

**BAZI LACTOBACILLUS CİNSİ BAKTERİLERİN SODYUM  
BENZOAT'A KARŞI DİRENÇLİLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE  
BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Yeşim GÜMÜŞTEKİN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EKİM 2010  
ANKARA**

Yeşim GÜMÜŞTEKİN tarafından hazırlanan, "BAZI LACTOBACILLUS CİNSİ BAKTERİLERİN SODYUM BENZOAT'A KARŞI DİRENÇLİLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI" adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Yavuz BEYATLI .....

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu alışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ .....

Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Yavuz BEYATLI .....

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ .....

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Tarih: 26/10/2010

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Bilal TOKLU .....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Yeşim GÜMÜŞTEKİN

**BAZI LACTOBACILLUS CİNSİ BAKTERİLERİN SODYUM BENZOAT'A  
KARŞI DİRENÇLİLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE BAZI PROBİYOTİK  
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI  
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Yeşim GÜMÜŞTEKİN**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Ekim 2010**

**ÖZET**

Bu çalışmada, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 ve *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşlarının hücre gelişimi, antimikrobiyal aktivite, agregasyon, EPS üretimi ve toplam hücresel protein miktarı üzerine, bir gıda katkı maddesi olan, sodyum benzoatın etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Sodyum benzoatın (0,05- 90 mg/ml) arasında farklı konsantrasyonları kullanılarak suşların bu maddeye karşı minimal inhibisyon konsantrasyon (MİK) düzeyleri belirlenmiştir. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşunda bu değer 30 mg/ml olarak belirlenirken, *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşunda 90 mg/ml olarak bulunmuştur. Genellikle her iki bakterinin sodyum benzoata karşı dirençli oldukları gözlenmiştir. Ayrıca, her iki suşun da yüksek miktarda asit ürettikleri tespit edilmiştir.

*Laktobasillus* bakterilerinin *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* O157:H7, *S. aureus* ATCC 25923, *S. enteritidis* ATCC 13076, *Bacillus cereus* RSKK 803, *Micrococcus luteus* NRLL B-4375 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşlarına karşı yüksek inhibisyon etki gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu bakterilerin *L. monocytogenes* ATCC 7644 üzerinde antimikrobiyal aktivitelerinin olmadığı gözlenmiştir. Genel olarak

*Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşunun sodyum benzoat direncinin, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşundan daha fazla olduğu bulunmuştur. En yüksek (69,6 mg/L) EPS üretimi *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşunda (2,5 mg/ml) sodyum benzoat içeren besi ortamında tespit edilirken, bu değer *Lactobacillus* DSM 20246 suşunda (2,5 mg/ml) sodyum benzoatlı ortamda (58,7 mg/L) en yüksek EPS üretimi ile belirlenmiştir. Bu değerler bakterilerin kontrol besi ortamında sırası ile 54,7 ve 51,9 (mg/L) olarak bulunmuştur. Çalışmada sodyum benzoat konsantrasyonunun artışına bağlı olarak bakterilerin EPS üretimi ve hücresel protein miktarlarının azaldığı bulunmuştur. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 ve *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşlarının otoagregasyonlarının %28-55 arasında değiştiği belirlenmiştir. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşunun test bakterilerine karşı koagregasyonu kontrol besi ortamında %7,5-48,1, %0,1'lik sodyum benzoatlı ortamda ise %7,5-28,7 olarak tespit edilirken, *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşunun test bakterilerine karşı koagregasyonu, kontrol besi ortamında %3,2-58,3, %0,1'lik sodyum benzoatlı ortamda ise %5,0-29,2 olarak tespit edilmiştir.

Bilim Kodu : 203.1.023

Anahtar Kelimeler : *Lactobacillus* spp., Probiyotik, Asit üretimi, Antimikrobial aktivite, EPS üretimi, Agregasyon.

Sayfa Adedi : 78

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

**RESISTANCES SOME OF LACTOBACILLUS BACTERIA ON SODIUM  
BENZOATE AND DETERMINATION SOME OF THEIR PROBIOTIC  
PROPERTIES  
(M.Sc. Thesis)**

**Yeşim GÜMÜŞTEKİN**

**GAZİ UNIVERSITY  
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY  
October 2010**

**ABSTRACT**

In this study, strains of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 and *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 were used. The effect of sodium benzoate on the cell growths, antimicrobial activity, aggregation, total amount of cellular protein and EPS production by the cultures were investigated. By using the different concentrations (0,05-90 mg/ml) sodium benzoate the minimal inhibition concentration (MIC) levels of the cultures were determined. The (MIC) levels of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 and *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 cultures were 30 mg/ml and 90 mg/ml of sodium benzoate respectively. In general both cultures have showed a great resistance to sodium benzoate. Also, both cultures produced high amount of acid.

*Lactobacillus* strains have showed high antimicrobial activities on tested bacteria *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* O157: H7, *S. aureus* ATCC 25923, *S. enteritidis* ATCC 13076, *Bacillus cereus* RSKK 803, *Micrococcus luteus* NRLL B- 4375 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *L. monocytogenes* ATCC 7644 strain was not inhibited by *Lactobacillus* strains.

The highest (69.6 mg / L) EPS production by *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 strain were determined in the medium containing (2.5 mg / ml) of sodium benzoate. The hight amount (58.7 mg / L) EPS production by the culture *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 were obtained in the medium containing (2.5 mg / ml) of sodium benzoate. The EPS production by the cultures in controlled medium were 54.7 and 51.9 (mg/L) respectiviely. In the study, it is found that EPS production and cellular protein amounts of the bacteria decreased by the increasing concentration of sodium benzoate. Both strains have showed high autoaggregation (28-55%) and coaggregation (3.2-58.3 %) activities.

Science Code : 203.1.023

Key Words : *Lactobacillus* spp., Probiotic, Acid production, Antimicrobial, EPS production, Aggregation,

Page Number : 78

Adviser : Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

## TEŞEKKÜR

2007-2010 yılları arasında Gazi Üniversitesi, Biyoloji Bölümü'nde Prof. Dr. Yavuz BEYATLI danışmanlığında yürütülen bu çalışma, yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır. Tez çalışmamın başından sonuna kadar ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, çalışmalarım boyunca değerli katkılarıyla ve bilgileriyle beni yönlendiren Sayın Hocam Prof. Dr. Yavuz BEYATLI'ya, tez çalışmamda tecrübe ve yardımlarından faydalandığım Sayın Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ'a, deneysel çalışmalarım sürecinde yardımlarından faydalandığım Dr. Derya ÖNAL DARILMAZA'a, tüm Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışanlarına, maddi ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan annem Serpil GÜMÜŞTEKİN, babam Ahmet Salih GÜMÜŞTEKİN ve kardeşim Onur GÜMÜŞTEKİN' e teşekkürlerimi sunarım.



## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                  | Sayfa |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| ÖZET .....                                                                                       | iv    |
| ABSTRACT .....                                                                                   | vi    |
| TEŞEKKÜR.....                                                                                    | viii  |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                                | ix    |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....                                                                         | xii   |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....                                                                        | xiv   |
| RESİMLERİN LİSTESİ.....                                                                          | xvi   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....                                                                    | xvii  |
| 1. GİRİŞ .....                                                                                   | 1     |
| 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....                                                                      | 3     |
| 2.1.Probiyotikler.....                                                                           | 3     |
| 2.1.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar .....                                      | 4     |
| 2.1.2. Probiyotik mikroorganizma seçim kriterleri.....                                           | 5     |
| 2.1.3. Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine etkisi ve<br>etki mekanizmaları..... | 6     |
| 2.2. Laktik Asit Bakterileri.....                                                                | 10    |
| 2.2.1. Genel özellikleri.....                                                                    | 11    |
| 2.2.2. <i>Lactobacillus</i> cinsi bakterilerin genel özellikleri .....                           | 12    |
| 2.3. Bakteriyel Eksopolisakkaritlerin (EPS) Probiyotik Önemi .....                               | 14    |
| 2.4. Agregasyon.....                                                                             | 16    |
| 2.5. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri.....                                 | 16    |
| 2.5.1. Laktik asit üretimi .....                                                                 | 16    |
| 2.6. Gıda Katkı Maddeleri .....                                                                  | 17    |

## Sayfa

|                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.6.1. Gıda katkı maddesinin kullanımı .....                                                                                 | 18 |
| 2.6.2. Sodyum benzoat (E 211) .....                                                                                          | 23 |
| 3. MATERYAL VE METOT .....                                                                                                   | 28 |
| 3.1. Materyaller .....                                                                                                       | 28 |
| 3.1.1. Materyal örnekleri.....                                                                                               | 28 |
| 3.1.2. Besiyerleri .....                                                                                                     | 28 |
| 3.1.3. Bakterilerin muhafazası.....                                                                                          | 29 |
| 3.1.4. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları.....                                                              | 30 |
| 3.1.5. Test bakterileri .....                                                                                                | 30 |
| 3.2. Metotlar .....                                                                                                          | 31 |
| 3.2.1. Bakterilerin sodyum benzoata dirençliliğinin belirlenmesi .....                                                       | 31 |
| 3.2.2. Bakterilerin hücre gelişiminin ve canlı hücre sayısının belirlenmesi .....                                            | 32 |
| 3.2.3. Laktik asit bakterilerinin asit üretimleri.....                                                                       | 33 |
| 3.2.4. Laktobasillerin antimikrobiyal aktiviteleri .....                                                                     | 33 |
| 3.2.5. Laktobasillerin ekso polisakkarit (EPS) üretimlerinin belirlenmesi... ..                                              | 34 |
| 3.2.6. Laktobasillerin agregasyon özelliklerinin tespiti.....                                                                | 35 |
| 3.2.7. Bakterilerin toplam hücre protein miktarının belirlenmesi.....                                                        | 36 |
| 3.2.8. İstatistiksel analizler .....                                                                                         | 37 |
| 4. DENEYSEL BULGULAR .....                                                                                                   | 38 |
| 4.1. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 Suşunun Hücre Gelişimi ve Sodyum Benzoata Dirençliliğinin Belirlenmesi ..... | 38 |
| 4.1.1. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 suşunun asit üretim yeteneği ve antimikrobiyal aktivitesi .....            | 39 |

**Sayfa**

|                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.2. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 suşunun farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren besi ortamında hücre gelişimi ve EPS üretimi ..... | 44 |
| 4.2. <i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246 Suşunun Hücre Gelişimi ve Sodyum Benzoata Dirençliliğinin Belirlenmesi .....                                   | 47 |
| 4.2.1. <i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246 suşunun asit üretim yeteneği ve antimikrobiyal aktivitesi .....                                              | 54 |
| 4.2.2. <i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246 suşunun farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren besi ortamında hücre gelişimi ve EPS üretimi .....   | 57 |
| 4.3. Laktobasillerin Agregasyonu .....                                                                                                                       | 58 |
| 4.3.1. Otoagregasyon .....                                                                                                                                   | 58 |
| 4.3.2. Koagregasyon .....                                                                                                                                    | 59 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....                                                                                                                                   | 61 |
| KAYNAKLAR .....                                                                                                                                              | 68 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                                                                                               | 79 |

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil                                                                                                                                                                                              | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 2.1. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ' a ait SEM görüntüsü .....                                                                                                                            | 13    |
| Şekil 2.2. Sodyum Benzoat' ın moleküler yapısı .....                                                                                                                                               | 23    |
| Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoatalı ortamda üretilen<br><i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 suşunun 600 nm'de ölçülen OD<br>değerleri .....                                         | 38    |
| Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoatalı ortamda üretilen<br><i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 suşunun canlı hücre sayısı .....                                                        | 39    |
| Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoatlı ortamda üretilen<br><i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 suşunun pH değer dağılımı.....                                                           | 40    |
| Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoatalı ortamda üretilen<br><i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 suşunun ürettiği % asit miktarları .....                                                | 41    |
| Şekil 4.5. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 suşunun farklı<br>konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren besiortamında<br>hücre içi toplam protein miktarı. ....                           | 46    |
| Şekil 4.6. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 suşunun farklı<br>konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren besiortamında<br>EPS üretimi .....                                                | 46    |
| Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoatlı ortamda üretilen<br><i>L. plantarum</i> DSM 20246 suşunun 600 nm'de ölçülen OD<br>değerleri .....                                            | 47    |
| Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoatlı ortamda üretilen<br><i>L. plantarum</i> DSM 20246 suşunun canlı hücre sayısı .....                                                           | 48    |
| Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoatlı ortamda üretilen<br><i>L. plantarum</i> DSM 20246 suşunun canlı hücre sayısı ve 600<br>nm'de ölçülen OD değerlerinin karşılaştırılması ..... | 48    |
| Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoatlı ortamda üretilen<br><i>L. plantarum</i> DSM 20246 suşunun pH değer dağılımı .....                                                           | 49    |
| Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren ortamda<br>üretilen <i>L. plantarum</i> DSM 20246 suşunun ürettiği % asit<br>miktarları .....                                          | 50    |

| Şekil                                                                                                                                                                                           | Sayfa |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 4.12. Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren ortamda geliştirilen <i>L. plantarum</i> DSM 20246 suşunun ürettiği % asit dağılımı ve son kültür pH'larının karşılaştırılması..... | 51    |
| Şekil 4.13. <i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246 suşunun farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren ortamlarda üretildiğinde hücresel toplam protein miktarları.....                   | 57    |
| Şekil 4.14. <i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246 suşunun farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren ortamlarda EPS üretimleri .....                                                    | 57    |

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge                                                                                                                                                                                                          | Sayfa |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Çizelge 2.1. Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar .....                                                                                                                                           | 4     |
| Çizelge 2.2. Probiyotiklerin sağlık bakımından önemleri .....                                                                                                                                                    | 10    |
| Çizelge 2.3. E kodu taşıyan bazı katkı maddeleri ve bazı etkileri.....                                                                                                                                           | 23    |
| Çizelge 3.1. MRS besiyeri.....                                                                                                                                                                                   | 28    |
| Çizelge 3.2. Nutrient sıvı besiyeri.....                                                                                                                                                                         | 29    |
| Çizelge 3.3. Test bakterilerinin temin edildiği kaynak.....                                                                                                                                                      | 38    |
| Çizelge 4.1. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 suşunun bağırsak<br>patojenleri ve gıda kontaminantları üzerine antimikrobiyal<br>aktivite sonuçları (zon çapı, mm) .....                                | 42    |
| Çizelge 4.2. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 suşunun farklı<br>konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren besiortamında<br>hücre gelişimi ve EPS üretimi .....                                          | 45    |
| Çizelge 4.3. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 suşunun farklı<br>konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren besiortamında<br>hücre içi toplam protein miktarı .....                                       | 45    |
| Çizelge 4.4. <i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246 kültürünün bağırsak<br>patojenleri ve gıda kontaminantları bakteriler üzerinde<br>antimikrobiyal aktivite sonuçları (zon çapı, mm). ....                   | 52    |
| Çizelge 4.5. <i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246 suşunun farklı<br>konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren besiortamında<br>hücre gelişimi ve EPS üretimi .....                                            | 55    |
| Çizelge 4.5. <i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246 suşunun farklı<br>konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren ortamlarda<br>üretildiğinde hücresel toplam protein miktarları gelişimi ve<br>EPS üretimi ..... | 56    |
| Çizelge 4.7. Laktobasil suşlarının % 0,1 Sodyum benzoatlı ortamda<br>otoagregasyonları .....                                                                                                                     | 58    |
| Çizelge 4.8. Laktobasil suşlarının % 0,1 Sodyum benzoatlı ortamda<br>koagregasyonları.....                                                                                                                       | 60    |

## RESİMLERİN LİSTESİ

| Resim                                                                                                                                               | Sayfa |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Resim 4.1. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 suşunun <i>Micrococcus luteus</i> NRLL B-4375 suşu üzerinde gösterdiği inhibisyon zonu .....  | 43    |
| Resim 4.2. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 suşunun <i>Bacillus cereus</i> RSKK 803 suşu üzerinde gösterdiği inhibisyon zonu .....        | 43    |
| Resim 4.3. <i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246 suşunun <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 suşu üzerinde gösterdiği inhibisyon zonu ..... | 52    |
| Resim 4.4. <i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246 suşunun <i>Bacillus Cereus</i> RSKK 803 suşu üzerinde gösterdiği inhibisyon zonu .....          | 53    |
| Resim 4.5. <i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246 suşunun <i>E. coli</i> ATCC 35218 suşu üzerinde gösterdiği inhibisyon zonu .....                | 53    |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

| Simgeler           | Açıklama              |
|--------------------|-----------------------|
| $\alpha$           | Alfa                  |
| $\beta$            | Beta                  |
| $^{\circ}\text{C}$ | Santigrat derece      |
| cm                 | Santimetre            |
| g                  | Gram                  |
| g/l                | Gram/Litre            |
| M                  | Molar                 |
| Mm                 | Milimolar             |
| mg/ml              | Miligram/Mililitre    |
| ml                 | Mililitre             |
| nm                 | Nanometre             |
| N                  | Normal                |
| pH                 | Asitlik bazlık birimi |
| rpm                | Dakikada devir sayısı |
| spp                | Species (Türleri)     |
| subsp              | Subspecies (Alt tür)  |
| U                  | Unit (Birim)          |
| $\mu\text{g/ml}$   | Mikrogram/Mililitre   |
| $\mu\text{l}$      | Mikrolitre            |
| $\mu\text{m}$      | Mikrometre            |
| %                  | Yüzde                 |



**Kısaltmalar****Açıklama****ATTC**

American Type Culture Collection

**Cfu**

Colony Forming Units

**CLSI**Clinical and Laboratory Standards  
Institute**Dk**

Dakika

**DSMZ**Deutsche Sammlung von  
Mikroorganismen und Zellkulturen**Eş**

Eşitlik

**HCl**

Hidrojen klorür

**HPLC**

High Performance Liquid Chromatography

**Kob**

Koloni oluşturan birim

**NaCl**

Sodyum klorür

**NaOH**

Sodyum hidroksit

**NH<sub>3</sub>**

Amonyak

**OD**

Optikal dansite

**RSSK**Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez  
Başkanlığı Kültür Koleksiyonu**Sn**

Saniye

## 1. GİRİŞ

Gıda katkı maddeleri işlem görmüş gıda maddelerinin raf ömrünü uzatmak amacıyla kullanılan kimyasal maddelerdir. Daha geniş tanımıyla gıda katkıları; tek başına gıda olmayan, ancak bunlara üretim, işleme, depolama ya da ambalajlama gibi aşamalarda katılan madde ya da madde karışımları olarak ifade edilmektedir [54].

Benzoik asitin sodyum tuzu olan sodyum benzoat hazır gıdalarda kullanılan antimikrobiyal bir maddedir. Günümüzde pek çok üretilen gıdalarda özellikle margarinlerde, gazlı ve gazsız içeceklerde, meyve sularında, soslarda, kakaolu ürünlerde, bisküvi, gofret, kek ve kremalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıdalara koruyucu katkı maddesi şeklinde katılmaktadır. Serbest benzoik asitin düşük düzeyde suda çözülmesi sebebiyle sodyum benzoat tercih edilmektedir. Maya üzerindeki inhibe edici etkiden dolayı maya ile kabartılmış ürünlerde kullanılmazken, bu gıda katkı maddesinin aktif olduğu optimum pH aralığı 2,5-4' tür [54].

Probiyotikler, sindirim sisteminde belli sayılarda bulunan ve konakçıda yararlı etkiler oluşturan canlı mikroorganizmalardır. Probiyotik bakterilerle kolonizasyonun arttırılmasının, sağlığı olumlu yönde etkilediğini gösteren çalışmalar giderek artmaktadır. Probiyotik olarak seçilen bakterilerin, işlem ve depolama süresinlerinde canlılığını koruması ve aktif olduğu bölgede çoğalabilmesi aranan en önemli özelliklerdendir. Bunun yanı sıra probiyotik bakteriler patojen olmamalı, toksik metabolitler üretmemeli, genetik açıdan stabil olmalı ve sağlık üzerinde olumlu etki yaptığı düşünülen ürünlerde değişim meydana gelmemelidir [11].

Bu çalışmada, insan bağırsak sisteminin üyeleri olan probiyotik *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 ve *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşlarının gıda katkı maddesi olan ve aşırı tüketimine yasal sınırlamalar getirilen, sodyum benzoata karşı dirençliliklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca,

yüksek konsantrasyonlarda sodyum benzoatın ilgili bakterilerin probiyotik özellikleri üzerindeki etkisinin incelenmesi de amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Probiyotikler

Probiyotik kelimesi; Yunanca kökenli olup “yaşam için” anlamına gelmektedir. Probiyotik terimi ilk defa 1965 yılında Lilly ve Stillwell tarafından diğer mikroorganizmaların gelişimini destekleyen maddeleri tanımlamak için kullanılmıştır. Tarihten günümüze kadar birçok anlamda açıklanan bu terim son olarak 1999’da Kneifel tarafından; vücuda alındığında konakçının gastrointestinal mikroflorasına olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmışlardır [1]. Probiyotiklerin en çok kabul gören tanımları Roy Fuller (1989) tarafından ‘tüketici sağlığına, bireylerin bağırsak mikrobiyal dengesini koruyarak veya geliştirerek yararlı olan canlı mikrobiyal gıda katkılarıdır’ şeklinde yapılmıştır [2]. Bu tanım Salminen ve ark., (1998) tarafından ‘insan ve hayvanların sağlığını geliştirmek için tasarlanan gıda, yem ya da besinsel katkılardaki canlı mikrobiyal preparatlar’ olarak değiştirilmiştir [3].

Fermente gıdaların metabolizma üzerindeki faydalı etkileri ilk defa 20. yüzyılın başlarında Nobel ödül sahibi; Rus Bilim adamı Elie Metchnikoff tarafından öne sürülmüştür. Metchnikoff Bulgar çiftçilerin fermente süt ürünleri tüketimi sonucu daha sağlıklı ve uzun ömürlü olduklarını, bunun nedeninin ise bu ürünlerde bulunan çubuk şeklindeki bakterilerin (*Lactobacillus* spp.) bağırsaktaki mikroflorayı olumlu yönde etkilemesi ve toksik mikrobiyal aktiviteyi azaltması olduğunu belirtmiştir. Fermente ürünler üzerinde yapılan çalışmaların başlangıcı çok eskilere dayanmakla birlikte, probiyotikler konusunda yapılan çalışmalar ancak son 10–15 yılda hız kazanmıştır [4].

