

*Pediococcus pentosaceus* ve *Lactobacillus brevis*'İN BEYAZ  
PEYNİRLERDE *Staphylococcus aureus* GELİŞİMİ ÜZERİNE  
ETKİSİ

**THE EFFECT OF *Pediococcus pentosaceus* AND  
*Lactobacillus brevis* ON THE GROWTH OF *Staphylococcus  
aureus* IN WHITE-BRINED CHEESES**

**MÜNEVVER YÜCEBAY**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

GIDA Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Olarak Hazırlanmıştır.

2012



Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI 'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....

Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Üye (Danışman) :.....

Prof. Dr. S. Aykut AYTAÇ

Üye (İkinci Danışman) :.....

Yrd. Doç. Dr. Birce TABAN

Üye :.....

Prof. Dr. Barbaros ÖZER

Üye :.....

Doç. Dr. Ayşe GÜR SOY

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından ...../...../..... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca ...../...../..... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof. Dr. ....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# *Pediococcus pentosaceus* ve *Lactobacillus brevis*' İN BEYAZ PEYNİRLERDE *Staphylococcus aureus* GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

**Münevver Yücebey**

## **ÖZ**

*Staphylococcus aureus*'un enterotoksin üreten suşları gıda zehirlenmelerinin en önemli kaynaklarından birini oluşturmaktadır. Süt ve süt ürünlerinden peynir, stafilokokal gıda zehirlenme vakalarının en yaygın olarak görüldüğü gıdalar arasındadır. Peynir yapımında laktik asit bakterilerinin kullanımı ile hem peynirin tat, koku, tekstür gibi duyuşsal özellikleri geliştirilmekte, hem de patojenlere karşı antimikrobiyel etki sağlanarak gıda kaynaklı zehirlenme riski minimuma indirilebilmektedir. Bu çalışmada Beyaz peynir üretim ve olgunlaşma süresince probiyotik özellikteki laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus brevis* BG18 ve *Pediococcus pentosaceus* BH105 suşlarının *S. aureus* ATCC6538 gelişimi üzerine etkisi ayrı ayrı incelenmiştir. Çalışma kapsamında, peynir üretimi boyunca 2, 6, 22 ve 24. saatlerde örnek alınırken, 3 ay süren depolama süresince belirli aralıklarla örnek alınmış ve kültürel ekimler gerçekleştirilmiştir. *L. brevis* ile yapılan çalışmada, elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde antibakteriyel etkinin 648. saatten sonra başladığı görülmüştür. Nitekim 648. saatte kontrol grubunda patojen sayısı  $2.50 \times 10^6$  EMS/mL olarak saptanırken örnekte  $3.65 \times 10^5$  EMS/mL olarak saptanmış ve depolamanın 90. gününde bu değerler sırasıyla  $3.82 \times 10^6$  EMS/mL ve  $5.50 \times 10^5$  EMS/mL olarak belirlenmiştir. Depolama başlangıcından sonuna kadar elde edilen verilerin istatistiksel analizi sonucunda *L. brevis* BG18 bakterisinin *S. aureus* gelişimi üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olduğu görülürken ( $p < 0.01$ ), *P. pentosaceus* BH105 bakterisinin istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermediği sonucuna ulaşılmıştır ( $p > 0.01$ ).

**ANAHTAR KELİMELELER:** *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus aureus*, Beyaz peynir, antimikrobiyel etki

Danışman: Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ, Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

Danışman Yardımcısı: Yrd. Doç. Dr. Birce TABAN, Ankara Üniversitesi, Süt Teknolojisi Bölümü

# THE EFFECT OF *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus brevis* ON THE GROWTH OF *Staphylococcus aureus* IN WHITE-BRINED CHEESES

Münevver Yücebey

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is responsible for broad range of human and animal infections, also enterotoxin producing strains are one of the main sources associated with food poisoning. Among dairy products, cheese is one of the most common food reported in staphylococcal food poisoning. The use of lactic acid bacteria in cheese manufacturing, not only increases the organoleptic properties of the end product, but also lowers the risk of food poisoning by showing an antimicrobial effect towards such pathogens. The effect of *Lactobacillus brevis* BG18 and *Pediococcus pentosaceus* BH105 on the growth of *S. aureus* ATCC6538 during the manufacturing and ripening of white pickled cheeses were studied. Cheese samples were picked at the 2<sup>nd</sup>, 6<sup>th</sup>, 22<sup>nd</sup> and the 24<sup>th</sup> hours of the manufacturing and at several intervals throughout the ripening period of 3 months. *S. aureus* and lactic acid bacteria counts were made for each sample and the results were evaluated. Antimicrobial activity of *L. brevis* towards *S. aureus* has started after 648<sup>th</sup> hour. Pathogen counts were  $2.50 \times 10^6$  EMS/mL and  $3.65 \times 10^5$  EMS/mL in control group and the group with *L. brevis* respectively. At the end of the ripening period (90<sup>th</sup> day), these counts were  $3.82 \times 10^6$  EMS/mL and  $5.50 \times 10^5$  EMS/mL respectively. Beyond the two lactic acid bacteria only *L. brevis* showed antimicrobial activity towards *S. aureus* during ripening period ( $p < 0.01$ ).

**KEYWORDS:** *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus aureus*, white-brined cheese, antimicrobial effect

Advisor: Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ, Hacettepe University, Food Engineering Department

Co-advisor: Assist. Prof. Dr. Birce TABAN, Ankara University, Dairy Technology Department

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans dönemim boyunca, anlayışı, sabırlı kişiliği, yardım severliği ile hep yanımda olduğunu hissettiren, araştırmalarım sırasında engin bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen çok değerli hocam sayın **Prof. Dr. S. Aykut AYTAÇ'a**,

Çalışmalarım süresince, her zaman yanımda olan, bana yol gösteren, biricik bebeğinden ve ailesinden feragat edip benimle ilgilenen, pratik çözümleriyle bir hoca ve bir arkadaş olarak destek olan Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü'nden Sayın Hocam **Yrd. Doç. Dr. Birce TABAN'a**

Çalışmanın en önemli aşaması olan beyaz peynir üretim aşamasında, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, emeği ve yardımları için her zaman saygı duyacağım Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Hocam **Prof. Dr. Barbaros ÖZER'e**;

Çalışmada, gece geç saatlere kadar süren peynir üretim aşamalarında yardımlarını, bilgi ve desteğini esirgemeyen, her zaman güleryüzlü ve anlayışlı olan Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Hocam **Doç. Dr. Ayşe GÜRSOY'a**;

Çalışmanın istatistiksel analizlerinin yapılması aşamasında değerli görüş ve katkıları ile bizleri yönlendiren Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Eğitim Bilimleri Bölümü Eğitimde Ölçme ve Değerlendirme A.B.D. Öğretim Üyesi Sayın Hocam **Doç. Dr. Nuri DOĞAN'a**

Her zaman güleryüzü ve içten tavırlarıyla yanımda olan, çalışmamdaki tüm zorlukları birlikte yendiğim sevgili çalışma arkadaşım **Meltem ÇOLAKLAR'a**; İyi günümde kötü günümde hep yanımda olup bana ailem kadar yakın olan, motivasyon kaynağım **Canım Arkadaşlarım**; Hayatımda olduğu için kendimi çok şanslı hissettiğim, her zaman sevgisiyle ve desteğiyle bana güven veren, tezimdeki yardımları gözardı edilemeyecek kadar büyük olan biricik ablam **MÜNÜSE UYGUROĞLU'na**; Sonsuz destek, sevgi ve anlayışları için, olmazsa olmazım, çok değerli **anne ve babama** ve hayat arkadaşım **Kemal AÇMAN'a**

En içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	viii
EKLER DİZİNİ .....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	x
1. GİRİŞ .....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ .....	4
2.1. <i>S. aureus</i> .....	4
2.1.1. Tarihçesi .....	4
2.1.2. Taksonomi ve biyokimyasal özellikleri .....	4
2.1.3. Virulans faktörleri ve patojenite .....	5
2.1.4. Stafilokokal zehirlenmeler .....	8
2.1.5. <i>S. aureus</i> ' un neden olduğu bazı hastalıklar .....	12
2.2. Laktik asit bakterileri .....	12
2.2.1. Laktik asit bakterilerinin gıdalardaki önemi .....	13
2.2.1.1. Starter kültür .....	14
2.2.1.2. Antimikrobiyel etki .....	15
2.3. Bakteriyosinler .....	16
2.3.1. Bakteriyosinlerin Etki Mekanizması .....	17
2.3.2. Gıdalarda bakteriyosinlerin kullanımı .....	18
2.4. Probiyotikler .....	18
2.4.1. Probiyotiklerin muhtemel etki mekanizmaları .....	19
2.4.2. Probiyotiklerin sağlık üzerine olumlu etkileri .....	20
2.5. Beyaz Peynir .....	20
2.5.1. Beyaz peynir üretim akım şeması .....	22
2.6. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) .....	23

3. MATERYAL VE METOT .....	25
3.1. Materyal .....	25
3.1.1. Çiğ süt.....	25
3.1.2. Starter kültür .....	25
3.1.3. Peynir mayası .....	25
3.1.4. Kalsiyum klorür .....	25
3.1.5. Tuz.....	25
3.1.6. Salamura .....	25
3.1.7. Kültürler .....	26
3.1.8. Besiyerleri .....	26
3.1.9. Tampon ve çözeltiler .....	26
3.1.10. Boya çözeltileri.....	26
3.1.11. DNA izolasyonu ve saflaştırılması kiti .....	26
3.1.12. DNA izolasyonu ve saflaştırılma işlemi deney düzeneği .....	26
3.1.13. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi deney düzeneği .....	26
3.1.14. Oligonükleotidler .....	27
3.1.15. Agaroz jel elektroforez işlemi deney düzeneği .....	27
3.1.16. Jel görüntüleme işlemi deney düzeneği .....	27
3.2. Metot .....	27
3.2.1. Saf kültürlerin canlandırılması ve kültürel sayım .....	27
3.2.2. Beyaz peynir üretimi .....	30
3.2.3. Peynir örneklerinde <i>S. aureus</i> ve laktik asit bakteri sayımı .....	33
3.2.4. DNA izolasyonu ve saflaştırılması işlemi .....	35
3.2.5. PZR amplifikasyon karışım bileşenlerinin ve PZR döngüsündeki sıcaklık parametresinin optimizasyonu .....	37
3.2.6. Agaroz jel görüntüleme işlemi.....	39
3.2.7. Jel görüntüleme işlemi .....	39
3.3. İstatistiksel analizler .....	40
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	41
5. SONUÇ .....	58

KAYNAKLAR.....	60
EKLER.....	67
ÖZGEÇMİŞ .....	79

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Beyaz peynir üretim akım şeması.....	22
Şekil 3.1. <i>S. aureus</i> canlandırma ve kültürel sayım .....	29
Şekil 3.2. Beyaz Peynir Üretimi .....	32
Şekil 3.3. Peynir örneklerinde <i>S. aureus</i> ve LAB sayımı .....	34
Şekil 3.4. Bakteri hücrelerinden DNA izolasyonu ve saflaştırılması uygulama basamakları.....	36
Şekil 4.1. <i>S. aureus</i> 'a ait PZR görüntüsü.....	44
Şekil 4.2. <i>L. brevis</i> 'in <i>S. aureus</i> 'a etkisi, t (saat) – log (EMS/mL) .....	45
Şekil 4.3. <i>P. pentosaceus</i> 'un <i>S. aureus</i> 'a etkisi, t (saat) – log (EMS/mL) .....	49

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. PZR amplifikasyon karışımı bileşenleri ve karışım içerisindeki miktar ve son konsantrasyonları .....	38
Çizelge 3.2. PZR döngüsündeki parametlerin optimizasyonunda kullanılan değerler .....	38
Çizelge 4.1. Örnek alım noktaları ( <i>L. brevis</i> ) .....	41
Çizelge 4.2. Kontrol Grubuna Ait <i>S. aureus</i> Sayım Sonuçları .....	42
Çizelge 4.3. Örnek Grubuna Ait <i>S. aureus</i> Sayım Sonuçları .....	43
Çizelge 4.4. Örnek alım noktaları ( <i>P. pentosaceus</i> ) .....	46
Çizelge 4.5. Kontrol Grubuna Ait <i>S. aureus</i> Sayım Sonuçları .....	47
Çizelge 4.6. Örnek Grubuna Ait <i>S. aureus</i> Sayım Sonuçları .....	48
Çizelge 5.1. High pure PCR template preparation kit içeriği .....	73
Çizelge 6.1. <i>nuc</i> -F166 ileri primerinin özellikleri .....	74
Çizelge 6.2. <i>nuc</i> -R565 geri primerinin özellikleri.....	75

## **EKLER DİZİNİ**

EK 1. ÇALIŞMADA KULLANILAN BESİYERLERİ .....	67
EK 2. ÇALIŞMADA KULLANILAN SELEKTİVİTE AJANLARI .....	69
EK 3. ÇALIŞMADA KULLANILAN TAMPON VE ÇÖZELTİLER .....	70
EK 4. ÇALIŞMADA KULLANILAN BOYA ÇÖZELTİLERİ .....	72
EK 5. ÇALIŞMADA KULLANILAN KİTLER .....	73
EK 6. ÇALIŞMADA KULLANILAN OLİGONÜKLEOTİDLER .....	74
EK 7. ÇALIŞMADA KULLANILAN JEL .....	76
EK 8. EMS TABLOSU .....	77

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	Adenozin trifosfat
bç	Baz çifti
BFP	Butterfield's phosphate
BPA	Baird Parker Agar
C	Sitozin veya sitidin
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum klorür
Da	Dalton
dATP	2'-deoksiadenozin-5'-trifosfat
dCTP	2'-deoksisitidin-5'-trifosfat
dGTP	2'-deoksiguanozin-5'-trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
dNTP	Deoksiriboükleozid trifosfat
dTTP	2'-deoksitimidin-5'-trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EMP	Emden Meyerhof Parnas
EMS	En muhtemel sayı
FDA	Food and Drug Administration
G	Guanin veya guanozin
GRAS	Generally recognized as safe
HMP	Heksoz monofosfat
K <sup>+</sup>	Potasyum iyonu
kob	Koloni oluşturan birim
LAB	Laktik asit bakterisi
MRS	de MAN, ROGOSA ve SHAPE
Na <sub>2</sub> EDTA	Disodyum etilendiamin tetraasetik asit

NaCl	Sodyum klorür
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
rpm	devir/dakika
SE	Stafilokokal enterotoksin
SH	Soxhlet-Henkel
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
Tm	Erime sıcaklığı
TSA	Triptik soy agar
TSB	Triptik soy broth
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü



# 1. GİRİŞ

Süt ve süt ürünleri insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. İçerdiği kaliteli besin maddeleri bakımından süttten maksimum seviyede yararlanabilmek için doğrudan tüketimi önerilmekteyse de bu her zaman mümkün olamamaktadır. Hacimli olması, naklinin zor olması ayrıca mikroorganizmalar için uygun bir ortam olduğundan çabuk bozuluyor olması nedeniyle süt, daha dayanıklı ürünlere işlenmekte böylece hem daha dayanıklı hem de farklı lezzetlerde ürünler ortaya koyulmaktadır. Süt ürünleri içinde en önemli payı peynir almaktadır.

Yüksek biyolojik değerli proteinler, yağda çözünen vitaminler (A, D, E, K) ve kalsiyum, fosfor gibi mineral maddeler içeren peynir, 1000'i aşan çeşide sahiptir. Bu çeşitlilik başta hammadde (koyun, keçi, inek sütü) olmak üzere, uygulanan teknik işlemler, kullanılan kültürler, ilave edilen katkı maddeleri ve farklı olgunlaştırma koşullarından kaynaklanmaktadır. Türkiye'de 40-50 çeşit peynir mevcutken, bunlardan Beyaz peynir, kaşar ve tulum peyniri ekonomik ve milli öneme sahiptir (Erkmen, 2000).

Beyaz peynir, sütün enzimatik yolla pıhtılaştırılması sonucu elde edilen, üretiminde starter olarak mezofilik laktik asit bakterileri kullanılan ve belli olgunlaşma evresi sonucu tüketime sunulan hafif tuzlu ve ekşimsi tada sahip yarı yumuşak bir peynir çeşididir (Wishah, 2007). Peynirde aroma gelişimi, olgunlaşma sırasında starter bakterilerin meydana getirdiği enzimatik olaylar sonucunda gerçekleşmektedir.

Birçok mikroorganizma için olduğu gibi, gıda kaynaklı zehirlenmelerin büyük çoğunluğundan sorumlu olan *Staphylococcus aureus* bakterisi için de peynir, içerdiği zengin besin öğeleri bakımından uygun bir gelişme ortamıdır. Literatürde *S. aureus*'un neden olduğu birçok peynir kaynaklı gıda zehirlenmesi mevcuttur. 1981 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde pastörize süttten üretilen peynirlerin tüketilmesi sonucu 16 kişide, 1983 yılında Fransa'da çiğ süttten yapılmış bir peynirin tüketilmesiyle 20 kişide, 1985 yılında İsviçre'de çiğ süttten yapılmış yumuşak yapıdaki peynirin tüketilmesiyle 215 kişide, İngiltere'de 1988 yılında çiğ süttten yapılan peynirin tüketilmesiyle 155 kişide *S. aureus* patojeninin neden olduğu zehirlenme vakası görülmüştür (Kousta et al., 2010).

*S. aureus* bakterisi, peynire üretimin farklı aşamalarında bulaşabilmektedir. Süt sağım aşamasında mastitisli hayvanların memesinden  $10^8$  kob/mL seviyesine kadar ulaşabilen *S. aureus* bulaşısı olabilmektedir. Pastörizasyonla mevcut *S. aureus* bakterilerinin sayısı azalsa da, gıda zehirlenmesine neden olan enterotoksinleri, ısıya dayanıklı olduğundan ortamda kalmaktadır. Bunun yanı sıra, pastörizasyon normlarının dikkatli bir şekilde yerine getirilmemesi sonucunda (yetersiz ısı işlem uygulaması ile) bakteriler canlılığını sürdürebilmekte ve ortamdaki uzaklaştırılmamaktadır. Pastörizasyon sonrası ise, üretimde stafilokokal enfeksiyona sahip bireylerin çalışması veya ekipmanların ve ortamın yeterli hijyen koşullarından yoksun olması ürüne *S. aureus* geçişine neden olmaktadır (Araujo et al., 2002, Kousta et al., 2010).

Gıdaların fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin geliştirilmesi ve muhafaza sürelerinin uzatılması için çeşitli katkı maddeleri kullanılmaktadır. Ancak bu katkıların bazılarının sağlıksız oluşu ve kullanım oranına bağlı olarak kanserojenik ve toksik olmaları nedeniyle bu yöntem günümüzde çok fazla tercih edilmemektedir. Bunun yerine, gıda güvenliğinin sağlanmasında mümkün olduğunca doğal katkı maddelerinin kullanımı önem kazanmıştır. Biyokontrol yöntemi ile antagonistik mikroorganizmalar ve metabolitler kullanılarak patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaların inaktive edilmesi sağlanmaktadır (de Martinis et al., 2002).

Gıdaların biyokontrolünde laktik asit bakterilerinin (LAB) ayrı bir önemi vardır. Fermantasyon teknolojisinin tipik bakterileri olup, gıdalarda uzun yıllardan beri güvenli bir şekilde kullanılan bu bakteriler, organik asitler, diasetil,  $CO_2$ , reuterin gibi antibiyotiklerle bakteriyosinler üreterek birçok Gram pozitif bakteriye karşı antagonistik etki göstermektedir. Bakteriyosinlerden özellikle nisin uzun yıllardır gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (Ross et al., 2002).

Bu çalışmada; Beyaz peynirde *S. aureus* bakterisi üzerine probiyotik özellikteki laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus brevis* ve *Pediococcus pentosaceus* bakterilerinin ayrı ayrı etkisi incelenmiştir. Bu amaçla peynir yapımı sırasında pastörize edilmiş süte yaklaşık  $10^6$ - $10^7$  kob/mL seviyesinde *S. aureus* bakterisi ve probiyotik bakteri ilave edilmiştir. Peynir üretim aşamasında ve 3 aylık olgunlaşma süresince çeşitli örnekler alınmış ve bakteri sayımı gerçekleştirilmiştir. *S. aureus*

bakteri sayımı için 5'li tüp EMS yöntemi kullanılmıştır. Bulanıklık görülen tüplerde doğrudan sonuca gidilmemiş, bunun yerine Baird Parker Agar (BPA) besiyerine ekim yapılmış, buradaki tipik kolonilerden saf kültür elde edilmiş ve ardından yüksek seçicilik ve duyarlılığa sahip Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi ile *S. aureus* bakterisine özgü *nuc* geninin 400 bç'lik bölgesi çoğaltılmıştır. Doğrulaması yapılmış tüplerden EMS tablolarına bakılarak sonuca gidilmiştir. Bu çalışma ile Türkiye'ye özgü *L. brevis* ve *P. pentosaceus* suşlarının biyokorumadaki yeri ve kullanılabilirliğinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1. *S. aureus*

#### 2.1.1. Tarihçesi

Eski Yunanca'da üzüm salkımı anlamına gelen 'staphyle' sözcüğünden türemiş olan *Staphylococcus* terimi ilk kez 1881 yılında, İskoçyalı cerrah Alexander Ogston tarafından insanların irinli lezyonlarından izole edilen kokların tanımlanmasında kullanılmıştır (Sandel and Mc Killip, 2004; Brock and Madigan, 2006). Daha sonrasında, Rosenbach stafilokokları yapay ortamlarda kültüre etmiş ve pigmentasyon bazında tanımlama yaparak sarı koloni oluşturan suşlara *S. pyogenes aureus* adını vermiştir (Brock and Madigan, 2006).

#### 2.1.2. Taksonomi ve biyokimyasal özellikleri

Micrococcaceae familyası üyesi olan *Staphylococcus* türleri hareketsiz, Gram pozitif 0.5 -1.5 µm çapında, kok şeklinde, fakültatif anaerob, spor oluşturmeyen, katalaz pozitif, oksidaz negatif, 2'li, 4'lü ve üzüm salkımı şeklinde düzensiz kümeler oluşturan bakterilerdir (Tükel ve Doğan, 2000; Çakır, 2007; Küçükçetin ve Milci, 2007). Bu cins içinde 28 tür ve 32 alt tür bulunmaktadır (Tükel ve Doğan, 2000).

Grubun en önemli üyesi koagülaz pozitif ve termostabil nükleaz (termonükleaz) pozitif olan *S. aureus* bakterisidir (Tükel ve Doğan, 2000). *S. aureus*, seçici olmayan besiyerlerinde 6-8 mm çapında, düz, parlak, dairesel, konveks koloniler oluşturur. Gelişme sıcaklıkları 6-46°C arasındadır. Toksin oluşturmaları için gerekli minimum ve maksimum sıcaklık dereceleri biraz daha yüksek olup 10-48°C'dir. Optimum gelişme sıcaklıkları 30-37°C'dir. Optimum olarak 7.0-7.5 pH'da gelişirler. Minimum su aktivite değeri ( $a_w$ ) aerobik gelişme için 0.83-0.86, anaerobik gelişme için 0.90 olarak belirlenmiştir (Çakır, 2007).

*S. aureus* bakterisi % 10'a kadar olan NaCl konsantrasyonlarında iyi gelişirken, % 15 NaCl konsantrasyonlarında gelişimi zayıftır. Glukoz, laktoz, maltoz ve mannitolden aerobik ve anaerobik koşullarda asit meydana getirirken, diğer karbonhidratların çoğundan aerobik koşullar altında asit meydana getirmektedirler (Tükel ve Doğan, 2000; Wang et al., 2003).

