.50
<i>L.plantarum 19</i>	9.62	5.72	3.90	59.46	3.41	>6.0	35.45
<i>L.plantarum 21</i>	9.81	5.68	4.13	57.90	2.68	3.13	27.32
<i>L.plantarum 22</i>	7.46	5.66	1.80	75.87	1.54	1.80	20.64
<i>L.plantarum 24</i>	9.57	5.60	3.97	58.52	<1	>6.0	0.00
<i>L.plantarum 24a</i>	9.44	5.45	3.99	57.73	<1	>6.0	0.00
<i>L.plantarum 25</i>	9.22	5.54	3.68	60.09	<1	>6.0	0.00
<i>L.plantarum 66</i>	8.47	5.68	2.79	67.06	1.70	>6.0	20.06

Araştırmada 2 pH'ya ayarlanmış gastrik solusyonda 3 saat inkübasyondan sonra yapılan ekimde ise yalnızca *L.pentosus* 13, *L.plantarum* 18, 19, 21 ve 22 numaralı izolatlar gelişebilmiştir. Geri kalan izolatlar hiç birisi gelişme gösterememiştir. Bunlar arasında en iyi gelişen %38.82 ile *L.pentosus* 13 ve %35.45 ile *L.plantarum* 19 numaralı izolatlardır. Vinderola ve Reinheimer (2003) tarafından yapılan çalışmada 2 pH'da *L.acidophilus*'un gelişimindeki düşüş 3.4-5.0 log cfu/gr olarak belirlenmiştir. Araştırmacının elde ettiği diğer izolatların çoğunda (*Lc.casei*, *Lc.rhamnosus*, *Lc.lactis*, *L.delbrueckii subsp. bulgaricus*) düşüş >6.0 olarak bulunmuştur. Klingberg vd (2005) de 2.5 pH'da *L.plantarum* ve *L.pentosus* izolatlarının 1-4 saat arasında rahatlıkla canlı kalma gösterdiğini belirtmişlerdir. Gardiner vd (1999) ise 2 pH değerine sahip mide suyunda probiyotik hücrelerin sayısının 5.5 dakika inkübasyon sonunda yaklaşık 15 kat azaldığını, 8 dakika sonunda ise canlı hücre kalmadığını belirtmiştir. Bu verilere göre 2 pH'daki gastrik sıvıda turşu ve zeytin izolatlarının gelişimindeki düşüşün Vinderola ve Reinheimer'in (2003) yaptıkları çalışmada *L.acidophilus*'a göre daha yüksek, fakat Lactococlar'a ve Gardiner vd'ye (1999) göre daha düşük olduğu ortaya konmuştur.

Bu sonuçlar, elde edilen tüm izolatların 3.0 pH'da önemli düzeyde canlı kaldıklarını, 2.0 pH'da özellikle *L.pentosus* 13, *L.plantarum* 18, 19, 21, 22 ve 66'nın (%17.50 ile %38.82) yüksek oranda canlı kaldığını, bundan dolayı probiyotik olarak rahatlıkla kullanılabileceğini göstermektedir

Turşu ve zeytin izolatlarında yapılan hidrofobisite ve mide suyuna tolerans değerleri yapılan korelasyon analizi sonucu birbirleriyle ilişkili bulunmuştur ($r=0.63$). İlişkinin pozitif olması probiyotik kültür seçimi açısından çalışanlara kolaylık sağlayabilecek bir sonuçtur.

3.3.14. Alkole dayanıklılık

İzolatlar %3, 7, 12, 13 ve 15 oranında etil alkol içeren 3 ml MRS Broth besiyerlerine %1 oranında aşılmalıdır. Örnekler 30°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda sadece *L.plantarum* 25 suşu %15 alkol içeren besiyerinde gelişmemiştir (Tablo 3.15). Diğer tüm izolatlar denenen tüm alkol konsantrasyonlarında gelişme göstermiştir.

Tablo 3.15 İzolatların alkole dayanıklılık sonuçları

İzolatlar	Alkol İçeriği				
	%3	%7	%12	%13	%15
<i>L.plantarum 2</i>	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 3</i>	+	+	+	+	+
<i>L.pentosus 5</i>	+	+	+	+	+
<i>L.pentosus 6</i>	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 9</i>	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 11</i>	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 12</i>	+	+	+	+	+
<i>L.pentosus 13</i>	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 18</i>	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 19</i>	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 21</i>	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 22</i>	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 24</i>	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 24a</i>	+	+	+	+	+
<i>L.plantarum 25</i>	+	+	+	+	-
<i>L.plantarum 66</i>	+	+	+	+	+

*: +: Gelişme Var; -: Gelişme Yok

G-Alegria vd (2004) yaptıkları çalışmada; *L.plantarum* izolatlarının tamamının %7, 12 ve 13 alkol içeren besiyerinde gelişme gösterdiğini tespit etmişlerdir. En düşük gelişme gösterilen oran olan %13 alkol içeren besiyerinde *L.plantarum* izolatlarının orijinal besiyerine göre gelişme oranları %22.5-53.7 arasında değişmiştir. Bu literatür verisine göre çalışmada elde edilen değerler beklenen sonuçlardır. Ancak %13 alkolde tüm izolatların gelişmesi nedeni ile gelişme oranı (%100) değer olarak G-Alegria vd (2004) tarafından verilen değerlerden daha yüksektir.

3.3.15. Antibiyotiğe dayanıklılık

Lactobacillus suşlarının antibiyotiklere dayanıklılığı hem starter kültür, hem de probiyotik özellik açısından büyük önem taşımaktadır. Bazı mikroorganizmalar bazı antibiyotiklere karşı spesifik özellik gösterebilmektedir. Örneğin ürogenital sistem enfeksiyonlarının tedavisinde bazı spesifik antibiyotiklere dirençli probiyotik laktik asit bakterileri başarılı sonuçlar vermektedir (Cebeci ve Gürakan 2003). Antibiyotiğe dayanıklılık genlerle ilişkilidir. Antibiyotik dayanıklılık genleri genelde konjugasyonla plazmidler aracılığıyla aktarılabilir (Cebeci ve Gürakan 2003). Bakterilerde antibiyotiklere dayanıklılığın gelişimi iki faktöre bağlıdır. Bunlardan ilki dayanıklılık

geninin bulunması, ikincisi ise antibiyotik kullanımı ile o antibiyotiğe karşı kendiliğinden direnç kazanılmasıdır (Mathur ve Singh 2005). Starter kültür olarak kullanılan probiyotik laktik asit bakterileri antibiyotiğe dayanıklı genlerin laktik asit bakterileri ile patojen bakteriler arasında transferi konusunda önemli bir konakçı görevi görmektedir. Tabi bu da önemli bir risk oluşturmaktadır (Mathur ve Singh 2005)

Turşu ve zeytinden elde edilen izolatların tetrasiklin, eritromisin, kloramfenikol, rifampisin, ampisilin, penicilin, polimiksin B, gentamisin, basitrasin, streptomisin, vankomisin, kanamisin ve neomisin antibiyotiklerine karşı dirençleri test edilmiş ve Charteris vd (1998) tarafından belirtilen hassasiyet değerlerine göre düzenlenmiş veriler Tablo 3.16’da sunulmuştur.