### 2.1.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar

Birçok mikroorganizma probiyotik olarak kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılan suşlar ise laktik asit bakterilerinin, enterokoklar, laktobasiller ve bifidobakterileri kapsayan heterojen bir grubundan oluşmaktadır. Özellikle laktobasiller probiyotik olarak kullanılan bakterilerin başında gelmektedir. Ancak, günümüzde diğer mikroorganizmalar da probiyotikler arasına girmiştir [5]. Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar Çizelge 2.1'de gösterilmiştir [5-7].

Çizelge 2.1. Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar

|                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Lactobacillus</i> spp.   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactobacillus delbreckii subsp. bulgaricus</i></li> <li>• <i>Lactobacillus cellobiosus</i></li> <li>• <i>Lactobacillus lactis</i></li> <li>• <i>Lactobacillus acidophilus</i></li> <li>• <i>Lactobacillus reuteri</i></li> <li>• <i>Lactobacillus brevis</i></li> <li>• <i>Lactobacillus casei</i></li> <li>• <i>Lactobacillus curvatus</i></li> <li>• <i>Lactobacillus fermentum</i></li> <li>• <i>Lactobacillus plantarum</i></li> <li>• <i>Lactobacillus helveticus</i></li> </ul> |
| <i>Pediococcus</i> spp.     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Pediococcus cerevisiae</i></li> <li>• <i>Pediococcus acidilactici</i></li> <li>• <i>Pediococcus pentosaceus</i></li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <i>Streptococcus</i> spp.   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Streptococcus cremoris</i></li> <li>• <i>Streptococcus thermophilus</i></li> <li>• <i>Streptococcus intermedius</i></li> <li>• <i>Streptococcus lactis</i></li> <li>• <i>Streptococcus diacetylactis</i></li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <i>Lactococcus</i> spp.     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i></li> <li>• <i>Lactococcus subsp. cremoris</i></li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <i>Bifidobacterium</i> spp. | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bifidobacterium animalis</i></li> <li>• <i>Bifidobacterium adolescentis</i></li> <li>• <i>Bifidobacterium bifidum</i></li> <li>• <i>Bifidobacterium breve</i></li> <li>• <i>Bifidobacterium infantis</i></li> <li>• <i>Bifidobacterium longum</i></li> </ul>                                                                                                                                                                                                                          |
| Diğerleri                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus subtilis</i></li> <li>• <i>Bacteriodes capillous</i></li> <li>• <i>Leunostoc mesenteroides</i></li> <li>• <i>Escherichia coli</i></li> <li>• <i>Propionobacterium sheemaniai</i></li> <li>• <i>Enterococcus faecalis</i></li> <li>• <i>Enterococcus faecium</i></li> </ul>                                                                                                                                                                                                   |

Probiyotik terimi yeni olsa bile insanlar ve hayvanlarda sindirim üzerinde belirli mikroorganizmalar uygun etkilerine ilişkin incelemeler, yüzyılın başına kadar uzanır. Son otuz yıldan beri hayvansal üretim koşulları, yetiştirmede olduğu gibi, endüstriyel olarak yapılmaktadır.

### **2.1.2. Probiyotik mikroorganizma seçim kriterleri**

Probiyotikler, sindirim sisteminde belli sayılarda bulunan ve konakçıda yararlı etkiler oluşturan canlı mikroorganizmalardır. Probiyotik bakterilerle kolonizasyonun arttırılmasının, sağlığı olumlu yönde etkilediğini gösteren çalışmalar giderek artmaktadır. Probiyotik olarak seçilen bakterilerin, işlem sürecinde ve depolama süresince canlılığını koruması ve aktif olduğu bölgede çoğalabilmesi taşıması gereken en önemli özelliklerdendir. Bunun yanı sıra probiyotik bakteriler patojen olmamalı, toksik metabolitler üretmemeli, genetik açıdan stabil olmalı ve sağlık üzerinde olumlu etki yaptığı düşünülen ürünlerde değişim meydana gelmemelidir.

İnsan beslenmesinde kullanılan mikroorganizmalarda aranması gereken temel özellikler [11-18] aşağıda belirtildiği gibi sıralanır;

- Probiyotikler gelişme faktörlerinden olmalı,
- Glikozinatlar gibi beslenmede zararlı olan faktörlerin besinlerde sindirilebilirliğini arttırmalı,
- Bağırsak düzensizlikleri üzerinde koruyucu bir etki sağlamalı,
- Sindirim sistemi mikroflorasının dengede tutulmasını kolaylaştırarak iyi bir sindirim hijyenini garantilemeli ,
- Sağlığın genel durumunu iyileştirmelidir.
- Güvenilir olmalıdır. Kullanım sonucu insan veya hayvanlarda yan etkisi olmamalıdır.
- Stabil olmalıdır.

- Düşük pH ve safra tuzlarına karşı dayanıklı olmalıdır. Mide ve bağırsak kanalından geçişleri sırasında canlı kalabilmelidirler.
- Epitel yüzeylere tutunmayı sağlayan maddeler (Ekzopolisakkarit, lektin vb.) bulundurmmalıdır.
- *Helicobacter pylori*'nin gelişimini engelleyebilmelidir.
- Agregasyon ve koagregasyon yeteneğine sahip olmalıdır.
- Bağırsak hücrelerine tutunabilmeli, kolonize ve metabolize olabilmelidir.
- Patojen bakterilere karşı antagonistik etkileri olmalıdır. Bakteriyosin, hidrojen peroksit, laktik asit ve propiyonik asit gibi organik asitler sentezleyebilmelidir.
- Antikarsinojenik aktivite gösterebilmelidir.
- Kan basıncı ve serumda kolesterol konsantrasyonunu düşürebilmelidir.
- İnsan ve hayvan sağlığında çeşitli nedenlerden dolayı kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli olmalıdır.
- Konakçı hücrelerde fazla sayıda bulunabilmelidir.
- Bakterilerin üretim ve depolama aşamalarında canlılığını ve aktivitelerini koruyabilmelidir.
- Patojenik olmamalı ve toksik madde üretmemelidir.

### **2.1.3. Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine etkisi ve etki mekanizmaları**

Probiyotiklerin etki mekanizmasına yönelik çalışmalar, bağırsak florasının düzensizliğiyle ortaya çıkan mide-bağırsak sistemindeki bozukluklara dayanarak yapılmaya başlamıştır [9]. Patojen mikroorganizmalar üzerine direkt antagonistik etki yaparlar: Probiyotik bakteriler, patojen bakterilerin üremesini engelleyen inhibitör antimikrobiyal peptid (mikrosin, bakteriyosin) üretirler. Yapılan çalışmalarda, *Saccharomyces boulardii*'nin, *Candida albicans*, *Salmonella typhi*, *Shigella* ve *E. coli*'nin üremesini baskıladığı gösterilmiştir. Patojenlerin adezyonunu önlerler; sayı ve hacim avantajları ile bağırsak ve ürogenital sistem epitel hücrelerinde, patojenlerin girmesini zorlaştırırlar. Epitelyal bariyeri güçlendirerek, patojenlerin translokasyonunu

önlerler. Patojenlerin üremek için gereksinim duydukları besin maddelerini tüketerek, üremelerini inhibe ederler; *S. boulardii*, *Clostridium difficile*'nin gereksinim duyduğu monosakkaridleri tüketerek bu bakterinin üremesini önler [9,10].

Son yıllarda özellikle probiyotiklerin etki mekanizmaları ve üstlendikleri görevler üzerine pek çok araştırma yapılmıştır. Bu mekanizmalar ve sağlık açısından yararları aşağıdaki gibi sıralayabiliriz:

Diyareye etkileri: Çevre koşullarının genellikle yetersiz olduğu gelişmekte olan ülkelerde bebek ve çocuklarda diyare ataklarına rastlanır. Diyare ile seyreden hastalıkların büyük çoğunluğundan enterotoksijenik *E. coli* ve *Rotavirüs* birlikte sorumludur. Endüstrileşmiş ülkelerde ise bebekler ve çocuklarda diyare ataklarına daha az rastlanmaktadır. Ancak en sık görülen sorumlu etken *Rotavirüs*'dür. Fermente süt ürünlerin *Rotavirüs* diyareli çocuklarda diyarenin süresini yarı yarıya azalttığı bir çok araştırmada gösterilmiştir [19-20].

*Helicobacter pylori* enfeksiyonları: *Helicobacter pylori*, insan ve diğer primatların midesine yerleşen spiral şeklinde, gram-negatif, mikraerofilik bir bakteridir. Günümüzde insanlarda ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, *H. pylori*'nin lokal inflamasyona ve sistemik olarak da humoral bağışık yanıtı neden olduğunu göstermiştir. Bu bakteri İnsanlarda kronik gastrit ve peptik ülser hastalıklarının nedenidir [21]. Bazı laktik asit bakterileri, özellikle mandıra starter kültürleri ile fermente edilen süt, *H. pylori* üzerinde antibakteriyel etkiye sahiptir. Laktik asit bakterileri genellikle organik asitler, hidrojen peroksit ve peptit gibi düşük moleküler ağırlıklı bileşikler içeren birkaç antimikrobiyal bileşik üretir. Yapılan bir çalışma sonucunda, *Lactobacillus salivarius*' un, *H. pylori*' ye karşı potansiyel etkili probiyotik olduğu gösterilmiştir [22].



Laktoz intoleransı: Laktoz direk olarak bağırsaktan absorbe edilemediğinden, glukoz ve galaktoz gibi basit şekerlere hidrolize olması gerekmektedir. Enerji üretiminde ya da vücudun temel taşlarının yapımında kullanılan bu monosakkaritlerin arzu edilen faydayı sağlayabilmesi için gerekli olan hidroliz, ince bağırsak kanalında iç yüzeyinde bulunan  $\beta$ -galaktosidaz enzimiyle sağlanır. İnsanlarda laktaz enzimiyle ilgili olarak ortaya çıkan problemler, bu enzimin salgılanmamasından veya doğumdan itibaren ince bağırsakta yetersiz miktarda bulunmasından kaynaklanmaktadır. Alınan laktoz ince bağırsakta parçalanmadan kalın bağırsağa (kolon) geçer. Burada laktoz yoğunluğu artar ve bunun sonucu olarak ozmotik basınç yükseldiği için bağırsak lümenine hızlı bir şekilde su gelir. Laktoz daha sonra kalın bağırsakta bulunan bakterilerin sentezledikleri enzimle parçalanır. Fermentasyona uğrar ve bu fermentasyon sonucu kısa zincirli yağ asitleri, hidrojen, karbondioksit ve çeşitli asitler oluşur. Bu olayların sonunda kişilerin bağırsağında gaz toplanır ve bunlarda şişkinlik, karın ağrısı, kramplar ve diyare gibi rahatsızlıklar oluşturarak, buna “laktoz intoleransı” denilir. Laktoz intoleransı olan kişiler yoğurt ve ayranı daha rahat tüketebildikleri gibi probiyotik mikroorganizma içeren süt ürünlerini de kullanabilirler. *Lactobacillus acidophilus* içeren sütle beslenmenin laktozun sindirilmesinde etkili olduğu ve bununda *L. acidophilus*’ un bağırsaktaki işlevinden kaynaklandığı bildirilmiştir [23].

Serum kolestrolünün düşürülmesi: Bazı kan lipidlerinin yüksek düzeye varması kalp damar hastalıkları açısından risk faktörü oluşturabilir. Araştırmalar, kültürlü fermente süt ürünleri tüketiminin, serum kolestrol değerinin düşmesine yardımcı olduğunu göstermiştir [24]. Hiperkolestemik insanların  $10^9$  /g oranında probiyotik bakteri içeren fermente süt ürünleriyle beslenmesi sonucunda, kolestrol değerinin 3,0 g/l’ den 1,5 g/l’ ye düştüğü belirlenmiştir [25].

Hipertansiyon: Yaşlı hipertansif bireyler üzerinde yapılan çalışmalarda 8 hafta süreyle fermente edilmiş süt tüketiminin sistolik ve diastolik kan basıncını önemli derecede azalttığı bildirilmiştir. Bu ve benzeri çalışmalar sonucu probiyotik bakterilerin hipertansiyonu düşürmek için alternatif bir yaklaşım olabileceği belirlenmiştir [24].

İmmün sistemin düzenlenmesi: Probiyotik bakterilerin endojen savunma mekanizmasının arttırdığı ileri sürülmektedir. Probiyotiklerin barsaklarda özgül olmayan savunma bariyerini uyarıcı etkisi, artan intestinal permeabilityi normale dönüştürmesi ve barsak mikroflorasını değiştirmesi ile açıklanmaktadır. Probiyotiklerin bu etkinliklerini fagositik aktivite, sitokin salınımı, doğal öldürücü hücre aktivitesi, immünoglobulin aktivitesi ( Ig A, IgG, IgM ), T ve B hücre fonksiyonunu arttırarak gösterdiği ileri sürülmektedir [24]. Probiyotiklerin bağırsak fizyolojisi üzerine dolaylı veya doğrudan etkide bulunarak immün sistemi uyardığı, bu çerçevede konakçının ağız ve sindirim sistemi dâhil, üst solunum yolu ve ürogenital sistem mukozal yüzeyini etkileyerek iyi hal ve sağlığı geliştirici, hastalık riskini azaltıcı potansiyel etkiye sahip olduğu bilinmektedir [8].

Probiyotiklerin hastalık durumunda kullanımları ve durumlar ‘Sanders (1999)’ tarafından Çizelge 2.2’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Probiyotiklerin sağlık bakımından önemleri [4].

| Kullanıldığı durumlar                    | Mekanizma                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Laktoz sindirimi                         | Bakterial laktozun laktoza hidrolizi                                                                                                                                                                                                                                        |
| Enterik patojenlere karşı direnç oluşumu | <ul style="list-style-type: none"> <li>Patojenler için uygun olmayan ortam oluşturma (bakteriyosin üretimi, ortam pH'sını düşürme ve kısa zincirli yağ asitleri oluşturma),</li> <li>Kolonizasyona karşı direnç oluşturma,</li> <li>Gut florasına etki gösterme.</li> </ul> |
| Anti kolon kanser etkisi                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Kolonik mikropların karsinogen etkili enzimlerinin inhibisyonu,</li> <li>Karsinogen deaktivasyon,</li> <li>İmmün cevap oluşturma.</li> </ul>                                                                                         |
| İmmün sistemin düzenlenmesi              | <ul style="list-style-type: none"> <li>İnfeksiyon ve tümörlere karşı oluşan spesifik olmayan savunmanın güçlendirilmesi,</li> <li>Antijene spesifik immün cevabın desteklenmesi,</li> <li>IgA üretimini artırma.</li> </ul>                                                 |
| Alerji                                   | Antijen translokasyonun kana karışmasını önleme.                                                                                                                                                                                                                            |
| Kalp hastalıkları                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>Bakteri hücreleri aracılığıyla kolesterolün asimilasyonu,</li> <li>Antioxidative erki.</li> </ul>                                                                                                                                    |
| Yüksek tansiyon üzerine etki             | Hücre duvarı bileşenlerinin anjiyotensin olarak görev üstlenmesi.                                                                                                                                                                                                           |
| Ürogenital enfeksiyonlar                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Üriner ve vajinal hücrelerin adhezyonu,</li> <li>İnhibitör madde üretimi (<math>H_2O_2</math> üretimi).</li> </ul>                                                                                                                   |

## 2.2. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri prokaryot, heterotrof ve kemo-organotrof olan canlı grubu içinde yer alır. Genel olarak bu özelliklere gösteren bakteriler; *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetracoccus* ve *Leuconostoc*' lardır [35-36].

### 2.2.1. Genel özellikleri

Laktik asit bakterileri; Gram pozitif, spor oluşturmeyen, çubuk ve kok şeklinde olmakla beraber, karbonhidrat fermentasyonu sırasında en yüksek son ürün olarak laktik asit üretirler. Bazı laktobasil'ların hareketli ve endospor oluşturduğu, bazı streptokoklarda aerob ortamda ürediği, yine bazı laktobasil ve tetrakoklarda katalaz pozitif reaksiyon verdikleri de bilinmektedir. Bu özelliklere gösteren bakteriler arasında 4 bakteri sınıfı ayırılır; *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc*' lar [35- 36].

Bütün laktik asit bakterileri anaerobik koşullar altında gelişim gösterebilmektedir. Ancak, pek çok anaerobik bakterinin tersine oksijene karşı duyarlı değildirler, yani oksijen varlığında da gelişim gösterebilmektedirler. Bu nedenle de aerotolerant anaerob organizmalar olarak adlandırılırlar [26-28].

Laktik asit bakterileri laktik asit fermentasyonu ile oluşturdukları ürünlerin cins ve miktarına göre de sınıflandırılır. Zorunlu homofermentatif laktik asit bakterileri glukozu, Fruktöz Di Fosfat (FDP) yolu ile parçalayarak fermentasyon sonucu % 99 oranında laktik asit, %1 oranında diğer bileşikler meydana getirirler. Zorunlu ve fakültatif heterofermentatif laktik asit bakterileri, glukozu Hekzoz Mono Fosfat (HMF) yolu ile parçalayarak fermentasyon sonucu % 70 laktik asit ve %30 oranında da diğer bileşikler, özellikle asetik asit, etil alkol ve karbondioksiti oluştururlar [30-34]. Homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterilerinin izledikleri metabolik yol birbirinden farklıdır. *L. plantarum* (sinonimleri: pentosus, arabinosus) glukozu homofermentatif olarak metabolize ederken, pentozları laktat ve asetat' a PP yolu ile hidrolize etmektedir. *L. casei* de glukozu homofermentatif, ribozu ise heterofermentatif olarak metabolize etmektedir [35].

Homofermentatif laktik asit bakterileri, fermentasyon işleminin son aşamasında pirüvik asitin laktik asite indirgenmesi için gliseraldehit 3-fosfat'ın dehidrogenasyonundan elde edilen NADH+H kullanmaktadır. Ortamdaki oksijenin varlığına da bağlı olarak diğer bir reaksiyon serisinde pirüvatın yalnızca küçük bir kısmı dekarboksile edilmekte ve asetat, etil alkol, karbondioksit ve belki asetoina dönüştürülebilmektedir [35].

Fakültatif heterofermantatif laktik asit bakteriler ise heksoz şekerleri laktik aside fermente ederken, pentoz şekerleri laktik asit ve asetik asite fermente ederler. Zorunlu heterofermentatif laktik asit bakterileri, heksoz ve şekerleri laktik asit, asetik asit (veya etanol) ve CO<sub>2</sub>' e, pentoz şekerleri ise laktik asit ve asetik aside fermente ederler [35]. Heterofermentatif laktik asit bakterileri FDP yolunun önemli enzimlerinden aldolaz ve trioz-fosfat izomeraz enzimine sahip değildir. Bu yüzden heterofermentatif türler FDP yolunu kullanamamaktadır. Glukozun yıkımı pentozfosfat (PP) yolu ile olmakta ve sonuçta laktat ile birlikte yaklaşık eşdeğer miktarda etil alkol ve karbondioksit üretilmektedir. Bir kısım heterofermentatif laktik asit bakterileri ise Asetil - P'yi ya kısmen ya da tamamen asetik asite dönüştürebilmektedir.

Laktik asit bakterilerine su ve toprakta rastlanılmazken, çeşitli cins ve türlerde olmak üzere, süt ve süt ürünleri üretim yerlerinde, bitki ve bitki atıklarında, insan ve diğer canlıların bağırsak sistemlerinde rastlanır. Ayrıca sağlıklı kadınların vajen florasında dominant olarak bulunmaktadır [34, 37, 38].

### **2.2.2. *Lactobacillus* cinsi bakterilerin genel özellikleri**

*Lactobacillus* cinsi bakteriler, *Lactobacillaceae* familyasına ait olup, Laktik asit bakterileri grubundandır. *Lactobacillus* spp.' ler anaerobik, gram (+), katalaz (-) bakterilerdir, spor oluşturmazlar. Çoğu *Lactobacillus* spp. basil ancak bazı türleri koko-basil şeklindedir. Bu mikroorganizmalar gelişebilmeleri için aminoasit, peptit, nükleik asit türevi vitamin, tuz, yağ asidi

veya yağ asidi esterleri ile fermente edebilecekleri besin maddelerine ihtiyaç duyarlar [35]. Kromozomlarındaki nükleik asit kompozisyonunun % 33–55' ini G+C oluşturmaktadır [40]. Oksijeni kullanma özelliğine göre mikroaerofilik ya da anaerob olup %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda gelişme gösterebilirler [39]. 10-30 µ uzunluğunda 0,7-2 µ kalınlığında, çubuk şeklinde tek tek veya zincirler şeklinde bulunur. Genç bakteriler genellikle zincir oluşturmaz. Optimum olarak 37-45 °C' de aktivite gösterirler. 70 °C' nin üzerindeki sıcaklıklarda ise canlılıklarını kayıb ederler [19-21, 23, 29].



Şekil 2.1. *Lactobacillus acidophilus*' a ait SEM görüntüsü [41].

*Lactobacillus* genusu türler, silajda, hayvan ve insan bağırsağında bulunurlar. Normal süt florasında yer alırlar. Nitratı redükte etmezler, katalaz enzimi üretmezler [35]. *Lactobacillus* genusu türlerine daha çok insan, hayvan ve bitkilerle birlikte bunların bulunduğu ortamda rastlanır. Genellikle zengin karbonhidratlı ortamlarda bulunurlar. Karbonhidrat metabolizması sonucunda oluşan ürünler ortamın asiditesini artırır. Böylece bu tip ortamlarda gelişemeyen bakteriler için antimikrobiyal etki yaratır. Özellikle insan ve hayvan bağırsaklarında yaşayanlar, o koşullara adapte olan türlerdir. Vajinanın normal florasını oluştururlar. Hücreler yuvarlaktan ovale kadar değişen şekilde olup 2 µm çapta, ikili veya zincir şeklinde bulunurlar. Genellikle hareketsiz olan bu bakteriler kültür ortamında küçük ve renksiz koloniler oluştururlar [34, 35, 37, 38].