Yapılan çalışmalarda aerobik ve anaerobik şartlarda seçici olmayan kanlı agar, nütrient agar, tryptic soy agar, brain heart infusion agarda üredikleri ve çoğunun koyun, at, insandan elde edilen kanlı besiyerinde 24-36 saat içinde hemolizin ürettiği ve hemolize sebep olduğu belirtilmiştir. Ayrıca stafilokokların jelatin proteinini erittiği ve nitratları nitrit ve amonyağa indirgediği, fermantatif ve proteolitik özelliklerinin olduğu rapor edilmiştir. Stafilokok zehirlenmelerine bizzat bakterinin değil, ortama salgıladıkları enterotoksin adı verilen maddelerin sebep olduğu bilinmektedir (Vural ve ztan, 1993; Gülbandılar, 2006).

### 2.1.3. Virulans faktörleri ve patojenite

*S. aureus* bakterisi 30'dan fazla antijenik özelliğe sahiptir. Bunlardan en önemlisi hücre duvarının kuru ağırlığının % 50'sini oluşturan peptidoglikandır. Bakterinin dışında bulunan polisakkarit yapıdaki mikrokapsül, bakteriyi fagositozdan korurken konak hücrelerine tutunmasını sağlar. Protein A, elastin, kollajen gibi yüzey proteinleri, bakterinin konak hücrede kolonize olmasında en önemli faktördür (Foster, 2004; nal, 2007; Güneş, 2008).

*S. aureus* bakterisi hücre dışına salgılanan birçok ekstrasellüler toksine sahiptir. Sitolitik toksinler, ökaryotik hücre membranının lizisine neden olan ve membran hasarı yapan  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  hemolizindir. *S. aureus* suşlarının büyük çoğunluğu tarafından oluşturulan  $\alpha$  hemolizin, tavşan eritrositlerine karşı yüksek hemoliz aktivitesine sahipken, insan eritrositlerine fazla etki etmemektedir. Hemolitik, lizozom parçalayıcı ve doku hücrelerinde sitolitik etkiye sahiptir. İnsan makrofaj ve trombositlerini hasara uğratan, monositlere etkisizdir.  $\beta$  hemolizin, yağ açısından zengin membranları hasara uğratan sfingomyelinazdır. En fazla koyun eritrositlerine karşı etkiliyken, insan ve tavşan eritrositleri üzerinde etkisi daha azdır.  $\gamma$  hemolizin hücre membranını hasara uğratan 2 komponentli proteindir. Zar hasarında bu proteinler birlikte etki gösterir.  $\delta$  hemolizin, çoğu *S. aureus* suşları tarafından üretilen çok küçük bir peptid toksindir. İnsan, tavşan, koyun ve maymun eritrositlerini eriten bu toksin, eritrosit, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositleri hasara uğratabilmektedir (Kutlu, 2006; nal, 2007; Yarlı, 2005)

Sitotoksinlerin yanı sıra lkosidin, polimorf nüveli lökositler ve makrofajlar üzerine litik etki göstermektedir. Diğer hücreler üzerine etkisi olmayan bu toksin F (fast) ve S (slow) adında iki protein komponentinden oluşur. Her iki komponent de antijen

özelliğinde olup formaldehit ile toksoide dönüştürülmektedir. Lökositin ile muamele edilmiş lökositin hücre zarında potasyum ve diğer katyonlara karşı geçirgenliği artar. Hücre hareketini kaybeder, şişer, granüllü, yuvarlak bir şekil alarak yavaş yavaş parçalanır. Lökositleri harap ettiği ve fagositozu engellediğinden virulansta önemli rol oynar (Kutlu, 2006; Yarı, 2005)

İntoksikasyona sebep olan stafilokokal enterotoksinler (SE), pirojenik olarak da bilinen, immün sistem hücrelerine etkili, molekül ağırlığı 26 900-29 600 Dalton arasında değişen, yapısında fazla miktarda lizin, tirozin, aspartik asit ve glutamik asit bulunduran tek zincirli proteinlerdir (Holeckova et al., 2002; Çakır, 2007). SE'nin antijenik özellikleri dikkate alındığında yaygın olarak görülen 7 farklı serolojik tipi bulunur. Bunlar; A (SEA); B (SEB); C1 (SEC1); C2 (SEC2); C3 (SEC3); D (SED) ve E (SEE) olarak isimlendirilmektedir (Küçükçetin ve Milci, 2007). Ancak nadir olmakla birlikte *S. aureus* bakterisinin G, H, I, J ve K tipi toksin ürettiği de belirlenmiştir (Holeckova et al., 2002). Bu toksinler içinde en toksik olanın enterotoksin A, ısıya en dayanıklı olanının ise enterotoksin B olduğu bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda enterotoksin A'nın çoğunlukla insan kaynaklı suşlar tarafından üretildiği ayrıca gıda zehirlenmelerine daha çok enterotoksin A ve D' nin sebep olduğu belirtilmiştir (Fueyo et al., 2001; Chen et al., 2001; Normanno et al., 2005; Pinto et al., 2005; Villard et al., 2005). İntoksikasyonun şiddeti alınan toksin miktarına bağlıdır. Evenson vd., (1988) yılında gıda intoksikasyonu için 100-200 ng enterotoksin A tüketiminin yeterli olduğunu belirtirken, Raj and Bergdoll, (1969) yaptıkları çalışmada enterotoksin B için bu miktarın 20-25 µg olduğunu ortaya koymuşlardır.

*S. aureus* tarafından üretilen toksinler ısıya ve proteaz, tripsin, kimotripsin, papain ve rennine karşı dirençli ekzotoksinlerdir. Enterotoksinlerin sebep olduğu gıda zehirlenmelerinin ilk semptomları 2-6 saat içerisinde ortaya çıkmaktadır. Bunlar; mide bulantısı, karın ağrısı, ishal, baş ağrısı, terleme, üşüme, kramplar, düşük nabız ve halsizliktir (Atanassova et al., 2001, Wang et al., 2003). Hasta 1-2 günde normale dönmektedir. Genellikle tam iyileşme görülür. Enterotoksinlerin inaktivasyonu için gerekli sıcaklık derecesi 100°C'de 1-3 saat veya 120°C'de 10-40 dakika olarak verilmektedir (Hacıbektaşoğlu vd., 1993; Tükel ve Doğan, 1999; Tükel ve Doğan, 2000; Gülbandılar, 2006). Görülen vakalardaki ölüm oranı düşüktür (Çakır, 2007).

Eksfoliyatif toksin, stafilokok enfeksiyonlarının veziküler ve eksfoliyatif deri lezyonlarından sorumludur. Eksfoliyatif toksin A ve eksfoliyatif toksin B olmak üzere iki türü vardır (Kutlu, 2006; Yarlı, 2005).

Toksik şok sendromu toksini, *S. aureus* bakterisinde sitokinlerin salgılanmasına neden olan T lenfosit alt gruplarını aktive ederek ateş, deri lezyonları, multi organ yetmezliği gibi sistematik belirtilere ve ölümlere yol açmaktadır (Kutlu, 2006; Yarlı, 2005).

*S. aureus* bakterisinin sahip olduğu çeşitli enzimler:

*S. aureus* bakterisi katalaz enzimi ile hidrojen peroksidi ( $H_2O_2$ ) su ( $H_2O$ ) ve oksijene ( $O_2$ ) dönüştürür. Bu enzim sayesinde bakteriler, fagositlerin içinde toksik oksijen radikalleri ile öldürülmeye karşı direnç kazanırlar (Kutlu, 2006; Güneş, 2008; Yarlı, 2005).

Koagülaz enzimi *S. aureus* için standart belirleyici olup tanımlamada kullanılan geleneksel bir göstergedir. Bu enzim fibrinojen ile doğrudan reaksiyona girmez ancak plazmanın bir faktörü olan "Coagulase-reacting" faktör ile birleşerek aktif duruma geçer ve plazmayı pıhtılaştırır. Bakterinin üzerinde oluşan kalın fibrin tabakası, bakteriyi fagositoza karşı korumaktadır (Kutlu, 2006; Güneş, 2008; Yarlı, 2005).

Lipaz enzimi *S. aureus* suşlarının tümü tarafından üretilmektedir. Yağları hidrolize eden bu enzim ile bakteri vücudun yağ içeren bölgelerinde yaşayabilmekte, ayrıca yüzeysel dokulara yayılarak enfeksiyona neden olmaktadır (Kutlu, 2006; Yarlı, 2005).

*S. aureus* suşlarının % 90'ı tarafından üretilen hiyalüronidaz enzimi bağ dokunun esas yapısını oluşturan hiyalüronik asidi hidrolize ederek, enfeksiyonun doku içine yayılmasını kolaylaştırır (Kutlu, 2006; Güneş, 2008; Yarlı, 2005).

Koagülaz pozitif *S. aureus* suşlarının % 99'undan fazlası tarafından üretilen ısıya dirençli deoksiribonükleaz (DNaz) enzimi, endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahip, nükleik asitleri 3'-fosfomononükleotidlere parçalayan fosfodiesterazdır (Kutlu, 2006; Güneş, 2008).

#### 2.1.4. Stafilokokal zehirlenmeler

Stafilokokal gıda zehirlenmeleri başta *S. aureus* olmak üzere enterotoksijenik stafilokoklar tarafından gıdalarda oluşturulan enterotoksinlerin alınması sonucu şekillenen ve tüm dünyada yaygın olarak görülen en önemli intoksikasyonlardan biridir (Erol ve İşeri, 2004). Başka bir deyişle bu tip zehirlenmeler, *S. aureus* tarafından sentezlenen ve sindirim sistemi üzerine etkili olan enterotoksinlerin gıdalarla birlikte vücuda alınması sonucu ortaya çıkan gıda kaynaklı hastalıklardandır (Meyrand et al., 1998).

Stafilokoklar ortam şartlarına karşı oldukça dayanıklı mikroorganizmalar olup, doğada çok yaygın olarak bulunurlar (Hacıbektaşoğlu vd., 1993). İnsan ve hayvanların doğal florasında bulunan bu bakteri, burunda, deride ve lezyonlar üzerinde, insan ve hayvan dışkılarında yoğun olarak bulunurlar (Küçükçetin ve Milci, 2008; Sandel and Mckillip, 2004).

*S. aureus* bakterisinin gıdaya bulaşmasındaki en muhtemel yollardan biri, bu mikroorganizma ile kontamine olmuş personelin gıdaya el ile temasıdır. El ile bulaşan stafilokoklar derinin alt tabakalarına geçerek gözeneklerde ve kıl köklerinde çoğalmaktadır. Yine taşıyıcılarla çevreye yayılan nazal stafilokoklar uygun şartlar altında gıdalar üzerinde çoğalıp toksin üretebilmektedir. Ürettikleri toksinler gıda yoluyla vücuda girerek intoksikasyon oluşturmaktadır (Gülbandılar, 2006). Bu gibi kişilerin, gıdaların hazırlanması, depolanması veya dağıtılmasında çalışması uygun değildir. (Tondo et al., 2000; Gündoğan vd., 2005; Gülbandılar, 2006 ).

*S. aureus* başta ısıtma işlem olmak üzere mikroorganizmaların inhibisyonuna yönelik tüm uygulamalara karşı yüksek bir duyarlılık gösterir. Dolayısıyla gıdalarda ve personel ekipmanlarında bu bakteriye veya enterotoksinlerine rastlanması zayıf bir sanitasyon göstergesidir (Tükel ve Doğan, 2000). Başka bir deyişle; gıdalarda, gıda işletmelerinde ve kurumlara ait büyük mutfaklarda bu bakteriye rastlanmaması hijyen göstergesi olarak kabul edilir (Çakır, 2007).

*S. aureus* bakterisinin neden olduğu gıda zehirlenmeleri genellikle toplu olarak yemek yenilen yerlerde ve endüstriyel yolla işlem görmüş değişik gıda maddelerinin tüketilmesi sonucu meydana gelmektedir. Özellikle; et ve et ürünleri,

kümes hayvanları ve ürünleri riskli gıdalar içinde ilk sırada yer almaktadır. Bunun yanı sıra insan kaynaklı bir bakteri olduğu için özellikle hazırlanması sırasında el ile temas edilen ve tüketiminden çok önce hazırlanarak oda sıcaklığında bekletilen salatalar (yumurta, ton balığı, balık, patates ve makarna salataları gibi), fırın ürünleri (kremalı pastalar, tartlar gibi), sandviçler gibi günlük ürünler riskli gıdalardır (Duman, 2007).

Süt ve süt ürünleri birçok patojen için olduğu gibi *S. aureus* gelişimi için de oldukça uygun bir ortamdır. Çiğ sütte doğal olarak bulunan bu bakteri, yetersiz ısıl işlem uygulaması veya ekipman ve personel kaynaklı kontaminasyon nedeni ile pastörize süt ve süt ürünlerinde de bulunabilmektedir. Özellikle ısıl işlem sonrası gerçekleşen kontaminasyonla rekabetçi floranın imha edilmiş olması nedeniyle *S. aureus* suşlarının gelişimi ve toksin oluşturmaları daha hızlı olmaktadır (Konaç, 2006).

*S. aureus* süte sağıldığı hayvandan bulaşabilmektedir. Özellikle mastitisli hayvandan sağılan süt, enteropatojenik *S. aureus* suşlarının önemli bir kaynağıdır. Çiftlikte, sağım ekipmanlarından enfekte olmuş hayvandan sağlıklı hayvana kontaminasyon riski çok yüksektir. *S. aureus*'un neden olduğu gıda zehirlenmelerinin süt ürünlerinden çoğunlukla peynir ve süt tozu gibi ürünlerden kaynaklandığı bilinmektedir (Konaç, 2006).

Peynir yapımı sırasında *S. aureus*'un gelişerek toksin ürettiği yapılan çalışmalar sırasında ortaya koyulmuştur. Özellikle peynire ilave edilen starter kültürün yavaş çalışması sonucu ortam asitliğinin düşük olması ( $\leq$  % 0.4), *S. aureus* gelişimine olanak sağlamaktadır. Pıhtı süzülmesi sırasında mikrobiyel gelişim sürmekte ve toksin oluşturabilecek sayılara ( $\sim 10^7$  kob/g) ulaşabilmektedir. Peynirde stafilokokal zehirlenmenin engellenmesi için; yeterli ısıl işlem uygulanmalı, normal starter aktivitesi sağlanmalı ve iyi bir sanitasyon programı uygulanmalıdır.

Süt ve süt ürünlerinde *S. aureus* varlığı konusunda birçok çalışma yapılmıştır. İnek sütünden çiğ olarak, pastörize edilerek ve pastörizasyon sonrası starter kültür ilave edilerek yapılan salamura beyaz peynirlerde mikroorganizma sayımı yapılmıştır. 15 günün sonunda *S. aureus* miktarı, çiğ süttten yapılan örneklerde 5.90 log kob/g,

pastörize sütte yapılan örneklerde 5.39 log kob/g, starter ilave edilmiş örneklerde ise 4.54 log kob/g olarak bulunmuştur.

Mastitisli sütle yapılan Cheddar peynirinde *S. aureus* bakterisinin 98-154 gün canlılığını sürdürdüğü, İsveç tipi peynirde bu sürenin 210 günü geçtiği yapılan çalışmada saptanmıştır (Konaç, 2006).

*S. aureus* bakterisinin gıdalarda düşük miktarlarda bulunması veya hiç bulunmaması o gıdanın stafilokokal gıda zehirlenmelerine neden olmayacağına dair güvence vermemektedir. Çünkü *S. aureus* gıdalara uygulanan ısı ileme ortadan kaldırılsa bile oluşturdukları toksinler ısıya dirençli olduklarından tahrip edilememektedir. Koyun sütünden yapılan peynirler üzerinde yapılan bir çalışmada canlı patojen bakterilerin varlığına rastlanmazken, peynir örneklerinde *S. aureus* tarafından oluşturulan SEA saptanmıştır (Bone et al., 1989).

Gıdalarda *S. aureus* gelişimi ve toksin oluşturması birçok faktöre bağlıdır. Bunlar; *S. aureus* suşu, su aktivitesi, pH, ortam sıcaklığı, tuz miktarı, nem, gıdanın özelliği (içerik, çığ, fermente) ve rekabetçi floradır (Villard et al., 2005; Gülbandılar, 2006). *S. aureus*'un toksin oluşturabilmesi için canlı bakteri sayısının  $10^6$  - $10^7$  kob/mL seviyelerinde olması gerektiği bildirilmiştir (Sağun vd., 2003)

*S. aureus*'un kontamine gıdada 1.0 µg'dan daha az oluşturduğu toksin miktarı, stafilokokal intoksikasyon semptomlarının görülmesine neden olur. Zehirlenmeye neden olan toksin miktarı tartışma konusu olup, toksin tipi minimal doz üzerinde etkilidir. Bu toksin düzeyine, *S. aureus* sayısı 100.000 kob/g-mL'den fazla olduğunda ulaşılır. Bir diğer deyiş ile *S. aureus* sayısı  $5 \times 10^5$  kob/g-mL olan gıdalar kesinlikle risklidir. Bu nedenle gıdadaki düşük *S. aureus* sayısı gıdanın kesinlikle güvenli olduğunu göstermez (Tükel ve Doğan, 2000). Türk Gıda Kodeksi (02.09.2001-24511 sayılı Resmi Gazete) mikrobiyolojik kriterlere göre süt ve süt ürünlerinde bulunabilecek en fazla *S. aureus* sayısı  $10^2$  kob/g olarak belirlenmiştir (Çakır, 2007). Avrupa yönetmeliği ise  $10^5$  kob/g konsantrasyonundan daha fazla *S. aureus* içeren süt ürünlerinde enterotoksin testinin zorunluluğunu şart koşturmaktadır (Marc et al., 2009).

Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalar, gıda zehirlenme vakalarının yaklaşık 1/3'ünün enterotoksijenik *S. aureus* ile kontamine olmuş gıdalardan kaynaklandığını ortaya

koymaktadır (Küçükçetin ve Milci, 2008). Gıda kaynaklı hastalıklar içinde stafilokokal zehirlenmelerin, ABD'nde % 45, Macaristan'da % 40 ve Japonya'da % 25-30 oranında olduğu tahmin edilmektedir (Holeckova et al., 2002). İlk stafilokokal gıda zehirlenmesinin, 1884 yılında ABD'nde görüldüğü bildirilmiştir. Cheddar peynirinin tüketiminden sonra çeşitli hastalık vakaları ortaya çıkmış ve analizler sonucunda peynir örneklerinden yüksek düzeyde stafilokok türleri izole edilmiştir. 1914 yılında mastitisli ineklerden sağılan sütün tüketilmesi sonucu, Filipinli çiftçilerde stafilokokal zehirlenme tespit edilmiştir. Şüpheli süt örneğinde önemli miktarda stafilokok belirleyen araştırmacılar, bu sütü kendileri de tüketerek gıda zehirlenmesi belirtilerinin doğruluğunu kanıtlamışlardır (Küçükçetin ve Milci, 2008).

1958 yılında İngiltere'de süt tozunun sebep olduğu zehirlenmede 8 değişik yerleşim bölgesinde 1 190 çocukta intoksikasyon görülmüştür. Finlandiya'da 1965-1974 yılları arasında ortaya çıkan gıda zehirlenmesi vakalarının % 50.6'sının stafilokoklardan ileri geldiği bildirilmiştir (Duman, 2007).

1985 yılında ABD'nde çikolatalı sütte kaynaklanan stafilokokal gıda zehirlenme vakası tespit edilmiş ve incelemeler sonucunda, üretim sırasında kontaminasyona uğrayan çikolatalı sütün, pastörizasyondan önce 4-5 saat uygun olmayan şartlarda depolandığı ortaya çıkmıştır. Pastörizasyon işlemi ile stafilokoklar ortamdaki uzaklaştırılabilmiş, ancak ısı işlem enterotoksinler üzerine herhangi bir etkide bulunamamıştır (Küçükçetin ve Milci, 2008).

Yapılan bir diğer çalışmada, 1993-1998 yılları arasında İspanya'da rapor edilen 5 517 gıda zehirlenmesi vakasının 228'inin stafilokok kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Munoz et al., 2007). 1999 yılının şubat ve mayıs aylarında Brezilya'da görülen gıda zehirlenme vakalarının ilkinde 50 kişi peynir, ikincisinde ise 328 kişi çiğ süt tüketiminden hemen sonra hastaneye kaldırılmıştır. Şüpheli gıdalarda sırasıyla  $2.4 \times 10^3$  kob/g ve  $2.0 \times 10^8$  kob/mL seviyelerinde *S. aureus* bulunduğu ve örneklerin enterotoksin içerdiği tespit edilmiştir. Kontaminasyonun, ilk vakada personelden; ikincisinde ise sütün mastitisli ineklerden elde edilmiş olmasından kaynaklandığı belirlenmiştir (Küçükçetin ve Milci, 2008). Stewart et al., (2000) yaptıkları çalışmada 14 700 kişinin yağsız süt tozu tüketimi sonucu zehirlendiği ve etkenin *S. aureus* tarafından oluşturulan SEA olduğu saptanmıştır (Marc et al., 2009).

### 2.1.5. *S. aureus*' un neden olduğu bazı hastalıklar

*S. aureus* intoksikasyonun yanı sıra, insanlarda ve hayvanlarda birçok enfeksiyona neden olmaktadır. Bunlara örnek olarak;

1. Cilt enfeksiyonları: Cilt bütünlüğünü bozan egzema gibi cilt hastalıklarını içerir.
2. Kemik kas ve eklem enfeksiyonları: Vücudun bir yerindeki enfeksiyonun kemiğe ulaşmasıyla veya açık cilt yarasıyla oluşur.
3. Stafilokokal pnömoni: Solunum yolundan aspirasyonu veya kan yolu ile akciğerlere yerleşme sonucu ortaya çıkar. Akciğerde geniş apseler oluşabileceği gibi, buradan diğer organlara da yayılabilir.
4. Menenjit: Beyin iltihabı
5. Stafilokokal endokardit: kalp kapakları iltihabıdır.
6. Stafilokokal bakteriyemi: Titremeye yükselen ateş, eklem ağrıları, bilinç durumunda değişiklikler görülür.
7. Üriner sistem enfeksiyonu
8. Sepsis: Kana geçen enfeksiyonun tüm organlara yayılmasıdır (Tükel ve Doğan, 2000; Gülbandılar, 2006).

### 2.2. Laktik asit bakterileri

Mikrobiyoloji bilim dalının doğuşu ile birlikte, gıda endüstrisinde ekonomik öneme sahip olarak bilinen laktik asit bakterileri (LAB) ile ilgili çalışmalar da başlamıştır. İlk kez 19. yüzyıl sonlarında süt ve süt ürünlerinde fermantasyona yol açan bakteriler, laktik asit bakterileri olarak isimlendirilmiş ve daha sonraki yıllarda Lactobacillaceae familyası içinde sınıflandırılmışlardır (Stiles and Holzapfel, 1997).

Gram pozitif basil ve koklardan oluşan laktik asit bakterileri, Firmicutes filumuna ait çeşitli bakteri cinslerinden oluşmaktadır. Fakültatif anaerob, katalaz negatif, spor oluşturmeyen, hareketsiz olan bu grubun önemli cinsleri arasında *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weisella* yer almaktadır (Klein et al., 1998).