Tablo 3.16 İzolatların antibiyotiğe dayanıklılık sonuçları

İzolatlar	Antibiyotik Hassasiyet Testinde Kullanılan Antibiyotikler**												
	T	E	C	RA	AM	P	PB	GM	B	S	VM	K	N
<i>L.plantarum 2</i>	R*	MS	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>L.plantarum 3</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>L.pentosus 5</i>	R	R	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>L.pentosus 6</i>	R	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>L.plantarum 9</i>	R	MS	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>L.plantarum 11</i>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
<i>L.plantarum 12</i>	R	R	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>L.pentosus13</i>	R	R	MS	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>L.plantarum 18</i>	R	MS	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>L.plantarum 19</i>	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>L.plantarum 21</i>	R	R	S	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>L.plantarum 22</i>	R	R	MS	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>L.plantarum 24</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>L.plantarum 24a</i>	R	R	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>L.plantarum 25</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>L.plantarum 66</i>	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R

* : R: Dirençli; MS: Yarı Hassas; S: Hassas; TE: Tespit Edilmedi

** : T: tetrasiklin, E: eritromisin, C: kloramfenikol, RA: rifampisin, AM: ampisilin, P: penicilin, PB: polimiksin B, GM: gentamisin, B: basitrasin, S: streptomisin, VM: vankomisin, K: kanamisin, N: neomisin

Turşu ve zeytinden elde edilen izolatlarından *L.plantarum 66* dışında hepsinin tetrasikline karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Cebeci ve Gürakan (2003) elde ettiği 12 *L.plantarum* suşundan 11’inin ve 3 *L.pentosus* suşunun tetrasikline dirençli, 1 *L.plantarum* suşunun ise hassas olarak saptamıştır. Herreros vd (2005) izole ettikleri

L.plantarum'ların hepsinin ve Temmerman vd (2003) de izole ettikleri *L.plantarum* suşlarının %17'sinin tetrasikline dirençli olduğunu belirtmişlerdir Zhou vd (2005) izole ettiği *L.plantarum* suşunun, Charteris vd (1998) de *L.plantarum*, *L.acidophilus*, *L.casei*, *L.fermentum* ve *L.bulgaricus* suşlarının hassas olduğunu belirtmiştir.. Bu literatür verilerine göre; çalışmada izole edilen *L.plantarum*'ların tetrasikline dayanıklılığı Herreros vd (2005) ile aynı, Cebeci ve Gürakan (2003) tarafından bulunan sonuçlar ile yakınlık göstermektedir. Zhou vd (2005), Charteris vd (1998) ve Temmerman vd (2003) tarafından verilen sonuçlardan ise daha yüksek dayanıklılığa sahiptir.

Turşu ve zeytinden izole edilen *L.plantarum* izolatlarının eritromisine karşı %75'i, *L.pentosus* izolatlarının %67'si dirençli olarak tespit edilmiştir. Cebeci ve Gürakan (2003) tarafından 13 *L.plantarum* suşundan 11'i ve *L.pentosus* suşları eritromisine hassas, 2 *L.plantarum* suşu yarı hassas, Zhou vd (2005) tarafından izole edilen *L.plantarum* izolatu ile Charteris vd (1998) tarafından izole edilen *L.acidophilus*, *L.casei*, *L.fermentum* ve *L.bulgaricus* suşları hassas, *L.plantarum* suşu ise dirençli olarak tanımlanmıştır. Temmerman vd (2003) de izole ettikleri *L.plantarum* suşlarının %33'ünü eritrosine dirençli bulmuşlardır. Danielsen ve Wind (2003) de *L.plantarum* ve *L.pentosus* suşlarına eritrosinin minimal inhibisyon konsantrasyonunu 11 tanesinde 1mg/ml, 5 tanesinde 2 mg/ml ve 2 tanesinde ise 0.5 mg/ml olarak tespit edildiğini belirtmişlerdir. Çalışmada eritromisine karşı elde edilen direnç Charteris vd (1998) tarafından *L.plantarum* için verilen ile benzer, diğer literatür verilerindeki değerlere göre daha yüksektir.

Araştırmada, *L.plantarum* izolatlarının kloramfenikole karşı 3 tanesi hassas, 6 tanesi yarı hassas ve 3 tanesi dirençli; *L.pentosus* suşlarının da 2 tanesi yarı hassas, 1 tanesi de dirençli olarak saptanmıştır. Zhou vd (2005), Temmerman vd (2003) ve Herreros vd (2005) izole ettikleri *L.plantarum* suşlarının, Charteris vd (1998) de *L.plantarum*, *L.acidophilus*, *L.casei*, *L.fermentum* ve *L.bulgaricus* suşlarının kloramfenikole karşı hassas olduğunu bildirmişlerdir. Danielsen ve Wind (2003) yaptıkları çalışmada *L.plantarum* ve *L.pentosus* suşlarına kloramfenikol antibiyotiğinin minimal inhibisyon konsantrasyonu 11 tanesinde 4 mg/ml, 5 tanesinde 8 mg/ml ve 2 suşta ise 2 mg/ml olarak tespit edildiğini belirtmişlerdir. Bu verilere göre izole edilen *L.plantarum* izolatları kloramfenikole literatürlere nispeten daha dirençlidir.

Araştırmada rifampisine karşı *L.plantarum* izolatlarının %83'ü, *L.pentosus* izolatlarının ise 2 tanesi dirençli, 1 tanesi de yarı hassas olarak tespit edilmiştir. Cebeci ve Gürakan (2003) elde ettiği 13 *L.plantarum* suşundan 7'si rifampisine dirençli, 3 *L.plantarum* suşu yarı hassas, 3 *L.plantarum* suşu ve *L.pentosus* suşu hassas, yine Zhou vd (2005) *L.plantarum*, Charteris vd (1998) ise *L.plantarum*, *L.acidophilus*, *L.casei*, *L.fermentum* ve *L.bulgaricus* suşlarını hassas olarak saptamışlardır. Danielsen ve Wind (2003) yaptıkları çalışmada, *L.plantarum* ve *L.pentosus* suşlarına rifampisin minimal inhibisyon konsantrasyonu 4 tanesinde 2 mg/ml, 6 tanesinde 1 mg/ml, 5 tanesinde 0.5 mg/ml ve 3 suşta ise 0.25 mg/ml olarak tespit edildiğini belirtmişlerdir. Bu literatür verilerine göre rifampisine direnç Cebeci ve Gürakan'ın (2003) çalışmasına benzerlik göstermekte olup, diğer çalışmalarda elde edilenlerden yüksektir. Bu sonuç Türkiye'de rifampisine direncin gelişmiş olabileceğini de düşündürmektedir.