Elektron mikroskopuyla yapılan incelemelerde *Lactobacillus* cinsi bakterilerin 5 ana kısımdan oluştuğu gösterilmiştir. Bunlar hücre çeperi, sitoplazmik membran, ribozomlar ve nükleer (kromozomlar ve plazmidler) elementlerdir. Hücre çeperi; *Lactobacillus* cinsi bakterilerde 20 – 40 nm kalınlığında, mineral maddeler (tuz vb.), su ve metabolitleri geçirebilen peptidoglikan (murein) bir tabakaya sahiptirler. Laktik asit bakterilerinin proteinleri kullanabileceği büyüklüğe dönüştürebilmesi enzimler yardımıyla sitoplazmik membranda gerçekleşir. Bunun yanında sitoplazmik membranda fosfotransferaz enzimleriyle aktif taşıma da yapılmaktadır. Peptidoglikanların ekstrasellüler polimerizasyonu için gereken enzimler de sitoplazmik membranda bulunmaktadır. Laktik asit bakterilerinde ribozomlar 70S tipindedir, 70S, 50S büyük ve 30S küçük olmak üzere iki alt ünitelerden oluşur. Laktik asit bakterilerinin birbirlerinden ayrımında 16S rRNA' nın özelliklerinden yararlanılmaktadır ve 16S rRNA' da değişen ve değişmeyen kısımlar bulunur. Değişen kısımlar yakın akrabaların tespitinde kullanılırken, değişmeyen kısımlar ise uzak akrabalıkların tespitinde kullanılmaktadır. Laktik asit bakterilerinin çoğu en az bir adet plazmid içerir. Plazmidler, ekzopolisakkarit ve antimikrobiyal madde sentezi gibi, koruma görevleri üstlenmiştir [42].

### 2.3. Bakteriyel Eksopolisakkaritlerin (EPS) Probiyotik Önemi

Laktik asit bakterileri (LAB) diğer mikroorganizmalar gibi, hücre içinde yerleşimlerine göre sınıflandırılabilen üç çeşit polisakkarit üretirler. Bunlardan birincisi sitozol içinde yer alır ve karbon ve enerji kaynağı olarak işlev görürken, ikincisi peptido glikanlar ve teikoik asitler gibi çeperde yer alırlar. Üçüncü grup ise, hücre içinde oluştuktan sonra hücre dışına salgılanmaktadır. Bazı durumlarda iki form aynı mikroorganizma tarafından oluşturabilir. Bu polimerlere kapsül ve mikrokapsül şeklinde polisakkarit adı verilmektedir [43,44].

Karbonhidrat metabolizması bir çok bakteri türünde enerji ve biyokütle üretimine ek olarak ekzopolisakkarit üretiminde de önemli bir rol

oynamaktadır. Hücresel lokasyonları, kimyasal ve fiziksel yapı özellikleri ile fonksiyonları esas alınarak mikrobiyal ekzopolisakkaritleri üç ana grup altında toplamak mümkündür. Bunlar; hücre yüzeyine kovalent bağlarla bağlı olan kapsüler polisakkaritler (CPS), hücre duvarının bir bileşeni olan polisakkaritler (LPS) ve dış çevreye salınan ya da hücre yüzeyi ile kovalent olmayan, gevşek bağlarla ilişkilenmiş polisakkaritlerdir (LAM) [46].

Ekzopolisakkaritlerin; bakteriyi sıvı kaybına, makrofajlara, fagositoza, bakteriyofajlara, protozoa, antibiyotik ve toksik bileşiklere karşı korumakla ve bunların yanında metal iyonlarının hücreye alınmasında görevli olduğu, bilinen özelliklerindendir . Ekzopolisakkaritler diğer önemli özellikleri ise; bakterinin yüzey tutunmasında yapıştırıcı (slime) işleve sahip olması ve bulunduğu ortama tutunma ve biyofilm oluşturmada etkili olmasıdır. Bütün bu özellikler ekzopolisakkarit üreten bir bakteriye bulunduğu ortamda stabil olarak kalabilme ve baskın olarak büyüme özelliği kazandırmaktadır [45].

Eksopolisakkaritler (EPS) çok sayıda bakterinin (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) yüzeyinde bulunan ekzoselüler polimerlerdir [47]. Genellikle güvenilir olarak (GRAS) tanımlanan laktik asit bakterilerinin EPS ürettikleri bilinmekle birlikte, propiyonik asit bakterilerinin ve bifidobakterilerin de EPS ürettikleri bildirilmiştir [48]. Bu polimerlerin bir diğer dikkate değer özelliği gıda sanayinde kıvam arttırıcı olmalarıdır [49,50]. EPS üreten LAB suşları yoğurt, peynir, tereyağ, kefir ve geleneksel fermente süt ürünlerinin üretiminde starter kültür suşları olarak da kullanılmaktadırlar [51]. Starter kültürlerin EPS oluşturma yetenekleri, üretimde kullanıldıkları fermente süt ürünlerinin yapısal, aromatik ve reholojik özellikleri üzerinde belirgin bir şekilde etki etmektedir [52]. EPS'lerin immun sistemi teşvik ettiği, antitümoral ve kolesterol düşürücü aktiviteye sahip olduğu da saptanmıştır [53].



## **2.4. Agregasyon**

Agregasyonun kelime anlamı; toplanma, bir araya gelerek kümeleşmedir. Bakterilerin agregasyon özelliğine sahip olması bulunduğu hücrelere tutunma ve dominant olarak kolonize olmasını sağlayacağından özellikle probiyotik açıdan önemli bir kriterdir. Laktik asit bakterilerinin bu özellikleri nedeniyle bulunduğu yüzeye ve birbirlerine yapışarak biyolojik bir bariyer oluşturduğu bilinmektedir [76, 77].

Bakterilerde agregasyonun iki şekilde gerçekleştiği bilinmektedir. Ototregasyon, aynı türe ait mikroorganizmaların birbirlerine tutunarak oluşturdukları hücre kolonileri şeklinde tanımlanmaktadır. Koagregasyon, farklı türe ait iki mikroorganizmanın birbirine tutunması şeklinde tanımlanabilir. Probiyotik türler otoagregasyon yetenekleri ile bağırsak epitel hücrelerine tutunurken ve koagregasyon yetenekleri ile patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu önleyen bir bariyer görevi gördükleri bilinen özelliklerindendir [78-80].

## **2.5. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri**

### **2.5.1. Laktik asit üretimi**

Antimikrobiyal maddeler, mikroorganizma gelişimini engelleyen, biyolojik kökenli, ikincil metabolitlerdir. Bunlar, mikroorganizmanın çoğalmasını engelleyici “bakteriostatik” veya “fungostatik” olabildikleri gibi; mikroorganizmanın ölümüne sebep olan “bakterisit” ve “fungisit” gibi maddeler de olabilirler. Mikroorganizmalar tarafından üretilen, düşük moleküler ağırlıklı, organik doğal ürünlerdir [81, 82].

Çeşitli ürünlerin doğal fermantasyonundan sorumlu olan laktik asit bakterilerinin ana fermantasyon ürünü heksozsdan D (-), L (+) ya da rasemik karışım şeklinde üretilen laktik asittir [83]. Laktik asit bakterilerinde laktik asit

üretimi iki farklı yolla gerçekleşebilmektedir. Laktik bakteriler oluşturdukları ürünler temel alınarak homofermentatif (aldolaz enzimine sahip olanlar) ve heterofermentatif (aldolaz ve triozfosfat izomeraz enzimlerine sahip olmayanlar) olmak üzere iki alt guruba ayrılmaktadırlar [28].

Süt endüstrisinde starter bakteriler olarak kullanılan laktokok suşlarının fermantasyon süreçlerindeki en önemli rollerinden biri, süt sekeri olan laktozu fermente ederek laktik asit oluşturmalarıdır. Yapılan çalışmalar süt ürünlerinde laktik asit oluşumunun süte antimikrobiyal özellik kazandırdığını ve mikrobiyal bozulmalara karşı daha dirençli hale geldiğini göstermiştir [84].

## **2.6. Gıda Katkı Maddeleri**

Katkı madde terimi Latince “addere” olarak ifade edilen katmak kelimesinden türetilmiştir. Gıda katkıları genel anlamda; tek başına gıda olmayan, ancak bunlara üretim, işleme, depolama ya da ambalajlama gibi aşamalarda katılan madde ya da madde karışımları olarak ifade edilmektedir [54].

Gıdalardaki katkı maddeleri denince, kendileri gıda maddesi olmadıkları halde gıdaların kalitesini arttırmak, kıvamını tutturmak, tadını ve rengini vermek, yapısını düzeltmek gibi işlevleri yanında onların hazırlanması sırasında da kolaylık ve iyileştirme sağlayan ve bu aşamadan sonra ise bozulmalarına engel olup raf ömürlerini uzatmak gibi birtakım teknolojik fonksiyonları olan maddeler anlaşılır [55].

Amerika Birleşik Devletleri’nde yürürlükte olan Gıda, İlaç ve Kozmetik Yasası’nda 1958 yılında gıda katkı maddeleri ile ilgili olarak yapılan değişiklik içerisinde verilen tanımda ise katkı maddeleri; belirli amaçla kullanım sonucunda direkt veya indirekt şekilde gıdanın bileşimi haline gelen veya karakteristiklerini değiştiren maddeler olarak tanımlanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization-WHO) ve Gıda Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization-FAO)’ nün ortak çalışmaları ile oluşturulmuş

Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (Codex Alimentarius Commission-CAC) tarafından verilen tanım ise oldukça ayrıntılıdır. Söz konusu tanımda, gıda katkı maddesi 'tek başına gıda olarak kullanılmayan ve gıdanın tipik bir bileşeni olmayan, besleyici değeri olsun veya olmasın, imalat, işleme, hazırlama, uygulama, paketlenme, ambalajlama, taşıma, muhafaza ve depo aşamalarında, gıdalara teknolojik amaçla katılan ya da bu gıdaların içinde veya yan ürünlerinde doğrudan ve dolaylı olarak bir bileşeni haline gelen veya bunların karakteristiklerini değiştiren maddeler' olarak ifade edilmektedir. Bu tanım gıdalara istenilmediği halde bulaşan kontaminantları veya besleyici kaliteyi arttırmak amacıyla katılan maddeleri içermemektedir [56].

#### **2.6.1. Gıda katkı maddesinin kullanımı**

Katkı maddeleri çok eski zamanlardan beri kullanılmaktadır. Eski insanlar gıdalarını tutsüleyerek (vinil guanikol ve fenol türevleri), sirke ile (asetik asit), yanmış kükürtle (kükürt dioksit), tuzlamak ve salamura yapmak (sodyum klorür ve sulfatlar) suretiyle korumaya çalışmışlardır. Bu insanlar gıdalarını böcek kabuklarını ezerek elde ettikleri kırmızı boya (kokineal-1-metil-2-carboksi-3,5,6,7,8 pentahidroksantakinon-7-glukozid) ve safran (krosetin digentiobiyoz ester) gibi doğal boyalarla da renklendirmişlerdir. Ayrıca arap sakızı (gam arabik) ile besinlerinin kıvamlarını arttırmışlardır. Kullandıkları bazı katkıları birden fazla görev üstlenmiş, örneğin koruyucu (preservative) olarak kullandıkları tutsü, tuz ve sirke aynı zamanda gıdanın lezzetine de katkıda bulunmuştur. Aynı şekilde safran ise hem renk maddesi (coloring matter) olarak hem de gıdaya özel bir çeşni katmak amacıyla (flavour enhancer) kullanılmıştır. Bu maddelerin birçoğu bugün de üç temel fonksiyon için kullanılmaktadırlar: kozmetik, koruyuculuk, işleme. Amaçlar bu fonksiyonlarla sınırlı kalsa da zaman içinde katkı maddelerinin sayıları çok artmış ve 4000' li rakamlara varmıştır [57].

Mikroorganizmaların, çoğunlukla maya bakteri ve küflerin, beslenme gereksinimleri, insan veya hayvan beslenme gereksinimleri ile benzerlik göstermektedir. Bu mikroorganizmaların fotosentez yapmayanları (bazı bakteriler yapabilir) enerjilerini organik maddelerin oksidasyonundan elde ederler. Bu benzerlikten dolayı mikroorganizmalar yaşadığımız habitatlarda doğal olarak bulunmaktadır. Bu koşullarda zararlı olduğu bilinen patojen mikroorganizmaların da yaşadığı ve değişik çevre koşullarında baskın rol aldıkları bilinmektedir. Ayrıca, besinlerde üreyen mikroorganizmaların ekstrasellüler ürünlerinin yoğunluğunun artması ve insan sağlığını olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle gıda teknolojisinde besinlerde bulunan mikroorganizmaların kontrolünü zorunlu kılmıştır [58].

Günlük hayatımızda yüzlerce farklı gıda katkı maddeler tüketilen gıdalarda yer almıştır. Bu maddelerin bir kısmı yararları için kullanılmaktadır. Bu yararlardan;

- Gıdaların raf ömrünün uzatılması ve kayıpların azaltılması: Örneğin, ekmeğin küflenmesini önlemede kalsiyum propiyonat, kür edilmiş et ürünlerinde botulizmi engellemede nitrat ve nitrit, yağların acılaşmasına karşı butillendirilmiş hidroksianisol (BHA) gibi maddelerin kullanımı, bu amaca örnek olarak verilebilmektedir.
- Gıdaların duysal özelliklerinin düzeltilmesi ve geliştirilmesi: Bu amaçla kullanılan gıda katkılarına örnek olarak emülgatörler, renklendiriciler, lezzet vericiler, lezzet arttırıcılar, tatlandırıcılar, hacim arttırıcılar verilebilmektedir.
- Gıda kalite karakteristiklerinin muhafaza edilmesi: Salata soslarında yağ ayrılmasını önleme amacıyla katılan emülgatörler veya fırınlanmış ürünlerde kullanılan kabartma ajanları bu amaçla kullanılan katkı maddeleridir.

- Gıda hazırlamada yardımcı olarak; hazır pudinglerin eldesinde fosfatlı katkı maddelerinden yararlanılması örnek olarak verilebilmektedir.
- Besleyici değerin korunması: Gıdalarda bulunan C vitamini gibi kolay bozunabilen besleyici özellikteki maddeleri koruyabilmek amacıyla antioksidanlardan yararlanılmaktadır [56].

Uluslararası kuruluşlarca kabul görmüş katkı maddesine bir numara verilir. Numaralanmış bu listelerden Avrupa Ekonomik Topluluğu'nda kullanımına izin verilen katkı maddelerine E kodu verilmiştir. Numaranın başındaki "E" ya da EU Avrupa Birliği'ni simgelemektedir. Ülkemizde de AET'ye uyum programı uygulandığı için aynı isimlendirme kullanılmaktadır. Kullanılmasına izin verilen katkı maddeleri için bazı ülkeler tarafından sınırlamalar getirilmiştir. Nitekim listelerde izin verildiği halde bazı katkı maddelerini, Amerika, Avusturya, Avrupa kendi ülke sınırları içerisinde yasaklamışlardır. Avrupa Ekonomik Topluluğunca, gıda maddelerinde kullanılan katkı maddeleri ile ilgili yapılan çalışmalar dikkate alınarak bu maddeler kendi içlerinde gruplandırılmışlardır:

A1 grubunda bulunan tüm maddelerin değerlendirilmeleri tamamlanmış ve günlük alınabilir dozlar (ADI) belirlenmiştir. Bunlar kullanımına izin verilen maddelerdir. A2 grubunda bulunan maddelerin değerlendirmeleri henüz tamamlanmamış ancak, günlük kullanım miktarları belirlenerek geçici olarak kullanımına izin verilmiş olan maddelerdir.

B grubu listesinde bulunan katkı maddelerinin değerlendirilmesi tamamlanmamıştır. B1 grubundaki maddelerde ise değerlendirmelere başlanmış olup, günlük alınabilir miktarlar tespit edilmemiştir. Bu gruptaki maddeler, üretimindeki önemlerinden dolayı teknolojik açıdan kullanımlarına izin verilen maddelerdir. B2 grubunda ise hiç bir değerlendirmeye tabi tutulmamış, ancak değerlendirmeye aday olan katkı maddeleri bulunur.

C listesi olumsuz yapı listesidir. C1 ve C2 gruplarında toksikolojik verilere göre kullanımı tamamen sakıncalı olanlar ya da kullanımına kısmen izin verilenler yer alır. C1 listesi gıda katkısı olarak kullanımları insan sağlığı için zararlı olarak kabul edilen katkı maddeleridir. ADI değerleri yoktur. C2 listesi kullanımı ancak belirli amaçlar için sınırlandırılmış olan katkı maddelerini içerir [59].

Koruyucu (preservative), renklendirici (coloring), oksitlenmeyi önleyici (antioxidant) v.s. işlevi gören bu maddelerin kullanımı son yıllarda çok hızlı bir artış göstermiş ve yıllık 200.000 ton miktarına ulaşmıştır. Batı ülkeleri mutfaklarında yaklaşık %75 oranında işlenmiş gıda ürünleri tüketildiği varsayılarak bu ürünlerle kişilerin her yıl yaklaşık 5-6 kg katkı maddesi aldığı hesaplanmıştır. Tüketimdeki bu hızlı tırmanmaya paralel olarak katkı maddelerine karşı gelişen ve çok değişkenlik gösteren yan etkilerde de artma gözlemlenmektedir [60].

Tarihsel süreç içerisinde katkı maddeleri her zaman yararlı amaçlar için kullanılmamışlardır. Pek çok eski kaynakta un, çay, şarap ve bira gibi ürünlerin yaygın biçimde bu maddelere ilave edildiği durumlar belirtilmektedir. İşte bu yüzden katkı maddelerinin zararlı etkilerini önlemek ve ucuz dolgu maddeleri olarak kullanılmalarına meydan vermemek amacıyla birçok ülkede yasal önlemler alınmıştır [54].

Ülkemizde de gıda katkı maddeleri ile ilgili olarak ilk kez 1983' de Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı tarafından bir yönetmelik çıkarılmıştır. Bunun yeni bir düzenlemesi de yine aynı bakanlık tarafından 1990 yılında yürürlüğe konulmuştur. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nca hazırlanmış olan ve 16 Kasım 1997 tarihli Resmi Gazete' de yayımlanarak yürürlüğe giren Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği (TGKY), katkı maddelerinin kullanımları konusunda başka yeni düzenlemeler getirmiştir. Söz konusu olan bu kodekste gıda katkı maddelerinin yeniden bir tanımı yapılmış ve her birinin EC kodları, adları, kullanılabileceği gıda grupları ve izin verilen maksimum miktarları listeler

halinde açıklanmıştır [54].

Ürüne katılacak, katkı maddesinin maksimum miktarının tespiti ayrı bir çalışmayı gerektirmektedir. Ürünün üretim teknolojisinin gerektirdiği miktar ile günlük doz miktarı aşıldığında, katkı maddesinin kullanılmasına izin verilmemesi gerekmektedir. Günlük doz, teknolojinin gerektirdiği miktarda aşılmadığında, günlük hayatımızda kullanılan ürünlerden kaç adedinde bu katkı maddesinin kullanıldığı incelenir. Bu ürünlerin toplamındaki katkı madde miktarı, günlük maksimum alınmasına izin verilen dozu aştığında, bu katkı maddesinin tüm ürünlerde kullanılmasının yasaklanması gerekir [59].

Uluslararası JECFA (Join Expert Commitee on Food Additive) komitesi, bütün faktörleri dikkate alarak gıda ürünlerinde kullanılacak katkı maddelerinin % miktarlarını tespit etmek zorundadır. Komitenin duyarlılığına rağmen vücut ağırlıkları farklı olan insanlarda riskli durumlar oluşabilmektedir. 80 kg vücut ağırlığına sahip insanın günlük maksimum dozu 80 mg olsa, aynı gıda ürünlerini kullanan 60 kg.'lık bir insan için doz aşımının oluşması kaçınılmaz olacaktır [59].

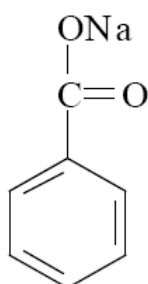
Katkı maddelerinin besinlerde kullanımları Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (Codex Alimentarius Commission-CAC) tarafından düzenlenmektedir. CAC' ın bünyesinde oluşturulan Gıda Katkıları ve Kontaminantları Kodeks Komitesi (Codex Committee on Food Additives and Contaminants-CCFAC) bu maddeleri ilgilendiren tüm konularda öneri ve tavsiyeler veren bir kuruluştur. Birleşik Gıda Katkıları Uzman Komitesi (Joint Expert Committee on Food Additives-JECFA) ise bu komitenin altında çalışan ve gıda katkı maddelerinin toksikolojik güvenilirliği üzerinde çalışmalarda bulunma; aynı zamanda bunlarla ilgili spesifikasyonları belirleme görevini yüklenmektedir. Çizelge 2.3' de E kodu taşıyan bazı katkı maddeleri ve bazı etkileri gösterilmiştir [54].

Çizelge 2.3. E kodu taşıyan bazı katkı maddeleri ve bazı etkileri [55].

| E-Numarası | Adı                       | Sınıf                       | Etki                                 |
|------------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| E102       | Tartrazin                 | Renklendirici               | Alerjik                              |
| E110       | Gün Batımı Sarısı         | Renklendirici               | Alerjik, böbrek bozukluğu, kanser    |
| E123       | Amarat                    | Renklendirici               | Alerjik, kanser, doğumsal defekt     |
| E133       | Brillant Blue FCF         | Renklendirici               | Alerjik, kanser                      |
| E210       | Benzoik Asit              | Koruyucu                    | Başağrısı, barsak bozukluğu, alerjik |
| E211       | Sodyum Benzoat            | Koruyucu                    | Başağrısı, barsak bozukluğu, alerjik |
| E320       | Butil Hidrosiyanzol (BHA) | Oksitelenmeyi Önleyen Madde | Kanser                               |
| E321       | Butil Hidroksitoluen      | Oksitelenmeyi Önleyen Madde | Kanser                               |
| 154        | Brown FK                  | Renklendirici               | Alerji, mutasyon, kanser             |
| 155        | Brown HT                  | Renklendirici               | Alerji, mutasyon, kanser             |

### 2.6.2. Sodyum benzoat (E 211)

Sodyum benzoat molekül ağırlığı 144,11 olan, benzoik asidin sodyum tuzudur. Erime sıcaklığı 300 °C olup, suda yüksek derecede çözünürlük gösterir (20 °C' de 550-600 gr/litre). Bunun yanında etanol ve metanolde de çözünebilir [61].



Sodium benzoate

Şekil 2.2. Sodyum Benzoat' ın moleküler yapısı [62].



Kuru karanfil, kuru erik, tarçın ve yoğurt gibi bazı besinlerde doğal şekilde bulunan benzoik asit ( $C_6H_5COOH$ ) çoğunlukla sodyum tuzu formunda (sodyum benzoat), besinlerin koruyucu katkı maddesi biçiminde uzun süreden beri kullanılmaktadır. Serbest benzoik asidin düşük düzeylerde çözünürlüğü, sodyum tuzunun tercih edilmesine yol açmaktadır. Böylece uygulama aşamasında tuz aside, yani aktif forma dönüşmektedir. Dissosiyasyon olmamış benzoik asit molekülünün antimikrobiyel aktivitesi bulunduğu ve mikroorganizmaların inhibe edilmesi ya da öldürülmesinde sahip olduğu lipofilik karakterin etkin faktör olduğu ileri sürülmektedir. Burada benzoik asidin optimum mikrobiyel inhibisyon yaptığı pH aralığı 2.5-4.0 olup, bunun sorbik ya da propiyonik asit değerlerinden düşük olduğu belirtilmektedir [54].