Laktik asit bakterileri grubunda; karbonhidrat metabolizması sonucunda şekeri parçalayıp son ürün olarak laktik asit oluşturan başlıca genuslar arasında *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* ve *Enterococcus* yer almaktadır (Klein et al., 1998)

Laktik asit bakterileri, genellikle mezofilik oldukları halde 5°C ve 45°C sıcaklıklarda gelişebilmektedirler. Suşların büyük bir kısmı pH 4.0 – 4.5’de gelişme gösterirken, pH 9.6 ve pH 3.2’de aktif olanlar da vardır. Bu bakteriler genellikle zayıf proteolitik ve lipolitik aktiviteye sahip olup, gelişmeleri için hazır amino asitlere, purin ve pirimidin bazlarına ve B vitaminlerine ihtiyaç duyarlar (Caplice and Fitzgerald, 1999).

Genel olarak laktik asit bakterileri, su ve toprakta hemen hemen hiç bulunmazken, süt ve süt ürünlerinde, fermente gıdalarda, bitkiler ve bitki artıklarında, insan ve hayvan barsak mukozalarında bulunurlar. (Apan vd., 2011)

Laktik asit bakterileri heksozları metabolize etme mekanizmalarına göre 2 gruba ayrılırlar. Bunlar;

- Homofermantatif laktik asit bakterileri: Bu bakteriler Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) yolu ile glukoz fermentasyonu sonucunda büyük oranda veya saf olarak laktik asit üretirler. Bu gruba örnek olarak *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* verilebilir.
- Heterofermantatif laktik asit bakterileri: Bu bakteriler Heksozmonofosfat (HMP) yolu ile glukoz katabolizması sonucunda laktik asitin yanı sıra etanol, asetik asit ve CO<sub>2</sub> üretmektedirler. Bu gruba *Leuconostoc* cinsi örnek olarak verilebilir (Bulut, 2003).

### **2.2.1. Laktik asit bakterilerinin gıdalardaki önemi**

Gıdaların fermantasyon ile daha dayanıklı ürünlere dönüştürülerek muhafazası çok eski bir teknolojidir. Laktik asit bakterileri metabolik karakterleri nedeniyle çeşitli fermente gıdaların üretilmesinde uzun yıllardır kullanılmaktadır. Süt ürünleri olarak çeşitli peynirler ve tereyağı, yaygın olarak tüketilen et ürünleri ve sebzelerden üretilen turşular bu gıdalara örnek olarak verilebilir.

### 2.2.1.1. Starter kültür

Starter kültür; fermente ürün oluşturmak amacıyla çığ gıdaya eklenen, fermantasyonu başlatıcı etki gösteren ve en az bir mikroorganizmaya ait çok sayıda hücreden oluşan mikrobiyel preparattır. Laktik asit bakterileri bu işlemde temel rolü üstlenir. Organik asit, özellikle laktik asit, oluşturarak çığ üründe hızlı asitlenmeye neden olur. Bunun yanı sıra çeşitli aroma bileşenlerini de üreterek fermente ürünlerde organoleptik özellikler denilen tat, koku, güzel görünüm gibi özelliklerin oluşumunu sağlamaktadır.

Fermente gıdalar, ilk zamanlarda çığ gıdanın doğal olarak barındırdığı mikrofloraya bağlı olarak gerçekleşen gelişigüzel fermantasyon ile ortaya çıkmıştır. Doğal olarak ürünün kalitesi mikrobiyel yüke ve dağılıma göre değişmekteydi. Fermantasyon işlemi, bir önceki başarılı fermantasyon ürününden az bir miktar alınıp, çığ ürüne katılmasıyla gerçekleştirilmekteydi. Bu işlemle, seçici starter kültür kullanımının fermantasyon işlemini hızlandıracağı ve fermantasyon hatalarının oluşum riskini azaltacağı fikrine ışık tutulmuştur. Seçilmiş starter kültürlerin çığ gıdaya katılması fermente gıdaların üretiminde kırılma noktası olurken, fermantasyon işleminin kontrollü yürütülebilmesine ve son ürünlerin standardizasyonuna olanak sağlamıştır (Leroy and de Vuyst, 2004).

Starter kültürleri iki başlık altında incelemek mümkündür:

a) Mezofilik Starter Kültürler: Bu bakterilerin optimum gelişme sıcaklığı 30°C'dir. Mezofilik starter kültürler, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* cinsi bakterilerden oluşmaktadır. *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* laktik asit üretirken, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* ve *Leuconostoc* spp. sitrik asit fermantasyonu yapmaktadır. Sonuçta, aseton/diasetil ve CO<sub>2</sub> oluşmakta ve diasetil süt ürünlerinde tat oluşumu için önem taşımaktadır (Bulut, 2003).

b) Termofilik Starter Kültürler: Bu bakterilerin optimum gelişme sıcaklığı 42°C civarındadır. Termofilik starter kültürler, yüksek ısı işlem uygulanan, peynir benzeri ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. *Lactobacillus* ve *Streptococcus* cinsi bakteriler, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus* bunlara örnek olarak verilebilir. (Bulut, 2003).

### 2.2.1.2. Antimikrobiyel etki

Son yıllarda gıdalarda gelişmesi istenmeyen mikroorganizmalara karşı “doğal koruyucu” kullanma eğiliminin giderek arttığı gözlenmektedir. Antibakteriyel etkiye sahip olduğu bilinen bazı mikroorganizmalar ya da bunların ürettikleri metabolik ürünler “doğal koruyucu” maddeler olarak kabul edilmekte ve gıdaların doğal yolla korunmasını sağlayabilmektedir. Bu mikroorganizmalar arasında sütte bulunan *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinsi bakteriler önemli bir yer tutmaktadır.

Laktik asit bakterileri, bozulma etmeni ve patojenik mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyel etki gösterirler. Fermente gıdalarda starter kültür olarak kullanılabildikleri gibi, antimikrobiyel özelliğe sahip metabolitler üretmeleri nedeniyle koruyucu kültür olarak da kullanılabirler. (Seçkin vd., 2010).

Laktik asit bakterileri; organik asit, hidrojen peroksit, karbon dioksit, diasetil, reuterin gibi geniş spektrumlu antimikrobiyel maddeler ile çeşitli bakteriyosinleri üreterek gıdaların biyokoruma yolu ile muhafazasında kullanılmaktadır (Sullivan et al., 2002).

Laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan laktik asit, asetik asit ve propiyonik asit gibi organik asitler, antagonistik özellikleri nedeniyle bakterilerin sitoplazma zar geçirgenliğini değiştirerek ve aktif taşımayı engelleyerek gelişimlerini inhibe etmektedir (Eklund, 1989).

Oksijen varlığında biriken ve katalaz negatif laktik asit bakterileri tarafından parçalanamayan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, membran yağları ve hücre proteinleri üzerindeki güçlü okside edici özelliği ile patojen bakterilerin inhibisyonuna neden olmaktadır (Caplice and Fitzgerald, 1999).

Laktik asit bakterileri metabolitleri arasında yer alan karbondioksitin anaerobik bir ortam oluşturması, hücre içi ve dışı pH değerini ve hücre zarının elektriksel potansiyelini düşürmesi sonucu antimikrobiyel etki sağlamaktadır (Caplice and Fitzgerald, 1999).

### 2.3. Bakteriyosinler

Bakteriyosinler bakterilerin protein veya peptid yapısındaki, kısa zincirli ve antimikrobiyel özellik gösteren ribozomal sentez ürünleridir. Daha çok Gram pozitif bakteriler üzerine etkili olan bu bileşiklere karşı üretici hücrenin bağışıklığı söz konusudur (Galvez et al., 2007). Süt ve süt ürünleri dahil birçok gıda ve gıda ürünlerinde patojenlerin ve gıdalarda bozulmaya neden olan mikroorganizmaların inhibisyonu için bakteriyosinlerin kullanıldığı rapor edilmiştir (Arques et al., 2011).

Bakteriyosinler ilk kez 1928 yılında İngiltere’de Rogers ve Whittier tarafından bazı laktokal suşların diğer laktik asit bakterileri üzerine inhibisyon etkisi olduğunu fark etmesiyle keşfedilmiştir. Kısa bir süre sonra 1933 yılında Yeni Zelanda’daki araştırmacılar benzer etkiyi peynirdeki starter kültürlerde gözlemlemiş ve izole ettikleri antimikrobiyel maddenin protein yapısında olduğunu tespit etmişlerdir. Bunu üreten suşların, N grup laktik streptokoklar olarak tanımlanması ile birlikte 1947 yılında Mattick ve Hirsch, bu inhibitör maddeye N grubunu temsilen ‘nisin’ ismini vermişlerdir. Bakteriosinler ilk kez 1953 yılında İngiltere’de endüstriyel anlamda kullanılmış ve ardından 48 ülkede daha kabul görmüştür. 1969 yılında WHO/FDA tarafından nisin, gıdada kullanılabilen güvenilir bir madde olarak kabul edilmiştir (Ross et al., 2002). Yıllar içinde gıda sektöründe biyokorumanın önemi arttıkça, nisin kullanımı da artış göstermiştir.

Bakteriyosinlerin aynı ya da farklı bakteri grupları tarafından sentezlenen yüzden fazla çeşidi bulunmaktadır. Gıdalarda güvenli olduğu düşünülen laktik asit bakterileri, özellikle de *Lactobacillus* ve *Lactococcus*, tarafından sentezlenen bakteriyosinler üzerinde önemle durulmaktadır (Chen and Hoover, 2003).

Laktik asit bakterilerinin sentezlediği bakteriyosinler birbirinden farklı özellikte olup, etki spektrumları, biyokimyasal özellikleri farklılık göstermektedir. Genellikle düşük molekül ağırlığına (3-10 kDa) sahip olup, hidrofilik ve hidrofobik kısımları bulunmaktadır. pH aralıkları geniş, izoelektrik noktaları yüksektir (de Martinis et al., 2002).

Gıdaların muhafazasında kullanılan bakteriyosinlerin çeşitli özellikleri mevcuttur:

- Bakteriyosinler GRAS maddelerdir.
- Toksik özellikte değildirler ve sağlık üzerine herhangi bir risk oluşturmazlar.
- pH ve ısıya karşı duyarlılıkları yüksektir.
- Gıda patojenleri ve gıdalarda bozulmaya neden olan saprofit mikroorganizmalara karşı geniş spektrumlu antimikrobiyel etki gösterirler.
- Üretici hücreler genetik olarak, kendi üretmiş oldukları bakteriyosinlere karşı bağışıklık kazanmıştır.
- Gıdaların güvenilirliği, kalitesi ve tadı üzerine yararlı etkileri vardır (Sullivan et al., 2002).

Bakteriyosinler için farklı sınıflandırmalar yapılmakla birlikte, daha çok Klaenhammer'in özellikle Gram pozitif bakterileri dikkate alarak yaptığı sınıflandırma kullanılmaktadır. Biyokimyasal özellikleri dikkate alınarak yapılan sınıflandırmada, bakteriyosinler molekül büyüklüğü, kimyasal yapıları, etki mekanizmaları ve ısı stabilitelerine göre genel olarak 4 sınıfa ayrılmışlardır. Bunlar; grup I bakteriyosinler (grup IA ve IB diye ikiye ayrılmaktadır), grup II bakteriyosinler (grup IIA, IIB ve IIC diye üçe ayrılmaktadır), grup III bakteriyosinler ve grup IV bakteriyosinlerdir. Biyokimyasal tanımlanması bakımından daha çok ilk 3 sınıf dikkate alınmaktadır (Chen and Hoover, 2003).

### **2.3.1. Bakteriyosinlerin Etki Mekanizması**

Bakteriyosinler duyarlı mikroorganizmalar üzerinde farklı etki mekanizmalarına sahiptirler. Hücrenin sitoplazmik zarına bağlanarak hücre içerisine girip, zarı zarda gözenek oluştururlar. Böylece düşük molekül ağırlığına sahip hücre bileşenlerinin hücre dışına sızmasına yol açarlar. Bununla birlikte iyonların, özellikle de ATP kaybı ve hücre içi pH dengesinin korunmasında etkili olan  $K^+$  iyonunun hücre dışına sızması, hücrede enerji tüketimine neden olmaktadır (Twomey et al., 2002). Hücrede meydana gelen bu değişimler, DNA ve RNA gibi hücre için hayati önemi olan makromoleküllerin degradasyonuna, bu moleküllerle birlikte protein ve peptidoglikan gibi biyolojik proseslerin inhibisyonuna yol açmaktadır (Hécharde and Sahl, 2002; de Martinis et al., 2002).

Laktik asit bakteriyosinleri pozitif yüklü moleküller olup, stoplazmik zar üzerinde etkili olmalarında sahip oldukları hidrofobik kısımlar önemli rol oynamaktadır. Duyarlı hücre zarında bulunan negatif yüklü fosfat gruplarının etkisiyle ortaya çıkan elektrostatik etkileşim sonucu bakteriyosin hücre zarına tutunmaktadır. Böylece hidrofobik kısım zar yapısının içine girerek gözenek oluşumuna yol açmaktadır (Nes and Holo, 2000).

### **2.3.2. Gıdalarda bakteriyosinlerin kullanımı**

Son yıllarda gıdalarda gelişmesi istenmeyen mikroorganizmalara karşı “doğal koruyucu” kullanma eğiliminin giderek arttığı gözlenmektedir (Seçkin vd., 2010). Gıdalarda patojen mikroorganizma gelişiminin engellenmesi için kimyasal koruyucular yerine bakteriyosinlerin biyoprezervatif olarak kullanımı gün geçtikçe önemli hale gelmektedir. Bakteriyosinlerin gıdalarda antimikrobiyel aktivitelerinin yanı sıra, doğal olmaları, renksiz, tatsız ve kokusuz olmaları ürün özellikleri açısından oldukça önemlidir.

Bakteriyosinler, doğrudan gıda maddesine eklenebildikleri gibi bakteriyosin üreten kültürlerin gıdaya ekimi ile uygun koşullar altında bakteriyosin üretimi sağlanabilmektedir (Galvez et al., 2007). Bunların yanı sıra kısmen saflaştırılmış bakteriyosin veya konsantre bakteri kültürünün taşıyıcıya bağlanarak immobil halde gıdaya eklenmesi de söz konusudur. (Yang et al., 1992)

### **2.4. Probiyotikler**

Probiyotik kelimesi Yunanca’ da “yaşam için” anlamına gelmektedir. İlk kez 1965 yılında Lily ve Stillwell tarafından, bir protozoa tarafından sentezlenen ve bir diğer protozoanın gelişimini teşvik eden bir maddeyi tanımlamak için kullanılmıştır (Gomes and Malcata, 1999). Probiyotik teriminin anlamı, 1970’li yılların başlarında genişletilerek mikrobiyel gelişmeyi destekleyen doku ekstraktları için de kullanılmaya başlamıştır. 1974 yılında Parker probiyotik kelimesinin tanımını; barsak sisteminin mikrobiyel dengesine katkıda bulunan madde ve organizmalar olarak, bugünkü kullanımına en yakın anlamda geliştirmiştir (Çakır, 2003). Bugün kullanılan tanım ise Fuller, (1989) tarafından geliştirilmiş olup probiyotik terimi, barsak sisteminin mikrobiyel dengesini geliştirerek konakçı hayvanın sağlığı

üzerinde yararlı etkileri olan canlı mikrobiyel yem destekleyicisi anlamında kullanılmıştır.

Fermente gıdaların metabolizma üzerindeki yararlı etkileri ilk kez Nobel Ödülü sahibi, Rus bilim adamı Elie Metchnikoff (1845-1916) tarafından öne sürülmüştür. Bulgar köylülerinin fermente süt ürünleri tüketimi sonucu daha sağlıklı ve uzun ömürlü olduklarını savunan Metchnikoff, bunun nedeninin bu ürünlerde bulunan çubuk şeklindeki bakterilerin (*Lactobacillus* spp.) bağırsaktaki mikroflorayı olumlu yönde etkilemesi ve toksik mikrobiyel etkiyi azaltması olduğunu belirtmiştir. Fermente gıdalarla sağlıklı yaşam arasındaki bu bağlantı bugün de geçerliliğini korumaktadır. Fermente ürünler üzerine yapılan araştırmaların başlangıcı çok eskilere dayanmakla birlikte, probiyotikler konusunda yapılan çalışmalar ancak son 20 yılda hız kazanmıştır (Çakır, 2003).

Probiyotik mikroorganizmalar arasında en yaygın olanları laktik asit bakterileridir. Bunlara; *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. brevis*, *P. acidilactici* ve *P. pentosaceus* örnek olarak verilebilmektedir.

Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların temel özellikleri, pankreatik enzimlere, asit ve safra tuzlarına karşı dirençli olmaları, barsak mukozasına tutunabilmeleri, insan orijinli olmaları, sağlığa yararlı olmalarıdır (Salminen et al., 1998).

#### **2.4.1. Probiyotiklerin muhtemel etki mekanizmaları**

1. İnhibe edici maddeler üreterek: Probiyotikler, Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizmalar üzerinde etkili birçok madde üretmektedir. Bunlardan bazıları organik asitler, hidrojen peroksit, bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddelerdir.
2. Tutunma bölgelerini bloke ederek: Probiyotikler tutunma bölgeleri için patojenlerle rekabete girerek, barsak sisteminde yerleşmelerini engellemektedirler.
3. Besin maddeleri için rekabet ederek: Probiyotikler patojenler için de gerekli olan besin maddelerini tüketerek, onların sistemde uzun süre kalmasını engellemektedirler.
4. Toksin reseptörlerinin yıkımını sağlayarak
5. Bağışıklık sistemini güçlendirerek: Son yıllarda yapılan çalışmalar probiyotiklerin özgün ve özgün olmayan bağışıklık sistemini güçlendirerek barsak

hastalıklarına karşı konakçıyı koruduğunu ortaya koymuştur (Çakır, 2003; Salminen et al., 1998).

#### **2.4.2. Probiyotiklerin sağlık üzerine olumlu etkileri**

1. Patojenlere karşı antimikrobiyel etki
2. Antikanserojenik ve antimutajenik etki
3. Kalp hastalıkları riskini azaltıcı etki
4. Laktoz intoleransını hafifletici etki
5. Serum kolesterolünü düşürücü etki
6. Hipertansiyonu önleyici etki
7. Bağışıklık sistemini güçlendirici etki
8. Sindirim sistemi enfeksiyonlarını önleyici etki
9. Sindirimi düzenleyici etki
10. Ürogenital enfeksiyon riskini azaltıcı etki
11. Midede bulunarak ülsera sebep olabilen ve rotavirüs üreten patojen bir bakteri olan *Helicobacter pylori*'nin gelişimini engelleyici etki (Klaenhammer and Kulen, 1999; Sağdıç vd., 2004)

#### **2.5. Beyaz Peynir**

Peynir, dayanıklılığı yanında besin değeri ve toplumun gelişen zevk ve isteklerine cevap verebilecek çok sayıda çeşidiyle önemli bir süt ürünüdür. Sütün pıhtılaştırılıp peynir altı suyunun ayrılmasından sonra pıhtının değişik şekillerde işlenmesiyle elde edilen peynir, taze ya da çeşidine özgü tat, aroma ve yapı kazanması için belirli bir olgunlaşma dönemi geçirdikten sonra tüketime sunulmaktadır (Kaynar vd., 2005).

Türkiye geleneksel fermente süt ürünleri bakımından oldukça zengin bir ülke olmakla birlikte, geleneksel peynirler arasında Beyaz peynir ilk sırayı almaktadır (Öner vd., 2006). Devlet Planlama Teşkilatı Dokuzuncu Kalkınma Planı Özel İhtisas Komisyonu Raporu'na göre; 2005 yılında ülkemizin salamura Beyaz peynir üretiminin 265 000 ton olduğu tahmin edilmektedir (Anonim, 2007).

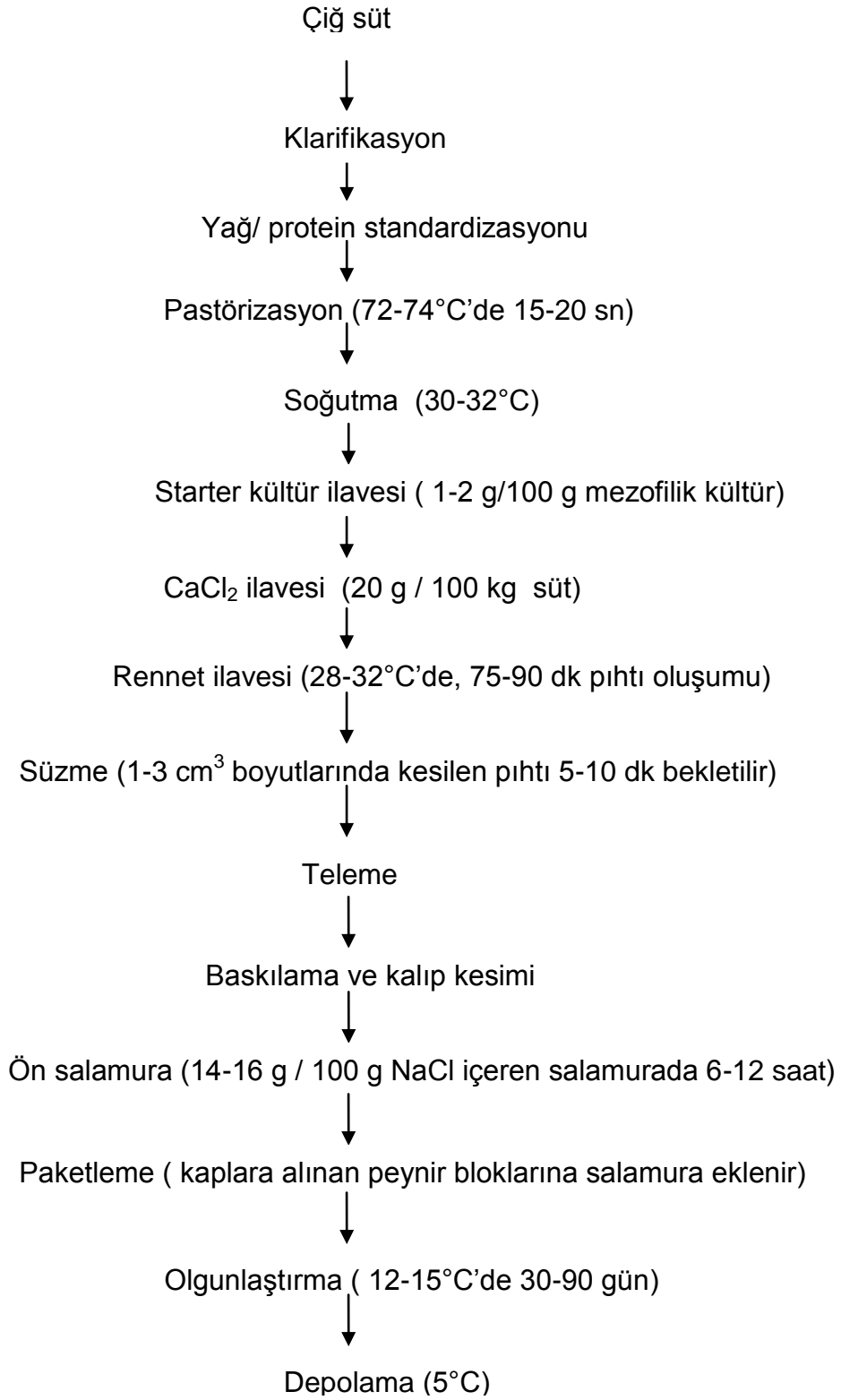
Beyaz peynir, geleneksel olarak koyun veya keçi sütünden üretilse de yılın her döneminde bu sütleri bulmak mümkün olmadığından genel olarak inek sütünden

veya bu sütlerin karışımından üretilmektedir. İlk üretildiğinde yumuşak yapıda, 7x7x7 cm<sup>3</sup> boyutlara sahip 350-500 g ağırlığında olan kp şeklindeki peynirler yaklaşık % 12-14 NaCl (w/w) içeren salamurada 3 ay süreyle bekletilmektedir. Bu olgunlaşma süresince geręekleřen ęeřitli proteoliz ve lipoliz olayları sonucunda peynirin yapısı sertleşmekte, ęeřitli tat ve aroma özellikleri peynire kazandırılmaktadır (Hayaloğlu vd., 2002).