Turşu ve zeytinden elde edilen *L.plantarum* ve *L.pentosus* izolatlarından *L.plantarum* 66 dışında hepsi ampisiline dirençli olarak tespit edilmiştir. Cebeci ve Gürakan (2003) tarafından denenen 13 *L.plantarum* suşundan 4'ü ve *L.pentosus* suşu ampisiline dirençli, 3 *L.plantarum* suşu yarı hassas, 6 *L.plantarum* suşu hassas olarak belirtilmiştir. Charteris vd (1998) çalışmasındaki *L.plantarum*, *L.acidophilus* ve *L.casei* suşlarının, Herreros vd (2005) *L.plantarum* suşlarının ampisiline karşı dirençli olduğunu, Zhou vd (2005) ise izole ettiği *L.plantarum* suşunun hassas olduğunu belirtmiştir. Danielsen ve Wind (2003) yaptıkları çalışmada *L.plantarum* ve *L.pentosus* suşlarına eritrosinin minimal inhibisyon konsantrasyonu 2 tanesinde 2mg/ml, 3 tanesinde 1 mg/ml, 1 tanesinde 0.5 mg/ml, 3 tanesinde 0.25 mg/ml, 8 tanesinde 0.12 ve 1 tanesinde de 0.06 mg/ml olarak tespit edildiğini belirtmişlerdir. Turşu ve zeytin izolatlarının ampisiline direncin Herreros vd (2005) ile Charteris vd'nin (1998) çalışma sonuçları ile benzer, Cebeci ve Gürakan (2003) ile Zhou vd'nin (2005) çalışma sonuçlarından daha yüksek olduğu görülmektedir.

Araştırmada izole edilen *L.plantarum* ve *L.pentosus* izolatlarının hepsi penisiline karşı dirençli olarak tespit edilmiştir. Cebeci ve Gürakan (2003) tarafından denenen 13 *L.plantarum* suşundan penisiline karşı 3'ü dirençli, 10'u yarı hassas, *L.pentosus* ise hassas, Temmerman vd (2003) tarafından izole edilen *L.plantarum* suşlarının da %66'sı penisiline karşı dirençli bulunmuştur. Charteris vd (1998) çalışmasındaki *L.acidophilus* suşunun penisiline karşı dirençli, Zhou vd (2005) ise *L.plantarum* suşunun hassas

olduğunu belirtmiştir. Penisiline direncin; Cebeci ve Gürakan (2003), Temmerman vd (2003) ve Zhou vd (2005) tarafından bildirilene göre yüksek olduğu görülmektedir.

Çalışmada izole edilen tüm *L.plantarum* ve *L.pentosus* izolatları polimiksine karşı dirençli olarak tespit edilmiştir. Cebeci ve Gürakan'ın (2003) elde ettiği 13 *L.plantarum* suşundan 5'i dirençli, 1'i yarı hassas ve 7'si hassas, yine *L.pentosus* suşu da hassas olarak saptanmıştır. Charteris vd (1998) çalışmasındaki *L.plantarum*, *L.acidophilus*, *L.casei*, *L.fermentum* ve *L.bulgaricus* suşları ile Zhou vd'nin (2005) çalışmasındaki *L.plantarum* suşu polimiksine karşı dirençli olarak belirlenmiştir. Bu verilere göre polimiksine direnç Charteris vd (1998) ve Zhou vd (2005) ile benzer, Cebeci ve Gürakan'a (2003) göre daha yüksek bulunmuştur.

Turşu ve zeytinden izole edilen tüm *L.plantarum* ve *L.pentosus* izolatları gentamisine dirençli olarak tespit edilmiştir. Cebeci ve Gürakan'ın (2003) elde ettiği 13 *L.plantarum* suşundan 3'ü ve *L.pentosus* suşu dirençli, 10 *L.plantarum* suşu hassas etki göstermiştir. Charteris vd (1998) çalışmasındaki *L.plantarum*, *L.acidophilus*, *L.casei*, *L.fermentum* ve *L.bulgaricus* suşlarının, Zhou vd (2005) de *L.plantarum* suşunun gentamisine karşı dirençli bulunduğunu belirtmişlerdir. Danielsen ve Wind (2003) yaptıkları çalışmada *L.plantarum* ve *L.pentosus* suşlarına eritrosinin minimal inhibisyon konsantrasyonu 3 tanesinde 64 mg/ml, 10 tanesinde 32 mg/ml, 2 tanesinde 16 mg/ml, 3 tanesinde 8mg/ml olarak tespit edildiğini belirtmişlerdir. Bu antibiyotiğe direnç Charteris vd (1998) ve Zhou vd (2005) ile benzer, Cebeci ve Gürakan'ın (2003) çalışmasındaki düzeyden daha yüksektir.

Turşu ve zeytinden izole edilen *L.plantarum* ve *L.pentosus* izolatlarının tümü basitrasine dirençli olarak tespit edilmiştir. Cebeci ve Gürakan'ın (2003) elde ettiği 13 *L.plantarum* suşu ve bir adet *L.pentosus* suşunun, Charteris vd (1998) de *L.plantarum*, *L.acidophilus* ve *L.casei* suşlarının basitrasine karşı dirençli olduğunu saptamıştır. Danielsen ve Wind (2003) yaptıkları çalışmada *L.plantarum* ve *L.pentosus* suşlarına eritrosinin minimal inhibisyon konsantrasyonunu 11 tanesinde 256mg/ml'den fazla, 3 tanesinde 128 mg/ml, 3 tanesinde 64 mg/ml ve 1 tanesinde 32 mg/ml olarak tespit edildiğini belirtmişlerdir. Araştırmada elde edilen basitrasine direnç düzeyi Charteris vd (1998) ile Cebeci ve Gürakan'ın (2003) çalışmalarıyla paralellik göstermektedir.

Çalışmada izole edilen tüm *L.plantarum* ve *L.pentosus*'ların izolatları streptomisine karşı dirençli olarak tespit edilmiştir. Charteris vd (1998) *L.plantarum*, *L.acidophilus*, *L.casei*, *L.fermentum* ve *L.bulgaricus* suşlarının, Zhou vd (2005) *L.plantarum*'un streptomisine dirençli olduğunu saptamışlardır. Danielsen ve Wind (2003) yaptıkları çalışmada, *L.plantarum* ve *L.pentosus* suşlarına streptomisinin minimal inhibisyon konsantrasyonu 17 tanesinde 256mg/ml'den fazla, 1 tanesinde 64mg/ml olarak tespit edildiğini belirtmişlerdir. Araştırmada elde edilen streptomisine direnç Charteris vd (1998) ve Zhou vd'nin (2005) yaptıkları araştırma sonuçları ile benzerlik göstermekte, Danielsen ve Wind'in (2003) sonuçları ile de desteklenmektedir.

Araştırmada vankomisine karşı tüm *L.plantarum* ve *L.pentosus* izolatlarının dirençli olduğu tespit edilmiştir. Cebeci ve Gürakan'ın (2003) elde ettiği 13 *L.plantarum* suşundan 11'i ve *L.pentosus* suşu dirençli, 2 *L.plantarum* suşu hassas etki göstermiştir. Herreros vd (2005) ve Temmerman vd (2003) ve Zhou vd (2005) yaptıkları araştırmada *L.plantarum* izolatlarının, Charteris vd (1998) de *L.plantarum*, *L.acidophilus*, *L.casei* ve *L.fermentum* suşlarının vankomisine karşı dirençli olduğunu belirtmişlerdir. Danielsen ve Wind (2003) ise *L.plantarum* ve *L.pentosus* suşlarının vankomisin minimal inhibisyon konsantrasyonunun 256 mg/ml'den fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Bu antibiyotiğe direnç Charteris vd (1998), Cebeci ve Gürakan (2003), Temmerman vd (2003), Herreros vd (2005) ve Zhou vd (2005) tarafından yapılan çalışma sonuçlarına benzerlik göstermektedir.