Sodyum benzoat ticari olarak beyaz toz ya da pulcuklar halinde bulunmaktadır. Bu tuz sıvılara toz halinde katılmakta ve benzoik asite oranla hızlı çözünmektedir. Buna göre bu tuzun sudaki çözünürlüğü; (25 ° C de) 50 g / 100 mL, alkolde ise 1.3 g / 100 mL düzeyinde olmaktadır. Serbest asit formunda ise bu değer su içinde 0.34 g / 100 mL civarındadır. Benzoik asitin diğer bir tuzu olan potasyum benzoatın çözünürlüğü daha düşük olduğundan aynı antimikrobiyel etkinin sağlanabilmesi için yaklaşık 2 kat kadar yüksek bir konsantrasyonda kullanmak gerekmektedir. Sodyum benzoatın suda çözünürlüğü benzoik asite oranla 200 kat daha fazladır [54, 63]. Laktik asit bakterilerinin süt içinde bulunan hippürik asidi benzoik aside çevirerek bu ürünü süt ve ürünlerinde doğal bir bileşen olarak ortaya çıkardığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir [54].

Sodyum benzoat, benzoik asit ve sodyum hidroksitin nötrale olmasından meydana gelmektedir. 1997 yılında, dünyadaki sodyum benzoat üretim miktarı 55.000-60.000 ton olarak belirlenmiştir. En yüksek üretici ülkeler, ABD, Hollanda, Estonya ve Çin'dir [54, 64].

Benzoik asit ve sodyum benzoat gıdalarda koruyucu katkı maddesi olarak bulunmaktadır. Benzoik asit ve sodyum benzoat, meyveli içeceklerde, kimyasal olarak kabartılmış unlu mamüllerde, fermente ürünlerde ve pH aralığı 4.5'un altında olan gıda maddelerinde koruyucu olarak kullanılırlar. Bu katkı maddelerinin dezavantajlarından biri tatta bozulmaya neden olabileceğidir. Maya üzerine yaptığı inhibe edici etkiden dolayı maya ile kabartılmış ürünlerde kullanılmaz. Amerika Birleşik Devletlerinde gıdalarda kullanılan benzoik asit limiti % 0,1'dir. Bu oran diğer ülkelerde %0,15 ile 0,25 arasında değişmektedir. Avrupa komisyonun gıdalardaki sodyum benzoat ve benzoik asit kullanım limiti %0,015- 0,5'dir [54, 65].

Benzoik asit, bazı süt ürünlerinde olduğu gibi birçok besinin yapısında doğal olarak bulunmaktadır. Miktarı ise 40 ppm'den fazla değildir. Koruyucu amacı ile kullanıldığında en yüksek benzoik asit ya da sodyum benzoat konsantrasyonunun 2000 ppm olması istenmektedir [54].

Benzoik asit ve tuzları öncelikle antimikotik madde olarak kullanılmakta ve bundan dolayı çoğu maya ve küf % 0,05-0,10 dissosiyeye olmamış benzoik asit konsantrasyonunda inhibe olmaktadır. Besin zehirlenmesi yapan ve spor oluşturan bakteriler ise bu asidin % 0,01-0,02 dissosiyeye olmamış konsantrasyonunda inhibe olmaktadır. Ancak bunun yanı sıra bozulmayı sağlayan pek çok bakteri belirtilen bu maddelere karşı direnç göstermektedir [54].

Sodyum benzoat özellikle işlenmiş yiyeceklerde bulunan bir katkı maddesidir. Çikolata, çeşitli meyve suları, şekerlemeler, dondurma, kremler ve çikletler ve bazı ilaçlarda bulunmaktadır. Gıda sektöründe etkili bir antimikrobial ve antifungusit ajan olarak kullanılmaktadır. Benzoik asidin bir tuzu olan sodyum benzoat, genelde en çok maya ve bakterilere karşı aktiftir. Buna karşın küfler üzerinde daha az aktiftir . Uygun şartlar altında benzoik asidin bakteriyostatik (gelişimi durdurucu), bakteriyosidal (öldürücü), fungistatik ve fungisidal

özelliklere sahip olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda pH 'sı 2.3 - 2.4 arasındaki % 0.02 - 0.03 'lük sodyum benzoat çözeltilerinin pek çok fermente edici organizmanın gelişimini engelledikleri ve pH 'sı 3.5 - 4.0 arasında olan meyve sularında % 0.06 - 0.10 'luk konsantrasyonunun inhibisyon için yeterli olduğu belirtilmiştir. *Aspergillus* 'un toksin üreten türlerinin gelişimi ve aflatoksin üretiminin benzoik asit ile birlikte diğer organik asitlerin dissosiyasyon olmamış formları tarafından kısmen ya da tamamen durdurulabildiği bildirilmiştir [54, 65-67].

Diğer koruyucularda olduğu gibi benzoik asidin de sinerjistik etkileri araştırılmaktadır. Sodyum klorürün sodyum benzoat ile fark edilir bir sinerjistik etki oluşturduğu bildirilmektedir. Maya ve küfler üzerinde ise benzoik asit ve ısı kombinasyonunun sinerjistik etki oluşturduğu gösterilmiştir [68].

Besinleri koruyucu maddeler arasında sodyum benzoat düşük maliyeti ile avantaj sağlamaktadır. Ancak bu maddenin dar bir pH aralığında etkili olması, bazı besinlerde ve özellikle meyve sularında istenmeyen tat oluşumuna neden olması ile düşük düzeylerde potasyum sorbatla birlikte kullanılmasının daha uygun olacağı belirtilmektedir. Sodyum benzoatın değişik besinlerde kullanım oranı genellikle % 0,05–0,10 arasında değişmektedir [68].

Sodyum benzoat'ın gıdalara farklı ülkelerde farklı miktarda ilave edildiği bilinmektedir [63]. Oral olarak alınan Sodyum benzoat'ın sindirim sisteminde hızlı bir şekilde emildiği, insanlarda ve deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [69]. İnsanlarda alındıktan sonra 1-2 saat içinde plazma konsantrasyonunda en yüksek düzeye vardığı bilinmektedir [70]. Sodyum benzoat dermal ya da oral yolla alındıktan sonra karaciğerde metabolize olmaktadır [71]. Ağızdan alımı halinde benzoik asit gastrointestinal sistemde hızla absorbe edilir ve karaciğerde glisin ile birlikte

hippürik asit yapılanmasını sağlar. Daha sonra hızlı bir şekilde idrar yolu ile atılır. Sodyum benzoat'ın kısa süreli oral alımına bağlı olarak serum gama glutamiltranspeptidaz, albumin, kolinesteraz seviyelerini değiştirdiği, özellikle periportal alandaki hepatositlerde camsi sitoplazmanın olduğu [72, 73], ancak böbrek dokusunda bir değişikliğin gözlenmediği bildirilmiştir [72]. Benzoik asit'in oral, dermal ya da solunum yoluyla alımına bağlı olarak insanlarda düşük seviyelerde dahi astıma, deri döküntüleri gibi çeşitli allerjik reaksiyonlara ve anafilaktik şoka neden olduğu bildirilmiştir [74, 75].

A.B.D.' de gıda endüstrisinde benzoik asit ve sodyum tuzlarının yasalar çerçevesinde kullanılması serbest bırakılmıştır. Bazı ülkelerde kullanımına sınırlamalar getirilmiş, bazı ülkelerde ise bu maddenin gıda katkısı olarak kullanılmasına izin verilmiştir. Besinlerde % 1 ve daha yüksek oranda kullanıldığında benzoik asit, toksik etkilere neden olmaktadır. Genellikle gıda katkı maddesi olarak kullanımında öngörülen miktarı % 0,2 – 0,3 arasında olup, yalnızca Fransa'da peynir mayasında kullanılmaktadır. Sodyum benzoat'ın günlük olarak alınmasına izin verilen miktarı 0–5 mg/kg vücut ağırlığıdır [63].

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyaller

##### 3.1.1. Materyal örnekleri

Çalışmada kullanılan *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 ve *Lactobacillus plantarum* DSMZ 20246 suşları Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarı kültür stoklarından temin edilmiştir.

##### 3.1.2. Besiyerleri

Araştırmada kullanılan *Lactobacillus* türlerinin aktifleştirilmesinde ve diğer deneylerin gerçekleştirilmesinde Man Rogosa ve Sharp (MRS) sıvı besiyeri kullanılmıştır [85]. Bu besiyerinin içeriği Çizelge 3. 1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. MRS besiyeri

| Maddeler                              | g/l     |
|---------------------------------------|---------|
| Pepton                                | 10,0 g  |
| Beef Ekstrakt                         | 10,0 g  |
| Yeast Ekstrakt                        | 5,0 g   |
| Dekstroz                              | 20,0 g  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>       | 2,0 g   |
| Na-Asetat. 3H <sub>2</sub> O          | 5,0 g   |
| Tri Amonyum Sitrat                    | 2,0 g   |
| MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O | 0,2 g   |
| MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O | 0,05 g  |
| Tween 80                              | 1,08 ml |

Madeler 1000 ml distile su da çözünmüştür. Deneyin amacına göre besiyerine %1,5 oranında agar ilave edilerek katı besiyeri hazırlanmıştır. 0,01 N HCl ve/veya 0,01 N NaOH ile pH  $6,2 \pm 0,2$ 'ye ayarlanarak, 121 °C'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir [85].

Araştırmada kullanılan test bakterilerinin geliştirilmesi için Nutrient sıvı besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyerinin içeriği Çizelge 3.2' de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Nutrient sıvı besiyeri

| Maddeler       | g/l |
|----------------|-----|
| Beef Ekstrakt  | 1,0 |
| Yeast Ekstrakt | 2,0 |
| Pepton         | 5,0 |
| Sodyum Klorit  | 5,0 |

Madeler 1000 ml distile su da çözünmüştür. Deneyin amacına göre besiyerine %1,5 oranında agar ilave edilerek katı besiyeri hazırlanmıştır. 0,01 N HCl ve/veya 0,01 N NaOH ile pH  $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlanarak, 121 °C'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir [86].

Araştırmada dilüsyon için kullanılan serum fizyolojik çözeltisi, 0,875 g sodyum kloritin tartılarak 100 ml'ye distile su ile tamamlanmasıyla hazırlanmıştır. Dilüsyon çözeltisi 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

### 3.1.3. Bakterilerin muhafazası

1,5 mL' lik ağzı kapaklı tüplere yaklaşık 400 µL gliserol aktararak, 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiştir. Bakteriler uygun sıvı besiyerinde iki kez ard arda aktifleştirilip, aktif kültürlerden 600 µL gliserol içeren steril tüplere paralelli olarak aktarılmıştır. Suşlar derin dondurucuda -80 °C' de

depolanarak, muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar iki ayda bir yenilenmiştir [87].

#### **3.1.4. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları**

Laktik asit bakterilerinin aktifleştirilmesinde MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır. Tüm deneysel çalışmalar bakterilerin iki kez  $37\pm1$  °C'de 24 saat inkübe edilerek aktifleştirildikten sonra kullanılmıştır.

#### **3.1.5. Test bakterileri**

*E. coli* ATCC 35218, *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Bacillus cereus* RSKK 863, *Shigella sonnei* Mu:57, *Micrococcus luteus* NRLL B-4375 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 test bakterisi olarak çalışmada kullanılmıştır.

Test bakterileri Nutrient Broth sıvı besi ortamında  $37\pm1$  °C'de 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Test bakterilerin temin edildikleri kaynaklar Çizelge 3.3' de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Test bakterilerinin temin edildiği kaynak.

| Bakteri Suşları                          | Temin Edildiği Kaynak |
|------------------------------------------|-----------------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218       | R.S.K.K               |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923  | H.Ü.                  |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644  | A.Ü.G.M               |
| <i>Escherichia coli</i> O157:H7          | A.Ü.G.M               |
| <i>Micrococcus luteus</i> NRLL-B 4375    | R.S.K.K.              |
| <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076 | A.Ü.G.M               |
| <i>Bacillus cereus</i> RSKK 863          | R.S.K.K               |
| <i>Shigella sonnei</i> Mu:57             | M.U                   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | R.S.K.K               |

- R.S.K.K. : Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Kültür Koleksiyonu
- H.Ü. : Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı
- E.Ü. : Ege Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı
- O.D.T.Ü. : Ortadoğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü
- A.Ü.G.M : Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü
- M.U : Muğla Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Doç. Dr. Aysel UĞUR'dan temin edilmiştir.

### 3.2. Metotlar

#### 3.2.1. Bakterilerin sodyum benzoata dirençliliğinin belirlenmesi

Suşların sodyum benzoata karşı dirençlilikleri Ceylan (2003)' e göre agar dilusyon metoduyla belirlenmiştir. Sodyum benzoat koruyucu gıda katkı maddesinin sırasıyla 0.05- 90 (mg/ml) arası konsantrasyonları kullanılmıştır. 10 ml farklı sodyum benzoat konsantrasyonları içeren MRS besiyeri ile çalışılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoata içeren MRS besiyerine aktif kültürlerden % 1 oranında inokule edilmiş ve 37±1 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir. Sodyum benzoat içermeyen besiyerine inokulasyon kontrol grubu olarak kullanılmıştır. MİK düzeyi sodyum benzoatın gelişmeyi engellediği en düşük konsantrasyon olarak belirlenmiştir. Tüm testler çift paralelli olarak yapılmıştır.



### 3.2.2. Bakterilerin hücre gelişiminin ve canlı hücre sayısının belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoatın suşların gelişimi üzerine etkisi, hem spektrofotometrik olarak ve hem de MRS agarlı petri üzerindeki canlı mikroorganizma sayısı saptanarak belirlenmiştir .

Farklı sodyum benzoat konsantrasyonlarının suşların gelişimi üzerinde etkisinin belirlenmesinde kullanılan spektrofotometrik yöntem;

- Aktif suşlar, (0,05-90 mg/ml) farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren 10 ml' lik MRS sıvı besiortamına inoküle edilerek,  $37 \pm 1$  °C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ayrıca kontrol olarak sodyum benzoatın içermeyen MRS broth besiortamına bu kültürlerden aynı oranda ekim yapılmıştır.
- İnkübasyon sonunda örneklerin optikal yoğunluk (OD) değerleri 600 nm dalga boyunda (Digilab Hitachi U-1800) spektrofotometrede ölçülmüştür.

Farklı sodyum benzoat konsantrasyonlarının suşların gelişimi üzerinde etkisinin incelenmesinde kullanılan MRS agarlı yöntem;

- Aktif suşlar, (0,05-90 mg/ml) farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren 10 ml' lik MRS sıvı besiortamına aşılanarak  $37 \pm 1$  °C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonunda örneklerden ( $10^{-1}$ - $10^{-8}$ ) dilüsyonlar yapılarak, MRS agar besiortamının yüzeyine ekilmiş ve  $37 \pm 1$  °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonunda koloni sayımları yapılarak canlı mikroorganizma sayıları  $\log_{10}$  cfu/mL olarak tespit edilmiştir.

$Kob/g \text{ (cfu/g)} = [Koloni \text{ sayısı} \times \text{Seyreltme faktörü} / \text{Dilüsyon tüpünden petri kabına aktarılan örnek hacmi (ml)}]$ .

$$\text{Seyreltme faktörü} = [1 / \text{Seyreltme oranı}] \quad [13, 129, 131]. \quad (3.1)$$

### 3.2.3. Laktik asit bakterilerinin asit üretimleri

#### Nicel asit üretimi

Aktif laktik asit bakterileri farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren 10 ml'lik MRS sıvı besiyortamına inoküle edilerek,  $37 \pm 1$  °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda 10 ml'lik kültür mezürlere aktararak, distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Titrasyon için 250 ml'lik cam erlene aktarılan örnekler üzerine 2-3 damla fenolfitaleyn indikatörü damlatılarak, 0,1 N NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Bakterilerin ürettiği asit titre edilebilir yüzde asitlik olarak hesaplanmıştır [140].

$$\% \text{ Asitlik} = \text{Harcanan } 0,1 \text{ N NaOH (ml)} \times 0,9 / \text{örnek (ml)} \quad (3.2)$$

#### *Fenolfitaleyn*

0,1 gram fenolfitaleyn %60'lık etil alkolde çözülerek hazırlanmıştır.

### 3.2.4. Laktobasillerin antimikrobiyal aktiviteleri

Laktobasil suşlarının aktif kültürlerinin OD değerleri 600 nm de  $0,6 \pm 0,2$ 'ye ayarlanarak MRS sıvı besi ortamına %2 oranında inokule edilerek, aerobik koşullarda  $37 \pm 1$  °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Aktif kültürler 5000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan berrak kısım (süpernatant) 0,45 µm'lik tek kullanımlık steril filtre ile mikrofiltrasyon yolu ile sterilize edilmiştir.

İnhibisyon zonunun tespiti için, test bakterileri olarak *Escherichia coli* ATCC 35218, *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Bacillus cereus* RSKK 863, *Shigella sonnei* Mu:57, *Micrococcus luteus* NRLL B-4375 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır.

Test bakterileri Nutrient sıvı besiortamında  $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat aktifleştirilmiştir. Aktif kültürler %0,875'lik serum fizyolojik çözeltisi ile 2 kez yıkanarak hücre yoğunlukları 0,5 nolu Mc Farland standartına göre ayarlanmıştır. 0,5 Mc Farland yoğunluğuna ayarlan bakteri süspansiyonundan daha sonra steril plaklara 100 µl aktarılmıştır. Bu işlemten sonra daha önceden hazırlanıp,  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiş ve yaklaşık olarak  $50^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulmuş olan Nutrient katı besiyerinden 20 ml petrilere ilave edilmiştir. Petrilere besiyerini ve test bakterilerinin homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Homojenlik sağlandıktan sonra petri kablarında Nutrient katı besiyerinin donması için buzdolabında 2 saat süre ile bekletilmiştir. Donan katı besiyeri üzerinde 0,6 cm çapındaki steril çubukla kuyular açılmıştır. Kuyuların tabanları steril agarla tekrar sıvanmış ve bu kuyulara bakterilerin mikrofiltrasyona tabi tutulmuş süpernatantından 100 µl ilave edilmiş ve  $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyu çevresinde oluşan zonların çapı kumpas ile ölçülmüştür [67].

### 3.2.5. Laktobasillerin eksopolisakkarit (EPS) üretimlerinin belirlenmesi

Laktobasil suşları  $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de iki kez ard arda MRS sıvı besi ortamında aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerin optikal yoğunlukları spektrofotometrede 600 nm de  $0,6 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. OD değerleri ayarlanan laktobasil suşları 5 ml'lik ve değişik konsantrasyonlarda (0.05-90 mg/ml) sodyum benzoat içeren sıvı besi ortamlarına ikişer paralelli olarak %2 oranında inoküle edilerek,  $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de aerobik koşullarda 24 saat inkübe edilmiştir. Sodyum benzoat içermeyen besiyerine inoküle edilen deney tüpü kontrol tüpü olarak

belirlenmiştir. Kùltürlerin EPS üretimleri Marshall ve Rawson (1999)'e göre yapılmıştır [142]. Sonuçlar standart glukozu göre belirlenmiştir (mg/l). Standart 1 ml steril saf suda çözümlere hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki glukoz esas alınarak, fenol sülfürik asit metodu ile çıkarılmıştır [143].

#### Fenol- sülfürik asit metodu;

Örneklerin üzerine 0,5 ml fenol (Sigma) ve 5 ml saf sülfürik asit eklenerek, 10 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra iyice karıştırılmıştır. Karıştırılan örnekler 30°C'de 15–20 dk. bekletildikten sonra, optik yoğunlukları 490 nm'de spektrofotometrik (Digilab Hitachi U–1800) olarak ölçülmüştür.

EPS üretim miktarlarını belirlemek için 5–100 mg/l arasında değişen oranlarda glukoz kullanılarak standart bir eğri çıkarılmıştır. Bu standarda göre örneklerin EPS miktarları mg/l olarak belirlenmiştir [143].

#### **3.2.6. Laktobasillerin agregasyon özelliklerinin tespiti**

MRS sıvı besiyerinde aerobik olarak 37°C'de 24 saat aralıklarla ard arda iki kez aktifleştirilmiş kùltürler 5000 X g'de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelet 0,01 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  fosfat tamponu (fosfat tamponu; %0,8 NaCl, %0,2 KCl, pH:7,2) ile 2 kez yıkanarak aynı tamponda yeniden süspanse edilerek OD'si spektrofotometrede 600 nm de  $0,6 \pm 0,02$ 'ye ayarlanmıştır. Test bakterisi olarak kullanılan ve Nutrient sıvı besiyerinde 37°C'de 24 saat inkübasyonla geliştirilen *E. coli* ATCC 35218, *S. enteritidis* ATCC 25923, *E.coli* O157:H7, *S.aureus* ATCC 25923, *Shigella sonnei* MU:57, *Micrococcus luteus* NRLL B-4375, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 için de aynı işlemler uygulanmıştır [118].

Bu testlerin yanında sodyum benzoat içeren ortamda gelişen laktobasil suşlarının agregasyon yeteneklerini belirlemek için MRS besiyeri ortamına % 0,1 oranında sodyum benzoat ilave edilmiş ve yukarıdaki açıklanan işlemler tekrar uygulanmıştır.

### Otoagregasyon

Optikal yoğunluğu (OD) 600 nm de  $0,6 \pm 0,02$ 'ye ayarlanan suşlardan 2 ml ve üçer paraleli olarak temiz tüplere alınmış aerobik çalkalamasız koşullarda 37 °C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde üsteki fazdan 0,1 ml alınmış ve optikal yoğunluğu spektrofotometrede 600 nm de ölçülmüştür. Eş. 3.3'de verilen formül kullanılarak bakterilerin otoagregasyon yüzdeleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Otoagregasyon} = [(OD_1 - OD_2 / OD_1) \times 100] \quad (3.3)$$

OD<sub>1</sub>: İlk optikal dansite.

OD<sub>2</sub>: 4 saat sonraki optikal dansite.

Dört saatlik otoagregasyon süresi sonunda tüplerin alt kısımlarından 20 µl'lik örnekler alınarak preparatlar hazırlanmıştır. Tespit edilen preparatlar gram boyama yöntemi ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenmiştir [123].