TS 591 No'lu standarda göre kurumadedeki yağ miktarı yüzdesine göre Beyaz peynirler 4 gruba ayrılmaktadır:

- Tam yağlı Beyaz peynir kurumadede en az % 45 yağ
- Yağlı Beyaz peynir kurumadede % 30-44 yağ
- Yarım yağlı Beyaz peynir kurumadede % 20-29 yağ
- Yağsız Beyaz peynir kurumadede % 20 'den az yağ iğermelidir.

### 2.5.1. Beyaz peynir üretim akım şeması



Şekil 2.1. Beyaz peynir üretim akım şeması (Temelli vd., 2006)

## 2.6. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

DNA ilk kez 1869 yılında Friedrich Miescher tarafından Almanya'da bir laboratuarda keşfedilmiştir. Bu hücreSEL yapının daha önce gördüklerinden farklı olduğunu savunan Miescher, ileriki yıllarda bu maddenin çekirdeğe özgü olduğunu anlamış ve ona "nüklein" adını vermiştir. Uzun yıllar süren araştırmalar sonrasında 1953 yılında Watson ve Crick DNA'nın çift sarmal yapısını çalışmalarında ortaya koymuşlardır (Devrim ve Kaya, 2004).

1974 yılında Panet ve Khorana iki primer kullanarak DNA molekülünün belirli bir bölgesinin çoğaltılabileceğini bulmuş ve ilk kez polimeraz zincir reaksiyonunun prensibini ortaya koymuşlardır. Bu yöntem adını, 1985 yılında Kary B. Mullis vermiş, yaptığı çalışma ile 1993 yılında kimya alanında Nobel Ödülü almıştır (Leary et al., 1997).

PZR, hedef DNA dizilerinin primer adı verilen spesifik komplementer oligonükleotidler ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri (*Taq*) kullanılarak *in vitro* olarak çoğaltılmasını sağlayan, oldukça özgün ve güvenilir moleküler biyolojik bir tekniktir. DNA dizilerinin sayısal olarak arttırılması esasına dayanan PZR yöntemi ile genetik materyaller ortamda çok az sayıda hatta birçok ilgisiz DNA arasında olsalar bile saptanabilir düzeye gelmektedir.

PZR yöntemi temel olarak tekrarlanan üç basamak ile karakterize edilmektedir.

1. Denatürasyon: PZR yönteminin bu ilk basamağında çift zincirli DNA molekülünün, 93-95°C'de 30-60 saniye tutularak tek zincirli hale gelmesi amaçlanmaktadır. Yüksek sıcaklık uygulaması ile DNA molekülünün sarmal yapısını bir arada tutan hidrojen bağları kırılmakta ve çift zincirin açılmasıyla "replikasyon çatalı" olarak adlandırılan bir alan oluşmaktadır. PZR süresi boyunca helikaz enzimi bu aralığın açık kalmasını sağlamakta böylece *Taq* DNA polimeraz enzimi ve primerler çalışabilmektedir.

2. Bağlanma (annealing): İkinci basamakta, 45-60°C'de 30-60 saniyelik süre boyunca primerlerin tek zincir haline gelmiş DNA'nın hedef bölgesindeki 3' uçlarına hidrojen bağları ile bağlanması sağlanmaktadır. Bu bağlanmanın ardından artık *Taq* DNA polimeraz enzimi, tamamlayıcı DNA molekülünü sentezleyebilmektedir.

3. Uzama (Elongation): PZR yönteminin son basamağında 70-72°C'de 1-2 dakika boyunca, *Taq* DNA polimeraz enzimi primerleri başlatıcı nokta; tek zincirli DNA'yı ise kalıp olarak kullanarak tamamlayıcı DNA molekülünü sentezlemektedir. *Taq* DNA polimeraz enzimi tamamlayıcı nükleotidlerin 5' uçları ile, primerlerin 3' uçları arasında bağ oluşturduğundan, DNA sentezi 5'-3' yönünde ilerlemektedir. Oluşan DNA, bir sonraki döngüde hedef olarak kullanıldığından, ikinci döngüde DNA sayısı 4'e, üçüncü döngüde ise 8'e ulaşmaktadır. Kısacası, "n" sayıda döngü gerçekleşen bir PZR uygulamasında ortamda "2<sup>n</sup>" sayıda çoğaltılmış DNA olacaktır.

PZR işlemi sonrası, PZR ürünlerinin elektroforez işlemine tabi tutulması gerekmektedir. Agaroz jel elektroforezi ile DNA fragmentleri (negatif yüklü), elektrik alan varlığında, negatif kutuptan pozitif kutba doğru jel boyunca molekül ağırlıklarına göre ayrılmaktadır. Kısa olan fragmentler düşük moleküler ağırlığa sahip olduklarından daha hızlı hareket etmektedirler. Moleküler ağırlık belirteci yardımı ile ayrılan fragmentlerin büyüklükleri belirlenebilmektedir. Elektroforez işleminde, agaroz jeldeki kuyucuklara yüklenen örneğin hareketinin gözlenebilir olması için yükleme öncesi örnek, marker boya ile karıştırılmaktadır. Elektroforez işlemi bittikten sonra, görüntüleme UV ışık altında yapılmaktadır.

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Çiğ süt**

Araştırmada, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Haymana Araştırma-Uygulama iftliği'nden sağlanan inek sütleri kullanılmıştır. Sağımdan hemen sonra süzülerek soğutulan sütler, üretimin yapılacağı Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü uygulama laboratuvarına getirilerek peynir yapımı gerçekleştirilmiştir.

##### **3.1.2. Starter kültür**

Peynir yapımında, CHR. Hansen's (Danimarka) firmasının liyofilize formdaki mezofilik homofermentatif R-707 ticari kodlu starter kültüründen yararlanılmıştır.

##### **3.1.3. Peynir mayası**

Araştırmada, "Peyma-Chr.Hansen's Peynir Mayası San. Ve Tic.A.ř." firmasının ürettiği "Mandra" ticari isimli ve etiketinde 1/16 000 kuvvetinde olduğu belirtilen dana şirdeninden elde edilen sıvı peynir mayası kullanılmıştır.

##### **3.1.4. Kalsiyum klorür**

Üretimde, süte % 40'lık  $CaCl_2$  (Merck) zeltisinden % 0.02 oranında katılmıştır.

##### **3.1.5. Tuz**

Peynirlerin n ve depolama salamuralarında granül formdaki ticari kaya tuzu kullanılmıştır.

##### **3.1.6. Salamura**

Peynirlerin tuzlanmasında, farklı tuz konsantrasyonlarına sahip ve 85°C'de 30 dakika pastörize edilen salamuralar kullanılmıştır.

### **3.1.7. Kùltùrler**

Çalışmada kullanılan *S. aureus* ATCC 6538, *L. brevis* BG 18 ve *P. pentosaceus* BH 105 bakteri kùltùrleri Ankara Ùniversitesi Fen Fakùltesi Biyoloji Bùlümü òğretim üyesi Prof. Dr. Mustafa Akçelik'ten temin edilmiştir.

### **3.1.8. Besiyerleri**

Çalışmada kullanılan TS broth, BP agar, TS agar, MRS broth ve MRS agar, Merck (Almanya) markalı besiyerleridir. Bu besiyerlerinin bileşimi ve hazırlanış şekilleri, EK 1 bùlümünde verilmektedir.

### **3.1.9. Tampon ve çùzeltiler**

Çalışmada kullanılan BFP çùzeltisi, Lambda tamponu, 10 mg/mL lizozim çùzeltisi, 10 mM tris-HCl çùzeltisi (pH: 8.0), 0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA (disodyum etilendiamin tetraasetik asit) çùzeltisi (pH: 8.0) ve tris-borik sit-EDTA (TBE) tamponu (10X)'in bileşimleri ve hazırlanış şekilleri, EK 2 bùlümünde verilmektedir.

### **3.1.10. Boya çùzeltileri**

Araştırmada kullanılan 1 mg/mL etidyum bromùr çùzeltisi ve 6X yùkleme boya çùzeltisinin bileşimleri EK 3 bùlümünde verilmektedir.

### **3.1.11. DNA izolasyonu ve saflaştırılması kiti**

Çalışmada Roche (Almanya) markalı high pure PCR template preparation kiti kullanılmıştır. Bu kitin içeriği EK 4 bùlümünde verilmiştir.

### **3.1.12. DNA izolasyonu ve saflaştırılma işlemi deney dÙzeneđi**

Çalışmada kullanılan Hettich (Almanya) markalı Mikro 200 mikrosantrifùj dÙzeneđi, maksimum 14 000 devir/dakika hızda çalışabilen ve 24 adet standart mikrosantrifùj tÙpünü tutabilen, otoklavlanabilir bir rotor ve bu rotorun otoklavlanabilir kapağını içermektedir.

### **3.1.13. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yùntemi deney dÙzeneđi**

Çalışmada THE-MWG markalı Primus 96 thermocyclers kullanılmıştır.

### **3.1.14. Oligonükleotidler**

Çalışmada kullanılan Metabion international AG primer çiftlerinin hazırlanış şekli EK 5 bölümünde verilmektedir.

### **3.1.15. Agaroz jel elektroforez işlemi deney düzeneği**

Çalışmada Serva markalı BlueMarine 100 ve BlueMarine 200 yatay elektroforez tankları ve bu tanklara uygun ebatlardaki jel tablaları ve tarakları ile birlikte BioRad (İngiltere) markalı PowerPac Basic güç kaynağı kullanılmıştır.

### **3.1.16. Jel görüntüleme işlemi deney düzeneği**

Araştırmada Syngene (İngiltere) markalı InGenius jel görüntüleme ve analiz sistemi kullanılmıştır. Bu düzenek; karanlık oda, yüksek performanslı dijital fotoğraf makinası, UV emisyon filtresi ve filtre kabini ve 302 nm'lik dalga boyunda çalışan UV translüminatörü içermektedir ve çalışma esnasında bilgisayara bağlı olarak kullanılmıştır.

## **3.2. Metot**

Çalışmanın ilk bölümü, saf kültürlerin canlandırılmasını, kültürel sayımı ve beyaz peynir üretimini içermektedir.

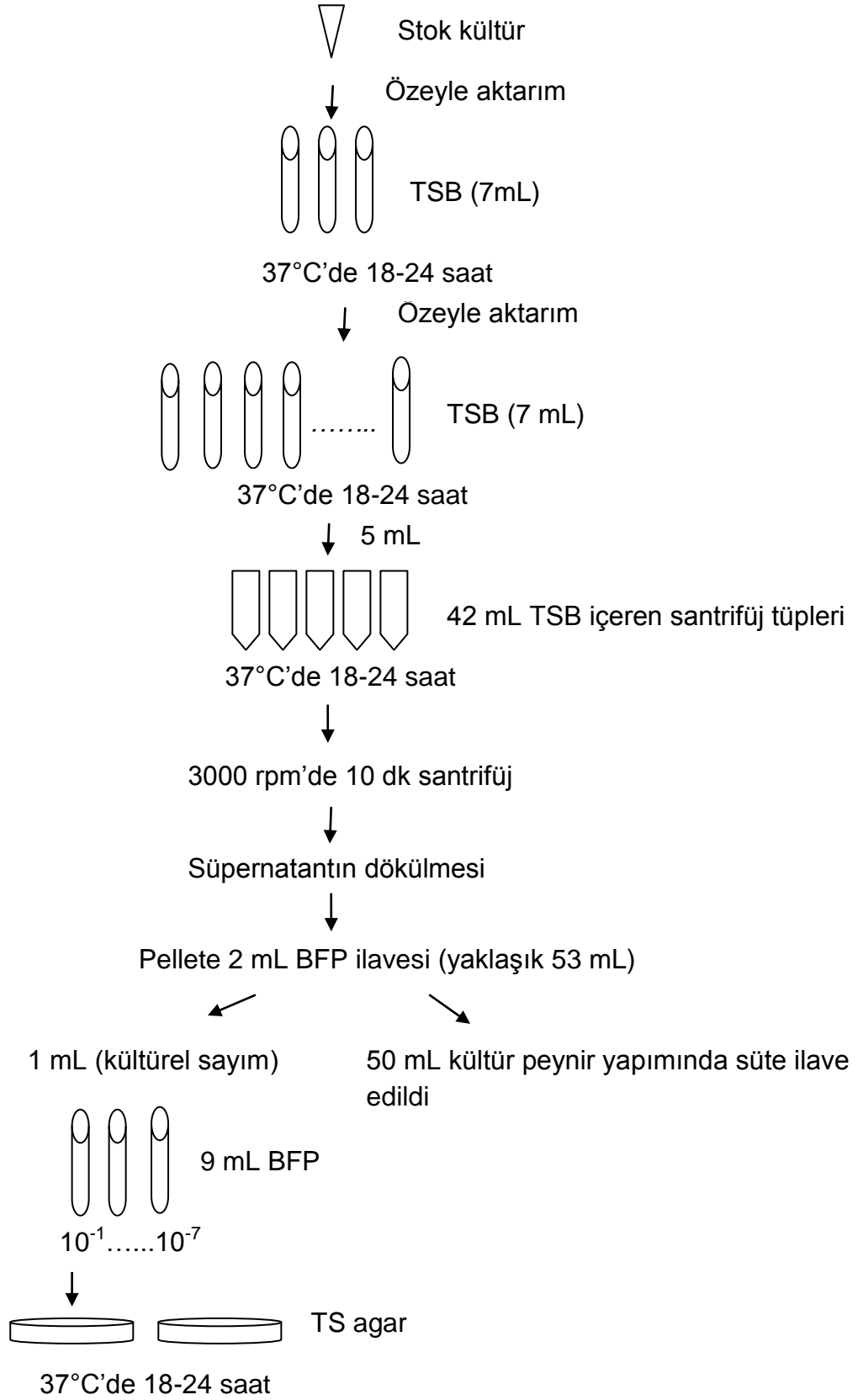
Çalışmanın ikinci bölümü, üretimi gerçekleştirilmiş beyaz peynir örneklerinde 3 ay boyunca *S. aureus* ve laktik asit bakterilerinin sayımını kapsamaktadır.

Çalışmanın üçüncü bölümü ise, doğrulama aşamasını ve elde edilen verilen istatistiksel analizler kullanılarak değerlendirilmesini içermektedir.

### **3.2.1. Saf kültürlerin canlandırılması ve kültürel sayım**

Çalışmanın bu bölümünde *S. aureus* ATCC 6538 stok kültüründen özeyle TS broth besiyerine aktarılmış ve 37°C'de 18-24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen bu ara kültürden yine özeyle 7 mL TSB içeren yaklaşık 30 tüpe ekim yapılmış ve aynı koşullarda inkübasyon sağlanmıştır. Bu kültürlerden 5'er mL alınarak 42 mL TSB içeren 50 mL hacimli 25 santrifüj tüpüne aktarılmıştır. İnkübasyon sonrası santrifüj tüpleri 3000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj

edilmiştir. Bu işlem sonrasında tüplerde oluşan süpernatant dökülmüş, *S. aureus* hücrelerini içeren pellet kısmına 2 mL BFP eklenmiştir. 25 tüpte de aynı işlem gerçekleştirilmiş böylece yaklaşık olarak 53 mL civarında bir *S. aureus* kültürü elde edilmiştir. Bu hacimden 50 mL alınarak peynir yapım aşamasında pastörize edilmiş süte eklenmiştir. Yine aynı kültürden kültürel sayım amaçlı 1 mL alınarak 9 mL BFP içeren tüpe aktarılmış ve dilüsyonlar hazırlanmıştır. Her bir dilüsyondan paralelli bir şekilde TSA besiyerine yüzeye yayma yöntemiyle ekim yapılmış ardından 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Petrilerdeki koloni sayım sonucuyla peynirdeki *S. aureus* sayısı hesaplanmıştır.



Şekil 3.1. *S. aureus* canlandırma ve kültürel sayım

*L. brevis* ve *P. pentosaceus* ile yapılan her iki çalışmada da canlandırma işlemi aynı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla -18°C'de muhafaza edilen stok kültürden öze yardımıyla MRS broth besiyerine aktarılmış ve 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Yağsız süt tozu kullanılarak % 10 kurumadde içeren 300 mL (30 L pastörize süte katılacak şekilde) rekonstitüye süt hazırlanmış ve 120°C'de 2 dakika sterilizasyonun ardından 37°C'de soğumaya bırakılmıştır. Bu süte laktik asit bakteri kültüründen % 1 oranında (3 mL) inoküle edilmiş 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kültürel sayım için 9 mL BFP içeren tüpe 1 mL kültür aktarılıp dilüsyonlar hazırlanmıştır. Her bir dilüsyondan MRS agar dökmeye plak yöntemiyle paralelli ekim yapılmıştır. 37°C'de 18-24 saat inkübasyon sonrasında petrillerdeki koloniler sayılarak sonuç kaydedilmiştir. Geriye kalan kültürün tamamı ise peynir yapımında pastörizasyon sonrası ayrılan kontrol ve örnek grubu peynirlerin üretileceği süte katılmıştır. Örnek grubu peynirlerde laktik asit bakterilerinin *S. aureus* üzerindeki etkisi belirlenmek istendiğinden kontrol grubu peynirler sadece *S. aureus* bakterisini içermektedir.

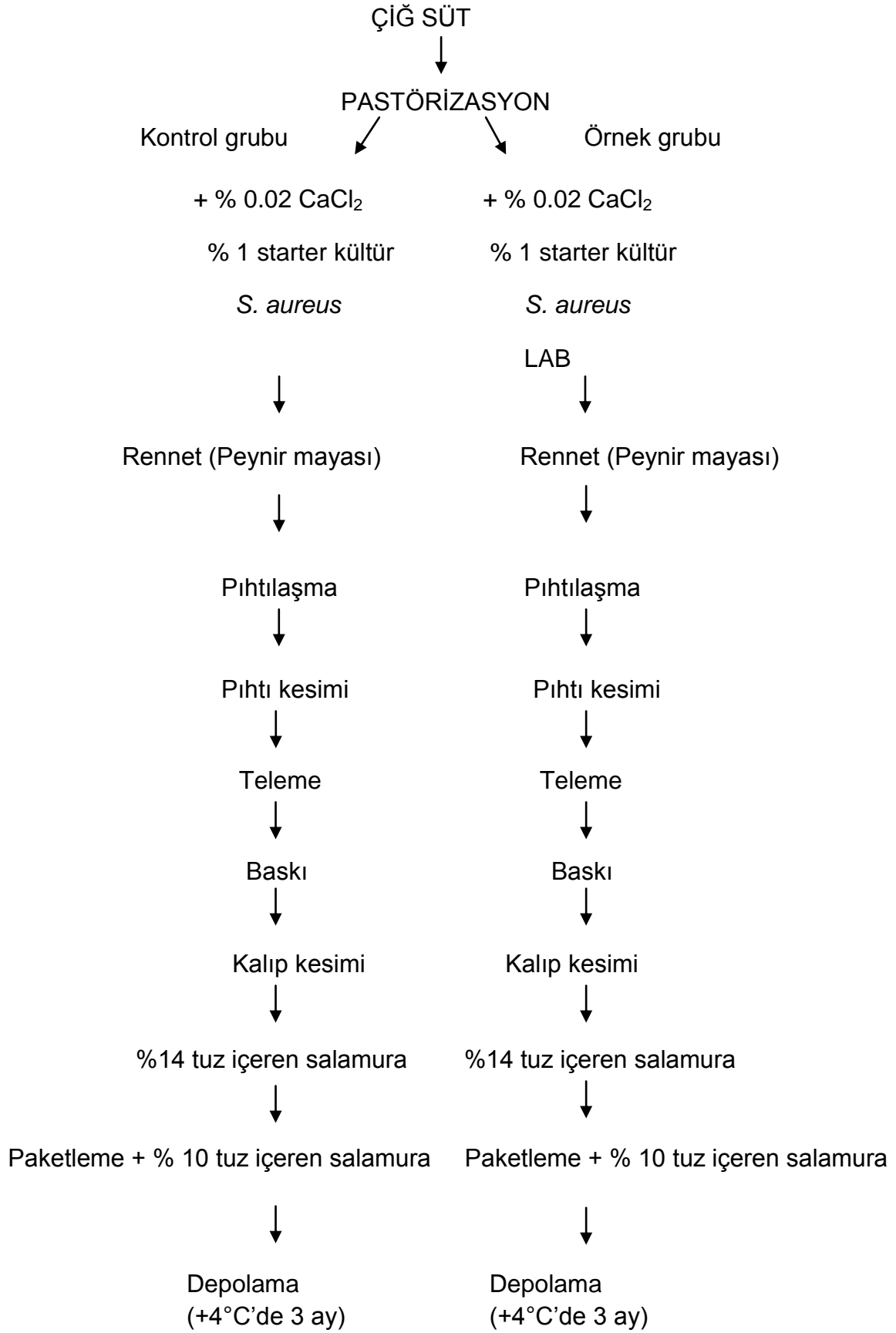
### 3.2.2. Beyaz peynir üretimi

Beyaz peynirlerin yapımı, A.Ü. Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü laboratuvarında yer alan pilot peynir üretim düzenlerinden yararlanılarak gerçekleştirilmiştir.

Hayvancılık işletmesinden güğümlerle getirilen inek sütü süzildükten sonra tanka aktarılmış ve iyice karıştırılan bu süttten örnek alınarak gerekli analizler yapılmıştır.

Çift cidarlı tankta süt  $72 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 2 dakika süreyle ısıtılarak ısıtıldıktan sonra mayalama sıcaklığına ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ) soğutulmuştur. Uygun sıcaklıktaki süt iki ayrı mayalama kazanına aktarılıp, kazanların her ikisine de % 0.02 oranında  $\text{CaCl}_2$ , % 1 oranında starter kültür ve 25 mL *S. aureus* kültürü ilave edilirken, laktik asit bakteri kültürü sadece bir tanka eklenmiştir. Yapılan ilaveler sonrasında süt ön olgunlaştırmaya bırakılmıştır. Ön olgunlaştırması tamamlanan süte 1.5 saatte pıhtı kesim olgunluğuna gelecek şekilde hesaplanan miktarda peynir mayası ilave edilmiştir. Süre sonunda pıhtı  $1 \text{ cm}^3$  'lük parçalar halinde kesilip içerisinde cendere bezi bulunan kalıplara aktarılmıştır. Pıhtılar önce 60 dakika süreyle baskısız süzülürken, ardından ortalama 4 saat baskılı süzme işlemine tabi tutulmuştur.