Turşu ve zeytinden izole edilen *L.plantarum* ve *L.pentosus*'ların tümü kanamisine dirençli olarak tespit edilmiştir. Herreros vd (2005) ve Zhou vd (2005) elde ettiği *L.plantarum* izolatlarının, Charteris vd (1998) de çalışmasındaki *L.plantarum*, *L.acidophilus*, *L.casei*, *L.fermentum* ve *L.bulgaricus* izolatlarının kanamisine karşı dirençli olduğunu belirtmiştir. Temmerman vd (2003) ise yaptıkları araştırmada *L.plantarum* izolatlarının kanamisine karşı hassas olduğunu saptamışlardır. Danielsen ve Wind (2003) de *L.plantarum* ve *L.pentosus* suşlarının kanamisinin minimal inhibisyon konsantrasyonunun 256 mg/ml'den fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmada bu antibiyotiğe karşı belirlenen direnç düzeyi, Charteris vd (1998), Herreros vd (2005), Zhou vd (2005) tarafından yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermekte olup, Temmerman vd (2003) tarafından verilen değerlerden ise çok yüksektir.

3.3.16. Plazmid DNA izolasyonu

Plazmidler sitoplazmada bulunan, kendi replikasyonlarını kendileri yöneten, küçük DNA molekülleridir (ekstrakromozomal DNA). Bir çok araştırmacı laktik asit bakterisinde bulunan plazmid DNA'ların; ekzoplisakkarit bakteriyosin ve asit üretimi, fajlara, antibiyotiklere ve ağır metal iyonlarına dirençlilik, proteolitik aktivite ve sitrat metabolizmasından sorumlu genleri taşıdığını belirtmişlerdir (McKay 1983, Pouwels ve Leer 1993, Venema 1993). Bu nedenle plazmidler; endüstriyel starter kültür suşu geliştirme çalışmalarının önemli materyalini oluşturmaktadır. Diğer yandan tür içi ve türler arası genetik madde aktarımlarını yönetme yeteneğindeki plazmidler bu bakterilere çevresel uyumu kolaylaştıracak bir genetik imkan sağlamaktadır. Ayrıca, izolatların plazmid profillerinin tanımlanması, özellikle suşların farklılığının ortaya konulması açısından da değer taşımaktadır.

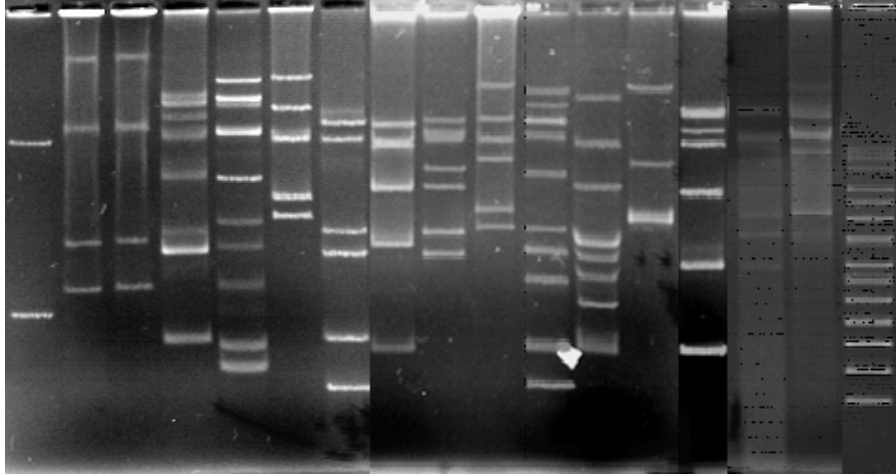
Araştırmada tanımlanan *Lactobacillus* izolatlarının plazmid analizleri sonucunda moleküler büyüklükleri yaklaşık olarak 2 ile 20 kbaz arasında değişen, 2-10 arasında plazmid içeriğine sahip oldukları saptanmıştır. Elde edilen izolatların sahip oldukları plazmid DNA sayıları ve moleküler büyüklükleri Tablo 3.17 ve Şekil 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.17 İzolatların plazmid DNA sayıları ve moleküler büyüklükleri

İzolatlar	Plazmid Sayısı	Yaklaşık Moleküler Büyüklük (kbaz)
<i>L.plantarum 2</i>	3	12-19
<i>L.plantarum 3</i>	8	4-18
<i>L.pentosus 5</i>	TE*	TE
<i>L.pentosus 6</i>	10	2.5-19
<i>L.plantarum 9</i>	6	11.5-19
<i>L.plantarum 11</i>	5	10-17
<i>L.plantarum 12</i>	4	10-17
<i>L.pentosus 13</i>	4	9-16
<i>L.plantarum 18</i>	5	4-17
<i>L.plantarum 19</i>	6	3.5-17
<i>L.plantarum 21</i>	5	12-19
<i>L.plantarum 22</i>	9	10-19
<i>L.plantarum 24</i>	6	3.5-17
<i>L.plantarum 24a</i>	7	4-17
<i>L.plantarum 25</i>	4	6-20
<i>L.plantarum 66</i>	2	5-16

*: TE: Tespit Edilmedi

Laktik asit bakteri izolatlarında en fazla plazmid DNA; 10 adet ile *L.pentosus 6*, en az plazmid DNA da 2 adet ile *L.plantarum 66*'da bulunmuştur. *L.pentosus 13* ise 4 adet plazmid DNA'ya sahiptir. Şimşek (2003) tarafından izole edilen *L.plantarum* suşlarında 3, 4 ve 6 adet plazmid DNA tespit etmiştir. Bu çalışmada elde edilen izolatlar Şimşek'in (2003) izolatlarına göre daha fazla plazmid DNA içermektedir. Bu durum starter kültür geliştirme çalışmaları açısından bir avantaj olarak görülebilir. Yine Şimşek (2003) tarafından izole edilen *L.plantarum* izolatlarının plazmid büyüklüklerinin 2.96-13.47 kbaz arasında değiştiği bildirilmiştir. Bu çalışmada izole edilen *L.plantarum* suşlarının plazmid büyüklüklerinin de (2.5-20.0 kbaz) Şimşek (2003) tarafından izole edilen *L.plantarum* izolatlarınınkinden daha büyük olduğu görülmektedir.



Şekil 3.3 Laktik asit bakterilerinin plazmid DNA jel görüntüsü (Soldan sağa sırasıyla *L.plantarum 66*, *25*, *25*, *24a*, *22*, *21*, *19*, *18*, *L.pentosus 13*, *L.plantarum 9*, *L.pentosus 6*, *L.plantarum 3*, *2*, *24*, *12*, *11* ve marker DNA)

L.plantarum izolatlarının plazmid DNA içeriklerinin, sayı ve büyüklük bakımından farklılığa sahip olması, izolatlarımızın farklı suşlar olabileceği konusunda bilgi verdiği gibi, elde edilen veriler söz konusu mikroorganizmalarla ileride gerçekleştirilecek çalışmalarda plazmid kodlu özelliklerin tanımlanmasına da temel oluşturacak niteliktedir. Plazmidler, tür içi ve türler arası genetik madde aktarımlarını yöneterek ev sahibi bakterilere çevresel uyumu kolaylaştıracak genetik imkan sağlamakta ve starter kültür için dikkate değer bir özellik katmaktadır. Ancak; özellikle yüksek aktarım yeteneğine sahip plazmidlerin antibiyotik dayanıklılık genlerine sahip olmaları

durumunda, antibiyotiğe direnç genlerinin floradaki yabani-istenmeyen mikroorganizmalara aktarılma riskinin de yüksek olması nedeni ile üzerinde karakterizasyon çalışmalarının yapılması gereken bir özellik olarak görülmektedir.