### Koagregasyon

OD'si 600 nm de  $0,6 \pm 0,02$ 'ye ayarlanan suşlar ile ve test bakterilerinden 2'şer ml alınarak ayrı bir tüp içinde 10-15 sn vortekslendikten sonra 37 °C'de 3'er paraleli olarak aerobik çalkalamasız koşullarda 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde üsteki fazdan 0,1 ml alınmış ve optikal yoğunluğu spektrofotometrede 600 nm' de ölçülmüştür. Eş. 3.4'de verilen formül kullanılarak bakterilerin koagregasyon yüzdeleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Koagregasyon} = [(OD_1 + OD_2) - 2(OD_3)] / (OD_1 + OD_2) \times 100 \quad (3.4)$$

OD<sub>1</sub>: *Lactobacillus* spp. suşlarının optikal dansitesi.

OD<sub>2</sub>: Test bakterisinin optikal dansitesi.

OD<sub>3</sub>: Karışımın 4 saat sonundaki optikal dansitesi.

Dört saatlik koagregasyon süresi sonunda tüplerin alt kısımlarından 20 µl'lik örnekler alınarak preperatlar hazırlanmıştır. Tespit edilen preperatlar gram boyama yöntemi ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenmiştir [144].

### 3.2.7. Bakterilerin toplam hücre protein miktarının belirlenmesi

Suşların toplam hücre protein miktarlarının belirlenmesi [Bradforte, 1976] metoduna göre Protein Assay Bradford kiti kullanılarak belirlenmiştir.

#### Standart hazırlaması

- Dört farklı ependrof tüplerine sırasıyla 5 µL, 10 µL, 15 µL ve 20 µL 0.5 N NaCl mg/ml BSA solüsyonun'dan ilave edilir, 0.15 N NaCL ile her biri 100 µL' ye tamamlanır.
- Blank olarak 100 µL 0.15 N NaCL + 1 ml Bradford reagent kullanılır.
- Her bir ependrof tüpüne 1 ml Bradford reagent ilave edildikten sonra 2dk. Vortekslenir ve oda sıcaklığında bekletilir.
- 595 nm dalga boyunda örneklerin optikal yoğunlukları (OD) değerleri ölçülür.

### Örneklerin toplam hücre proteinlerinin belirlenmesi

- Örnekler 10, 000 rpm'de 25 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası süpernatant' tan 100 µL örnek diğer bir ependrof tüpüne alınmış ve üzerine 100 µL 0,15 N NaCL ilave edilmiştir.
- Örneklerin üzerine 1 ml Bradford reagent ilave edildikten sonra, iyice karıştırılmıştır.
- Örnekler 10 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Örneklerin optikal yoğunlukları 595 nm dalga boyundaki spektrofotometrede ölçülmüştür.

*Lactobacillus* ssp. suşlarının farklı sodyum benzoat konsantrasyonu içeren ortamlarda toplam hücre protein miktarını belirlemek amacıyla; aynı test 0.5-90 mg/ml konsantrasyonlarında sodyum benzoatlı ortamda geliştirilmiş laktobasil suşlarına uygulanmıştır.

### **3.2.8. İstatistiksel analizler**

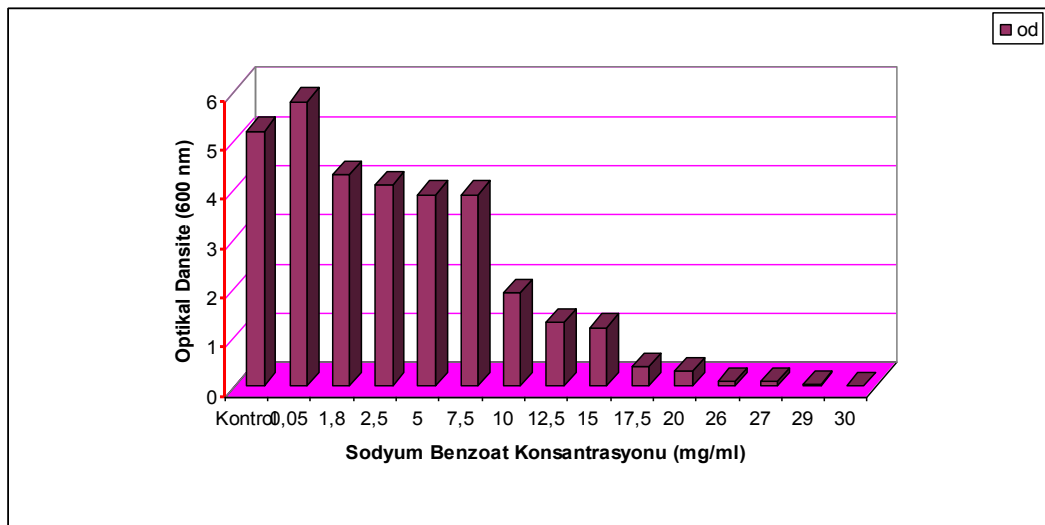
Sodyum benzoatın hücre canlılığına etkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde probit analiz yöntemi ile LC<sub>50</sub> değerlerinden yararlanarak gerçekleştirilmiştir [Finney, 1963].

#### 4. DENEYSEL BULGULAR

##### 4.1. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 Suşunun Hücre Gelişimi ve Sodyum Benzoata Dirençliliğinin Belirlenmesi

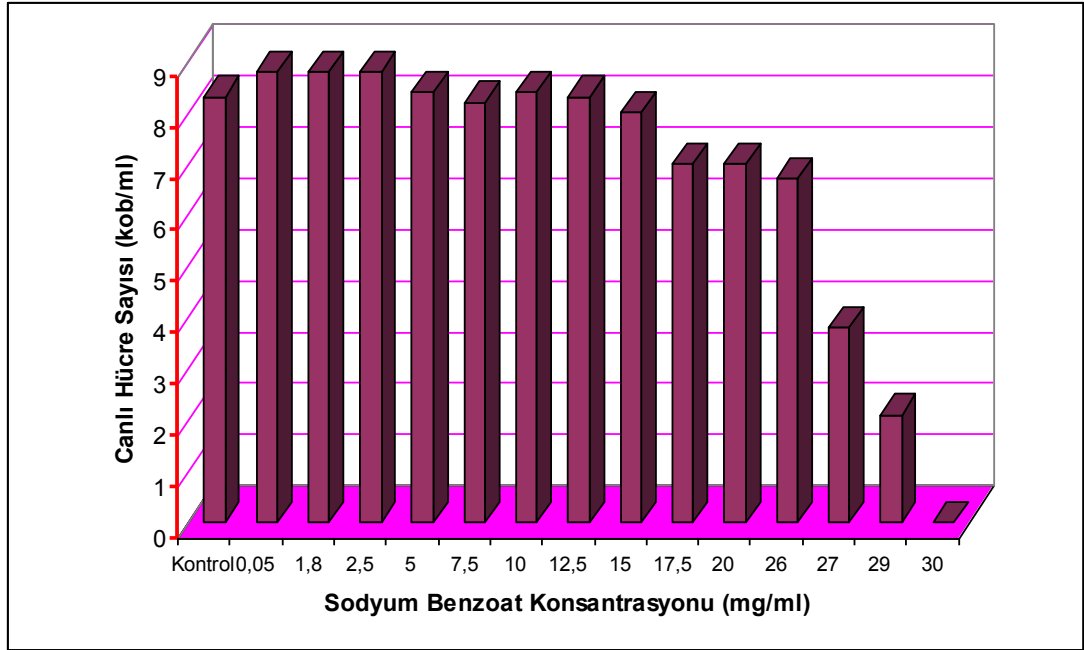
*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşunun sodyum benzoata karşı direnci ve hücre gelişimi Bölüm 3.2.1 ve 3.2.2' de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşunun sodyum benzoata karşı MİK değeri 30 mg/ml olarak belirlenmiştir. Probit analizi yapılan suşun LC<sub>50</sub> değeri (11.318 mg/ml) olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda OD değeri  $5,2 \pm 0,3$  olarak belirlenirken, 0,05 mg/ml sodyum benzoatlı ortamda üretilen suşun üremesi stimüle ettiği ve OD değerinin de  $5,8 \pm 0,3$  olduğu belirlenmiştir. OD değeri ile üremenin stimüle edilmesi canlı hücre sayı belilenme testiyle de desteklenmiştir. Kontrol grubunda  $8,3 \pm 0,2$  kob/ml iken, 0,05 mg/ml sodyum benzoatlı ortamda üretilen suşun canlı hücre sayısı  $8,8 \pm 0,4$  kob/ml olarak tespit edilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki sodyum benzoatalı ortamda suşun optikal yoğunlukları (OD) ve hücre sayıları Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de sunulmuştur.



Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoatalı ortamda üretilen *L.acidophilus* ATCC 4356 suşunun 600 nm'de ölçülen OD değerleri.



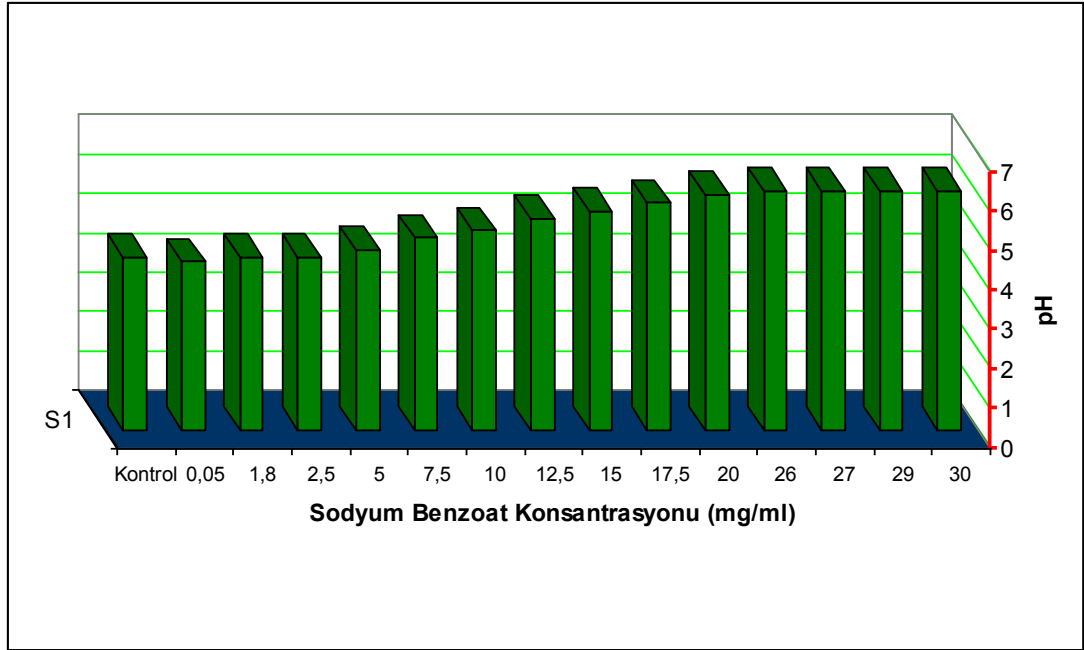


Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoatalı ortamda üretilen *L. acidophilus* ATCC 4356 suşunun canlı hücre sayısı.

#### 4.1.1 *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşunun asit üretim yeteneği ve antimikrobiyal aktivitesi

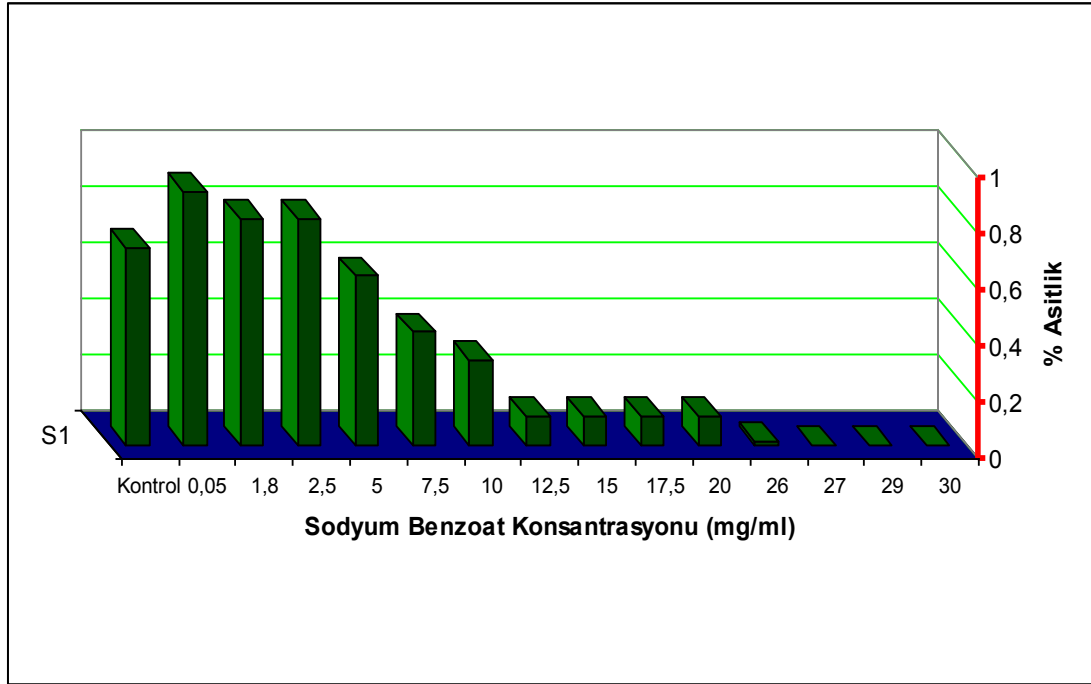
*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşunun asit oluşturma yeteneğinin belirlenmesi ve antimikrobiyal aktivitesinin tespiti Bölüm 3.2.3 ve 3.2.4' de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşu farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoatalı ortamda üretilmiştir. Kontrol grubunda ortamın son kültür pH değeri  $4,4 \pm 0$  olarak ölçülürken, 0,05 mg/ml sodyum benzoatalı ortamda kültür pH değerinin  $4,3 \pm 0$  olarak belirlenmiştir. Ortamdaki sodyum benzoat miktarının artışına bağlı olarak da suşun üreme ortamının pH değeri artışı gözlenmiştir. 26 mg/ml sodyum benzoat içeren ortamda pH  $6,1 \pm 0,1$  olarak belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki sodyum benzoatalı ortamda üretilen suşun pH değer dağılımı Şekil 4.3' de sunulmuştur.



Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoatlı ortamda üretilen *L. acidophilus* ATCC 4356 suşunun pH değer dağılımı.

Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren ortamlarda üretilen *L. acidophilus* ATCC 4356 suşunun üretmiş olduğu nicel asit miktarları Şekil 4,4'de sunulmuştur. Kontrol grubunda tespit edilen nicel asit üretim miktarı  $0,7 \pm 0$  olarak ölçülmüş, 0,05 mg/ml sodyum benzoatlı ortamda suşun nicel asit üretimi  $0,9 \pm 0$  olarak bulunmuştur. Sodyum benzoat miktarındaki artışa bağlı olarak suşun ürettiği nicel asit miktarının azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoatalı ortamda üretilen *L. acidophilus* ATCC 4356 suşunun ürettiği % asit miktarları.

Probiyotik olarak kullanımı araştırılan mikroorganizmaların sahip olması gereken en önemli özelliklerden biri de patojen mikroorganizmaları inhibe etme özelliğidir. Bu nedenle çalışmada *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 referans kültürünün, gıda veya bağırsakta patojen olan bazı mikroorganizmalar (*Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Bacillus cereus* RSKK 863, *Shigella sonnei* Mu:57, *Micrococcus luteus* NRLL B-4375 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) üzerine inhibisyon etkileri Bölüm 3.2.4.' de anlatıldığı gibi belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir.

*L. acidophilus* ATCC 4356 suşunun son kültür pH'sı 4,4 olarak belirlenirken, bu suşun *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 dışında tüm test bakterilerine karşı antimikrobiyal özellik gösterdiği tespit edilmiştir. *L. acidophilus* ATCC 4356 suşunun en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi *Shigella sonei* MU:57 ve

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşların üzerinde gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşunun bağırsak patojenleri ve gıda kontaminantları üzerine antimikrobiyal aktivite sonuçları (zon çapı, mm).

| Bağırsak patojenleri ve gıda kontaminantları | İnhibisyon zonu (mm) |
|----------------------------------------------|----------------------|
| pH                                           | 4,4±0                |
| <i>E. coli</i> ATCC 35218                    | 5,8±0,5              |
| <i>E. coli</i> O157:H7                       | 5,8±0,2              |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923                  | 5,6±0                |
| <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644            | -                    |
| <i>S. enteritidis</i> ATCC 13076             | 7,4±0,2              |
| <i>Bacillus cereus</i> RSKK 803              | 4,2±0                |
| <i>Shigella sonnei</i> MU:57                 | 8,0±1,3              |
| <i>Micrococcus luteus</i> NRLL B-4375        | 6,8±1,0              |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853     | 8,6±0,1              |

-: İnhibisyon yok

*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşunun *Micrococcus luteus* NRLL B-4375 ve *Bacillus cereus* RSKK 803 suşları üzerinde gösterdiği inhibisyon zonları Resim 4.1 ve Resim 4.2' de gösterilmiştir.



Resim 4.1. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşunun *Micrococcus luteus* NRLL B-4375 suşu üzerinde gösterdiği inhibisyon zonu.



Resim 4.2. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşunun *Bacillus cereus* RSKK 803 suşu üzerinde gösterdiği inhibisyon zonu.

#### 4.1.2. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşunun farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren besi ortamında hücre gelişimi ve EPS üretimi

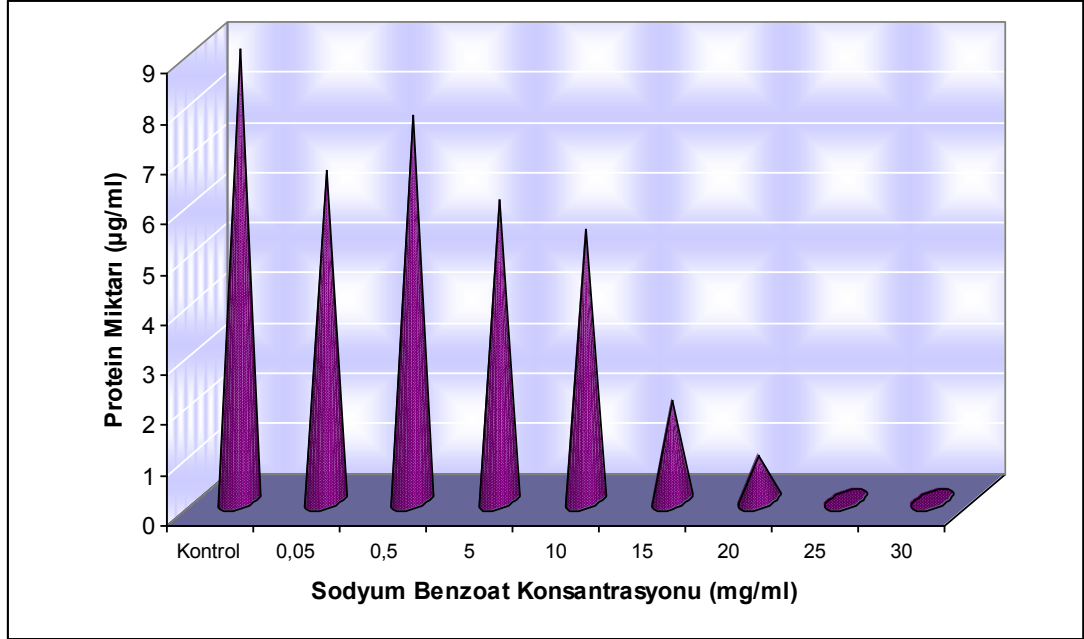
*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşunun farklı sodyum benzoatlı ortamda üretildiğinde hücre gelişimi Çizelge 4.2 ve Şekil 4.6 da gösterilmiştir. Suşun sodyum benzoata karşı MİK düzeyi 30 mg/ml olarak belirlenmiştir. Sodyum benzoat konsantrasyonundaki artışa paralel olarak, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hücre gelişiminde azalma belirlenirken, EPS üretiminde muhtemel bir direnç mekanizması olarak artış belirlenmiştir. En yüksek hücre gelişimi ve EPS üretimi 2,5 mg/ml sodyum benzoat konsantrasyonunda (8,8 kob/ml) ve (69 mg/l) olarak tespit edilmiştir. Bu suşun farklı sodyum benzoatlı ortamdaki protein miktarları Çizelge 4.3 ve Şekil 4.5’ de sunulmuştur. Ortamdaki gıda katkı maddesinin konsantrasyon artışa bağlı olarak, protein miktarının da azaldığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.2. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşunun farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren besi ortamında hücre gelişimi ve EPS üretimi.

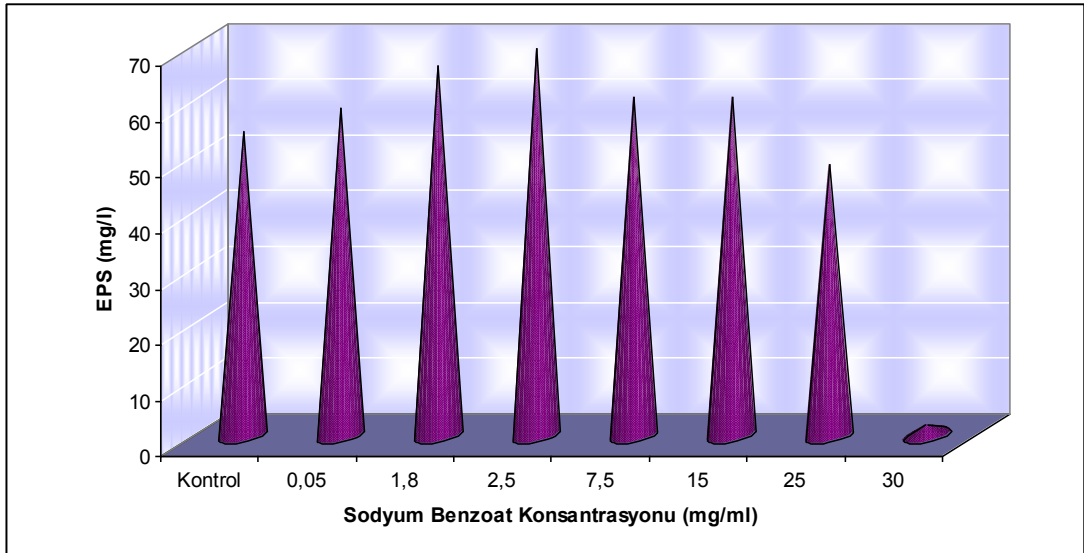
| Sodyum benzoat konsantrasyonu (mg/ml) | Hücre gelişimi $\log_{10}$ kob/ml | EPS üretim miktarı (mg/l) |
|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| 0,05                                  | 8,8±0,4                           | 58,9±3,3                  |
| 1,8                                   | 8,8±0,4                           | 66,4±2,1                  |
| 2,5                                   | 8,8±0,2                           | 69,6±1,5                  |
| 7,5                                   | 8,2±0,3                           | 60,9±0,9                  |
| 15                                    | 8,0±0,1                           | 60,9±3,4                  |
| 25                                    | 7,0±0,2                           | 48,7±2,1                  |
| 30                                    | 0±0,2                             | 1,9±2,9                   |
| KONTROL                               | 8,3±0,2                           | 54,7±2,3                  |

Çizelge 4.3. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşunun farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren besiortamında hücre içi toplam protein miktarı.

| Sodyum benzoat konsantrasyonu (mg/ml) | Protein miktarı (µg/ml) |
|---------------------------------------|-------------------------|
| 0,05                                  | 6,6±0,9                 |
| 0,5                                   | 7,7±0,9                 |
| 2,5                                   | 5,5±0                   |
| 5                                     | 6,0±0                   |
| 10                                    | 5,4±0                   |
| 15                                    | 2,0±0                   |
| 20                                    | 0,9±0                   |
| 30                                    | 0±0                     |
| KONTROL                               | 9,0±0,1                 |



Şekil 4.5. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşunun farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren besiortamında hücre içi toplam protein miktarı.