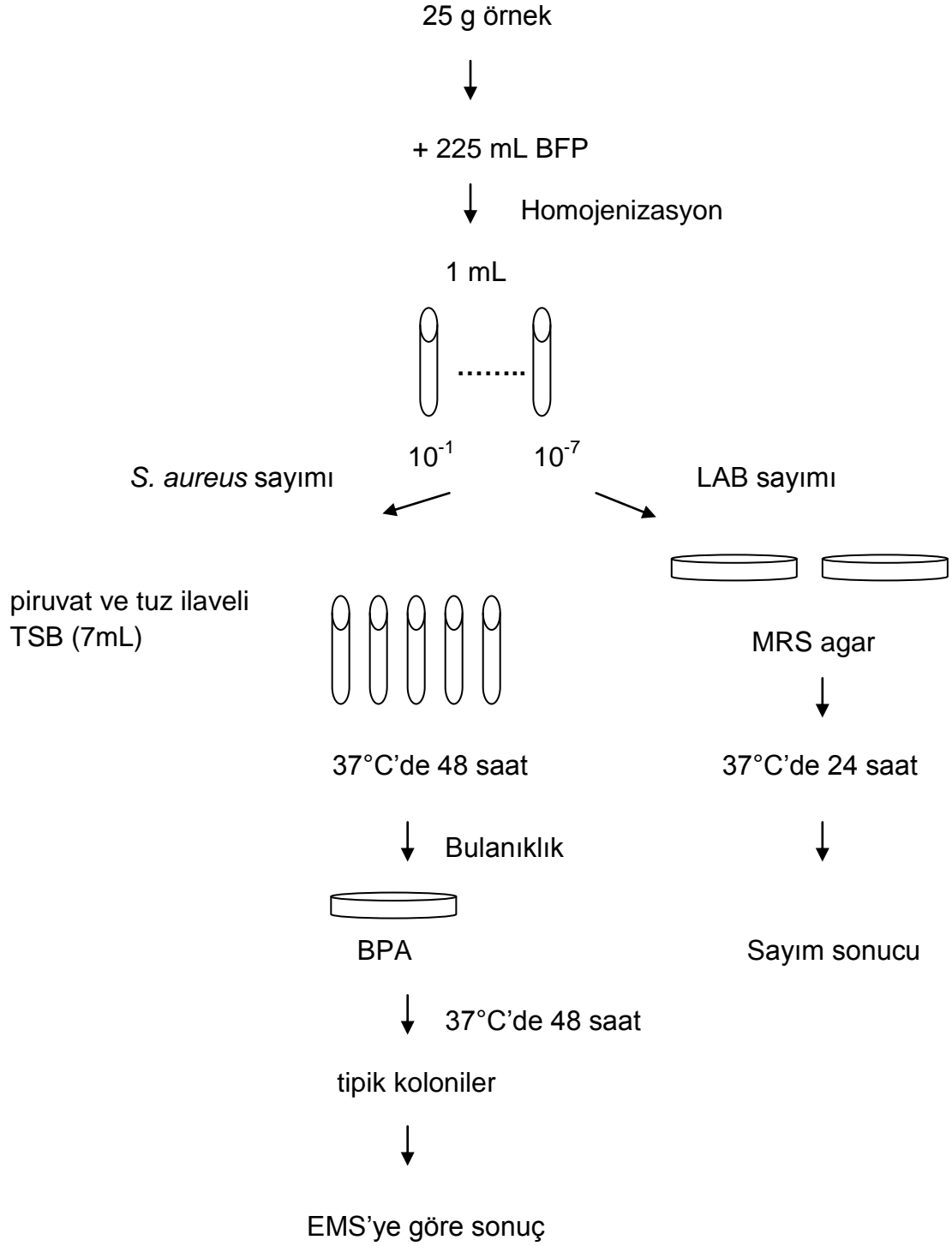
Baskı işlemi sonunda telemeler 7x7x7 cm boyutlarında kesilip, % 14 oranında tuz içeren salamurada 5 saat süreyle n tuzlanmaya bırakılmıştır. Bu n salamura işleminden çıkarılan peynirler ortalama 50-65 SH asitliğe gelinceye kadar evre sıcaklığında bekletilmiş, ayrılan peynir altı suyunun uzaklaştırılması sağlandıktan sonra plastik kutulara yerleştirilmiştir. % 10 tuz içeren salamura ilavesinden sonra kutular hava almayacak şekilde kapatılmıştır. Paketlenen peynirler 4C sıcaklıkta üç ay süreyle olgunlaştırmaya alınmıştır.



Şekil 3.2. Beyaz Peynir Üretimi

### 3.2.3. Peynir örneklerinde *S. aureus* ve laktik asit bakteri sayımı

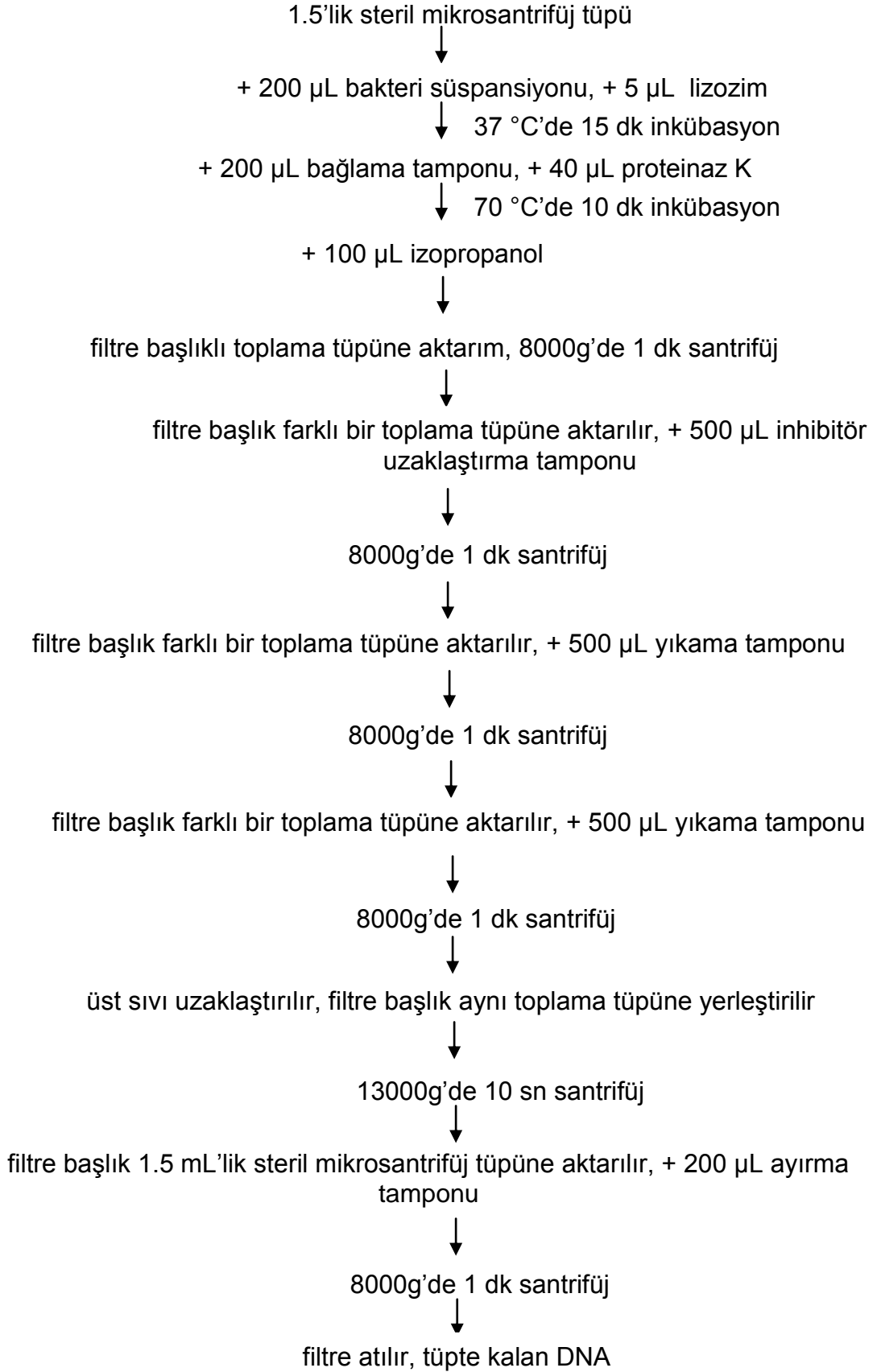
Çalışmada *S. aureus* ve laktik asit bakterilerinin sayısını belirlemek için peynir üretiminde pastörizasyon, pıhtı oluşumu, kalıp kesimi ve ön salamura çıkış sonrasında örnekler alınırken, depolama başlangıcı dahil olmak üzere 3 aylık süre zarfı içerisinde belirli periyotlarda bu işlem tekrarlanmıştır. Steril stomacher torbasına alınan 25 g peynir örneğine 225 mL BFP ilave edilip 1 dk karıştırılmıştır. Ardından 9 mL BFP içeren tüplerde dilüsyonlar hazırlanmıştır. Laktik asit bakteri sayımı için bu dilüsyonlardan MRS agar besiyerine dökme plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. 37°C sıcaklıkta 18-24 saat inkübasyon sonunda petrillerdeki koloni sayım sonucu kaydedilmiştir. *S. aureus* sayımı içinse U.S. FDA Bacteriological Analytical Manual (2001)'in önerdiği şekilde 5'li tüp EMS yöntemi kullanılmıştır. Örnekten elde edilen dilüsyonların her birinden % 1 (10 g/L) piruvat (MERCK) ve % 10 (95 g/L) tuz ilaveli TS broth (7 mL) içeren 5 tüpe 1'er mL aktarılmış, 37°C sıcaklıkta 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Bulanıklık görülen tüplerden steril özeyle tek koloni düşürme yöntemine göre BPA besiyerine ekim yapılmıştır. 37°C sıcaklıkta 48 saat süre ile inkübasyonun ardından tipik koloniler (parlak ve mat zon yapmış siyah renkli *S. aureus* kolonileri) TS broth besiyerine aktarılmış, 37°C' de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. PZR ile doğrulaması yapılan tüplerden EMS tablosuna bakılarak sonuca gidilmiştir.



Şekil 3.3. Peynir örneklerinde *S. aureus* ve LAB sayımı

### 3.2.4. DNA izolasyonu ve saflaştırılması işlemi

High pure PCR template preparation kitine göre, 1.5 mL'lik steril mikrosantrifüj tüpüne, 200 µL bakteri süspansiyonu ve 5 µL lizozim çözeltisi eklenmiş ve 37°C sıcaklıkta 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyonun ardından aynı tüpe, 200 µL bağlama tamponu ve 40 µL proteinaz K çözeltisi eklenerek, hemen karıştırılmış ve 70°C sıcaklıkta 10 dakika süre ile ikinci bir inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra aynı tüpe, 100 µL izopropanol eklenerek karıştırılmış ve bu karışım, filtre başlık içeren toplama tüpünün üstteki filtre kısmına aktararak, 8000 g (9175 rpm)'de 1 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj işlemi sonrası üst sıvıyı içeren toplama tüpü atılarak filtre, başka bir steril toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Yeni toplama tüpüne yerleştirilen bu filtre kısmına, 500 µL inhibitör uzaklaştırma tampon eklenerek, 8000 g (9175 rpm)'de 1 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj işlemi sonrası üst sıvıyı içeren toplama tüpü atılarak filtre, başka bir steril toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Yeni toplama tüpüne yerleştirilen bu filtre kısmına, 500 µL yıkama tamponu eklenerek 8000 g (9175 rpm)'de 1 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj işlemi sonrası üst sıvıyı içeren toplama tüpü atılarak filtre, başka bir steril toplama tüpüne yerleştirilmiş ve bir önceki işlem tekrar edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası üst sıvı uzaklaştırılmış ve filtre, aynı toplama tüpüne yerleştirilerek, 13000 g (11696 rpm)'de 10 saniye santrifüj işlemi yapılmıştır. Üst sıvıyı içeren toplama tüpü atılmış ve filtre, 1.5 mL'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. Bu filtre üzerine, 200 µL 70°C sıcaklıkta bekletilen ayırma tamponu eklenerek, 8000 g (9175 rpm)'de 1 dakika süre ile son bir santrifüj işlemi yapılmıştır. Son olarak, filtre başlık atılmış ve tüpte kalan üst sıvı, hedef DNA'yı içerdiğinden, daha sonra kullanılmak üzere -18°C sıcaklıkta saklanmıştır (Taban, 2007). Prosedür Şekil 3.4'te özet olarak verilmektedir.



Şekil 3.4. Bakteri hücrelerinden DNA izolasyonu ve saflaştırılması uygulama basamakları ( Taban, 2007)

### 3.2.5. PZR amplifikasyon karışım bileşenlerinin ve PZR döngüsündeki sıcaklık parametresinin optimizasyonu

Çalışmada dNTP'lerin (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP) her birinin 10 mM'lık eşit konsantrasyonlarını içeren ve hazır halde ticari olarak satılan PZR nükleotid karışım çözeltisi kullanılmıştır (Roche, Almanya). Karışımda kullanılan modifiye *Taq* (FastStart *Taq*) polimeraz enzimi çözeltisi (Roche, Almanya), 75°C'nin altındaki sıcaklıklarda inaktif halde olup 95 °C'de 3 dakikalık bir beklemenin ardından aktif hale geçebilme özelliğine sahiptir. Bu özellikteki enzim çözeltisi, PZR amplifikasyon karışımı hazırlanırken hedef DNA ve primerler arasında oluşabilecek özgün olmayan bağlanmaların uzatılmasını engellemek amacıyla tercih edilmiştir.

Çalışmanın bu aşamasında, PZR amplifikasyon karışımında *nuc* primer çifti (*nuc*-F166 ve *nuc*-R565) ile PZR döngüsünde 4 farklı bağlanma sıcaklığında (50, 55, 58, 60°C) çalışılarak, çalışmanın ilerleyen bölümlerinde uygulanacak PZR yöntemi değerlerinin bulunması hedeflenmiştir.

İlk olarak 0.2 µL'lik PZR tüpü içerisinde, belirli miktardaki hedef DNA ve ultra saf su ile birlikte, hazır halde ticari olarak satılan 10 mM'lik PZR nükleotid karışımının son konsantrasyonu 200 µM olacak şekilde, 20 pmol/µL olarak hazırlanan ileri ve geri primerlerin son konsantrasyonları 0.4 µM olacak şekilde, hazır halde ticari olarak satılan 20mM MgCl<sub>2</sub> içerikli 10X PZR tamponunun (Roche, Almanya) son konsantrasyonu 4 mM olacak şekilde, hazır halde ticari olarak satılan 5 U/µL'lik FastStart *Taq* DNA polimeraz enzim çözeltisinin son konsantrasyonu 0.04 U/µL olacak şekilde, toplam 25 µL' lik PZR amplifikasyon karışımı hazırlanmış ve kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. PZR amplifikasyon karışımı bileşenleri ve karışım içerisindeki miktar ve son konsantrasyonları

Bileşen	PZR amplifikasyon karışımı içindeki miktar ( $\mu\text{L}$ )	PZR amplifikasyon karışımı içindeki son konsantrasyon
10 mM'lık PZR nükleotid karışımı	0.5	200 $\mu\text{M}$
20 mM $\text{MgCl}_2$ içerikli 10 X PCR Buffer	5	4.0 mM
İleri primer (20 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0.5	0.40 $\mu\text{M}$
Geri primer (20 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0.5	0.40 $\mu\text{M}$
5 U/ $\mu\text{L}$ ' lik Taq DNA polimeraz enzim çözeltisi	0.2	0.04 $\mu\text{M}$
Hedef DNA	3	-
Ultra saf su	15,3	-
<b>Toplam hacim (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>25.0</b>	

Çizelge 3.2. PZR döngüsündeki parametrelerin optimizasyonunda kullanılan değerler

	Sıcaklık ( $^{\circ}\text{C}$ )	Süre (saniye)	Döngü sayısı (adet)
Başlangıç denatürasyonu	95	300	1
Denatürasyon	95	30	35
Bağlanma	50,55,58,60	30	
Uzama	72	60	
Son uzama	72	420	1

Her primer çifti için PZR tüpünde hazırlanan PZR amplifikasyon karışımına, yukarda gösterilen 4 farklı bağlanma sıcaklığı üzerinden PZR yöntemi uygulanmıştır. Agaroz jel elektroforez ve ardından görüntüleme işlemi sonrasında optimum koşulların *nuc-F166* ve *nuc-R565* primer çifti ile 50 C bağlanma sıcaklığında yürütülen PZR yöntemi olduğu belirlenmiştir.

### **3.2.6. Agaroz jel görüntüleme işlemi**

Parametrelerinin optimizasyonu ile örneklere PZR işlemi uygulanmış ve çoğaltılan hedef DNA'ların gösterilmesi amacı ile agaroz jel elektroforez işlemi uygulanmıştır. Bu işlem esnasında, % 1.5'lik agaroz jeli (w/v) kullanılmıştır. Bu jelin içeriği ve hazırlanış şekli, EK 6 bölümünde verilmiştir.

Agaroz jel elektroforez işleminde ilk olarak; tabla üzerinde oluşturulan agaroz jel, uygun ebatlardaki yatay elektroforez tankına yerleştirilmiş ve tank içerisine jelin üzerini kapatacak miktarda, TBE tamponu (1X) ilave edilmiştir. Diğer taraftan, PZR yöntemi ile çoğaltılan hedef DNA'lardan (amplikonlar) 10'ar  L alınarak 2'şer  L'lik 6X boya  zeltisi ile karıştırılmıştır. Jeldeki ilk kuyucuğa Fermentas markalı (Litvanya) 100 bç'lik GeneRuler DNA ladder plus/ready-to-use) molekül ağırlıklı belirteç yüklenirken, diğer kuyucuklara boyanarak hazır hale getirilmiş amplikonlar yüklenmiş ve 90 volt sabit akımda yaklaşık 1-1.5 saat boyunca yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın PZR optimizasyonu sırasında saf kültür ile çalışıldığından, pozitif kontrole (PK) gerek duyulmamış ancak negatif kontrol (NK) olarak hedef DNA içermeyen PZR amplifikasyon karışımının PZR ürünü kullanılmıştır. Doğrulama amaçlı PZR yönteminin kullanıldığı aşamalarda ise pozitif kontrol olarak saf kültürden izole edilen hedef DNA ile hazırlanan PZR karışımının PZR yöntemi ile çoğaltılan amplikonları kullanılmıştır.

### **3.2.7. Jel görüntüleme işlemi**

Agaroz jel elektroforez işlemi sonunda çoğaltılan hedef DNA'nın gösterilmesi amacıyla jel 302 nm dalgaboyunda UV işik altında moleküler ağırlık belirteci ile karışlaştırılarak görüntülemeye alınmış ve *S. aureus* bakterisine ait *nuc* gen

bölgesi için 400 bç'lik uzunluğa karşılık gelen DNA fragman bantları aranarak, amplikonlar değerlendirilmiştir.

### **3.3. İstatistiksel Analizler**

Çalışma boyunca elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacı ile, SPSS 11.5 paket programından yararlanılmıştır. Çalışmadaki karşılaştırmalar, SPSS 11.5 paket programı yardımı ile "T testi, Mann-Whitney, tek yönlü ANOVA ve Kruskal-Wallis Testleri" kullanılarak yapılmıştır. Çalışma sonuçları,  $p < 0.01$  olduğu durumlarda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

*L. brevis* ile yapılan çalışmada peynir sütüne, örnek grubu için  $1.8 \times 10^6$  EMS/mL düzeyinde *S. aureus* ATCC 6538 ve  $6.5 \times 10^7$  EMS/mL düzeyinde *L. brevis* BG18 inoküle edilirken, kontrol grubu için sadece  $1.8 \times 10^6$  EMS/mL düzeyinde *S. aureus* inoküle edilmiştir. Peynir üretim aşamasında ve 3 ay süren depolama süresince belirli aralıklarla örnek alımı gerçekleştirilmiştir. Örnek alım noktaları Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Örnek alım noktaları (*L. brevis*)

Örnek Alım Yeri Numarası	Örnek Alım Yeri Açıklaması	t (saat)
1	Pastörizasyon Sonrası	0
2	Pıhtı Kesimi	2
3	Kalıp Kesimi	6
4	Ön Salamura Çıkışı	22
5	Depolama Başlangıcı	24
6	Depolama 3. Gün	72
7	Depolama 27. Gün	648
8	Depolama 48. Gün	1140
9	Depolama 67. Gün	1608
10	Depolama 80. Gün	1920
11	Depolama 90. Gün	2160

Alınan örneklerden yapılan kültürel ekim sonuçlarının sayısal değerleri için Ek 8' de verilen EMS tablosundan yararlanılmıştır. Çalışma iki tekerrürlü gerçekleştirildiğinden kontrol ve örnek grubuna ait verilen sonuçlar her iki tekerrürde EMS tablosundan elde edilen verilerin ortalamasını göstermektedir.