4. SONUÇ

Araştırmada endüstriyel işletmeler ve evlerden alınan turşu ve zeytinler materyal olarak kullanılarak önce bazı mikrobiyolojik ve kimyasal özellikleri belirlenmiştir. Daha sonra antimikrobiyal aktiviteye sahip olan laktik asit bakterileri izole edilmiş, starter ve probiyotik özelliği açısından temel testler uygulanarak öne çıkan izolatlar tanımlanmış ve ileride yapılacak çalışmalar için muhafazaya alınmıştır.

Araştırmada denemeye alınan 70 adet turşu ve 16 adet zeytin örneğinin gerek kimyasal, gerekse de mikrobiyolojik açıdan önemli farklılıklara sahip olduğu saptanmıştır. Araştırma sonucu turşu örneklerinin pH değerleri 2.0-6.41 pH arasında ve ortalama 3.53 pH, asitlik değerleri %0.18-4.41 arasında ve ortalama %1.60, tuz değerleri de %0.39-9.89 arasında ve ortalama %3.96 olarak bulunmuştur. Zeytin örneklerinin pH değerleri 2.81-4.84 pH arasında ve ortalama 3.77, asitlik dereceleri %0.20-2.12 arasında ve ortalama %0.91, tuz değerleri de %0.18-10.82 arasında ve ortalama %4.63 olarak belirlenmiştir. Turşu örneklerinin mikrobiyolojik analizi sonucunda; <3.00-7.80 log cfu/g arasında LAB, <3.00-8.28 log cfu/g arasında TAMB, <3.00-7.85 log cfu/g MK; zeytin örneklerinin ise <3.00-7.15 log cfu/g arasında LAB, 23.95-7.18 log cfu/g arasında TAMB ve <3.00-6.91 log cfu/g arasında da MK içerdiği tespit edilmiştir. Turşu ve zeytin örneklerinin hiçbirisinde *E.coli*'ye rastlanılmamıştır. Bu sonuçlar turşu ve fermente zeytin örneklerinin % asit, pH, tuz ve mikrobiyolojik nitelikler açısından çok farklı olduğunu ortaya koymaktadır. Bu durumun; örneklerin bir kısmının geleneksel olarak evlerde hazırlanmış olmasından kaynaklandığı söylenebilir. Aynı zamanda farklı şartlar altında muhafaza edilmeleri de bu sonuçların ortaya çıkmasında önemli bir etkidir. Bu durum endüstriyel üretimde standartizasyon açısından yetersizliğimizi, evlerde yapılanlarda ise kültürel zenginliğimizi ortaya koymaktadır. Bu farklılık ve zenginlik starter kültür izolasyonu için şansımızı artırmaktadır.

Toplanan 86 adet örnekten 4000'i aşkın laktik asit bakteri kolonisi agar spot testiyle antimikrobiyal aktivite testine tabi tutulmuş ve 32 adet izolat antimikrobiyal aktiviteye sahip bulunarak seçilmiştir. Tekrarlanan antimikrobiyal aktivite testleri sonucu bu izolatlardan 16 adedi tanımlanarak çalışmaya bunlarla devam edilmiştir. Tanımlama testlerinde bu seçilen izolatların 13 adedi *L.plantarum*, 3 adedi ise *L.pentosus* olarak

tanımlanmıştır. İzolatlardan sadece *L.pentosus 6* zeytinden, diğerlerinin tümü turşudan izole edilmiştir.

Antimikrobiyal aktivite spektrumunun belirlenmesinde agar spot testinde indikatör mikroorganizma olarak *L.sake Lb790*, *L.monocytogenes Li1*, *L.monocytogenes Li6*, *E.coli*, *E.feacium*, *Y.lipolitica*, *P.vulgaris* ve *A.hydrophila* kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm izolatlar önemli antimikrobiyal aktiviteye sahip olmakla birlikte agar spot testinde *L.plantarum 2, 12, 22, 24a, 25* ve *66* ile *L.pentosus 5* izolatlarının antimikrobiyal aktivitelerinin diğer izolatlara göre daha yüksek olması sebebiyle starter kültür olarak diğerlerine oranla avantaja sahiptirler.

Turşu ve zeytin üretiminde starter kültür olarak kullanılacak izolatların ortamı hızlı asitlendirmesi istenmektedir. İzolatlar içinde 24. saatte en fazla asiti *L.plantarum 25* ve *L.pentosus 13*; en az asidi ise *L.plantarum 18* ve *L.pentosus 6* üretmiştir. Tüm izolatların 24. saatte ortalama %1.80 asit üreterek ortam pH'sını 3.34'e düşürdüğü saptanmıştır. *L.plantarum 18* hariç (%78'ini) diğer tüm izolatlar üretebilecekleri toplam asitliğin %80'den fazlasını 1. gün sonunda üretmişlerdir. Yine, en düşük pH değerine de 1. gün sonunda ulaşılmıştır. Bu bilgiler ışığında tüm izolatların asit üretim düzeyleri açısından starter kültür olarak uygun niteliğe sahip olduğu söylenebilmektedir.

Elde edilen izolatların probiyotik özelliklerinin tespiti için safra tuzuna, gastrik suya, antibiyotiğe, hidrojen peroksite, alkole, dondurma ve liyofilizasyona dayanıklılıkları ile β -galaktozidaz üretimi ve hidrofobisite değerlerini içeren probiyotik özelliklerinin tümünün dikkate alındığı değerlendirme sonucunda *L.plantarum 2, 3, 9, 11, 18, 22* ve *L.pentosus 13*'ün iyi özelliklere sahip olduğu ortaya konulmuştur. Bunları *L.plantarum 12, 24a, 25* ve *66* takip etmektedir.