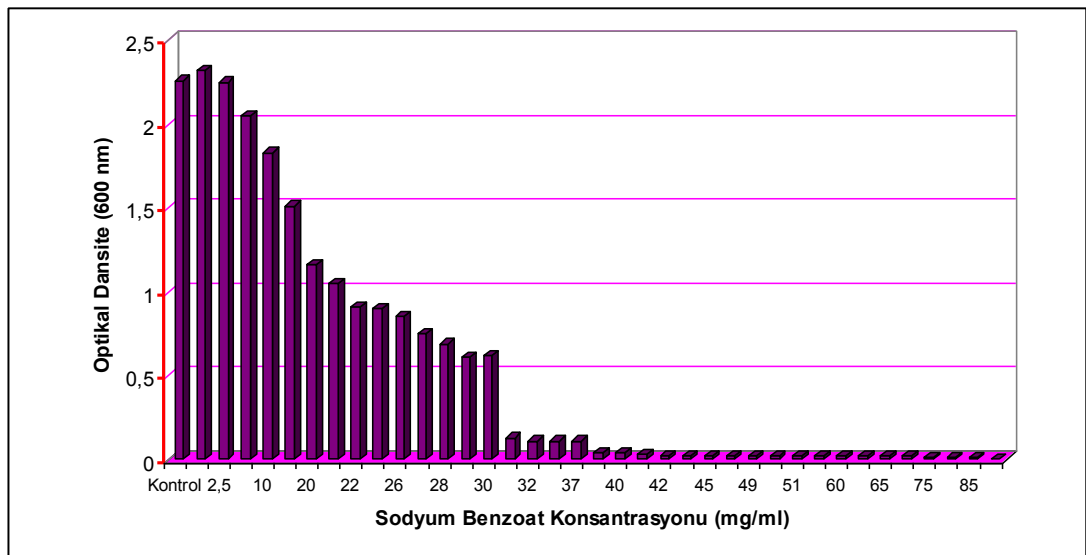
Şekil 4.6. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşunun farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren besiortamında EPS üretimi.



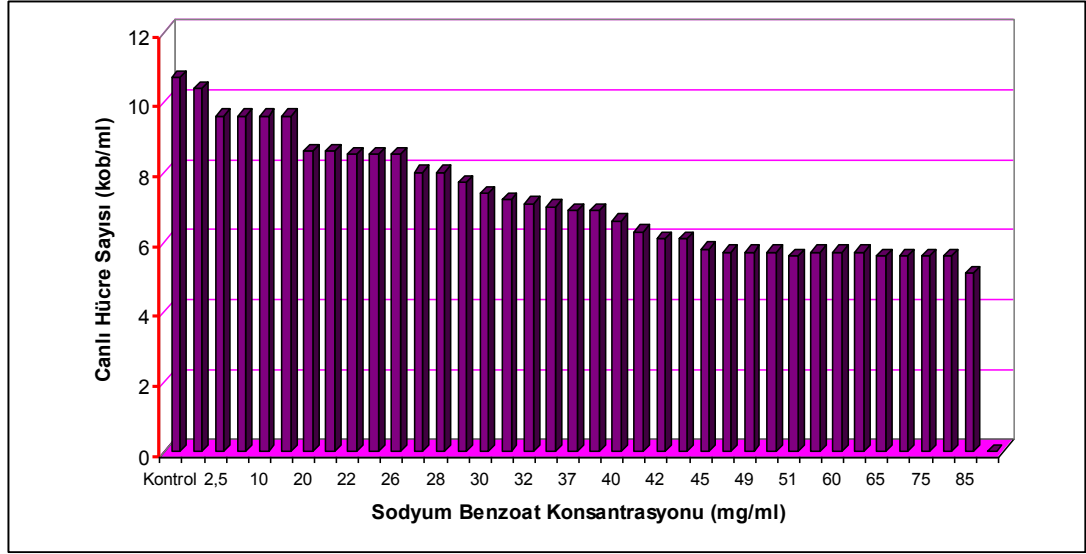
#### 4.2. *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 Suşunun Hücre Gelişimi ve Sodyum Benzoata Dirençliliğinin Belirlenmesi

*Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşunun sodyum benzoata karşı direnci ve hücre gelişimi Bölüm 3.2.1 ve 3.2.2' de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

*Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşunun sodyum benzoata karşı MİK değeri 90 mg/ml olarak belirlenmiştir. Probit analizi yapılan suşun LC<sub>50</sub> değeri (23.918 mg/ml) olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda OD değeri  $2,26 \pm 0,05$  iken, 0,5 mg/ml sodyum benzoatlı ortamda üretilen suşun OD değeri  $2,32 \pm 0,04$  olarak belirlenmiştir. Canlı hücre sayıları kontrol grubunda  $10,7 \pm 0,2$  kob/ml iken, 0,5 mg/ml sodyum benzoatlı ortamda suşun canlı hücre sayısı  $10,4 \pm 0,2$  kob/ml olarak tespit edilmiştir. Besi ortamında sodyum benzoat miktarının artışına bağlı olarak, hücre yoğunluğu ve canlı hücre sayılarında doğrusal bir azalma belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki sodyum benzoatlı ortamda üretilen suşun optikal yoğunlukları (OD) ve hücre sayıları Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de sunulmuştur.

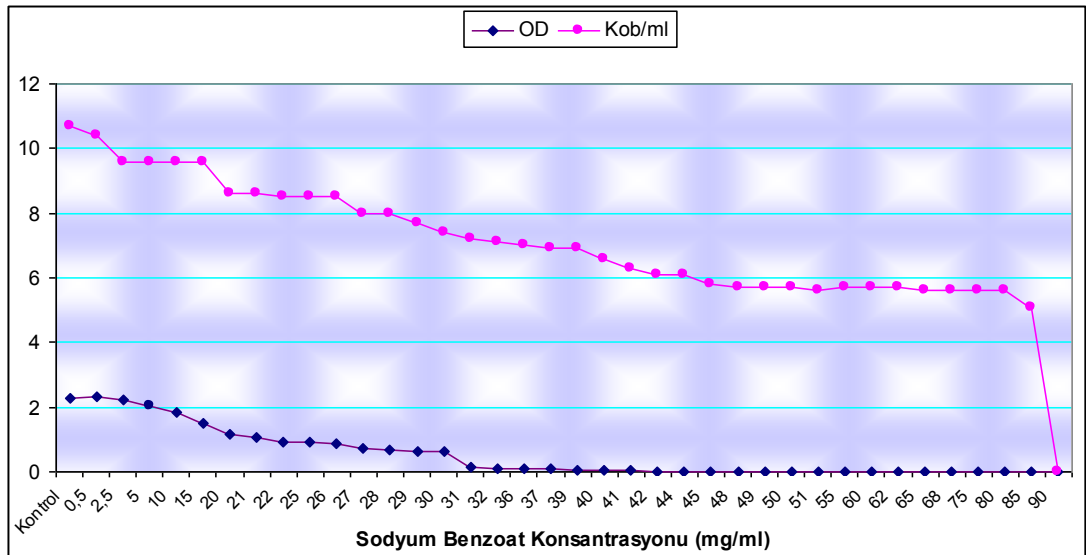


Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoatlı ortamda üretilen *L. plantarum* DSM 20246 suşunun 600 nm'de ölçülen OD değerleri.



Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoatlı ortamda üretilen *L. plantarum* DSM 20246 suşunun canlı hücre sayısı.

Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoatlı ortamda üretilen suşun OD değeri ve canlı hücre sayısı arasındaki doğrusal azalma Şekil 4.9.'da sunulmuştur.

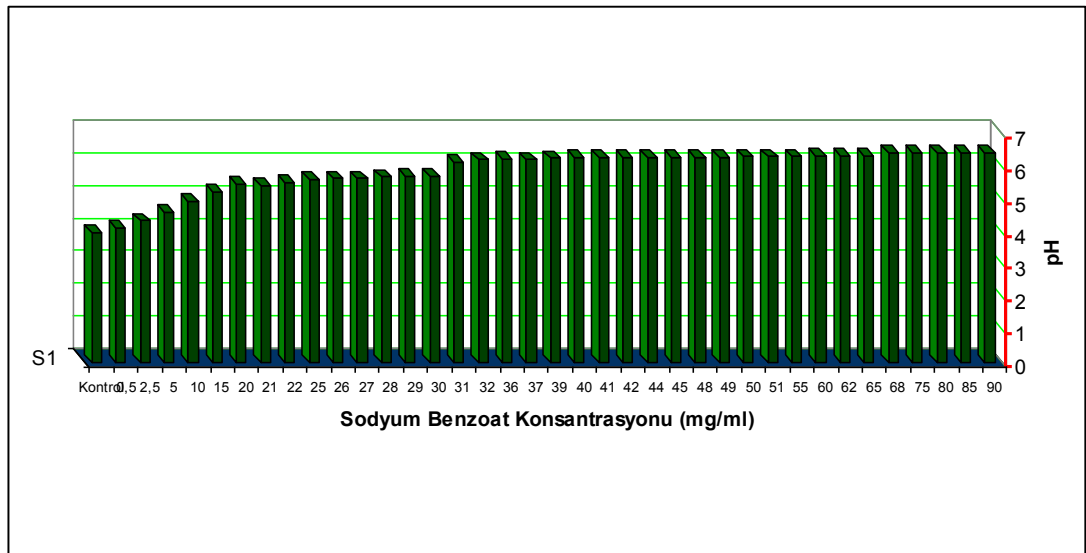


Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoatlı ortamda üretilen *L. plantarum* DSM 20246 suşunun canlı hücre sayısı ve 600 nm'de ölçülen OD değerlerinin karşılaştırılması.

#### 4.2.1 *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşunun asit üretim yeteneği ve antimikrobiyal aktivitesi

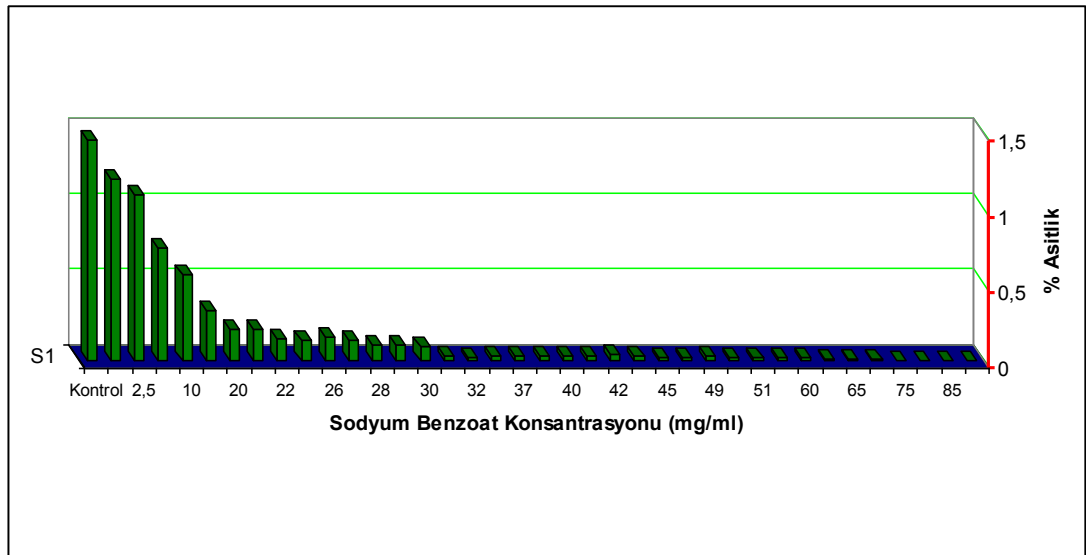
*Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşunun asit oluşturma yeteneğinin belirlenmesi ve antimikrobiyal aktivitesinin tespiti Bölüm 3.2.3 ve 3.2.4' de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

*Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşu farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren besi ortamlarında üretilmiştir. Kontrol grubunda son kültür pH değeri  $3,96 \pm 0$  olarak ölçülürken, 0,5 mg/ml sodyum benzoat içeren ortamda son kültür pH değeri  $4,08 \pm 0$  olarak belirlenmiştir. Ortamdaki sodyum benzoat miktarının artışına bağlı olarak suşun son kültür pH değeri de artmıştır. 36 mg/ml sodyum benzoat içeren ortamda son kültür pH değeri  $6,20 \pm 0$  olarak ölçülmüştür. Bu da ortamın başlangıç kültür pH değerine eşit olduğunu, asidik ortam koşullarının ortadan kalktığını göstermektedir. Suşun farklı konsantrasyonlardaki sodyum benzoatlı ortamda üretildiğinde pH değerleri Şekil 4.10' da sunulmuştur.



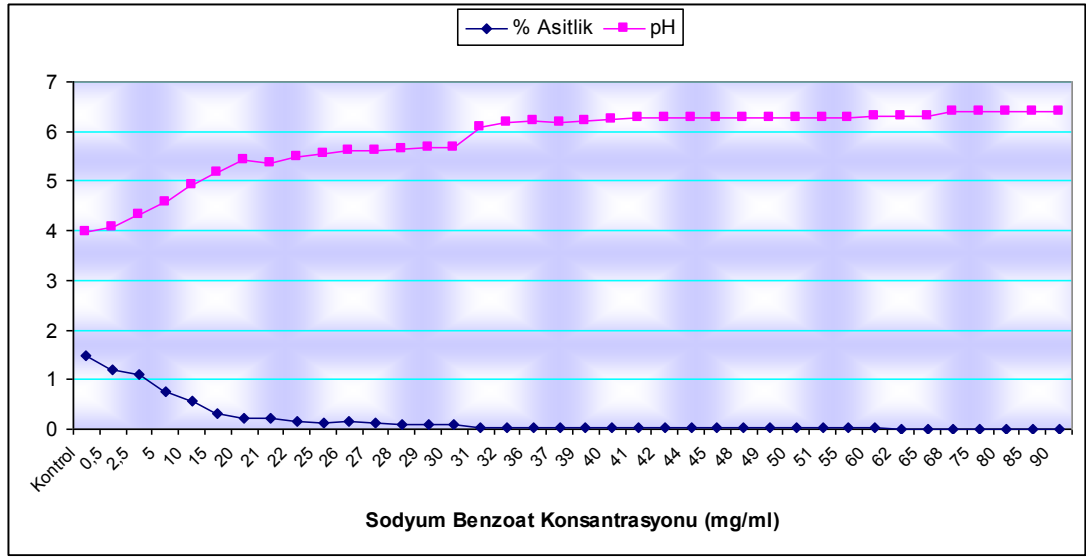
Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoatlı ortamda üretilen *L. plantarum* DSM 20246 suşunun pH değer dağılımı.

Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoatlı ortamda üretilen *L. plantarum* DSM 20246 suşunun üretmiş olduğu nicel asit miktarları Şekil 4.11’de sunulmuştur. Kontrol grubunda tespit edilen nicel asit miktarı  $1,47 \pm 0,1$  olarak ölçülmüş, 0,5 mg/ml sodyum benzoatlı ortamda bu değer  $1,21 \pm 0,1$  olarak tespit edilmiştir. Sodyum benzoat miktarındaki artışa bağlı olarak suşun ürettiği nicel asit miktarının azaldığı, 30 mg/ml sodyum benzoat içeren ortamda suşun ürettiği asit miktarının 0,10’ nun altına düştüğü, 75 mg/ml sodyum benzoata geliştirilen suşun asit üretmediği belirlenmiştir.



Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren ortamda üretilen *L. plantarum* DSM 20246 suşunun ürettiği % asit miktarları.

Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren ortamlarda geliştirilen suşun ürettiği asit miktarının doğrusal azalmasına bağlı olarak, kültür ortamının pH değerinin doğrusal artışı arasındaki ters orantıyı gösteren grafik Şekil 4.12.’de sunulmuştur.



Şekil 4.12. Farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren ortamda geliştirilen *L. plantarum* DSM 20246 suşunun ürettiği % asit dağılımı ve son kültür pH'larının karşılaştırılması.

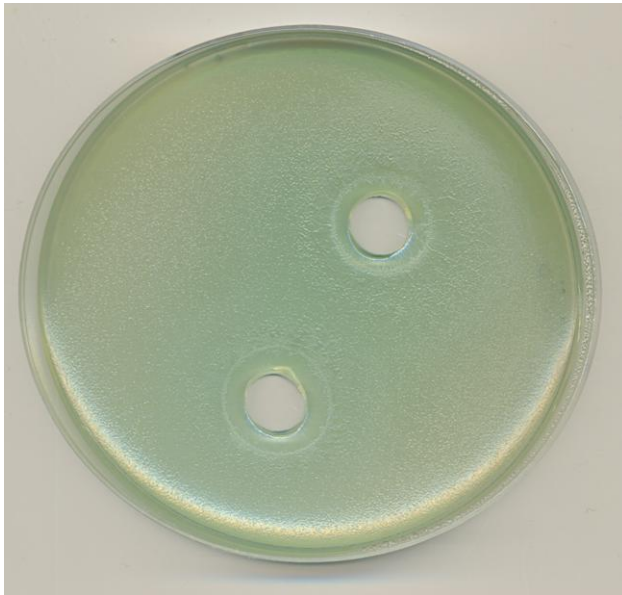
Probiyotik olarak kullanımı araştırılan mikroorganizmaların sahip olması gereken en önemli özelliklerden biri de, daha önce bahsettiğimiz gibi patojen mikroorganizmaları inhibe etme özelliğidir. Bu nedenle çalışmada *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 referans kültürünün, gıda veya bağırsakta patojen olan bazı mikroorganizmalar (*Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Bacillus cereus* RSKK 863, *Shigella sonnei* Mu:57, *Micrococcus luteus* NRLL B-4375 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) üzerine inhibisyon etkileri Bölüm 3.2.4.' de anlatıldığı gibi belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.4, Resim 4.3, Resim 4.4 ve Resim 4.5'de verilmiştir.

*L. plantarum* DSM 20246 suşunun son kültür pH'sı  $3,96 \pm 0$  olarak belirlenirken, bu suşun *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 dışında tüm test bakterilerine karşı antimikrobiyal özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu suşun en yüksek antimikrobiyal etkiyi *Micrococcus luteus* NRLL B-4375 suşu üzerinde göstermiştir.

Çizelge 4.4. *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 kültürünün bağırsak patojenleri ve gıda kontaminantları bakteriler üzerinde antimikrobiyal aktivite sonuçları (zon çapı, mm).

| Bağırsak patojenleri ve gıda kontaminantları | İnhibisyon zonu (mm) |
|----------------------------------------------|----------------------|
| pH                                           | 3,96±0,0             |
| <i>E. coli</i> ATCC 35218                    | 7,0±0,4              |
| <i>E. coli</i> O157:H7                       | 6,8±0,6              |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923                  | 6,2±0,6              |
| <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644            | -                    |
| <i>S. enteritidis</i> ATCC 13076             | 5,8±1,0              |
| <i>Bacillus cereus</i> RSKK 803              | 4,2±0,2              |
| <i>Shigella sonnei</i> MU:57                 | 8,4±0,5              |
| <i>Micrococcus luteus</i> NRLL B-4375        | 13,8±2,2             |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853     | 8,6±0,4              |

- : İnhibisyon yok.



Resim 4.3. *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşunun *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşu üzerinde gösterdiği inhibisyon zonu.



Resim 4.4. *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşunun *Bacillus cereus* RSKK 803 suşu üzerinde gösterdiği inhibisyon zonu.



Resim 4.5. *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşunun *E. coli* ATCC 35218 suşu üzerinde gösterdiği inhibisyon zonu.

#### 4.2.2. *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşunun farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren besiortamında hücre gelişimi ve EPS üretimi

*Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşunun farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren ortamlardaki hücre gelişimi Şekil 4.7 ve Çizelge 4.5’ de gösterilmiştir. Suşun sodyum benzoata karşı MİK düzeyi 90 mg/ml olarak belirlenmiştir. Sodyum benzoat konsantrasyonundaki artışa paralel olarak, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre gelişimi ve EPS üretiminde azalma belirlenmiştir. En yüksek hücre gelişimi ve EPS üretimi 5 mg/ml sodyum benzoat konsantrasyonunda (9,6 kob/ml) ve (56,9 mg/l) olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5. *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşunun farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren besiortamında hücre gelişimi ve EPS üretimi.

