

**ANNE SÜTÜNDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN GIDA TEKNOLOJİSİ AÇISINDAN
ÖNEMLİ OLAN BAZI ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**DETERMINATION OF SOME IMPORTANT PROPERTIES
OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM HUMAN
MILK BASED ON FOOD TECHNOLOGY**

UFUK BAĞCI

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

GIDA Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2012

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

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

BAŞKAN :.....
Prof. Dr. Leyla AÇIK

ÜYE (DANIŞMAN) :.....
Prof. Dr. Ayhan TEMİZ

ÜYE :.....
Prof. Dr. A.Kadir HALKMAN

ÜYE :.....
Prof. Dr. Halil VURAL

ÜYE :.....
Doç. Dr. Ali TOPCU

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../2012 tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca/...../2012 tarihinde kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Fatma Sevin DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ANNE SÜTÜNDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN GIDA TEKNOLOJİSİ AÇISINDAN ÖNEMLİ OLAN BAZI ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

UFUK BAĞCI

ÖZ

Bu tez çalışmasında, anne sütünden izole edilen laktik asit bakterileri (LAB) tanımlanarak, gıda endüstrisi açısından önemli olan bazı özellikleri belirlenmiştir. 16S rRNA sonuçları göz önüne alınarak tanımlanan 23 adet *Enterococcus faecalis*, 6 adet *E. faecium*, 8 adet *Streptococcus salivarius*, 2 adet *Lactobacillus gasseri* ve 1 adet *Pediococcus acidilactici* suşu gıda endüstrisinde kullanıma potansiyeli bulunan LAB olarak tespit edilmiştir. Bu suşlar enzim profilleri, biyogen amin oluşturma özellikleri, antibiyotik dirençlilikleri, antimikrobiyel aktiviteleri ve bakteriyosin oluşturma yetenekleri açısından incelenmiştir. Çalışılan suşlarda tirozin dekarboksilaz dışında herhangi bir dekarboksilaz aktivitesi belirlenmemiştir. Suşların büyük bir çoğunluğu kloramfenikol, ampisilin, penisilin, vankomisin ve gentamisin'e duyarlı, kanamisin ve eritromisin'e ise dirençlidir. Antimikrobiyel aktivite gösterdiği belirlenen suşlardan 7 adedinin bakteriyosin ürettiği tespit edilmiştir. Bakteriyosin üreten suşların yüksek sıcaklık, düşük pH ve safra ortamlarına, çeşitli tuz ve nitrit derişimlerine karşı direnç özellikleri ile kolesterolü azaltma gibi fonksiyonel özellikleri test edilmiştir. Bu suşlar kolesterolü *in-vitro* olarak % 25.1 - % 64.1 oranlarında azaltmıştır. Bakteriyosinlerin tamamının gelişimin logaritmik fazında üretilmeye başlandığı ve durgun fazın başında üretimin maksimum düzeye ulaştığı gözlenmiştir. Bakteriyosinler yüksek sıcaklıklara (100 °C; 30 dakika) dirençli ve geniş pH stabilitesine (pH 2-9) sahiptir. *P.acidilactici* LB A06-02, *Lb. gasseri* LB A14-01, *Str. salivarius* LB A15-01, *E. faecium* LB A01-01, *E. faecium* LB K04-03, *E. faecium* M17 K09-02 ve *E. faecium* LB A13-01 bakteriyosinlerinin moleküler büyüklükleri sırasıyla 5.23, 5.00, 5.25, 5.02, 4.93, 4.48 ve 4.96 kDa olarak belirlenmiştir. Çalışma kapsamında incelenen suşlarının gıda endüstrisinde starter veya probiyotik kültür olarak kullanım potansiyellerinin tam olarak değerlendirilebilmesi için bağırsakta tutunma ve kullanıldıkları ürün özelliklerine etkileri gibi diğer önemli fonksiyonel ve teknolojik özelliklerini ortaya koyacak ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterileri, anne sütü, starter kültür, bakteriyosinler, antibiyotik dirençliliği.

Danışman: Prof.Dr. Ayhan TEMİZ, Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

DETERMINATION OF SOME IMPORTANT PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM HUMAN MILK BASED ON FOOD TECHNOLOGY

UFUK BAĞCI

ABSTRACT

In this thesis, lactic acid bacteria (LAB) isolated from human milk were identified and some important properties were determined from the point of food industry. Taking into consideration of 16S rRNA, 23 *Enterococcus faecalis*, 6 *E. faecium*, 8 *Streptococcus salivarius*, 2 *Lactobacillus gasseri* and 1 *Pediococcus acidilactici* strains were identified as LAB having a potential for use in the food industry. These strains were examined in terms of enzyme profiles, ability to produce biogenic amines, antibiotic resistance, antimicrobial activity and ability to produce bacteriocins. These strains did not have any decarboxylase activity except tyrosine decarboxylase. The vast majority of these strains were determined to be sensitive to chloramphenicol, ampicillin, penicillin, vancomycin and gentamycin, and resistant to kanamycin and erythromycin. Strains which have antimicrobial effect were evaluated in terms of bacteriocin producing abilities and 7 strains were found to be bacteriocin producer. Resistance to high temperature, low pH and bile environment, various salt and nitrite concentrations and functional properties such as cholesterol reducing ability of the bacteriocin producer strains were examined. Cholesterol level was reduced at 25,1-64,1% rates by these strains *in-vitro* conditions. All bacteriocins began to produce at the logarithmic growth phase and bacteriocin productions reached to maximum level at the beginning of the stationary phase. Bacteriocins were resistant to high temperatures (100 °C, 30 minutes) and stable at a wide pH range (pH 2-9). Molecular mass of the bacteriocins of *P. acidilactici* LB A06-02, *Lb. gasseri* LB A14-01, *Str. salivarius* LB A15-01, *E. faecium* LB A01-01, *E. faecium* LB K04-03, *E. faecium* M17 K09-02 and *E. faecium* LB A13-01 was found to be 5.23, 5.00, 5.25, 5.02, 4.93, 4.48 and 4.96 kDa, respectively. Further studies like adhesion to colon and effects of cultures on the product characteristics are needed in order to evaluate the potential use of strains as starter or probiotic culture examined in this study.