Araştırmada tanımlanan *Lactobacillus* izolatlarının 2-10 arasında tür içi ve türler arası genetik madde aktarımlarını yönetme yeteneğinde olan plazmidleri içermesi, bu bakterilere çevresel uyumu kolaylaştıracak bir genetik imkan sunması nedeni ile starter kültür geliştirme çalışmaları açısından bir avantaj olarak görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adams, M.R. and Nicolaides, L. (1997) Review of the Sensitivity of Different Foodborne Pathogens to Fermentation. **Food Control**, 8 (5-6): 227-239.
- Aktan, N., Kalkan, H. ve Yücel, U. (1999) Turşu Teknolojisi, Ege Üniversitesi **Ege Meslek Yüksekokulu Yayınları**, No:23, 148s.
- Aktan, N. ve Kalkan, H. (2000) Sofralık Zeytin Teknolojisi, Ege Üniversitesi **Ege Meslek Yüksekokulu Yayınları**, No:23, 122s.
- Anderson, D.G. and McKay, L.L. (1983) Simple and Rapid Method for Isolating Large Plasmid DNA from Lactic Streptococci, **Appl. and Environ. Microbiology**, 46: 549-552.
- Anon (1990) TS 4200 Türk Standartı: Lahana Turşusu, **Türk Standardları Enstitüsü**, Ankara, 7s.
- Anon (1993) TS 11112 Türk Standardı: Hıyar Turşusu, **Türk Standardları Enstitüsü**, Ankara, 9s.
- Anon (1997) TS 774 Türk Standardı: Sofralık Zeytin Teknolojisi, **Türk Standardları Enstitüsü**, Ankara, 16s.
- Anon (2005) Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed: A. K. Halkman. **Başak Matbaacılık Ltd.Şti.**, Ankara, 358s.
- Anon (2006) Zeytincilik Araştırma Enstitüsü, Ekonomi ve İstatistik Bölümü www.zae.gov.tr/ekonomi
- Aslım, B. (1994) *L.bulgaricus* ve *S.thermophilus* Bakterilerinin Metabolik ve Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Bazı Fiziksel ve Kimyasal Mutajenlerin Etkisi., Doktora Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 151s.
- Aytuna, H., Köksoy, A. ve Aran, N. (2003) Süt ve Ürünlerinde Probiyotik Bakterilerin Canlılıklarının Korunumu”, **Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu Bildiriler Kitabı**, Bildiri No: P43, 375-379.
- Badis, A., Guetarni, D., Moussa-Boudjemaa, B., Henni, D.E., Tornadijo, M.E. and Kihal, M. (2004) Identification of Cultivable Lactic Acia Bacteria Isolated from Algerian Raw Goat's Milk and Evuluation of Their Technological Properties. **Food Microbiology**, 21: 343-349.
- Beyatlı, Y. (1994) Bazı Laktik Asit Bakterilerinde Tespit Edilen Plazmid DNA'ların Fonksiyonları. **Kükem Dergisi**, 17(1): 51-59.

- Brenes, M. (2004) Olive Fermentation and Processing: Scientific and Technological Challenges, Fermentation Technology, 12 th. World Congress of Food Science and Technology, **Journal of Food Science**, 69: 33-34.
- Buchenhüskes, J.H. (1993) Selection Criteria for Lactic Acid Bacteria to Be Used as Starter Cultures for Various Food Commodities. **FEMS Microbiology Reviews**, 12: 253-272.
- Budde, B.B., Hornbaek, T., Jacobsen, T., Barkholt, V. and Koch, A.G. (2003) *Leuconostoc carnosum* 4010 has the Potential for Use as a Protective Culture for Vacuum-Packed Meats: Culture Isolation, Bacteriocin Identification, and Meat Application Experiments. **International Journal of Food Microbiology**, 83: 171-184.
- Can, A. ve Özçelik, B. (2003) Probiyotik Süt Ürünleri ve İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri, **Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu** Bildiriler Kitabı, Bildiri No: P64, 257-261.
- Caplice, E. and Fitzgerald, F.G. (1999) Food Fermentations: Role of Microorganisms in Food Production and Preservation. **International Journal of Food Microbiology**, 50: 131-149.
- Carr, J.F., Chill, D. and Miada, N. (2002) The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. **Critical Reviews in Microbiology**, 28(4): 281-370.
- Cebeci, A. and Gürakan, C. (2003) Properties of Potential Probiotic *Lactobacillus plantarum* Strains. **Food Microbiology**, 20: 511-518.
- Cemeroğlu, B. (1992) Meyve ve Sebze İşleme Endüstrisinde Temel Analiz Metodları, **Biltav Yayınları**, Ankara, 381s.
- Charlotte, A.W. and Warner, P.J. (1985) Plasmid Profiles and Transfer of Plasmid-Encoded Antibiotic Resistance in *Lactobacillus plantarum*. **Applied Environmental Microbiology**, 50:1319-1321.
- Charteris, P.W., Kelly, M.P., Morelli, L. and Collins, K.J. (1998) Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic *Lactobacillus* Species. **Journal of Food Protection**, 61(12): 1636-1643.
- Collins, J.K., Thornton, G. and Sullivan, G.O. (1998) Selection of Probiotic Strains for Human Applications. **International Dairy Journal**, 8: 487-490.
- Corbo, M.R., Albenzio, M., De Angelis, M., Sevi, A. and Gobbetti, M. (2001) Microbiological and Biochemical Properties of Canestrato Pugliese Hard Cheese Supplemented with Bifidobacteria. **Journal Dairy Science**, 84: 551-561.
- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P.L. and Maas, W.K. (1988) Identification and Classification of Bacterial Plasmids. **Microbiological Reviews**, 52(3): 375-395.

- Çon, A.H. (1995) Sucuktan Bakteriosin- Benzeri Antimikrobiyal Metabolit Üreten Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyon ve İdentifikasyonu ve Çeşitli Gıda Zararlısı ve/veya Gıda Kaynaklı Patojen Bakterilere Karşı Antagonistik Aktivite Araştırılması, Doktora Tezi, **Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Erzurum,78s.
- Çon, A.H. and Gökalp, H.Y. (2000) Production of Bacteriosin like Metabolites by Lactic Acid Cultures Isolated from Sucuk Samples. **Meat Science**, 55: 89-96.
- Çon, A.H. ve Gökalp, H.Y. (2001) Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Metabolitleri ve Etki Şekilleri. **Türk Mikrobiyal Cem Dergisi**. 30: 180-190.
- Çon, A.H. ve Gökalp, H.Y. (2002) Gıda Mikrobiyolojisi, **Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Notları**, Yayın No:007, 169s.
- Daeschel, M.A., Flemming, H.P. and McFetters, R.F. (1988) Mixed Cultures Fermentation of Cucumber Juice with *Lactobacillus plantarum* and Yeasts, **Journal Food Science**, 53: 862-868.
- Danielsen, M. and Wind, A. (2003) Susceptibility of *Lactobacillus spp.* to Antimicrobial Agents. **International Journal of Food Microbiology**, 82: 1-11.
- De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. (1960) A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli*. **Journal Applied Bacteriology**, 23: 30-138.
- De Vries, M.C., Vaughan, E.E., Kleerebezem, M. and De Vos, W.M. (2006) *Lactobacillus plantarum*- Survival, Functional and Potential Probiotic Properties in the Human Intestinal Tract. **International Dairy Journal**, 16: 1018-1028.
- Evren, M. (1991) Turşudan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Bunlardan Starter Kültür Üretimnin Araştırılması., Yüksek Lisans Tezi, **Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Gıda ve Bilimi ve Teknolojisi ABD, Samsun, 64s.
- G-Allegria, E., Lopez, I., Ruiz, I.J., Saenz, J., Fernandez, E., Zarazaga, M., Dizey, M., Torres, C. and Ruiz- Larrea, F. (2004) High Tolerance of Wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* Strains to Lyophilisation and Stress Environmental Conditions of Acid pH and Ethanol. **FEMS Microbiology Letters**, 230: 53-61.
- Gardiner, G., Stanton, C., Lynch, P.B., Collins, J.K., Fitzgerald, G. and Ross, R.P. (1999) Evaluation of Cheddar Cheese as a Food Carrier for Delivery of a Probiotic Strain to the Gastrointestinal Tract. **Journal Dairy Science**, 82: 1379-1387.
- Gardner, J.N., Savard, T., Obermeier, P., Caldwell, G. and Champagne, P.C. (2001) Selection and Characterization of Mixed Starter Cultures for Lactic Acid Fermentation of Carrot, Cabbage, Beet and Onion Vegetable Mixtures. **International Journal of Food Microbiology**, 64: 261-275.
- Giraffa, G. (2004) Studying The Dynamics of Microbial Population During Food Fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**, 28: 251-260.