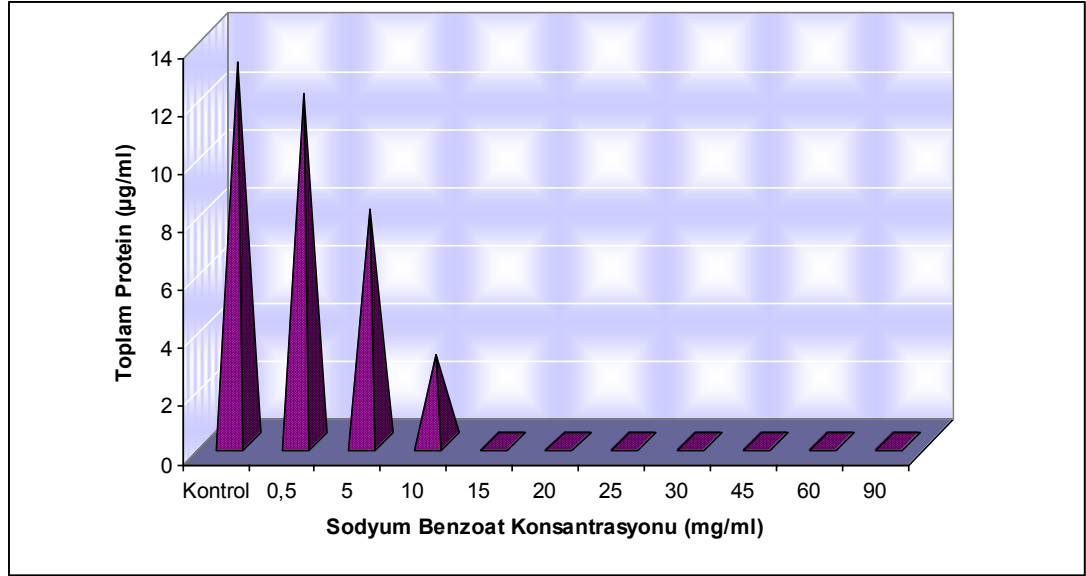
| Sodyum benzoat konsantrasyonu (mg/ml) | Hücre gelişimi $\log_{10}$ kob/ml | EPS üretim miktarı (mg/l) |
|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| 0,5                                   | 10,4±0,2                          | 52,4±0,7                  |
| 2,5                                   | 9,6±0,0                           | 58,7±3,1                  |
| 5                                     | 9,6±0,0                           | 56,9±0,8                  |
| 10                                    | 9,6±0,0                           | 50,4±0,6                  |
| 15                                    | 9,6±0,07                          | 45,6±2,3                  |
| 20                                    | 8,6±0,2                           | 45,6±1,0                  |
| 25                                    | 8,5±0,0                           | 36,8±0,2                  |
| 27                                    | 8,0±0,0                           | 16,5±3,9                  |
| 28                                    | 8,0±0,0                           | 15,2±2,7                  |
| 29                                    | 7,7±0,0                           | 11,4±0,8                  |
| 30                                    | 7,4±0,0                           | 13,6±2,4                  |
| 40                                    | 6,6±0,1                           | 0±0                       |
| 60                                    | 5,7±0,1                           | 0±0                       |
| 90                                    | 0±0,0                             | 0±0                       |
| KONTROL                               | 10,7±0,2                          | 51,9±0,7                  |



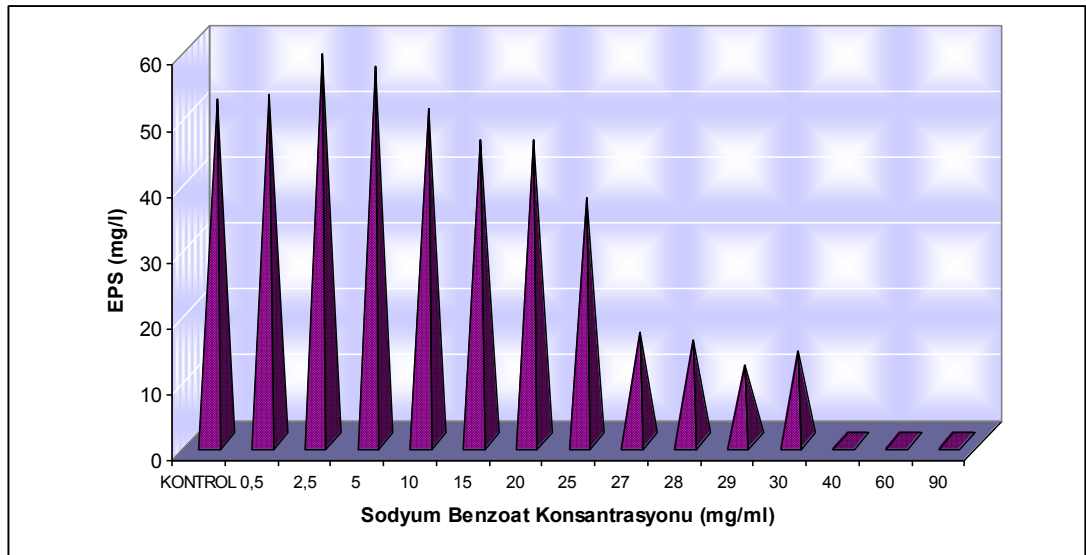
Bu suşunun farklı sodyum benzoat içeren üretiltiğinde hücresel protein miktarları Çizelge 4.6 ve Şekil 4.13' de sunulmuştur. Ortamdaki sodyum maddenin konsantrasyonun artışına bağılı olarak, protein miktarının da azaldığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşunun farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren ortamlarda üretiltiğinde hücresel toplam protein miktarları.

| Sodyum benzoat konsantrasyonu<br>(mg/ml) | Protein miktarı<br>(µg/ml) |
|------------------------------------------|----------------------------|
| 0,5                                      | 12,0±0,1                   |
| 5                                        | 8,0±0                      |
| 10                                       | 3,0±0,1                    |
| 90                                       | 0                          |
| KONTROL                                  | 13,1±0,1                   |



Şekil 4.13. *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşunun farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren ortamlarda üretildiğinde hücresel toplam protein miktarları.



Şekil 4.14. *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşunun farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren ortamlarda EPS üretimleri.

### 4.3. Laktobasillerin Agregasyonu

#### 4.3.1. Otoagregasyon

*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 ve *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşlarının otoagregasyon denemeleri Bölüm 3.2.6'da (otoagregasyon) anlatıldığı gibi yapılmıştır. Denemelerde % 0,1 oranında sodyum benzoatta üretilen suşlar ve kontrol grupları kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7'de sunulmuştur.

*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 ve *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşlarının %0,1 Sodyum benzoatlı ortamda otoagregasyon yüzdelerinin, kontrol gruplarına nispetle daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. Laktobasil suşlarının % 0,1 Sodyum benzoatlı ortamda otoagregasyonları.

| Suşlar                          | % Otoagregasyon | % 0,1 Na-Benzotlı Ortama Mağruz Bırakılan Suşlarda % Otoagregasyon |
|---------------------------------|-----------------|--------------------------------------------------------------------|
| <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 | 35,8±5,9 (++)   | 51,5±2,4 (+++)                                                     |
| <i>L. plantarum</i> DSM 20246   | 27,7±3,8 (+)    | 31,8±2,1 (++)                                                      |

+++; Yüksek otoagregasyon; ++; Orta dereceli otoagregasyon; +; Düşük otoagregasyon.

#### 4.3.2. Koagregasyon

*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 ve *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşlarının test bakterileriyle koagregasyon denemeleri Bölüm 3.2.6' da (koagregasyon) anlatıldığı gibi yapılmıştır. Denemelerde % 0,1 oranında sodyum benzoata üretilen suşlar ve kontrol grupları kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8' de sunulmuştur.

*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 ve *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşlarının en yüksek koagregasyon olduğu test bakterisi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 olarak tespit edilmiştir. Bu test bakterisiyle koagregasyon olan ve % 0,1 sodyum benzoata üretilen laktobasil suşlarında % koagregasyon değerinin düşüş gösterdiği tespit edilmiştir.

*S. enteritidis* ATCC 13076 test bakterisine koagregasyon yüzdesi kontrol gruplarında düşük iken, % 0,1 oranında sodyum benzoata üretilen *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 ve *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşlarının % koagregasyon değerlerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. En yüksek koagregasyon artışı *L. plantarum* DSM 4356 ve *Shigella sonnei* MU:57 arasında olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.8. Laktobasil suşlarının % 0,1 sodyum benzoatlı ortamlarda koagregasyonları.

| Test Bakterileri                         | <i>L.acidophilus</i><br>ATCC 4356<br>%<br>Koagregasyon | <i>L. acidophilus</i><br>ATCC 4356<br>% 0,1 Na-<br>Benzotlı<br>Ortamda<br>%<br>Koagregasyon | <i>L. plantarum</i><br>DSM 20246<br>%<br>Koagragasyon | <i>L. planlarum</i><br>DSM 4356<br>% 0,1<br>NaBenzotlı<br>Ortamda<br>%<br>Koagregasyon |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>E.coli</i> ATCC 35218                 | 14,9±1,2 (+)                                           | 15,7±0,3 (+)                                                                                | 7,0±0.3 (+)                                           | 16,7±1,2 (+)                                                                           |
| <i>E.coli</i> O157:H7                    | 4,9±0,9 (+)                                            | 9,8±0,0 (+)                                                                                 | 3,2±1,2 (+)                                           | 5,0±0,2 (+)                                                                            |
| <i>S.aureus</i> ATCC 25923               | 8,3±0,2 (+)                                            | 8,2±0 (+)                                                                                   | 23,2±0,0 (+)                                          | 29,2±0,0 (+)                                                                           |
| <i>S.enteritidis</i> ATCC 13076          | 9,8±0,2 (+)                                            | 28,1±0,9 (+)                                                                                | 13,1±0,0 (+)                                          | 28,3±0,0 (+)                                                                           |
| <i>Shigella sonei</i> MU:57              | 7,5±0,0 (+)                                            | 7,5±0,0 (+)                                                                                 | 5,0±0,2 (+)                                           | 20,9±0,0(+)                                                                            |
| <i>Micrococcus luteus</i> NRLL B-4375    | 13,3±0,9 (+)                                           | 9,7±0,9 (+)                                                                                 | 8,2±1,9 (+)                                           | 9,2±0,8 (+)                                                                            |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 48,1±0,0 (++)                                          | 28,7±2,1(+)                                                                                 | 58,3±3,2(+++)                                         | 28,3±0,2 (+)                                                                           |

+++; Yüksek koagregasyon; ++; Orta dereceli koagregasyon; +; Düşük koagregasyon

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gıda katkı maddeleri; normal koşullarda tek başına tüketilmeyen veya gıda hammaddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan; seçilen teknoloji gereği kullanılan işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamul maddede bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında; gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek amacıyla kullanılmasına izin verilen maddelerdir [88].

Birçok çalışmada gıda katkı maddelerinin canlı sistemleri üzerine olumsuz etkiler gösterdiğine dair sonuçlar açıklanmıştır. Örneğin mekanizması tam açıklanamamış olmasına rağmen; butillenmiş hidroksitolüenin ve hidroksiyanazol' ün kronik ürtikerde alevlenmelere neden olduğu [89], organik olarak bazı bitki köklerinden elde edilen fenolik bileşiklerin anti kanser özelliği taşıırken, gıdalarda antioksidan olarak kullanılan sentetik fenolik bileşenlerin prekanserojen ekilerinin olduğu bilinmektedir [90]. Yine gıda katkı maddelerinden sodyum benzoatın yüksek konsantrasyonlarda kullanılmasıyla küçük damarlarda nekrozla seyreden, Löko Klastik Vaskülit hastalığının ortaya çıktığı belirlenmiştir [91].

Gıda katkı maddelerinin açıklanan yan etkilerden başka; gastrointestinal sistem üzerine, karaciğer ve böbrek dokusu üzerine, tiroid bezleri üzerine olumsuz etkileri yapılan çalışmalarla açıklanmıştır [89-93].

Bu çalışmada, yüksek dozda kullanımına yasal sınır getirilmiş koruyucu gıda katkı maddesi olan sodyum benzoatın, bağırsak sistemi probiyotik bakterilerden olan *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 ve *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 suşları üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu incelemelerde özellikle bu maddenin ilgili bakterilerin canlılığı ve üreme durumları üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Farklı konsantrasyonlarda (0,05-30 mg/ml) sodyum benzoat içeren ortamlarda üretilen *L. acidophilus* ATCC 4356'nın kontrol grubunda daha yüksek oranda üreme göstermiştir. Bu durum özellikle ortama ilave edilen 0,05 mg/ml sodyum benzoatlı ortamda gözlenmiştir. Bakterinin bu ortamda 24 saatlik inkübasyonunda kültürün OD değeri  $5,8 \pm 0,3$  olarak tespit edilmiştir. Ortama ilave edilen sodyum benzoat konsantrasyonunun artışına bağlı olarak üreme kültürlerinin OD değerlerinde düşüşler olmuştur. Sodyum benzoat katkı madde konsantrasyonunun artışına bağlı olarak da bakterinin üreme sayısındaki nitel azalma, hücre canlılık testiyle de desteklenmiştir. Bu bakterinin sodyum benzoata karşı MİK değeri 30 mg/ml olarak belirlenmiştir.

*L. acidophilus* ATCC 4356 suşu gibi, *L. plantarum* DSM 20246 suşu da farklı konsantrasyonlarda (0,5-90 mg/ml) sodyum benzoat içeren besiortamında üretildiğinde; inkübasyon sonunda kontrol grubunda üretilen kültürün son kültür OD değeri  $2,26 \pm 0,05$  olarak ölçülmüştür. 0,5 mg/ml sodyum benzoat içeren besiortamında üremeye bırakılan suşun son kültür OD değeri  $2,32 \pm 0,04$  olarak belirlenmiştir. Üreme ortamına 37 mg/ml sodyum benzoat ilave edildiğinde, suşun kültür hücre yoğunluğu belirgin bir şekilde azalmıştır. Bu ortamda hücre yoğunluğu OD değeri  $0,04 \pm 0,0$  olarak ölçülmüştür. Besiortamına ilave edilen 90 mg/ml sodyum benzoat bakterinin üremesini durdurmuştur. Bu durum canlı hücre sayısı belirleme testleriyle de desteklenmiştir. 37 mg/ml sodyum benzoatlı ortamda üremeye bırakılan suşun canlı hücre sayısı  $6,9 \pm 0$  olarak tespit edilmiştir. *L. plantarum* DSM 20246 suşunun sodyum benzoata karşı MİK değeri 90 mg/ml olarak belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada; mayaların sodyum benzoata karşı MİK değeri 0,2-7 mg/ml arası, bakterilerin MİK değerinin (pH 4,3-6,2) aralığında 0,5-30 mg/ml olduğu belirlenmiştir [95]. Yapılan diğer bir çalışmada sodyum benzoatın *Vibrio parahaemolyticus* bakterisi üzerindeki etkisi araştırılmış ve MİK değerinin 30-300 µg/ml arasında olduğu tespit edilmiştir [94]. Araştırmada

elde edilen sonuçlar bu açıdan değerlendirildiğinde; sodyum benzoatın *L. acidophilus* ATCC 4356 ve *L. plantarum* DSM 20246 suşları üzerinde üremeyi engelleyici etkisinin diğer bakteri gruplarına göre daha az olduğunu göstermektedir.

Sodyum benzoatın bakteriler üzerindeki etkisini araştıran bir diğer çalışmada; *S. aerus* (MRSA) bakterisi ile klinik açıdan savaşmada alternatif olarak sodyum benzoatın kullanılması düşünülmüş, bakterinin MİK değerinin (32 µg/ml) düşük olması bu düşüncelerini destekleyici nitelikte sonuçlar almalarını sağlamıştır [96].

Laktik asit bakterileri, metabolizmaları sırasında laktozu parçalayarak başlıca laktik asit oluşturan mikroorganizmaları kapsar [97]. Laktik asit bakterileri laktozu, çoğunlukla %0,5–1,5' luk laktik asit konsantrasyonuna kadar parçalarlar, ancak %3 konsantrasyona kadar fermentasyon yapan türleri de vardır [98]. Laktik asit bakterileri, laktik asidin yanında hidrojen peroksit, hidrojen sülfür, bakteriosin gibi antimikrobiyal maddeler oluştururlar [99-103]. Laktik asit bakterilerinin metabolizmaları sonucu oluşan çeşitli antimikrobiyal maddeler, diğer kontaminant mikroorganizmaların üremelerini engeller [104,105].

Tüm bu özellikler dikkate alındığında laktik asit bakterilerinin en önemli inhibitör etkisi, özellikle asidik ortamlarda oluşmaktadır. Ayrıca besiyerine inoküle edilen starter kültür miktarı ve aktivitesi de, özellikle fermentasyonun ilk aşamasında, patojen mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmektedir [97].

Sodyum benzoatın *L. acidophilus* ATCC 4356 ve *L. plantarum* DSM 20246 suşları üzerine etkilerinin incelenildiği bu çalışmada; suşların besiortamlarına farklı konsantrasyonlarda gıda katkı maddesi olan bu madde ilave edilmiş, inkübasyon süresi sonunda *L. acidophilus* ATCC 4356 son kültür pH değeri  $4,4 \pm 0$  olarak ölçülürken, bu pH değerinde üretilen nicel asit miktarının %0,7



olduğu tespit edilmiştir. Suşun besiortamına ilave edilen sodyum benzoat konsantrasyonunun artması ile üretilen asit miktarının azaldığı ve besiortamının pH değerinin arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.3 ve Şekil 4.49). *L. plantarum* DSM 20246 suşunda da besi ortamına ilave edilen sodyum benzoat miktarının artması ile son kültür pH değerinde artış belirlenmiş, üretilen % asit miktarı azalma göstermiştir (Şekil 4.10, 4.11 ve 4. 12).

*L. acidophilus* ATCC 4356 ve *L. plantarum* DSM 20246 suşlarının antimikrobiyal özellikleri incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.4' de sunulmuştur. Bu sonuçlara göre *L. acidophilus* ATCC 4356 suşu en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi, 8,6 mm'lik zon çapı ile *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 bakterisine karşı göstermiştir. *L. acidophilus* ATCC 4356 suşu bu yüksek antimikrobiyal aktiviteyi diğer test bakterilerine karşı gösterirken; *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşuna karşı antimikrobiyal etkisinin olmadığı saptanmıştır. *L. plantarum* DSM 20246 suşu en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi 13,8±2,2 mm'lik zon çapı ile *Micrococcus luteus* NRLL B-4375 suşu üzerinde göstermiştir. *L. plantarum* DSM 20246 suşunun da diğer tüm test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği, *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşuna karşı antimikrobiyal özellik göstermediği belirlenmiştir.

Yapılan birçok araştırma sonucunda organik asitler (laktik asit, asetik asit, formik asit), diasetil ve hidrojen peroksidin tek başına veya birlikte gerek gram pozitif gerekse gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [106,107]. Özellikle *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Enterococcus*, *Listeria* ve *Pseudomonas* cinsi mikroorganizmalara karşı antagonistik etki gösterdikleri gösterilmiştir [107-110].

EPS'nin probiyotik açıdan önemi; antibiyotiklerin toksik etkisinden, mide-bağırsak koşullarının olumsuz etkilerinden korunmak ve bağırsakta kolonizasyonu artırmak gibi probiyotik suşa çeşitli avantajlar kazandırmaktadır. Ekzopolisakkaritlerin, fermente süt ürünlerinin yapısal özellikleri üzerinde oynadıkları rol yanında antitümör, antiülser, immün

sistemi uyarıcı ve kolesterol düşürücü aktivitelerinden dolayı insan sağlığını koruyucu etkiye sahip oldukları birçok çalışmada bildirilmiş ve bu yüzden bu çalışmada bu testlere yer verilmiştir.

*L. acidophilus* ATCC 4356 ve *L. plantarum* DSM 20246 suşlarının EPS ve toplam hücresel protein oluşturma özellikleri incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.2, Çizelge 4.3, Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6' da sunulmuştur. Elde edilen sonuçlarda, ortama ilave edilen sodyum benzoat miktarının artması ile bakterilerin EPS üretim miktarlarında belirli miktarlarda bir artış gösterdiği gözlenmiştir. Ancak, yüksek miktarda ortama ilave edilen sodyum benzoat ile bakterilerin EPS üretimlerinin azaldığı bulunmuştur. Sodyum benzoat konsantrasyonunun artışıyla birlikte EPS miktarlarının artması, bakterilerin muhtemel bir direnç mekanizması oluşturması olarak düşünülmüştür.

Ortamdaki sodyum benzoatın artışıyla ters orantılı olarak *L. acidophilus* ATCC 4356 ve *L. plantarum* DSM 20246 suşlarında protein miktarında azalma tespit edilmiştir (Çizelge 4.3 ve 4.6).

Yapılan çalışmalarda, Frengova ve ark. (2000), yoğurt starter kültürü olarak kullanılan *S. thermophilus*'un on suşunun 57-270 mg/l arasında EPS ürettiğini, Cerning ve ark. (1992), *L. bulgaricus* suşlarının 55-150 mg/l aralığında EPS ürettiklerini bildirmişlerdir [111, 112].

Probiyotik olarak tanımlanmak istenen bakterinin; patojen olmaması, mide-bağırsak sistemi koşullarına toleranslı olması, bağırsak mukozasına adezyon ve rekabetle patojenlerin bağırsaktan uzaklaştırılması beklenen en önemli özellikleridir. Probiyotiklerin konak için yararlı etkiler gösterebilmesi için agregasyon ile yeterli yoğunlukta olmaları gerekmektedir. Bu nedenle probiyotiklerin agregasyon yetenekleri probiyotik seçiminde istenilen bir özellik olduğu bildirilmiştir. Probiyotiklerin patojen bakterilerle koagregasyonu bu bakterilere, bağırsakta tutunamayan ve koagregat olmayan türlere göre avantaj sağladığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bazı

araştırmacılar *Lactobacillus* türlerinin koagregasyon yeteneklerinin patojenlerin kolonizasyonunu engelleyen bir bariyer olabileceğini bildirmişlerdir [113-116].

Bu çalışmada *L. acidophilus* ATCC 4356 ve *L. plantarum* DSM 20246 suşlarının otoagregasyon ve test bakterileriyle koagregasyon yetenekleri incelenmiştir. Sodyum benzoatın *L. acidophilus* ATCC 4356 ve *L. plantarum* DSM 20246 suşlarının agregasyon yeteneğinin belirlenmesinde Avrupa Birliği ülkelerinde sodyum benzoatın kullanım yasal sınırı olan % 0,1 konsantrasyonu kullanılmıştır. Bakteriler bu konsantrasyonda besiortamında üretilerek, kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak agregasyon özellikleri tesbit edilmiştir (Şekil 4.7 ve 4.8).

*L. acidophilus* ATCC 4356 ve *L. plantarum* DSM 20246 suşları %0,1 konsantrasyonda sodyum benzoatlı ortamda inkübe edildiğinde, agregasyon yeteneklerinin arttığı gözlenmiştir. Bunun ile birlikte bu suşların % 0,1' lik sodyum benzoatlı ortamda koagregasyon yeteneklerinin de arttığı tesbit edilmiştir. Sadece *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 test bakterisine karşı koagregasyon yeteneğinde azalma gözlenmiştir.