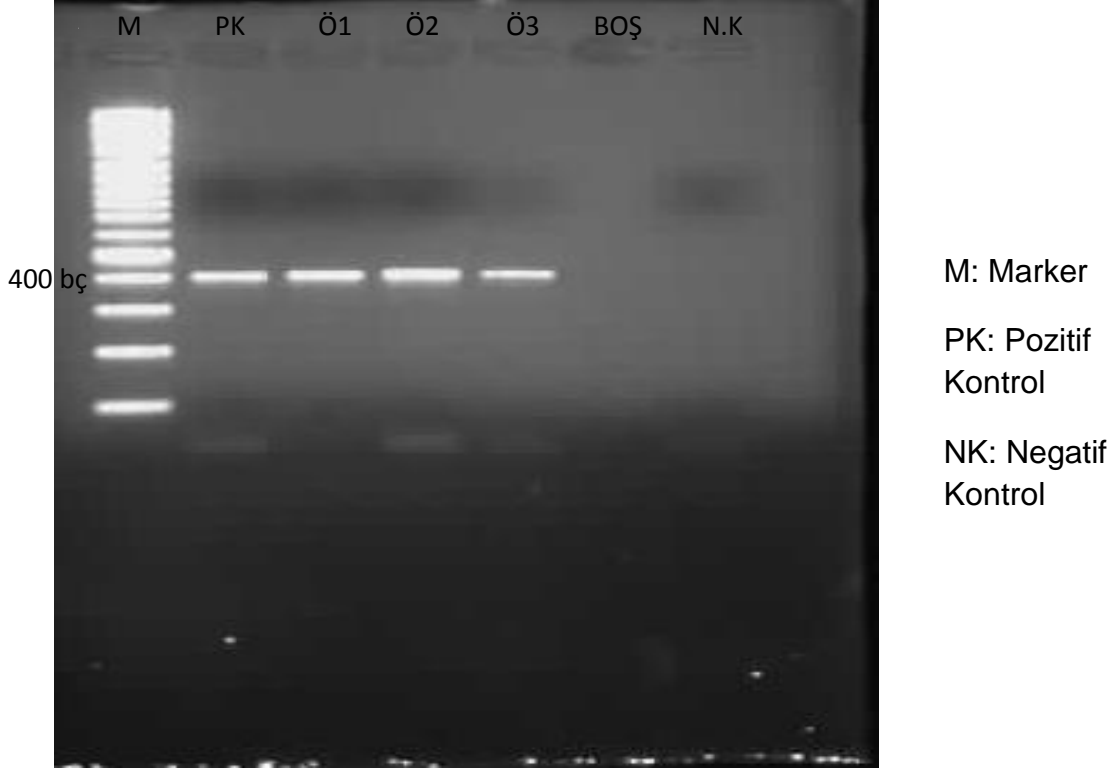
Çizelge 4.2. Kontrol Grubuna Ait *S. aureus* Sayım Sonuçları

<b>Örnek Alım Yeri Numarası</b>	<b>t (saat)</b>	<b>Sayım sonucu (EMS/mL)</b>	<b>log (EMS/mL)</b>
1	0	1.79X10 <sup>6</sup>	6.252
2	2	3.81X10 <sup>5</sup>	5.581
3	6	4.03X10 <sup>6</sup>	6.605
4	22	8.16X10 <sup>6</sup>	6.912
5	24	9.00X10 <sup>6</sup>	6.954
6	72	3.11X10 <sup>6</sup>	6.492
7	648	2.50X10 <sup>6</sup>	6.397
8	1140	5.98X10 <sup>6</sup>	6.777
9	1608	2.85X10 <sup>6</sup>	6.454
10	1920	2.59X10 <sup>6</sup>	6.413
11	2160	3.82X10 <sup>6</sup>	6.582

Çizelge 4.3. Örnek Grubuna Ait *S. aureus* Sayım Sonuçları

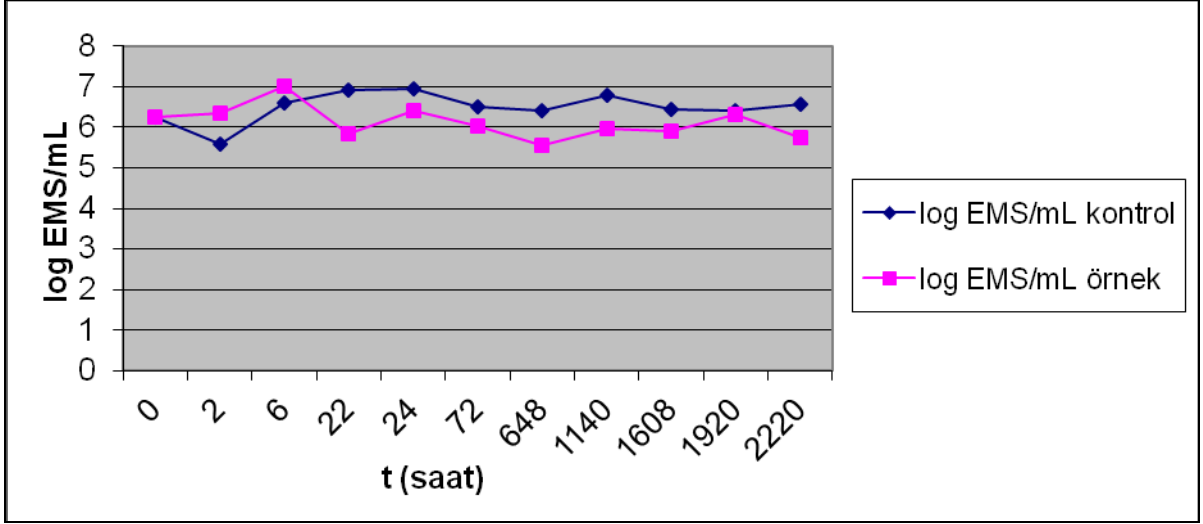
<b>Örnek Alım Yeri Numarası</b>	<b>t (saat)</b>	<b>Sayım sonucu (EMS/mL)</b>	<b>log (EMS/mL)</b>
1	0	$1.79 \times 10^6$	6.252
2	2	$2.20 \times 10^6$	6.342
3	6	$1.03 \times 10^7$	7.015
4	22	$7.10 \times 10^5$	5.851
5	24	$2.65 \times 10^6$	6.423
6	72	$1.06 \times 10^6$	6.023
7	648	$3.65 \times 10^5$	5.562
8	1140	$9.00 \times 10^5$	5.954
9	1608	$7.90 \times 10^5$	5.898
10	1920	$2.14 \times 10^6$	6.329
11	2160	$5.50 \times 10^5$	5.740

Kültürel ekimlerin sonucunda bulanıklık görülen tüplerden bazılarında doğrulamaya gidilmiştir. Bu amaçla 400 bç'lik *nuc* primer çifti ile gerçekleştirilen PZR yöntemi sonucunda Şekil 4.1'deki görüntü elde edilmiştir.



Şekil 4.1. *S. aureus*'a ait PZR görüntüsü

EMS tablosundan elde edilen verilerle *L. brevis*'in *S. aureus*'a antimikrobiyel etkisini incelemek amacıyla, kontrol ve örnek grubu verileri bir grafikte toplanmıştır.



Şekil 4.2. *L. brevis*'in *S. aureus*'a etkisi, t (saat) – log (EMS/mL)

Başlangıç *S. aureus* sayısı  $1.8 \times 10^6$  EMS/mL iken peynir üretim aşamasının 2. saatinde bu değer kontrol grubunda  $3.8 \times 10^5$  EMS/mL, örnek grubunda ise  $2.2 \times 10^6$  EMS/mL düzeyindedir. 6. saatteki verilere göre patojen sayısı kontrol grubunda  $4.0 \times 10^6$  EMS/mL, örnek grubunda ise  $1.0 \times 10^7$  EMS/mL düzeyindedir. 24 saatin sonunda bu değerler kontrol ve örnek grubunda sırasıyla  $9 \times 10^6$  EMS/mL ve  $2.7 \times 10^6$  EMS/mL olup sonuçlar başlangıç değerleriyle kıyaslandığında peynir üretimi süresince *L. brevis*'in antimikrobiyel etki göstermediği görülmektedir. Depolamanın 27. gününde, kontrol grubuna ait değer  $2.5 \times 10^6$  EMS/mL, örnek grubuna ait değer ise  $3.7 \times 10^5$  EMS/mL olarak saptanmıştır. Depolamanın 90. gününde yapılan sayım sonuçlarına göre, kontrol grubundaki patojen sayısı  $3.8 \times 10^6$  EMS/mL, örnek grubunda ise  $5.5 \times 10^5$  EMS/mL düzeyindedir.

Depolama başlangıcından sonuna kadar kontrol grup ile örnek grup arasında her bir örnek alım noktasından elde edilen veriler gerek T testi gerekse Mann-Whitney testi kullanılarak incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ( $p < 0,01$ ). Bu çalışma ile, *L. brevis* BG18 bakterisinin Beyaz peynirde *S. aureus* ATCC6538 bakterisine karşı antimikrobiyel etkiye sahip olduğu ortaya koyulmuştur.

*P. pentosaceus* ile yapılan çalışmada peynir sütüne, örnek grubu için  $8.95 \times 10^5$  EMS/mL düzeyinde *S. aureus* ve  $7.3 \times 10^7$  EMS/mL düzeyinde *P. pentosaceus* inoküle edilirken, kontrol grubu için sadece  $8.95 \times 10^5$  EMS/mL düzeyinde *S. aureus* inoküle edilmiştir. Peynir üretim aşamasında ve 3 ay süren depolama süresince belirli aralıklarla örnek alımı gerçekleştirilmiştir. Örnek alım noktaları Çizelge 4.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Örnek alım noktaları (*P. pentosaceus*)

Örnek Alım Yeri Numarası	Örnek Alım Yeri Açıklaması	t (saat)
1	Pastörizasyon Sonrası	0
2	Pıhtı Kesimi	2
3	Kalıp Kesimi	6
4	Ön Salamura Çıkışı	22
5	Depolama Başlangıcı	24
6	Depolama 19. Gün	444
7	Depolama 40. Gün	948
8	Depolama 50. Gün	1200
9	Depolama 68. Gün	1632
10	Depolama 79. Gün	1884
11	Depolama 90. Gün	2160

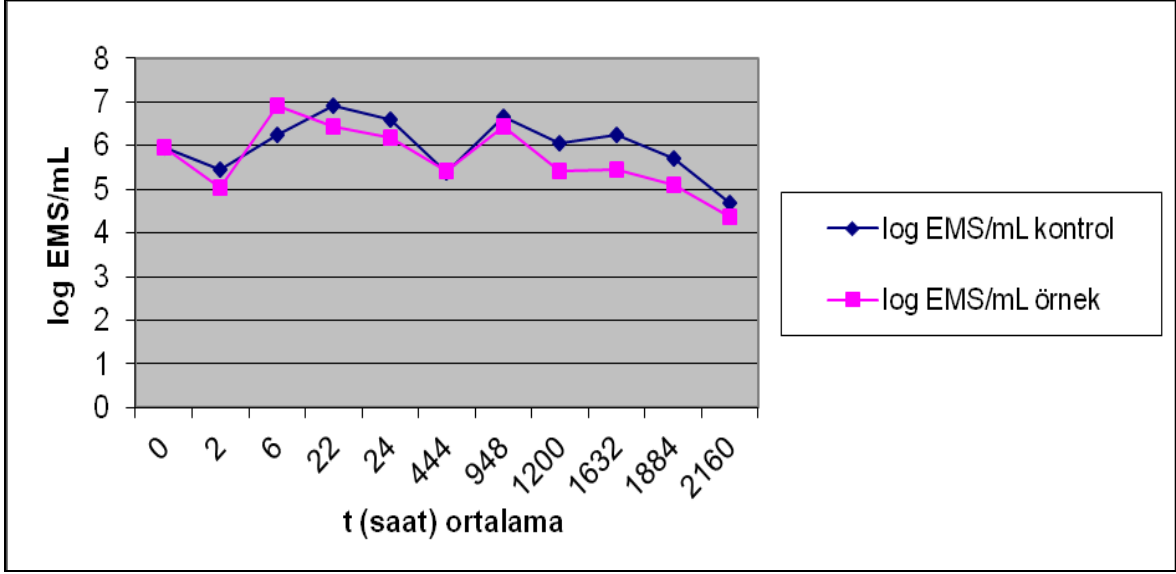
Çizelge 4.5 ve 4.6. her iki tekerrürde kontrol ve örnek grubuna ait sonuçların EMS tablosundan elde edilen verilerin ortalamasını göstermektedir.

Çizelge 4.5. Kontrol Grubuna Ait *S. aureus* Sayım Sonuçları

<b>Örnek Alım Yeri Numarası</b>	<b>t (saat)</b>	<b>Sayım sonucu (EMS/mL)</b>	<b>log (EMS/mL)</b>
1	0	$8.95 \times 10^5$	5.952
2	2	$2.80 \times 10^5$	5.447
3	6	$1.76 \times 10^6$	6.245
4	22	$8.27 \times 10^6$	6.918
5	24	$3.77 \times 10^6$	6.577
6	444	$2.44 \times 10^5$	5.387
7	948	$4.61 \times 10^6$	6.664
8	1200	$1.16 \times 10^6$	6.064
9	1632	$1.80 \times 10^6$	6.257
10	1884	$5.15 \times 10^5$	5.712
11	2160	$4.90 \times 10^4$	4.690

Çizelge 4.6. Örnek Grubuna Ait *S. aureus* Sayım Sonuçları

<b>Örnek Alım Yeri Numarası</b>	<b>t (saat)</b>	<b>Sayım sonucu (EMS/mL)</b>	<b>log (EMS/mL)</b>
1	0	$8.95 \times 10^5$	5.952
2	2	$1.07 \times 10^5$	5.031
3	6	$8.02 \times 10^6$	6.904
4	22	$2.78 \times 10^6$	6.444
5	24	$1.47 \times 10^6$	6.169
6	444	$2.66 \times 10^5$	5.424
7	948	$2.75 \times 10^6$	6.439
8	1200	$2.66 \times 10^5$	5.424
9	1632	$2.85 \times 10^5$	5.454
10	1884	$1.25 \times 10^5$	5.095
11	2160	$2.30 \times 10^4$	4.361



Şekil 4.3. *P. pentosaceus*'un *S. aureus*'a etkisi, t (saat) – log (EMS/mL)

Başlangıç *S. aureus* sayısı  $8.9 \times 10^5$  EMS/mL iken peynir üretim aşamasının 2. saatinde bu değer kontrol grubunda  $2.8 \times 10^5$  EMS/mL, örnek grubunda ise  $1.1 \times 10^5$  EMS/mL düzeyindedir. 6. saatteki verilere göre patojen sayısı kontrol grubunda  $1.8 \times 10^6$  EMS/mL, örnek grubunda ise  $8.0 \times 10^6$  EMS/mL düzeyindedir. 24 saatin sonunda bu değerler kontrol ve örnek grubunda sırasıyla  $3.8 \times 10^6$  EMS/mL ve  $1.5 \times 10^6$  EMS/mL olup sonuçlar başlangıç değerleriyle kıyaslandığında peynir üretimi süresince laktik asit bakterisinin patojene karşı bir etki göstermediği görülmektedir. Depolamanın 50. gününde, kontrol grubuna ait değer  $1.2 \times 10^6$  EMS/mL, örnek grubuna ait değer ise  $2.7 \times 10^5$  EMS/mL olarak saptanmıştır. Depolamanın sonlanmasıyla 90. günde yapılan sayım sonuçlarına göre, kontrol grubundaki patojen miktarı  $4.9 \times 10^4$  EMS/mL, örnek grubunda ise  $2.3 \times 10^4$  EMS/mL düzeyindedir.

Depolama başlangıcından sonuna kadar kontrol grup ile örnek grup arasında her bir örnek alım noktasından elde edilen veriler gerek T testi gerekse Mann-Whitney testi kullanılarak incelendiğinde, *P. pentosaceus* BH105 laktik asit bakterisinin Beyaz peynirdeki *S. aureus* ATCC 6538 patojen bakterisi üzerindeki etkisi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p > 0,01$ ). *P. pentosaceus* BH105 bakterisinin *S. aureus* ATCC 6538 bakterisine karşı antimikrobiyel etki gösterememesinin nedeni olarak Beyaz peynirin matriks yapısı, yüksek tuz içerikli salamura gibi ortam faktörleri gösterilebilir. Yüksek tuz oranının (%14), laktik asit bakterisinin bakteriyosin üretimini baskıladığı düşünülebilir.

Bunun yanı sıra bakterinin bakteriyosin üretebildiği varsayılarak, peynirin matriks yapısı nedeniyle bu bakteriyosinin patojenle etkileşiminin engellendiği düşünülebilir.

Uymaz vd. (2009) *P. pentosaceus* BH105 bakterisinin probiyotik özelliklerini belirlemek için yaptıkları çalışmada, bakterinin bazı bakterilere karşı antimikrobiyel etkisini de incelemişlerdir. "Agar overlay" ve "well diffusion" yöntemleri kullanılarak, bakterinin oluşturduğu zon çapına göre etkinliği tespit edilmiştir. Agar overlay yöntemiyle, *P. pentosaceus* BH105, geniş inhibitör etki göstermiştir. *S. aureus* ATCC 6538 bakterisine karşı agar overlay yöntemiyle >11 mm çapında zon oluşturan bakteri, well diffusion yöntemiyle bu bakteriye karşı zon oluşturmamıştır.

*Pediococcus* türü üzerine yaptıkları araştırmalarda, Caldwell et al., (1996) bu bakterinin laktozu fermente etme özelliklerinin çok güçlü olmadığını ve sütteki proteolitik aktivitelerinin yetersiz olduğunu göstererek, süt ve süt ürünlerinde bu bakteri türünün kullanımını önermemektedirler.

*Pediococcus* türü bakteriler genellikle fermente et ürünlerinde starter olarak kullanılmaktadır. Bu sebeple, literatürde bu bakterinin antimikrobiyel etkilerini belirlemek için daha çok et örnekleriyle yapılan çalışmalar mevcuttur.

Kaban ve Kaya (2006) iki farklı starter kültür kullanarak fermente ettikleri sucuk örneklerinde *S. aureus* bakterisinin varlığını incelemişlerdir. *P. acidilactici*, *L. curvatus* ve *S. xylosus* bakterilerini içerirken starter A kültürü ile *L. sakei*, *S. carnosus* bakterilerini içeren starter B kültürü  $10^7$  kob/g olacak şekilde sucuk hamuruna eklenmiştir.  $10^6$  kob/g *S. aureus* bakterisi ile kontamine ederek yapılan sucuk örneklerinde olgunlaşma süresi boyunca belirli aralıklarla pH ve bakteri sayımı gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, starter kullanılan iki grupta da daha fazla miktarda asit oluşumu gözlenmiş ve daha düşük pH değerine ulaşılmıştır. Kontrol grupta, 3. günde *S. aureus* sayısında artış görülüp ilerleyen günlerde bu sayı korunurken, 14 günlük olgunlaşma süresince starter A ve starter B kültürlerini içeren örneklerde patojen sayısında sürekli bir azalma görülmüştür.

Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel etkisini, üretilen organik asitlere bağlı olarak gıda ortamındaki pH düşüşüne dayandıran birçok çalışma mevcuttur.

Sakhare and Rao (2003) yaptıkları çalışmada, et örneklerinde *L. plantarum* (%60), *L. casei* (%20) ve *L. lactis* (%20) bakterilerinin birlikte kullanımının, *S. aureus*, *E. coli* ve *Salmonella* Typhimurium bakterilerine karşı etkisini incelemiştir. Belirtilen oranlardaki laktik asit bakterilerinin toplam sayısı  $10^7$  adet/g, patojen mikroorganizmalar ayrı ayrı  $10^5$  adet/ g olacak şekilde pH'sı 5.5 olan et örneklerine ilave edilmiş ve belirli periyotlarla pH ölçümleri ve bakteri sayımı yapılmıştır. Laktik asit bakterilerin etkisiyle 24 saat içinde pH 4.0- ve 4.2 seviyelerine ulaşılmış, buna bağlı olarak *S. aureus* ve koliform bakterilerin sayılarının tespit edilemeyecek seviyelere kadar düştüğü belirtilmiştir. Bu çalışma ile laktik asit bakterilerinin birlikte kullanıldıklarında etkinliklerinin arttığı vurgulanmıştır.

Sameshima et al. (1998) fermente et ürünü olan sosiste, starter kültür olarak insan bağırsağından izole ettikleri *Lactobacillus* suşlarının (*L. paracasei*, *L. rhamnosus* ve *L. acidophilus*) *S. aureus* gelişimine ve enterotoksin oluşumuna etkisini araştırmışlardır. 20 ve 35°C'de gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda pH ölçümü, bakteri sayımı ve enterotoksin tespiti yapılmıştır. Sosis hamuruna yaklaşık  $10^4$  kob/g *S. aureus* bakterisi ve  $10^7$  kob/g starter (kontrol grubu hariç) inoküle edilmiştir. Her iki sıcaklıkta gerçekleşen fermantasyon sonucunda kontrol grubunda enterotoksine rastlanılmışken, bağırsaktan izole edilen 3 suştan *L. paracasei* ve *L. rhamnosus*, fermente sosis üretiminde ticari olarak kullanılan *L. sake* starter kültürü ile benzer etki göstermiştir. Asit üretimine bağlı olarak pH düşmüş, *S. aureus* gelişimi ve enterotoksin oluşumu engellenmiştir. *L. acidophilus* kültürü ile yapılan örneklerde asitlik çok fazla gelişmemiş buna bağlı olarak *S. aureus* gelişimi ve enterotoksin oluşumu baskılanamamıştır. Bu çalışma ile sosis fermantasyonunda iki yeni suşun ticari olarak kullanılabilirliği ortaya koyulmuştur.

Charlier et al. (2008) yaptıkları çalışmada, süt örneğinde *L. lactis* suşlarının *S. aureus* bakterisine olan etkisini incelemiştir. 25 bakteri suşu, sütte gelişebilme özelliklerine göre üç gruba ayrılmıştır. Grup I, sütte  $10^9$  kob/mL kadar gelişip, pH yaklaşık 4.0'e kadar asitlik oluştururken, Grup II ve III,  $10^{6-7}$  kob/mL civarlarında gelişme göstermiş, daha az asit üretmiştir (pH yaklaşık 6.0). Süte  $10^3$  kob/mL *S. aureus* bakterisi inoküle edilmiş, belirli saat aralıklarında örnek alınarak sayım sonucuna bakılmıştır. Laktik asit bakterilerinin inhibisyon etkileri, Grup I > Grup II > Grup III şeklinde olsa da her 3 grup üyeleri de kontrole göre patojen sayısında azalma sağlamıştır. Bu çalışma ile düşük asitlik oluşturan *L. lactis* suşlarının bile

$10^3$  kob/mL *S. aureus* içeren çiğ süttten yapılan yumuşak peynirlerde inhibisyonu sağlayabileceği kanıtlanmıştır.

Radovanovic and Katic (2009) peynir örneklerinden izole ettikleri laktik asit bakterilerinden *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. plantarum*'un sütte *S. aureus* gelişimine etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla, 9 mL sütte % 1 oranında yalnızca *S. aureus* ( $10^6$  kob/mL), *L. lactis* subsp. *lactis* ( $10^6$  kob/mL), *L. plantarum* ( $10^6$  kob/mL) bakterileri ve % 1 *S. aureus* + % 1 *L. lactis* + %1 *L. plantarum* bakterilerini içeren 4 örnek grubu oluşturulmuştur. 24 saatlik inkübasyon boyunca alınan örneklerde bakteri sayımı ve pH ölçümü yapılmıştır. *S. aureus* ve *L. plantarum* içeren iki örnekte pH düşüşü çok fazla gözlenmezken, *L. lactis* subsp. *lactis* ve karışık kültür ortamında daha düşük pH değeri elde edilmiştir. İnkübasyon sonunda, karışık kültürde asitliğe bağlı olarak *S. aureus* sayısında tekli kültüre kıyasla 2 log birimlik azalma görülmüştür.

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin patojen mikroorganizmalara karşı etkisini inceleyen çalışmalar da vardır.

Ananou et al. (2005) yaptıkları çalışmada, sosis örneğinde *Enterococcus faecalis* bakterisi tarafından üretilen AS-48 bakteriyosininin *S. aureus* bakterisine karşı etkisini incelemişlerdir. Çalışmanın ilk kısmında, AS-48 bakteriyosininin etkinliğini belirlemek amacıyla,  $10^3$  kob/g *S. aureus* bakterisini içeren 3 grup oluşturulmuştur (AS-48 içermeyen kontrol grup; 30 µg/g AS-48 ve 40 µg/g AS-48 içeren gruplar). 40 µg/g AS-48 ilave edilen grupta, *S. aureus* sayısında 5.31 log birimlik azalma görülürken, 30 µg/g AS-48 ilave edilen grupta 2 log birimlik düşüş tespit edilmiştir. Çalışmanın ikinci bölümünde ise bakteriyosin üreten ve üretmeyen *E. faecalis* suşlarının etkinliği incelenmiştir. Bu amaçla bir kontrol grubu, bakteriyosin üretmeyen *E. faecalis* suşunu içeren örnek grubu ve bakteriyosin üreten *E. faecalis* suşunu içeren örnek grubu olmak üzere,  $10^3$  kob/g *S. aureus* bakterisi içeren gruplar hazırlanmıştır. Tüm örneklerde asitlik gelişmiş ve pH düşüşü gözlenmiştir. Kontrol ve bakteriyosin üretmeyen suşu içeren grupta *S. aureus* sayısında artış gözlenirken, bakteriyosin üreten suşu içeren grupta sayı sabit kalmıştır.

Nunez et al. (1997), Manchego peyniri üretiminde enterosin 4 üreten *E. faecalis* INIA 4 kullanımı ile *L. monocytogenes* bakterisinin inhibisyonunu incelemişlerdir.