- Herreros, M.A., Sandoval, H., Gonzales, L., Castro, J.M., Fresno, J.M. and Tornadijo, M.E. (2005) Antimicrobial Activity and Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria Isolated from Armada Cheese (a Spanish Goats Milk Cheese). **Food Microbiology**, 22: 455-459.
- Holzapfel, W. (1997) Use of Starter Cultures in Fermentation on a Household Scale, **Food Control**, 8(5/6): 241-258.
- Holzapfel, W.H. (2002) Appropriate Starter Culture Technologies for Small- Scale Fermentation in Developing Countries. **International Journal of Food Microbiology**, 75: 197-212.
- Holzapfel, W.H. and Schillinger, U. (2002) Introduction to Pre- and Probiotics, **Food Research International**, 35(2-3): 109-116.
- Jin, L.Z., Ho, Y.W., Abdullah, N. and Jalalludin, S. (1998) Acid and Bile Tolerance of *Lactobacillus* Isolated from Chicken Intestine. **Letters in Applied Microbiology**, 27: 183-185.
- Johanningsmeier, S.D., Flemming, H.P. and Breidt, F. (2004) Malolactic Activity of Lactic Acid Bacteria During Sauerkraut Fermentation. **Journal of Food Science**, 69(8): 222-227.
- Karovicova, J., Drdak, M., Greif, G and Hybenova, H. (1999) The Choice of Strain of *Lactobacillus* Species for the Lactic Acid Fermentation of Vegetable Juices. **Eur. Food Res. Technol.**, 210: 53-56.
- Kılıç, S. (2001) Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri, **Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları**, No:542, 451 s.
- Kim, S.W., Perl, L., Park, H. J., Tandianus, E.J and Dunn, W.N. (2001) Assesment of Stress Responce of the Probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **Current Microbiology**, 43: 346-350.
- Klein,G., Pack, A., Bonaparte, C. and Reuter, G. (1998) Taxonomy and Physiology of Probiotic Lactic Acid Bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, 41:103-125.
- Klingberg, T.D., Axelsson, L., Naterstad, K., Elsser, D. and Budde, B.B. (2005) Identificaton of Potential Probiotic Starter Cultures for Scandinavian-type Fermented Sausages. **International Journal of Food Microbiology**, 105: 419-431.
- Klingberg, T.D. and Budde, B.B. (2006) The Survival and Persitence in the Human Gastrointesitinal Tract of Five Potential Progbiotic *Lactobacilli* Consumed as Freze-dried Cultures or as Probiotic Sausage. **International Journal of Food Microbiology**, 105(3): 157-159.
- Leal-Sanchez, M.V., Ruiz Barba, J.L., Sanchez, A.H., Rejano, L., Jimenez-Diaz, R. and Garrido, A. (2003) Fermentation Profile and Optimization of Gren Olive

Fermentation Using *Lactobacillus plantarum* LPC10 as a Starter Culture, **Food Microbiology**, 20: 421-430.

Leroy, F., De Vuyst, L. (2004) Lactic Acid Bacteria as Functional Starter Cultures for the Food Fermentation Industry, **Trends in Food Science&Technology**, 15: 67-78.

Lewus, C.B., Kaiser, A. and Montville, T.J. (1991) Inhibition of Food-Borne Pathogens by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. **Appl. Environ. Microbiology**, 57: 1683-1688.

Lönner, C., Welander, T., Malin, N. and Dostalek, M., (1986). The Microflora in a Sour Dough Starter Spontaneously on Typical Swedish Rye Meal. **Food Microbiology**, 3(1): 3-12.

Marsilio, V., Seghetti, L., Ianucci, E., Russi, F., Lanza, B. and Fellicioni, M. (2005) Use of Lactic Acid Bacteria Starter Culture During Green Olive (*Olea europaea* L. cv *Ascolana tenera*) Processing, Society of Chemical Industry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 85: 1084-1090.

Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R. and Saarela, M. (2002) Technological Challenges for Future Probiotic Foods, **International Dairy Journal**, 12(2-3): 173-182.

Matur, S. and Singh, R. (2005) Antibiotic Resistance in Food Lactic Acid Bacteria- A Review. **International Journal of Food Microbiology**, 105: 281-295.

McDonald, L.C., Fleming, H.P. and Hassan, H.M. (1990) Acid Tolerance of *L.mesenteroides* and *L.plantarum*. *Appl Environ Microbiol.*, 56(7): 2120-2124.

McKay, L.L. (1983) Functional Properties of Plasmids in *Lactic Streptococci*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 49: 259-274.

Montano, A., Sanchez, A.H., Casado, F.J., De Castro, A. and Rejano, L. (2003) Chemical Profile of Industrially Fermented Green Olives of Different Varieties. **Food Chemistry**, 82: 297-302.

Mumcu, Z.N. (1997) Kefirden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik, Antimikrobiyal ve Plasmid DNA'larının İncelenmesi., **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD**, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 129s.

Nes, I. F. (1984) Plasmid Profiles of Ten Strains of *Lactobacillus plantarum*. **FEMS Microbiology Letters**, 21: 359-361.

Ouwehand, A.C., Kirijavainen, P.V., Grönlund, M.M., Isoluri, E. and Salminen, S.J. (1999) Adhesion of Probiotic Microorganisms to Intestinal Mucus. **International Dairy Journal**, 9: 623-630.

Ova, G. (2002) Hıyar Turşularında Duyusal Kalite Karakteristiklerin İncelenmesi. **Gıda**, 27(4): 315-319.

- Özçelik, F., Ulu, T. (2002) Depolanmış Hıyar Turşularının Sertliği ve Duyusal Özellikleri Üzerine pH'nın Etkisi, **Gıda**, 27(6): 521-527.
- Özyıldız, F. (2001) Turşunun Olgunlaştırılmasında Kullanılan *L.plantarum*'un En İyi Gelişim Ortamının Sağlanması, **Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi**, İzmir, 100s.
- Panagou, E.Z. and Katsaboxakis, K.Z. (2006) Effect of Differnet Brining Treatments on The Fermentation of cv. Conservolea Gren Olives Processed by The Spanish-Method. **Food Microbiology**, 23: 199-204.
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Tzanetaki, L.E. and Kotzekidou, P. (2003) Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated From a Greek Dry- Fermented Sausage in Respect of Their Technological and Probiotic Properties. **Meat Science**, 65: 859-867.
- Park, S.C., Hwang, M.H., Kim, Y.H., Kim, J.C., Song, J.C., Lee, K.W., Jeong, K.S., Rhee, M.H., Kim, K.S. and Kim, T.W. (2006) Comparison of pH and Bile Resistance of *Lactobacillus acidophilus* Strains Isolated from Rat, Pig, Chicken and Human Resources. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 22: 35-37.
- Pouwels, H.P. and Leer, R. J. (1993) Genetics of *Lactobacilli*; Plasmid and Gene Expression, **Antonie Van Leeuwenhoek**, 64: 85-107.
- Quan Li, S., Zhang, H.Q., Jin, T.Z., Turek, E.J. and Lau, M.H. (2005) Elimination of *Lactobacillus plantarum* and Achievement of Shelf Stable Model Salad Dressing by Pilot Scale Pulsed Electric Fields Combined with Mild Heat. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 6(2): 125-133.
- Randazzo, L.R., Restuccia, C., Romano, D.A. and Caggia, C. (2004) *Lactobacillus casei*, Dominant Species in Naturally Fermented Sicilian Green Olives. **International Journal of Food Microbiology**, 90: 9-14.
- Ross, R.P., Morgan, S. and Hill, C. (2002) Preservation and Fermentation: Past, Present and Future, **International Journal of Food Microbiology**, 79: 3-16.
- Sanchez, I., Palop, L. And Ballesteros, C. (2000) Biochemical Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Spontaneous Fermentation of "Alamgro Eggplants, **International Journal of Food Microbiology**, 59: 9-17.
- Sanchez, H.A., Rejano, L., Montano, A. and De Castro, A. (2001) Utilization at High pH pf Starter Cultures of *Lactobacilli* for Spanish Style Gren Olive Fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, 67: 115-122.
- Sano, K., Otani, M., Okad, Y., Kawamura,R., Umesaki, M., Ohi, Y., Umezawa, C. And Kanatani, K., (1997), Identification of the Replication Region of the *Lactobacillus acidophilus* plasmid pLA106. **FEMS Microbiology Letters**, 148:223-226.