Sonuç olarak çalışmada sodyum benzoatın *L. acidophilus* ATCC 4356 ve *L. plantarum* DSM 20246 suşları üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde;

- Avrupa Birliği ülkelerinde sodyum benzoatın kullanımın yasal sınırı olan % 0,1 orana karşı her iki bakterinin dirençli olduğu belirlenmiştir.
- Sodyum benzoatın belirli konsantrasyona kadar, her iki bakterinin de üremelerini stimüle ettiği belirlenmiştir. Sodyum benzoatın % 0.1 konsantrasyonunun, doğal bağırsak bakterileri olan bu iki bakterinin üremeleri üzerinde olumsuz etkisinin olmadığı ve olası zararlı etkilerinin önlenbilmesinin sağlanabileceği düşünülmektedir.

- Yasal sınırlar içerisinde sodyum benzoat kullanıldığında her iki probiyotik bakterinin insan bağırsak sisteminde otoagregasyon ve koagregasyon yeteneklerinin artabileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Gomes, A. M. P., Malcata, F. X., “*Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biochemical, technological and threpeutic properties revelant for use as probiotics” , **Trends. Food Sci. Techn.**, 10: 139 (1999).
2. Fuller, R., “Probiotics in man and animal” , **J. Appl. Bacteriol.**, 66: 365-378 (1998).
3. Salminen, S., Bouley, C., Boutron- Ruault, M. C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., Moreau, M. C., Roberfroid, M., Rowland, O., “Functional food science and gastrointestinal physiology and function” , **Brit. J. Nutr.**, 80 (1): 147 (1998).
4. Sanders, M. E., “Probiotics” , **Food Tecnol.**, 53: 67-77 (1999).
5. Salminen, S., Ouwehand, A. C., Isolauri, E., “Probiotics: an overview of beneficial effects” , **Anton Leeuw.**, 82: 279-289 (2002).
6. Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., Kim, H. Y., “Probiotics and their fermented food prudycts are beneficial for health” , **J.Appl. Microbiol.**, 100: 1171-1185 (2006).
7. Jan, G., Leverrier, P., Proudly, I., Roland, N., “Survival and beneficial effects of propionibacteria in the human gut: in vivo and in vitro investigations” , **Lait.**, 82:131-144 (2002).
8. Sillanpää, J., “Tissue-Adherence in Lactic Acid Bacteria: Identification and Characterization of the Collagen Binding S-Layer Protein of *Lactobacillus crispatus*” , **University of Helsinki**, Helsinki, 7-11 (2001).
9. Klaenhammer, R. T., Kullen, J. M., “Selection and design of propeitics” , **Int. J. Food Microbiol.**, 50: 45-57 (1999).
10. Donohue, D. C., Salminen, S. J., “Safety of probiotic bacteria” , **Asia., Pac., J.Clin. Nutr.**, 5: 25–28 (1996).
11. Girsmondo, M. R., Dargo, L., Lombardi, A., “Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora” , **Int. J. Antimicro. Agents.**, 12: 287-292 (1999).
12. Yılsay, T. Ö., Kurdal, E., “Probiyotik süt ürünlerinin beslenme ve sağlık üzerindeki etkisi” , **VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu (Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri)**, Tekirdağ, 279-294 (2000).

13. Yıldırım, Z., Yıldırım, M., "Probiyotik özellik gösteren Bifidobakteriler" , **VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu (Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri**, Tekirdağ, 266-271 (2000).
14. Gamez, S., Cosson, C., Deschamps, A. M., "Evidence for a bacteriocin-like substances produced by a new strain of *Streptococcus* sp., inhibitory do gram-positive food-borne pathogenes" , **Res. Microbiol.**, 148: 757-766 (1997).
15. Ocana, V. S., Pesce, A. A., Holgado, P. R., Nader-Macias, M. E., "Characterization of bacteriosin-like substances produced by a vaginal *Lactobacillus salivarius* strain" , **Appl. Environ. Microbiol.**, 65: 5631-5635 (1999).
16. Volin, M. J., Jerry, S., Miller, T. L., Zang, Y., Bank, S., "Change in production of ethanol , acids and H<sub>2</sub> from glucose by the fecal of a 16- to 158- -d-old breast-fed infant" , **J. Nutr.**, 130: 85-90 (1998).
17. Kabir, A., Aiba, M. A.Y., Takagi, A., Kamiya, S., Mirwa, T., Koga, Y., "Perventation of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnatabiotic murine model" , **Gut.**, 41: 49-55 (1997).
18. Pelto, L., Salminen, S. J., Isolauri, E., "*Lactobacillus* GG modulates milk induced immune inflammatory response in milk-hypersensitive adults" , **Nutr Doday Suppl.**, 31: 454-455 (1996).
19. Salminen, S., Isolauri, E., Salminen, E., " Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier successful strains and future challenges" , **Antonie Van Leeuwenhoek**, 70: 347-358, (1996).
20. Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., Lee, K.Y.,. "Probiotics: How should they be defined?" , **Trends in Food Sci. & Technol.** 10: 107-110 (1999).
21. Zubillago, M., Weill, R., Postaine, E., Goldman, C., Caro, R., Boccio, J., "Effect of probioticsand functional foods and their use in different diseases" , **Nutrition Research**, 21: 569-579, (2001).
22. Rolfe, R.D., "The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health" , **Journal of Nutrition**, 130: 3965-4025, (2000).

- 23.Yücesan, S., , "Probiyotikler ve sağlık üzerine etkileri", **Türk Diyetisyenler Derneği Bülteni**, 2: 1-13, (2002).
- 24.Çakır,İ., "*Lactobacillus* ve *Bifidobacter*lerde bazı probiyotik özelliklerin incelenmesi", Doktora Tezi, **Ankara Üniversitesi**, Ankara, (2003).
- 25.Shah, N.,. "Functional foods from probiotics and prebiotics", **Food Technology** 55:46-53, (2001).
- 26.Beasley, S., "*Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota*", **Academic Dissertation in Microbiology**,(2004).
- 27.Gürsoy, O. ve Kınık, O. 'Laktobasiller ve Probiyotik Peynir Üretiminde Kullanım Potansiyelleri,' **Mühendislik Bilimleri Dergisi**, 3: 361–371, (2005).
- 28.Madigan, M.T., Martinko, J.M. '**Brock Biology Of Microorganisms**,' Pearson Education, Inc. 11: 375–378, (2006).
- 29.Marteau, P.R., Vrese, M., Cellier, J.C., Schrezenmeir, J., "Protection from gastrointestinal diseases with use of probiotics", **Am. J. Clin. Nutr**, 73: 430-436, (2001).
- 30.Drinan, D. F., Tobin, S. and Cogan, T. M., "Citric acid metabolism in hetero and homofermentative lactic acid bacteria", **Appl. Envir. Microbiol.**, 31 (4): 481-486 (1976).
- 31.Prescott, C. S. and Dunn, G. C., "Industrial Microbiology", **Puldished on Distributors**, India, 882, (1987).
- 32.Halkman, K., "Tarım Mikrobiyolojisi", No: 1214, **A. Ü. Ziraat Fak. Yayınları**, Ankara, 82, (1991).
- 33.Yetişmeyen, A., "Süt Teknolojisi", No: 1420, **A. Ü. Ziraat Fak. Yayınları**, Ankara, 229 (1995).
- 34.Tekinşen, O. C. ve Atasever, M., "Süt Ürünleri Üretiminde Starter Kültür", **Selçuk Ü. Vet. Fak. Yayınları**, Konya, 150: (1994).

35. Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Wright, A., "Lactic Acid Bacteria, microbial and Functional Aspects, **Food Sci. & Technol.** 3: 1-53 (2004).
36. Çakır, İ., "Lactobacillus ve Bifidobacterlerde bazı probiyotik özelliklerin incelenmesi", Doktora Tezi, **Ankara Üniversitesi**, Ankara, (2003).
37. McGroarty, J. A., "Cell surface appendages of *Lactobacilli*", **FEMS Microbiol. Lett.**, 124: 405-410 (1994).
38. Tunali, N. ve Köşker, Ö., "Süt Mikrobiyolojisi", No:1116, **A. Ü. Ziraat Fak. Yayınları**, Ankara, 113 (1989).
39. Hammes, W.P. and Vogel, R.F., "The genus *Lactobacillus*", in the lactic acid bacteria. The genera of lactic acid bacteria, **Blackie Academics and Professionals**, 2: 19-55 (1995).
40. Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H., 'Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy', **Int. J. Food Microbiol.**, 36: 1-29 (1997).
41. İnternet: <http://nccam.nih.gov/health/probiotics/>
42. Sneath, P. H. A., Mair, N. S. and Holt, J. G., "Bergey's Manual of Systemic Bact., Volume 2", **Willims & Wilkins.**, London, 1208-1304 (1986).
43. Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M.J., Landon, M., "Isolation and Characterization of Exocellular Polysaccharide Produced by *Lactobacillus bulgaricus*", **Biotech .Lett.** 8: 625-628 (1986).
44. Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M.J., Landon, M., "Comparision of Exocellular Polysaccharide Production by Thermophilic Lactic Acid Bacteria", **Sci.Aliments** 10: 43-451 (1990).
45. Ding, Y., Karie, O., Labbe, J., Palcic, M.M., Ernat, B. and Hindsgaul, O., 'Syntesis and biological activity of oligosaccharide libraries', **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 376:261-269 (1995).



46. Leigh, J. A., Walker, C. G., "Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function1 , **Trends Genet.**, 10: 63–67 (1994).
47. Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., Reyes-Gavilan, C. G., Salminen, S., "Exopolisaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to Human intestinal Mucus" , **J Food. Protect.**, 69(8): 2011-2015 (2006).
48. Gorret, N., Maubois, J. L., Engasser, J. M., Ghoul, M., "Study of the effects of temperature, pH, and yeast extract on growth and exopolysaccharides production by *Propionibacterium acidopropionici* on milk microfiltrate using a response surface methodology" , **J. Appl. Microbiol.**, 90: 788-796 (2001).
49. Cerning J., Renard, C. M. G. C., Thibault, J. F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., Topisirovic, L., "Carbon Source Requirement for Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus casei* CG11 and Partial Structure Analysis of the Polymer" , **Appl. Environ. Microbiol.**, 60 (11): 3914-3919 (1994).
50. Bouzar, F., Cerning, J., Desmazeaud, M., "Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants" , **J. Dairy Sci.**, 79: 205-211 (1996).
51. Roginski, H., "Fermented milks: products from Northern Europe" , **Ency. Food Microbiol.**, 791-798 (1999).
52. Duboc, P., Mollet, B., "Applications of exopolysaccharides in the dairy industry" , **Int. Dairy J.**, 11: 759-768 (2001).
53. Hosono, A., Lee, J., Amentoni, A., Natsume, M., Hirayama, M., Adachi, T., Kaminogawa, S., "Characterization of a water-soluble polysaccharides fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis*, M 101-4" , **Biosci. Biochem.**, 61: 312-316 (1997).
54. Altuğ, T., Demirağ, K., "Influence of monosodium glutamate on flavour acceptability and the reduction of sodium chloride in some ready-made soups" **Chem Microbiol. Technol Lebensmittel.**, Vol.15(5/6) 161-164 (1993).
55. Doğruyol, H., "Gıdalardaki Katkı Maddeleri ve Zararları", **Güncel Pediyatri**, 2:42-8, (2006).
56. Altuğ, T., "Gıda Katkı Maddeleri", **Meta Basım**, İzmir, 2: (2006).

57. Miller M., "Danger! Additives at Work", **London Food Commission**, (1985).
58. Coultate, T.P., "FOOD, The Chemistry of Its Components", **Royal Society of Chemistry**, Second Edition, (2000).
59. Bakar, E., "Besin Koruyucuların Sıçan Dokularında Silialik Düzeyleri ve Membran Gligozaminoglikanları Üzerine Etkileri", **Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi**, (2008).
60. Cohen N, Weiss G., Minde K., "Cognitive styles in adolescentis previously diagnosed as hyperactive", **J. Child Psychol. Psychiatry**, 13:203-9, (2006).
61. Maki T., Suziki, Y., "Benzoic acid and derivatives." **Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry**, . A3:. 555-568 (1985).
62. İnternet: <http://www.inchem.org/sodiumbenzoate/>
63. WHO, "Benzoik acid and sodium benzoate." **Concise İternational Chemical Assessement**, 26: (2000).
64. Srour, R., "Benzoik acid and derivatives." **Aromatic intermediates and derivatives**, A.IV: 1-17 (1998).
65. Chipley, J.R., "Sodium benzoate and benzoic acid." **Antimicrobials in foods**, 11-35 (1983).
66. Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M.O., Baker, R.A., "Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products." **Critical reviews in food science and nutrition**, 35 (6): 509 – 524 (1995).
67. Balachandra, S., Sudha, D.R., "Estimation of Sodium Benzoat in Ayurvedic Formulation. Kashaya (Water Decoction)." **Assian Journal of Chemistry**, 19(5): 3421- 3426 (2007).
68. Ova G., "Koruyucular. Gıda katkı maddeleri." **Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yay.**, 128 (2001).
69. US FDA, "GRAS (Generally Recognized As Safe) food ingradient: benzoik acid and sodium benzoate." **Washington, DC.US Food and Drug Administration**, (1972 a).
70. Kubota, K., Ishizaki, T., "Dose-dependent pharmocokinetics of benzoik acid following oral administration of sodium benzoate to humans." **European journal of clinical pharmacology**, 41 (4) : 363-368 (1991).

71. Feilet, F., Leonard, J.V., "Alternative pathway therapy for urea cycle disorders." **Journal of inherited metabolic disease**, 21 (1): 101 – 111 (1998).
72. Fujitani, T., "Short-term of sodium benzoate in F344 rats and B6C3F1 mice." **Tox. Lett.**, 69: 171-179 (1993).
73. Kabaoğlu, A., Aktaş, T., "A study of the effects of sodium benzoate on the Mouse liver." **Biologia**, 57 (3): 373-380 (2002).
74. Binslev-Jensen, C., "ABC of allergies. Food allergy." **British medical journal**, 316: 1299 -1302 (1998).
75. Coverly, J., Peters, L., Whittle, E., Basketter, D.A., "Susceptibility to skin stinging, non-immunologic contact urticaria and acute skin irritation; is there a relationship?" **Contact dermatitis**, 38 (2): 90-95 (1998).
76. Boris, S., Suarez, J. E., Barbes, C., "Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, vaginal isolate" , **J. Appl. Microb.**, 83: 413-420 (1997).
77. Kos, B., Šušković, S., Šimpraga, M., Frece, J., Matošić, S., "Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92" , **J. Appl. Microbiol.**, 94: 981-987 (2003).
78. Boris, S., Suárez, J. E., Vázquez, F., Barbés, C., "Adherence of human vaginal *Lactobacilli* to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens" , **Infect. Immun.**, 66 (5): 1985-1989 (1998).
79. Reid, G., McGroarty, J. A., Angotti, A., Cook, R. L., "*Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens" , **Can. J. Microbiol.**, 34: 344-351 (1988).
80. Demain, A. L., "Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms" , **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 52: 455-463 (1999).
81. El-Adaway, T. A., "Optimum production, stability, partial purification and inhibitory spectrum of antimicrobial compounds produced by *Pediococcus pentosaceus* D1" , **Nahrung/Food**, 45: 118-124 (2001).
82. Jehanno, D., Thuault, D., Bourgeois, C.M., 'Development of a Method for Detection of Lactic Acid Bacteria Producing Exclusively the L-(+)- Isomer of Lactic Acid,' **Applied and Environmental Microbiology**, 58 (12):, 4064-4067 (1992).

83. Kılıç, S., *Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri*, **Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları**, 542: 109-111 (2001).
84. deMan, J. C., Rogosa, M., Sharpe, M. E., "A medium for the cultivation of lactobacilli" , **J. Bacteriol.**, 23: 130 (1960).
85. Anonymous, "Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları" , Halkman, A.K., Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 243-244, 246, 247, 250, 289, 261, 320, (2005).
86. Baer, A., Ryba, I., "Serological identification of propionibacteria in milk and cheese samples" , **Inter. Dairy J.**, 2: 299-310, (1992).
87. Sağlam, Ö. F., **Türk Gıda Mevzuatı**
88. Goodman, D. "Chronic urticaria exacerbated by the antioxidant food preservatives, butylated hydroxytoluene (BHT)" **Journal Allergy Clinical Immunology** October 86 (4): , (1990).
89. Sitich, F. H., "The beneficial and hazardous effects of simple phenolic compounds", **Mutation Research**, 259: 307-32, (1991).
90. Vogt, T., "Sodium Benzoate- Induced Acute Leukocytoclastic Vasculitis with Unusual Clinical Appearance"; **Archive of Dermatology**, June, 135: 726-727, (1999).
91. Bağcı, T., "Gıda Katkı Maddeleri ve Sağlığımız Üzerine Etkileri", **Hacettepe Tıp Dergisi**; 28(1): 18-23, (1997).
92. Groten, J.P., "An Analysis of the Possibility for Health Implication of Joint Actions and Interactions Between Food Additives", **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 31: 77-91, (2000).
93. Beuchat, L. R., "Comparison of Anti- Vibrio Activities of Potassium Sorbate, Sodium Benzoate, and Glycerol and Sucrose Esters of Fatty Acids" **Applied and Environmental Microbiology**, 39 (6): , (1980).
94. Lund, M.B., **The Microbiological Safety and Quality of Food**, Apsen Publishers, 1: , (2000).
95. Sahin I, Karabay O., "In vitro activity of sodium-benzoate against isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*", **West Indian Medical Journal**, 54 (2): , (2005).
96. Tekinşen, O.C. ve Atasever, M., "Süt Ürünleri Üretiminde Starter Kültür", **Selçuk Ü. Vet. Fak. Yayını**, Konya, 1: 150, (1994).

97. Yetişmeyen, A., "Süt Teknolojisi", **A.Ü. Ziraat Fak Yayınları**, 1420:, 229, (1995).
98. Daeschel, M.A., "Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives", **Food Technol.**, 164-167 (1989).
99. Reiter, B. and Harnulv, G., "Lactoperoxidase antibacterial system: Natural occurrence, biological functions and partial applications", **J. Food Protect.**, 47(9): , 724-732 (1984).
100. Carminati, D., Giraffa, G. and Bossi, M.G., "Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*", **J. Food Protec.**, 52(9): , 614-617, (1988).
101. Spelhaug, S.R. and Harlander, S.K., "Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*", **J. Food Protect.**, 52(12):, 856-862, (1989).
102. Fitzsimmons, N. and Berry, D.R., "Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*: Evidence for the involvement of a peroxidase system", **Microbios**, 80:, 125-133, (1994).
103. Fitzsimmons, N. and Berry, D.R., "Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*: Evidence for the involvement of a peroxidase system", **Microbios**, 80:, 125-133 (1994).
104. Attaie,R., Whalen, P.J., Shahani, K.M. and Amer, M.A., "Inhibition of growth of *Staphylococcus aureus* during production of acidophilus Yogurt", **J. Food Protec.**, 50(3):, 224-228 (1987).
105. Juven, B.J., Schved, F. and Lidner, P., "Antagonistic compounds produced by a chicken intestinal strain of *Lactobacillus acidophilus*", **J. Food Protect.**, 55(3):, 157-161, (1992).
106. Harris, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.E. and Klaenhammer, T.R., "Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*", **J. Food Protect.**, 52(6):, 384-387, (1989).
107. Attaie,R., Whalen, P.J., Shahani, K.M. and Amer, M.A., "Inhibition of growth of *Staphylococcus aureus* during production of acidophilus Yogurt", **J. Food Protec.**, 50(3):, 224-228, (1987).
108. Frank, J.F. and Marth, E.H., 'Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* by homofermentative lactic acid bacteria in skim milk", **J. Food Protect.**, 40(11):, 754-759, (1977).

109. Keppler, K., Geisen, R. and Holzapfel, W.H., "An  $\alpha$ -amylase sensitive bacteriocin of *Leuconostoc carnosum*", ***Food Microbiol.***, 11:, 39-45, (1994).
110. Cerning, J., Bouillanne, C., London, M., Desmazeaud, M., "Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria" , ***J. Dairy Sci.***, 75: 692-699 (1992).
111. Frengova, G. I., Simova, E. D., Beshkova, D. M., Simov, Z. I., "Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains" , ***Znaturforsch.***, 57: 805-810 (2002).
112. Collado, M. C., Meriluoto, J., Salminen, S., "Development of New Probiotics by Strain Combinations: Is It Possible to Improve the Adhesion to Intestinal Mucus?" , ***J. Dairy Sci.***, 90: 2710-2716, (2006).
113. Collado, M. C., Meriluoto, J., "Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains" , ***Eur. Food Res Technol.***, 226: 1065-1073, (2008).
114. Boris, S., Suárez, J. E., Barbés, C., "Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, vaginal isolate", ***J. Appl. Microbiol.***, 83: 413-420, (1997).
115. Schachtsiek, M., Hammes, W. P., Hertel, C., "Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001<sup>T</sup> surface protein Cpf Mediating coaggregation with and aggregation among pathogens" , ***Appl. Environ. Microbiol.***, 70: 7078-7085, (2004).

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : GÜMÜŞTEKİN, Yeşim  
 Uyuğu : T.C.  
 Doğum tarihi ve yeri : 04.10.1986/Çanakkale  
 Medeni hali : Bekar  
 Telefon : 05052864094  
 e-mail : yesimgumustekin@yahoo.com

### Eğitim

| Derece tarihi | Eğitim Birimi                   | Mezuniyet |
|---------------|---------------------------------|-----------|
| Lisans        | Osmangazi Üniversitesi/Biyoloji | 2007      |
| Lise          | Etimesgut Anadolu Lisesi        | 2004      |

### Yabancı Dil

İngilizce

### Ulusal ve Uluslararası Sempozyum Bildirileri

1. Gümüştekin, Y., Beyatlı, Y. and Darılmaz, Önal, D., *Lactobacillus plantarum*' da sodyum benzoat (E211) dirençliliği, eksopolisakkarit (eps) ve toplam hücresel protein miktarının belirlenmesi, XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi. 13-16 Aralık 2009
2. Gümüştekin, Y., Beyatlı, Y. and Darılmaz, Önal, D., *Lactobacillus acidophilus*' ta sodyum benzoat (E211) dirençliliği ve eksopolisakkarit (eps) miktarının belirlenmesi, 7. Uluslararası Katılımlı Türk Toksikoloji Derneği Kongresi, Ankara, 30 Mayıs-01 Haziran 2009 Syf:126 (Poster Sunum).