Çalışmada *L. monocytogenes* Ohio ve Scott A suşları ile ayrı ayrı peynir üretimi gerçekleştirilmiştir. Çiğ süte  $10^5$  kob/mL patojen mikroorganizma inoküle edildikten sonra sadece % 1 ticari starter kültürü, % 1 bakteriyosin üreten *E. faecalis* INIA 4 kültürü, % 1 hem ticari hem de bakteriyosin üreten kültürler ilave edilmiş ve peynir üretimi gerçekleştirilmiştir. 60 günlük olgunlaşma süresi boyunca pH ölçümü, bakteri sayımı ve enterosin tespiti yapılmıştır. *L. monocytogenes* Ohio bakterisi için yapılan çalışmada, kontrol grubu hariç her iki grupta da bakteri sayısında, 8 saat içinde 3 log birimlik, 7 gün içinde ise 6 log birimlik azalma görülmüştür. *L. monocytogenes* Scott A bakterisi ile yapılan peynir örneklerinde enterosin 4 etkinliği gözlenememiştir. Hem kontrol hem de % 1 bakteriyosin üreten kültürle yapılan örneklerde 60 günün sonunda bakteri sayısında herhangi bir azalma görülmezken, % 1 starter + % 1 bakteriyosin üreten kültür içeren örneklerde ise bakteri sayısında, 7 saat içinde 1 log birimlik, 60 günün sonunda ise 2 log birimlik azalma görülmüştür. Enterocin 4 üretimi ise her iki çalışmada da aynı şekilde gerçekleşmiş ve % 1 bakteriyosin üreten kültürle yapılan örneklerde, her iki kültürü de içeren örneklere göre çok daha fazla sayıda enterosin 4 tespit edilmiştir. Bunun sebebinin ise, starter kültürün varlığı ile besin öğeleri için yarış ortamının yaratılması ve asitliğin artırılması olarak gösterilmiştir.

Munoz et al. (2007) yaptıkları çalışmada yağsız sütte ve taze peynirde *S. aureus* üzerine enterosin AS-48 etkisini incelemiştir. İlk olarak sütte enterosin AS-48'in etkisini belirlemek için 10-50 µg/mL oranlarında bakteriyosini  $10^3$  cfu/mL *S. aureus* içeren süt örneğine ekleyip inkübasyon süresince belirli periyotlarda bakteri sayımı gerçekleştirilmiş ve bunun sonucunda artan bakteriyosin konsantrasyonu ile bakteri sayısının azaldığı yani bakteriyosin etkinliğinin arttığı görülmüştür. 50 µg/mL bakteriyosinle yapılan çalışmada bile 8 saatin sonunda patojen sayısı artış göstermiştir. Sütte bakteriyosin üreten *E. faecalis* A-48-32 bakterisinin *S. aureus* bakterisine karşı etkisini belirlemek için, enterokok/stafilokok oranı 100/1, 1/1 ve 1/100 olan 3 tür örnek grubunda bakteri sayımı ve agar well difüzyon yöntemiyle bakteriyosin etkisine bakılmıştır. 1/100 oranındaki örnek grubunda daha az olmakla birlikte çok fazla miktarda bakteriyosin üretildiği ve *S. aureus* sayısının kontrol altına alındığı yapılan çalışma sonucunda görülmüştür. Aynı işlemler bakteriyosin veya bakteriyosin üreten kültür süt ortamına eklenmeden önce yapılan sıcaklık uygulamasıyla (65°C'de 5 dk) birlikte tekrarlandığında, direkt

bakteriyosin eklenen örneklerde 2 saat içinde, kültür eklenen örneklerde 2 gün içinde patojen sayısının tespit edilemeyecek seviyenin altına düştüğü görülmüştür.

*E. faecalis* A-48-32 veya *E. faecium* UJA32-8 ( $10^6$  kob/mL) ile yapılan peynir örneklerinde olgunlaşma süresince *S. aureus* bakterisinin nasıl etkilendiğini inceleyen araştırmacılar, her iki kültürle yapılan örnekte kontrol grubuna göre patojen sayısında ilk gün belirgin bir azalma olduğunu ve sayının 30 gün boyunca bu seviyede kaldığını tespit etmişlerdir.

Laukova and Czikkova (1999) enterosin CCM 4231 kullanımı ile soya sütünde *L. monocytogenes* ve *S. aureus* gelişiminin nasıl etkilendiğini incelemişlerdir. *L. monocytogenes* Ohio suşunu 24 saat içerisinde inhibe eden enterosin CCM 4231, *S. aureus* bakterisini tam olarak inhibe edememiş ancak yine de 24 saat sonunda kontrol grupla örnek grubu arasındaki fark 3.55 log birim olarak bulunmuştur.

Guessas et al. (2007) keçi ve koyun sütünden ekstrakte ettikleri birçok laktik asit bakterisinin *S. aureus* bakterine karşı etkisini incelemişlerdir. Süt örneklerinde ekstrakte edilen 96 suşun *S. aureus* bakterisine karşı antagonistik etkiye sahipken bu etkinin çoğu zaman organik asit oluşumuna bağlı pH'daki düşüğe dayandığı belirtilmektedir. Laktik asit bakterilerinden yalnızca 2 tanesi; *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (Lc8) ve *L. lactis* subsp. *lactis* (Lc7) antimikrobiyel madde ile antagonistik etki göstermiştir. Bu iki bakteriden özellikle Lc8'in etkinliği oldukça yüksektir. Bu bakterinin, ısıya dayanıklı, protein yapısında, bakteriyosin diye kabul edilen bir madde ile inhibisyonu sağladığı yapılan testlerle ortaya koyulmuştur. Bu bakteriyosin, sütte *S. aureus* sayısını 48 saatlik inkübasyon sonunda tespit edilemeyecek seviyeye düşürmüştür. Bu çalışma ile Lc8 suşunun *S. aureus* bakterisine olan antagonistik etkisi gösterilmiş, peynir üretiminde kullanılabilir bir suş ortaya konulmuştur.

Muthukumarasamy and Holley (2007) sosis üretiminde geniş spektrumlu bir antimikrobiyel olan reuterin maddesini üreten *L. reuteri* bakterisi ile yine probiyotik özellikteki *Bifidobacterium longum* bakterilerini kullanmıştır. Sosis hamuruna starter kültürün yanı sıra, 7.4 log kob/g *E. coli* O157:H7, mikro kapsül içerisinde veya serbest halde *L. reuteri* ve/veya *B. longum* bakterileri inoküle edilmiştir. Reuterin üreten *L. reuteri* bakterisinin tek başına veya *B. longum* ile birlikte kullanıldığı sosis örneklerinde *E. coli* O157:H7 sayısında 3 log kob/g azalma

olduğu görülürken, *B. longum* tek başına 1.9 log kob/g azalma sağlayabilmiştir. Mikroapsl uygulaması, *L. reuteri* ve *B. longum* bakterilerinin peynirde daha uzun süre kalmalarını sağladıysa da *E. coli* O157:H7 bakterisine karşı inhibitör etkilerini azaltmıştır.

Bakteriyosin ve diğer antimikrobiyel maddelerin birlikte kullanılmasıyla oluşacak etkiyi inceleyen çalışmalar da mevcuttur. Arques et al. (2011) sütte reuterin ve bakteriyosinlerin (nisin, laktisin 481, enterosin I ve enterosin AS-48) ayrı ayrı ve birlikte kullanımının *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* zerine etkisini incelemişlerdir. Reuterinin nisin, laktisin 481 ve enterosin AS-48 ile birlikte kullanımının *L. monocytogenes* bakterisine güçlü sinerjetik etkili olduğu grlmştir. *S. aureus* bakterisine karşı reuterin etkisini yalnızca nisin arttırmıştır. Diğer patojenlere karşı reuterin etkisini hiçbir bakteriyosin arttıramamıştır.

Buyong et al. (1998) pediyosin PA-1 (*Pediococcus* tarafından üretilen bakteriosin) kodlayan pMC117 içeren *L. lactis* subsp. *lactis* MM217 starter kültürü ile yapılan Cheddar peynirinde *L. monocytogenes* bakterisinin varlığını incelemişlerdir. Bu amaçla, peynir yapılacak süt 2 gruba ayrılmış ve ilk gruba  $10^3$  kob/mL *L. monocytogenes* bakterisi ve  $10^6$  kob/mL genetik olarak pediyosin üretebilme özelliği kazandırılmış olan *L. lactis* subsp. *lactis* MM217 eklenirken, ikinci gruba  $10^3$  kob/mL *L. monocytogenes* ve  $10^6$  kob/mL pediyosin üretmeyen *L. lactis* subsp. *lactis* MM210 inoküle edilmiştir. 8°C'de 6 ay boyunca olgunlaşma bırakılan peynir örneklerinde, bakteri sayımı ve pediyosin tespiti yapılmıştır. Kontrol grubunda, *L. monocytogenes* sayısı 2 hafta içinde  $10^7$  kob/g yükselirken, 6 ay sonunda  $10^3$  kob/g olarak bulunmuştur. MM217 suşu ile yapılan peynir grubunda ise, pediyosin aktivitesi ile *L. monocytogenes* sayısının 1 hafta sonunda  $10^2$  kob/g, 3 ay sonunda ise 10 kob/g olduğu belirtilmiştir. Ayrıca kontrol grubunda pediyosin aktivitesi belirlenemezken, örnek grubu peynirlerinde pediyosin miktarının zaman geçtikçe azaldığı grlmştir. Her iki peynir grubuna ait pH değer, nem, NaCl ve yağ miktarının birbirine yakın değerlerde olması, pMC117 varlığının, MM217 suşunun peynir yapımındaki etkinliğini değiştirmediğini ortaya koymaktadır. Bu alışma ile pediyosin üreten suşların peynir yapımında kullanımı ile *L. monocytogenes* patojeninin gelişiminin engellenebileceği ortaya koyulmuştur.

Arques et al. (2005) iğ sütten yapılan peynir rneğinde *S. aureus* bakterisine karşı bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin ve yüksek basınç uygulamasının (2 veya 50. günde 300 MPa (10°C, 10 dk) veya 500 MPa (10°C, 5 dk) )ayrı ayrı ve birlikte etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla çiğ süte, 5 log kob/mL *S. aureus* bakterisi, starter kültür inoküle edilmiştir. Kontrol grubu dışındaki 7 gruba farklı bakteriyosin üreten laktik asit bakterileri % 0.1 kadar ilave edilmiştir. Olgunlaşmanın 3. gününde kontrol grubundaki *S. aureus* sayısı 6.46 log kob/g seviyesine ulaşırken, laktik asit bakterilerini içeren diğer örneklerde bu sayı 0.46 log kob/g kadar dşrlmştir. Kontrol gruba göre 300 MPa basınç uygulamasıyla 2 günün sonunda *S. aureus* sayısı 0.45 log kob/g, 500 MPa uygulamasıyla da 2.43 log kob/g kadar dşrlmştir. Hem bakteriyosin üreten bakterileri içeren hem de 2. günde basınç uygulaması yapılan örneklerde, olgunlaşmanın 3. gününde alınan sonuçlara göre patojen sayısı, 300 MPa basınç uygulamasına tabii tutulan grupta 1.02 log kob/g, 500 MPa basınç uygulanan örnek grubunda 4.00 log kob/g kadar azaltılmıştır. Bu alışma ile düşük basınçla gerçekleştirilecek yüksek basınç uygulaması ile bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin birlikte kullanımının hem güvenilir hem de tkstr özellikleri bozulmamış kaliteli peynir üretiminde kullanılabileceği ortaya koyulmuştur.

Rodriguez et al. (2005) bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin, *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7 zerine etkisini peynir ortamında incelemişlerdir. Peynir yapılacak olan süte  patojenden de 6 log kob/mL kadar inoküle edilmiştir. Starter kültürün yanı sıra kontrol grubu dışındaki 5 gruba %1 oranında *P. acidilactici* 347 (*Ped+*), *L. lactis* ESI 153, *L. lactis* ESI 515 (*Nis+*), *L. lactis* CL1 (*Ped+*) ve *L. lactis* CL2 (*Nis+*, *Ped +*) bakterileri eklenmiştir. 30 gün süren olgunlaşma süresince, belirli aralıklarla alınan örnek gruplarında, patojen bakteri sayımı ve bakteriyosin tespiti yapılmıştır. Kontrol grubunda 30 günün sonunda *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7 sayım sonuçları sırasıyla 5.30, 5.16 ve 4.14 log kob/ g olarak kaydedilmiştir. Pedyosin reten *L. lactis* CL1 ve *L. lactis* CL2 suşları kontrol gruba göre *L. monocytogenes* sayısını 2.97 ve 1.64 log, *S. aureus* sayısını 0.98 ve 0.40 log ve *E. coli* O157:H7 sayısını 0.84 ve 1.69 log birim kadar azalmıştır. Nisin üreten laktik asit bakterisi (*L. lactis* ESI 515 (*Nis+*)), olgunlaşma süresince bakteriyosin aktivitesi gösterirken, pediyosin aktivitesi gösteren tek suş olarak *L. lactis* CL1 kaydedilmiştir. Bu alışma

ile güçlü antimikrobiyel aktiviteye sahip pediyosin PA-1 bakteriyosininin, süt ortamında iyi gelişme gösteren laktik asit bakterileri tarafından üretilebiliyor olmasıyla güvenilir peynir üretiminde kullanılabileceği ortaya koyulmuştur.

## 5. SONUÇ

Gıda zehirlenmelerine neden olan bakteriler arasında önemli bir yeri olan *S. aureus* bakterisinin, süt ve peynir gibi süt ürünlerinden sık sık izole edildiği ve salgınlara neden olduğu bilinmektedir. Çiğ süttten yapılan peynirlerin bakteri ile kontamine olması, gıda kaynaklı hastalık riskini daha da arttırmaktadır.

Peynirlerin mikrobiyolojik kalitesi ve güvenilirliği için, hammadeden son ürüne kadar, sağlıklı üretim sağlanmalı, üretim hattı boyunca alınan örneklerin mikrobiyolojik durumu periyodik olarak değerlendirilmelidir. Bunun yanı sıra üretilen peynirler, depolama ve dağıtım aşamalarında ürünün kalitesini olumsuz yönde etkileyecek koşullara maruz bırakılmamalıdır. Gelişen gıda bilimi ve teknolojisi çerçevesinde peynir dahil birçok fermente ürünün mikrobiyolojik kalitesinin sağlanmasında probiyotik özellikteki laktik asit bakterilerinden yararlanılabileceğini gösteren birçok çalışma mevcuttur.

Yapılan çalışmalarda, kültür ortamında belirli bir konsantrasyona kadar geliştirilen laktik asit bakterileri ve test edilecek patojen mikroorganizma, üretilen ürünün hammaddesine ilave edilmekte, üretim boyunca ve olgunlaşma süresince belirli örnekler alınarak yapılan mikrobiyolojik sayım sonucunda probiyotiklerin patojenler üzerine etkisi belirlenmektedir. Bazı araştırmacılar yaptıkları testlerle bu etkiyi, laktik asit bakterilerince üretilen organik asit, hidrojen peroksit, karbon dioksit, bakteriyosin, reuterin, diasetil gibi maddelere dayandırmaktadır. Bu çalışmada, Beyaz peynirlerde, *L. brevis* ve *P. pentosaceus* bakterilerinin *S. aureus* bakterisine etkisi ayrı ayrı incelenmiştir. Üretim boyunca ve 3 aylık olgunlaşma süresince periyodik olarak bakteri sayımı gerçekleştirilmiştir. EMS yöntemiyle yapılan *S. aureus* sayımının ardından PZR yöntemi kullanılmıştır.

Bu çalışmada elde edilen bulgular; *L. brevis* BG18'in *S. aureus* ATCC 6538 bakterisine karşı Beyaz peynir ortamında istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahipken, *P. pentosaceus* BH105 bakterisinin çok fazla etkili olmadığını göstermektedir. Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilen Türkiye'ye endemik bu suşların, *S. aureus*'a karşı antimikrobiyel etkisi "agar overlay" ve "well diffusion" yöntemleriyle belirlenmiştir. Kültür ortamında etkili olan *P. pentosaceus* bakterisi peynir ortamında yüksek bir etki gösterememiştir. Ancak bu araştırmada

aynı zamanda doğrudan laktik asit bakterilerinin peynir ortamına ekilerek yapılması ve kısmen de olsa bir etki gözlenmesi açısından da önemlidir.

Yapılacak ileri çalışmalarla, farklı matriks yapıda üretilecek Beyaz peynirde, daha düşük tuz konsantrasyonlu salamura kullanarak Türkiye'ye endemik olan bu iki suşun patojene karşı antimikrobiyel etkisinin incelenmesi ve gıda teknolojisinde yerini alması önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Ananou, S., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., Galvez, A., Valdivia, E., 2005, Control of *S. aureus* in sausages by enterocin AS-48, *Meat Science*, 71, 549–556.
- Anonim, 2007, T.C. Başbakanlık, Devlet Planlama Teşkilatı, Dokuzuncu Beş Yıllık Kalkınma Planı (2007-2013), Gıda Sanayi Özel İhtisas Komisyonu Raporu. DPT: 2720, ÖİK: 673, ANKARA.
- Apan, M., Evren M., Evren S., Tutkun E. 2011, Geleneksel fermente gıdalarda bulunan laktik asit bakterileri, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 9(1), 11-17.
- Araujo, V.S., Pagliares, V.A., Queiroz, M.L.P., Freitas-Almeida, A.C., 2002, Occurance of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil, *Journal of Applied Microbiology*, 92, 1172-1177.
- Arques, J. L., Rodriguez, E., Gaya, P., Medina, M., Guamis, B., Nunez, M., 2005, Inactivation of *S. aureus* in raw milk cheese by combinations of high-pressure treatments and bacteriocin producing lactic acid bacteria, *Journal of Applied Microbiology*, 98, 254–260.
- Arques, L.J., Rodriguez, E., Nunez, M., Medina, M., 2011, Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in milk, *Food control* 22, 457-461.
- Atanassova, V., Meindl, A., Ring, C., 2001, Prevalence of *S. aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham a comparison of classical culturing detection and RFLP- PCR, *Journal Food Protection*, 63, 1144-1153.
- Bone, F.J., Bogie, D., Morgan-Jones, S.C., 1989, Staphylococcal food poisoning from sheep milk cheese, *Epidemiology and Infection*, 103, 449-458.
- Brock, T.D., Madigan, M.T., 2006, *Biology of Microorganisms*, 11. Edition, Pearsen Prentice Hall, New Jersey, A.B.D.
- Bulut, Ç., 2003. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from cheese, İzmir Institute of Technology, Master of Science.
- Buyong, N., Kok, J., Luchansky, B.J., 1998, Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in cheddar cheese, *Applied and Environmental Microbiology*, 64,12, 4842.
- Caldwell, S.L., McMahon, D.J., Oberg, C.J., Broadbent, J.R., 1996, Development and characterisation of lactose-positive *Pediococcus* species from milk fermentation, *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 936-941.

- Caplice, E., Fitzgerald, G.F. 1999, Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation, *International Journal of Food Microbiology*, 50, 131-149.
- Charlier, C., Even, S., Gautier, M., Loir, L.Y., 2008, Acidification is not involved in the early inhibition of *S. aureus* growth by *Lactococcus lactis* in milk, *International Dairy Journal*, 18,197–203.
- Chen, T., Hsiao, M., Chiou, C., Tsen, H., 2001, Development and use of PCR primers for the investigation of C1, C2 ve C3 enterotoxin types of *S. aureus* strains isolated from food-borne outbreaks, *International Journal of Food Microbiology*, 71, 63-70.
- Chen, H., Hoover, D.G., 2003, Bacteriocins and their food applications, *Food Safety* 2(3), 82-100.
- Çakır, İ., 2003, *Lactobacillus*. ve *Bifidobacteri*lerde bazı probiyotik özelliklerin incelenmesi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, ANKARA.
- Çakır, P., 2007, Gıda ve insan kaynaklı *S.aureus* strainlerinin karakterizasyonu, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, ESKİŞEHİR.
- de Martinis, E.C.P, Alves, V.F., Franco, B.D.G.M., 2002, Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products, *Food Reviews International*, 18, 2-3, 191-208.
- Devrim, A.K., Kaya, N., 2004, Polimeraz zincir reaksiyonu, Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi 10(2), 209-214.
- Duman, T., 2007, Tavuk karkaslarından izole edilen *Staphylococcus*ların virülans faktörleri ve antibiyotik dirençliliği, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Fakültesi Biyoloji Bölümü Yüksek Lisans Tezi, ANKARA.
- Eklund, T., 1989, Organic acids and esters, In Gould, G.W., Russell, J. N., *Food preservatives*.
- Erkmen, O., 2000, Inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* in Turkish White cheese during the ripening period. *Journal of Food Engineering*, 46(2), 127-131.
- Erol, İ., İşeri, Ö., 2004, Stafilokokal enterotoksinler, Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 51, 239-245.
- Evenson, M.L., Hinds, M.V., Bernstein, R.S., Bergdoll, M.S., 1988, Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *International Journal of Food Microbiology*, 7, 311-316.

- Foster, T. 2004, *S. aureus* 'superbug', The Jurnal of Clinical Investigation, 114, 12, 1693-1696.
- Fuller , R., 1989, Probiotics in man and animals, Journal of Applied Bacteriology 66, 365-378.
- Fueyo, J.M., Martin, M.C., Gonzales-Hevia, M.A., Mendoza, M.C., 2001, Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *S. aureus* isolated from human and food samples, Relation between genetic types and enterotoxins, International Journal of Food Microbiology, 67, 139-145.
- Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., Omar N.B., 2007, Bacteriocin-based strategies for food biopreservation, International Journal of Food Microbiology, 120, 51-70.
- Gomes, A.M.P., Malcata, F.X., 1999, *Bifidobacterium* spp. and *L. acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics, Trends in Food Science & Technology 10, 139-157.
- Guessas, B., Hadadji, M., Saidi, N., Kihal, M., 2007, Inhibition of *S. aureus* growth by lactic acid bacteria in milk. African Crop Science Conference Proceeding, 8, 1159-1163.
- Gülbandılar, A., 2006, Kütahya yöresinde çeşitli kaynaklardan elde edilen *S. aureus* izolatlarının karakterizasyonu, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, ESKİŞEHİR.
- Gündoğan, N., Çitak, S., Turan, E., 2005, Slime production, Dnase Activity and Antibiotic Resistance of *S. aureus* Isolated from Raw Milk, Pasteurised Milk and Ice Cream Samples, Food Control.
- Güneş, H., 2008, Metisiline dirençli stafilokoklarda glikopeptid antibiyotiklere duyarlılık durumunun araştırılması, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ISPARTA.
- Hacıbektaşoğlu, A., Eyigün, C.P., Özsoy, M.F., 1993, Gıda elleyicilerinde burun ve boğaz portörlüğü, Mikrobiyoloji Bülteni, 27, 62-70.
- Hayaloğlu, A.A., Güven, M., Fox, P.F., 2002, Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish white cheese 'Beyaz Peynir', International Dairy Journal, 12, 635-648.
- Hechard, Y., Sahl, H.G., 2002, Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram positive bacteria, Biochimie, 84, 545-557.
- Holeckova, B., Holoda, E., Fotta, M., Kalinacova, V., Gondo, I. J., Grolmus, J., 2002, Occurrence of enterotoxigenic *S. aureus* in food, Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 9(2), 179-82.