- Santos, A., San Mauro, M., Sanchez, A., Torres, J.M. and Marquina, D. (2003) The Antimicrobial Properties of Different Strains of *Lactobacillus spp.* Isolated from Kefir. **Systematic and Applied Microbiology**, 26: 434-437.
- Santos, A., San Mauro, M., Sanchez, A., Torres, J.M. and Marquina, D. (2003) The Antimicrobial Properties of Different Strains of *Lactobacillus spp.* Isolated from Kefir. **Systematic and Applied Microbiology**, 26: 434-437.
- Savage, D.C. (1992) Growth Phase, Cellular Hydrophobicity, and Adhesion in Vitro of Lactobacilli Colonizing the Keratinizing Gastric Epithelium in the Mouse. **Applied and Environmental Microbiology**, 58(6): 1992-1995.
- Schillinger, U. and Lucke, F.K. (1989) Identification of Lactobacilli from Meat and Meat Products. **Appl. Environ. Microbiol.**, 4: 199-209.
- Şahin, İ. (1997) Turşu, **Tarımsal Araştırmaları Destekleme ve Geliştirme Vakfı**, Yayın No:29, Yalova, 64s.
- Şahin, İ., Akbaş, H. (2001) Hıyar Turşularında Yumuşamanın Önlenmesi ve Kullanılabilecek CaCl₂ Miktarının Belirlenmesi, **Gıda**, 26(3): 333-338.
- Shimamura, S., Abe, F., Ishibashi, N., Miyakawa, H., Yaeshima, T., Araya, T. and Tomita, M. (1992) Relationship Between Oxygen Sensitivity and Oxygen Metabolism of *Bifidobacterium* Species. **Journal of Dairy Science**, 75(12): 3296-3306.
- Şimşek, Ö. (2003) Uşak ve Yöresi Ekşi Hamurlarından İzole Edilen Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması ve Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi., Yüksek Lisans Tezi, **Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Denizli, 90s.
- Şimşek, Ö., Çon, A.H. and Tulunoğlu, Ş. (2006) Isolating Lactic Starter Cultures with Antimicrobial Activity for Sourdough Processes. **Food Control**, 17: 263-270.
- Tamang, J.P., Tamang, B., Schillinger, U., Franz, C.M.A.P., Gores, M. and Holzaphel, M.H. (2005) Identification of Predominant Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditionally Fermented Vegetable Products of the Eastern Himalayas. **International Journal of Food Microbiology**, 105: 347-356.
- Tassou, C.C., Panagou, E.Z. and Katsaboukakis, K.Z. (2002) Microbiological and Physicochemical Changes of Naturally Black Olives Fermented at Different Temperatures and NaCl Levels in The Brine. **Food Microbiology**, 19: 605-615.
- Temmerman, R., Pot, B., Huys, G. and Swings, J. (2003) Identification and Susceptibility of Bacterial Isolates Probiotic Products. **International Journal of Food Microbiology**, 81:1-10.
- Todorov, S.D. and Dicks, L.M.T. (2005) *Lactobacillus plantarum* Isolated From Molasses Produces Bacteriocins Active Against Gram-negative Bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, 36: 318-326.

- Tolonen, M., Rjaniemi, S., Pihlava, J.M., Johansson, T., Saris, P.E.J. and Ryhanen, E.L. (2004) Formation of Nisin Plant-Derived Biomolecules and Antimicrobial Activity in Starter Culture Fermentations of Sauerkraut. **Food Microbiology**, 21: 167-179.
- Venema, G. (1993) Molecular Biology and Genetic Modification of *Lactococci*. **Journal of Dairy Science**, 76 (8) : 2133-2144.
- Vinderola, C.G. and Reinheimer, J.A. (2003) Lactic Acid Starter and Probiotic Bacteria: A Comparative “in vitro” Study of Probiotic Characteristics and Biological Barrier Resistance. **Food Research International**, 36: 895-904.
- Von Husby, K.O. and Nes, I. F. (1986) Changes in the Plasmid Profiles of *Lactobacillus plantarum* Obtained from Commercial Meat Starter Cultures. **Journal of Applied Bacteriology**, 60 : 413-417.
- Yaman, A., Gökalp, H.Y. ve Çon, A.H. (1998) Some Characteristics of Lactic Acid bacteria Present in Commercial Sucuk Samples, **Meat Science**, 49(4): 387-397.
- Yıldırım, Z., Bayram, M. ve Yıldırım, M. (2003) Probiyotik, Prebiyotik ve İnsan Sağlığı Üzerindeki Yararlı Etkileri, **Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu Bildiriler Kitabı**, Bildiri No: P66, 267-272.
- Yüksekdağ, Z.N., Beyatlı, Y. and Aslım, B. (2004) Determination of Some Characteristics Coccoid Forms of Lactic Acid Bacteria Isolated from Turkish Kefirs with Natural Probiotic. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, 37(6): 663-667.
- Zhao, G. and Zhang, G. (2005) Effect of Protective Agents, Freezing Temperature, Rehydration Media in Viability of Malolactic Bacteria Subjected to Freze Drying, **Journal of Applied Microbiology**, 99: 333-338.
- Zhou, J.S., Pillidge, C.J., Gopal, P.K. and Gill, H.S. (2005) Antibiotic Susceptibility Profiles of New Probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains. **International Journal of Food Microbiology**, 98: 211-217.

ÖZGEÇMİŞ

Nihat Karasu 11.05.1981 tarihinde Bamberg/Almanya’da doğdu. 1987-1992 yılları arasında Aydın Güzelhisar İlkokulu, 1992-1995 yılları arasında Aydın Efeler Ortaokulu, 1995-1999 yılları arasında da Aydın Efeler Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi’ni başarıyla bitirdi. Üniversite öğrenimini ise 2003 yılında Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde tamamladı. Aynı yıl girdiği lisanüstü sınavlarını başarıyla geçerek Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği ABD’da yüksek lisans eğitimine başladı. Yüksek lisans öğrenimine devam ederken 2004 yılında girdiği Kamu Personeli Seçme Sınavında başarılı olarak Burdur İl Tarım Müdürlüğü’ne Gıda Denetçisi olarak atandı. Halen Burdur İl Tarım Müdürlüğü’nde Gıda Denetçisi görevini sürdürmektedir.