- Kaban, G., Kaya, M., 2006, Effect of starter culture on growth of *S. aureus* in sucuk, *Food Control*, 17, 797–801.
- Kaynar, Z., Kaynar, P., Koçak, C., 2005, Ankara piyasasında tüketime sunulan Beyaz peynirlerin hijyenik kalitelerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 62(1-2-3), 1-10.
- Klaenhammer T. R., Kullen M. J., 1999, Selection and design of probiotics, *International Journal of Food Microbiology* 50, 45–57.
- Klein G, Pack A, Bonaparte C, Reuter G. 1998, Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal Food Microbiology*, 41,103-125.
- Konaç., Y., 2006, Beyaz peynir örneklerinde *S. aureus*'un farklı selektif besiyerinde sayımı ve tanımlanması, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, ANKARA.
- Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., Drosinos, H. E., 2010, Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels, *Food control*, 21, 805-815.
- Kutlu, S.B., 2006, Çeşitli gıda örneklerinde izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında metisilin direnci ve e-test ile vankomisin mic değerlerinin araştırılması, Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi.
- Küçükçetin, A., Milci, S., 2008, *S. aureus* ile kontamine olan peynirlerden kaynaklanan gıda zehirlenmeleri, *Gıda* 33, 3, 129-135.
- Laukova, A., Czikkova, S., 1999, The use of enterocin CCM 4231 in soy milk to control the growth of *Listeria monocytogenes* and *S. aureus*, *Journal of Applied Microbiology*, 87, 182-186.
- Leary, J.J., Engels, K., Dada, M.A., 1997, Origins of the polymerase chain reaction in pathology, *Journal of Clinical Pathology*, 50, 805-810.
- Leroy, F., de Vuyst 2004, Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry, *Trends in Food Science & Technology*, 15, 67-78.
- Marc, L., Valik, L., Medved'ova, A., 2009, Modelling the effect of the starter culture on the growth of *S. aureus* in milk, *International Journal of Food Microbiology*, 129, 306-311.
- Meynard, A., Boutrand-Loei, S., Ray-Gueniot, S., Mazuy, C., Gaspard, C.E., Jaubert, G., Perrin, G., Lapeyre, C., Rozand-Vernozy, C., 1998, Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from goats' milk, *Journal of Applied Microbiology*, 85, 537-544.

- Munoz, A., Ananou, S., Galvez, A., Martinez-Bueno, M., Rodriguez, A., Maqueda, M., Valdivia, E., 2007, Inhibition of *S. aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism with heat, *International Dairy Journal*, 17, 760-769.
- Muthukumarasamy, P., Holley, R.A., 2007, Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry fermented sausages containing micro-encapsulated probiotic lactic acid bacteria, *Food Microbiology*, 24, 82-88.
- Nes, I.F., Holo, H., 2000, Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria, *Biopolymers (Peptide Science)*, 55, 50-61.
- Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Decastelli, L., Mioni, R., Scuota, S., Bolzoni, G., Di Giannatale, E., Salinetti, A.P., La Salandra, G., Bartoli, M., Zuccon, F., Prino, T., Sias, S., Parisi, A., Quaclia, N.C., Celano, G.V., 2005, Coagulase-positive resistant staphylococci and *S. aureus* in food products marketed in Italy, *International Journal of Food Microbiology*, 98, 73-79.
- Nunez, M., Rodriguez, J.L., Garcia, E., Gaya, P., Medina, M., 1997, Inactivation of *Listeria monocytogenes* by enterocin-4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese, *Journal of Applied Microbiology*, 83, 671-677.
- Öner, Z., Karahan, A.G., Aloğlu, H., 2006, Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal Turkish white cheese during ripening, *LWT-Food Science and Technology*, 39, 449-454.
- Pinto B., Chenoll, E., Aznar, R., 2005, Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques, *Systematic and Applied Microbiology*, 28, 340-352.
- Radovanovic, R.S., Katic, V., 2009, Influence of Lactic acid bacteria isolates on *S. aureus* growth in skimmed milk, *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 15(3), 196-203.
- Raj, H.D., Bergdoll, M.S., 1969, Effect of enterotoxin B on human volunteers, *Journal Bacteriology*, 98, 833-834.
- Rodriguez, E., Arques, J.L., Nunez, M., Gaya, P., Medina, M., 2005, Combined Effect of High-Pressure Treatments and Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria on Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in Raw-Milk Cheese, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3399–3404.
- Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C., 2002, Preservation and fermentation: past, present and future, *International Journal of Food Microbiology*, 79, 3-16.
- Sağdıç, O., Küçüköner, E., Özçelik, S., 2004, Probiyotik ve prebiyotiklerin fonksiyonel özellikleri, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35 (3-4), 221-228.

- Sağun, E., Alişarlı, M., Durmaz, H., 2003, Farklı sıcaklıklarda muhafazanın çiğ köftede *S.aureus*'ün gelişimi ve enterotoksin üretimi üzerine etkisi, Turk Journal Veteriner Animal Scientis, 27, 839-845.
- Sakhare, P.Z., Rao, N.D., 2003, Microbial profiles during lactic fermentation of meat by combined starter cultures at high temperatures. Food Control, 14,1-5.
- Salminen, S., Bouley, M.C., Boutron-Rualt, M.C., Cummings, J., Franck, A., Gibson, G., Isolauri, E., Moreau, M.-C., Roberfroid, M., Rowland, I. 1998, Functional food science and gastrointestinal physiology and function, British Journal of Nutrition, Supplement 1, 147-171.
- Sameshima, T., Magome, C., Takeshita, K., Arihara, K., Itoh, M., Kondo, Y., 1998, Effect of intestinal starter cultures on the behaviour of *S. aureus* in fermented sausage, International Journal of Food Microbiology, 41, 1-7.
- Sandel, M.K., Mc Killip, J.L., 2004, Virulence and recovery of *S. aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches, Food Control, 15, 5-10.
- Seçkin, K. A., Tosun H., Aritürk R., 2010, Biyokorumanın süt endüstrisinde kullanım olanakları, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 5(3), 36-46.
- Steward, C.M., Cole, M.,B., Legan, J.D., Slade, L., Vandeven, M.H., Schaffner, D.W., 2002, *Staphylococcus aureus* growth boundaries: moving towards mechanistic predictive models based on solute-specific effects, Applied Environmental Microbiology, 68, 1864-1871.
- Stiles, M.E., Holzapfel, W.H. 1997, Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy, International Journal of Food Microbiology, 36, 1-29.
- Sullivan, L., Ross, R.P., Hill, C., 2002, Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality, Biochimie, 84, 593-604.
- Taban, B., 2007, İmmünomanyetik ayırma-polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin uygulanması ile tavuk etlerinde *Salmonella* spp. belirlenmesi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, ANKARA.
- Temelli, S., Anar, Ş., Sen, C., Akyuva, P., 2006, Determination of microbiological contamination sources during Turkish white cheese production, Food Control 17, 856-861
- Tondo, E.C., Guimarães, M.C.M., Henriques, J.A.P., Ayub, M.A.Z., 2000, Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE, Canadian Journal of Microbiology, 46, 1108-1113.

- Tükel, Ç., Doğan, H.B., 1999, "S. aureus Aranması" Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, 233-238.
- Tükel, Ç., Doğan, H.B., 2000, S. aureus, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, 357-366, ANKARA.
- Twomey, D., Ross, R.P., Ryan, M., Meany, B., Hill, C., 2002, Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and application, Antonie van Leeuwenhoek, 82, 165-185.
- Uymaz, B., Şimşek, Ö., Akkoç, N., Ataoğlu, H., Akçelik, M., 2009, In vitro characterization of probiotic properties of *Pediococcus pentosaceus* BH105 isolated from human faeces, Annals of Microbiology, 59(3), 485-491.
- Ünal, N., 2007, İnsan ve hayvan kökenli *Staphylococcus aureus* izolatlarının fenotipik ve genotipik özellikleri üzerine çalışmalar, Kırıkkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi.
- Villard, L., Lamprell, H., Maurin, F., Noel, Y., Beuvier, E., Chamba, J.F. ve Kodjo, A., 2005, Enterotoxin D producing strains of *S.aureus* are typeable by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), Food Microbiology, 22, 261-265.
- Vural, H., Öztan, A., 1993, Effects of starter cultures on growth of *S. aureus* in fermented meat products, Gıda, 18(4), 259-263.
- Wang, J., Huang, T., Chang, Y., Shih, D.Y., 2003, Subtyping of enterotoxin C strains isolated from food poisoning outbreak in Taiwan, Journal of Food and Drug Analysis, 11(3), 239-245.
- Wishah, R., 2007, Peynir üretiminde starter kültürlerine ek olarak bazı bakteriyel suşlarının kullanımı ve bunun peynir özelliklerine etkisi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, ANKARA.
- Yang, R.G., Johnson, M.G., Ray, B., 1992, Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria, Applied and Environmental Microbiology, 58, 3355-3359.
- Yarlı, İ., 2005, *S. aureus* suşlarında çeşitli virulans faktörlerinin araştırılması, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL.

## **EK 1. ÇALIŞMADA KULLANILAN BESİYERLERİ**

### **Triptik Soy (TS) Broth-MERCK Cat No. 1.05459**

Mikroorganizmaların geliştirilmesinde kullanılmıştır.

17 g/L kazein tamponu, 3 g/L soya peptonu, 2.5 g/L D(+) glukoz, 5 g/L NaCl ve 2.5 g/L K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> içeren hazır karışımdan 30 gram tartılarak, 1000 mL destile su içerisinde çözündürülür. Test tüplerine gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile sterilize edilir. Besiyerini içeren tüpler, 4°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Taban, 2007).

### **Triptik Soy (TS) Agar-MERCK Cat. No. 1.05458**

Kültürel sayım amaçlı mikroorganizmaların geliştirilmesinde kullanılmıştır.

15 g/L kazein tamponu, 5 g/L soya peptonu, 5 g/L NaCl ve 15 g/L agar içeren hazır karışımdan 40 g tartılarak, 1000 mL destile su içerisinde çözündürülür. Çözünme işleminin verimini arttırmak için su banyosunda bekletilir. Ardından besiyeri otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası, steril petri kaplarına dökülen besiyeri katılaşmaya bırakılır. Besiyerini içeren petri kapları, ters olarak, 4°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi yüzeyleri kurutulmalıdır (Taban, 2007).

### **Baird Parker Agar (BPA)–MERCK Cat. No. 1.05406**

Seçici katı besiyerine ekim basamağında kullanılmıştır.

Hazır karışımdan 58 g tartılarak, 950 mL destile su içerisinde çözündürülür. Çözünme işleminin verimini arttırmak için su banyosunda bekletilir. Erlen veya balon gibi cam kaplardaki besiyeri otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası, 50 mL steril egg-yolk tellurite emulsion ilave edilir ve steril petri kaplarına dökülen besiyeri katılaşmaya bırakılır. Besiyerini içeren petri kapları, ters olarak, 4°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi yüzeyleri kurutulmalıdır.

**MRS Broth- MERCK Cat. No. 1.10661**

Mikroorganizmaların geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Hazır karışımdan 52.2 g tartılarak, 1000 mL destile su içerisinde çözündürülür. Test tüplerine gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile sterilize edilir. Besiyerini içeren tüpler, 4°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir.

**MRS Agar- MERCK Cat. No. 1.10660**

Seçici katı besiyerine inokülasyon basamağında kullanılmıştır.

Hazır karışımdan 68.2 g tartılarak, 1000 mL destile su içerisinde çözündürülür. Çözünme işleminin verimini arttırmak için su banyosunda bekletilir. Erlen veya balon gibi cam kaplardaki besiyeri otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası, uygun sıcaklığa (40°C) soğutulan besiyeri, 1 mL kültür inokülasyonu yapılmış steril petri kaplarına dökülür ve katılaşmaya bırakılır.

## **EK 2. ÇALIŞMADA KULLANILAN SELEKTİVİTE AJANLARI**

### **Pirüvik asit-MERCK Cat. No. 1.06619**

EMS basamağında TSB besiyerine ilave edilip besiyerinin *S. aureus* bakterisine karşı seçiciliğini arttırmak için kullanılmıştır.

1000 mL TS borth besiyerine hazırlık aşamasında 10 g pirüvik asidin sodyum tuzu ( $C_3H_3NaO_3$ ) (110.04 g/mol) tartılarak eklenmiştir.

### **Egg yolk tellurit emülsiyonu % 20 - MERCK Cat. No. 1.03785**

50 mL hacimde steril halde tüplerde olan bu ürün iyice karıştırılır ve sterilize edilmiş 950 mL BP agar besiyerine ilave edilir.

## **EK 3. ÇALIŞMADA KULLANILAN TAMPON VE ÇÖZELTİLER**

### **Butterfield's Phosphate (BFP)**

Ardışık dilüsyonların hazırlanmasında ve peynir örneklerinin sulandırılmasında kullanılmıştır. Stok çözeltiden 1 mL alınarak distile su ile 1000 mL hacme tamamlanarak kullanılmıştır.

Stok çözelti için 3.4 g potasyum dihidrojen fosfat (68 g/L) tartılarak 50 mL destile su içerisinde çözündürülür. 1 N NaOH çözeltisinden yaklaşık 17.5 mL ilave edilerek pH 7.2 'ye ayarlanır. İstenilen pH' ya ulaşıncaya toplam çözelti 100 mL'ye tamamlanır. Stok çözelti otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile sterilize edilir ve 4°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir.

### **Lambda Tamponu**

DNA izolasyonu ve saflaştırılması basamağında kullanılmıştır.

5.8 g NaCl, 5 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 50 mL 1 M Tris-HCl çözeltisi (pH 7.5) tartılarak, 1000 mL destile su içerisinde çözündürülür. Test tüplerine gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile sterilize edilir. Çözelti, 4°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Taban, 2007).

### **10 mM Tris-HCl Çözeltisi (pH: 8.0)**

Lizozim çözeltisinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

1.211 g Tris, 1000 mL destile su içinde çözündürülür ve çözeltinin pH'sı, HCl çözeltisi ile 8.0'e ayarlanır. Erlen veya cam kaplara dağıtılan çözelti 121°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile sterilize edilir. Çözelti, oda sıcaklığında muhafaza edilmelidir.

### **10 mg/mL Lizozim Çözeltisi**

DNA izolasyonu ve saflaştırılması basamağında kullanılmıştır.

0.01g lizozim tartılarak, 1 mL steril 10 mM Tris-HCl çözeltisi (pH:8.0) içerisinde çözündürülür. Mikrosantrifüj tüpü steril plastik tüplere gerekli miktarlarda

dağıtılarak, -18°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Taban, 2007).

### **0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA (Disodyum etilendiamin tetraasetik asit) Çözeltisi (pH:8.0)**

Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tamponu hazırlanmasında kullanılmıştır.

186.12 g/L Na<sub>2</sub>EDTA-2H<sub>2</sub>O içeren çözeltinin pH'sı NaOH çözeltisi ile 8.0'a ayarlanır. Erlen veya cam kaplara gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile sterilize edilir. Çözelti, oda sıcaklığında muhafaza edilmelidir (Taban, 2007).

### **Tris-Borik asit-EDTA (TBE) Tamponu (10X)**

Agaroz jel elektroforez basamağında bu tamponun 10 kat seyreltilmiş hali (1X) kullanılmıştır.

108 g Tris, 55 g Borik asit ve 40 mL 0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA çözeltisi (pH : 8.0) 1000 mL destile su içerisinde çözündürülür. Erlen veya balon gibi cam kaplara gerekli miktarlarda dağıtılarak, oda sıcaklığında muhafaza edilmelidir (Taban, 2007).

## **EK 4. ÇALIŞMADA KULLANILAN BOYA ÇÖZELTİLERİ**

### **1 mg/mL Etidyum bromür Çözeltisi**

Agaroz jel elektroforez basamağında kullanılmıştır.

1mg etidyum bromür, 1 mL steril destile su içerisinde çözündürülür. Steril mikrosantrifüj tüpüne gerekli miktarda dağıtılarak, 4°C sıcaklıkta ve karanlıkta muhafaza edilmelidir.

Etidyum bromür son derece mutajenik ve toksik bir madde olduğundan, bu boya çözeltisinin hazırlanma sırasında ve çalışılırken mutlaka eldiven giyilmeli ve maske kullanılmalıdır (Taban, 2007).

### **6X Yükleme Boya Çözeltisi**

Agaroz jel elektroforez basamağında kullanılmıştır.

Bileşimi, 10 mM Tris-HCl çözeltisi (pH: 7.6), hacimce % 0.03 bromfenaol mavisi, % 0.03 ksilen siyanol FF, hacimce % 60 gliserol ve 60 mM EDTA çözeltisi olan boya çözeltisi -18°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi 4°C sıcaklıkta tutularak çözündürülmelidir (Taban, 2007).

## EK 5. ÇALIŞMADA KULLANILAN KİTLER

### High Pure PCR Template Preparation Kit-ROCHE Cat. No. 11 796 828 001

DNA izolasyonu ve saflaştırılması basamağında kullanılmıştır (Taban, 2007).

Çizelge 5.1. High pure PCR template preparation kit içeriği

İÇERİK	MİKTAR
Doku eritme tamponu (pH: 7.4)	20 mL
Bağlama Tamponu (pH: 4.4)	20 mL
Proteinaz K	100 mg
İnhibitör uzaklaştırma tamponu (pH:6.6)	33 mL
Yıkama tamponu	20 mL
Ayırma tamponu (pH: 8.5)	40 mL
Steril filtre başlık	100 adet
2.0 mL'lik steril toplama tüpü	400 adet

- Doku eritme tamponu çalışma esnasında kullanılmamıştır.
- Proteinaz K, liyofilize halde bulunmaktadır ve 4.5 mL ultra saf su ile karıştırılarak çözelti haline getirilmiştir. -18 °C sıcaklıkta muhafaza edilen çözelti kullanım öncesi 4°C sıcaklıkta tutularak çözündürülmelidir.
- İnhibitör uzaklaştırma tamponu, 20 mL etanol ile karıştırılarak kullanılmaktadır.
- Yıkama tamponu 80 mL saf etanol ile karıştırılarak kullanılmaktadır.

## EK 6. ÇALIŞMADA KULLANILAN OLİGONÜKLEOTİDLER

### *nuc*- F166 İleri primeri ve *nuc*-R565 Geri Primeri

Çalışmanın PZR basamağında kullanılmışlardır.

Çizelge 6.1. *nuc*-F166 ileri primerinin özellikleri

<b>BİLEŞİM</b>	
5'- AGT TCA GCA AAT GCA TCA CA-3'	
<b>Uzunluk</b>	20 baz
<b>Molekül Ağırlığı</b>	6094 g/mol
<b>Tm</b>	54°C
<b>GC içeriği</b>	% 40
<b>Saflaştırma</b>	HPLC
<b>Miktar</b>	83.1 µg, 13.6 nmol

*nuc* - F166 ileri primeri, liyofilize halde bulunmaktadır ve 136 µL ultra saf su ile karıştırılarak 100 pmol/ µL'lik çözelti haline getirilir. Ancak çalışma esnasında kullanılmak üzere, 20 pmol/ µL'lik stok çözeltisi hazırlanır. Stok çözelti, -18°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi 4°C sıcaklıkta tutularak çözündürülmelidir.

Çizelge 6.2. *nuc*-R565 geri primerinin özellikleri

<b>BİLEŞİM</b>	
5'- TAG CCA AGC CTT GAC GAA CT-3'	
<b>Uzunluk</b>	20 baz
<b>Molekül Ağırlığı</b>	6086 g/mol
<b>Tm</b>	58°C
<b>GC içeriği</b>	% 50
<b>Saflaştırma</b>	HPLC
<b>Miktar</b>	85.3 µg, 14.0 nmol

*nuc* - R565 geri primeri, liyofilize halde bulunmaktadır ve 140 µL ultra saf su ile karıştırılarak 100 pmol/µL'lik çözelti haline getirilir. Ancak çalışma esnasında kullanılmak üzere, 20 pmol/µL'lik stok çözeltisi hazırlanır. Stok çözelti, -18°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi 4°C sıcaklıkta tutularak çözündürülmelidir.

## **EK 7. ÇALIŞMADA KULLANILAN JEL**

### **% 1.5'lik Agaroz Jeli (w/v)**

1.5 g agaroz tartılarak 100 mL TBE tamponu (1X) içerisinde kaynar su banyosunda çözündürülür. 60°C sıcaklığa soğutulan çözeltiliye, 1 mg/mL etidyum bromür\* çözeltilisinden 3 µL eklenir ve karıştırılarak, uygun ebatlardaki jel tablasına dökülür. Jel tarağı ilgili yere yerleştirilir ve jel katılaşmaya bırakılır. Katılaşma işlemi sonunda, jele zarar vermeden yavaş bir şekilde tarak yerinden çıkartılır. Oluşturulan jel, bekletilmeden elektroforez işleminde kullanılır.

## EK 8. EMS TABLOSU

Dilüsyonlar			EMS	% 95 Güvenlik Sınırları	
10 mL	1 mL	0.1 mL		En az	En çok
0	0	0	>0,02	-	-
1	0	0	0,02	<0,01	0,13
1	1	0	0,04	0,01	0,16
1	1	1	0,06	0,02	0,19
2	0	0	0,04	0,01	0,18
2	1	0	0,07	0,02	0,21
2	1	1	0,09	0,03	0,25
2	2	0	0,09	0,04	0,25
2	2	1	0,12	0,05	0,28
2	2	2	0,14	0,06	0,32
3	0	0	0,08	0,03	0,24
3	1	0	0,11	0,04	0,29
3	1	1	0,14	0,06	0,33
3	2	0	0,14	0,06	0,33
3	2	1	0,17	0,08	0,38
3	2	2	0,2	0,1	0,42
3	3	0	0,17	0,08	0,38
3	3	1	0,21	0,1	0,43
4	0	0	0,13	0,05	0,34
4	1	0	0,17	0,07	0,4
4	1	1	0,21	0,1	0,47
4	2	0	0,22	0,1	0,48
4	2	1	0,26	0,13	0,55
4	2	2	0,32	0,16	0,63

4	3	0	0,27	0,13	0,57
Dilüsyon			EMS	% 95 Güvelik Sınırları	
10 mL	1 mL	0.1 mL		En az	En çok
4	3	1	0,33	0,16	0,65
4	3	2	0,39	0,02	0,74
4	4	0	0,34	0,17	0,67
4	4	1	0,4	0,21	0,77
5	0	0	0,23	0,1	0,56
5	1	0	0,33	0,15	0,73
5	1	1	0,46	0,22	0,96
5	2	0	0,49	0,24	1,03
5	2	1	0,7	0,35	1,4
5	2	2	0,94	0,49	1,81
5	3	0	0,79	0,4	1,58
5	3	1	1,09	0,57	2,09
5	3	2	1,41	0,76	2,61
5	3	3	1,75	0,97	3,16
5	4	0	1,3	0,68	2,5
5	4	1	1,72	0,93	3,2
5	4	2	2,21	1,22	3,99
5	4	3	2,78	1,58	4,9
5	4	4	3,45	2,01	5,95
5	5	0	2,4	1,29	4,46
5	5	1	3,48	1,93	6,28
5	5	2	5,42	3,08	9,55
5	5	3	9,18	5,33	15,81
5	5	4	16,09	9,53	27,19
5	5	5	>160,00	-	-

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Münevver Yücebay

Doğum Yeri : KIBRIS

Doğum Yılı : 30 Aralık 1988

Medeni Hali : Bekar

### Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : 2002 – 2005 Türk Maarif Koleji

Lisans : 2005 – 2009 Hacettepe Üniversitesi

Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce (çok iyi), Almanca (orta)

İş Tecrübesi : Kasım 2011 – Devam ediyor Gıda Mühendisi

Eziç Chicken Bar Ltd.