Keywords: Lactic acid bacteria, human milk, starter culture, bacteriocins, antibiotic resistance.

Advisor: Prof.Dr. Ayhan TEMİZ, Hacettepe University, Department of Food Engineering, Food Science Section

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın belirlenmesi, planlanması ve yürütülmesinde bilimsel bilgi birikimi ve sonsuz desteği ile her zaman yanımda olan, çok büyük yardım ve desteğini gördüğüm değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ayhan TEMİZ'e,

Tez çalışmamda bana yol gösteren, bilgi ve katkılarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Halil VURAL ve Prof. Dr. A.Kadir HALKMAN'a

Tez çalışmam boyunca ilgilerini ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Yeşim ÖZBAŞ ve Prof. Dr. Aykut AYTAÇ'a,

Tez çalışmamı "Anne sütünden izole edilen laktik asit bakterilerinin tanımlanması" başlıklı ve 4753 no'lu proje ile destekleyen Hacettepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne,

Tez çalışmam kapsamında laktik asit bakteri izolatlarının 16S rDNA dizi analizi çalışmalarının gerçekleştirilmesinde hizmetlerinden yararlandığım Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü ve çalışanlarına,

Tez çalışmam boyunca manevi yardımlarını hiç eksik etmeyen Ceren UÇAR'a

Çalışmanın çeşitli aşamalarında yardım ve desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Hacı Ali GÜLEÇ, Dr. Sine Özmen TOĞAY, Kenan YILDIZ, Hüseyin BİLGİÇOĞLU, Umut AKTAN, Dr. Ceyda DUDAK ŞEKER, Yasin ŞEN, Seher GÜMÜŞ, Meltem YILDIRIM, Tuğba BULAT, Tuğrul MASATCIOĞLU ve burada isimlerini tek tek sıralayamadığım tüm arkadaşlarıma,

Tez çalışmamın başından itibaren anlayışlı ve özverili tavrıyla her zaman yanımda olan sevgili Yrd. Doç. Dr. Pelin ONSEKİZOĞLU'na,

Hayatımın her döneminde olduğu gibi tez çalışmam sırasında da sevgileri ile her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem Fahire BAĞCI, babam MURAT BAĞCI ve kardeşlerim Esenay BATIR ve Ömür BAĞCI'ya,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
3. MATERYAL ve METOT	45
3.1. Materyal.....	45
3.1.1. Laktik asit bakteri şüpheli isolatlar	45
3.1.2. Kontrol ve test bakteri suşları	45
3.2. Metot	46
3.2.1. İzolatların aktifleştirilmesi ve saf kültürlerinin elde edilmesi.....	46
3.2.2. İzolatların tanımlanması	46
3.2.2.1. İzolatların cins düzeyinde tanımlanması	46
3.2.2.2. İzolatların tür düzeyinde tanımlanması	48
3.2.3. İzolatların enzimatik aktivite profilleri.....	50
3.2.4. İzolatların antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi	51
3.2.5. İzolatların biyogen amin oluşturma özellikleri	52
3.2.6. İzolatların antimikrobiyel aktivite özellikleri	53
3.2.7. İzolatların yüksek sıcaklığa direnç özellikleri	54
3.2.8. İzolatların düşük pH'ya direnç özellikleri.....	55
3.2.9. İzolatların safraya direnç özellikleri	56
3.2.10. İzolatların nitrite direnç özellikleri	56
3.2.11. İzolatların tuza (NaCl) direnç özellikleri	57
3.2.12. İzolatların <i>in-vitro</i> olarak kolesterolü düşürme özellikleri	57
3.2.13. İzolatların antimikrobiyel aktivitesinin bakteriyosinlerden kaynaklanıp kaynaklanmadığının belirlenmesi	58
3.2.13.1. Düşük pH'ın izolatların antimikrobiyel aktivitesinden sorumlu olup olmadığının belirlenmesi.....	58
3.2.13.2. Hidrojen peroksit varlığının izolatların antimikrobiyel aktivitesinden sorumlu olup olmadığının belirlenmesi	59

3.2.13.3. Protein yapıdaki maddelerin izolatların antimikrobiyel aktivitesinden sorumlu olup olmadığının belirlenmesi	60
3.2.14. İzolatların besiyerinde gelişimi ile bakteriyosin üretim ilişkisinin belirlenmesi	60
3.2.15. Kaba bakteriyosin preparatlarının hazırlanması	61
3.2.16. İzolatların bakteriyosin aktivitesi üzerine enzimlerin etkisi.....	62
3.2.17. İzolatların bakteriyosin aktivitesi üzerine pH'ın etkisi.....	62
3.2.18. İzolatların bakteriyosin aktivitesi üzerine ısı işlemin etkisi	62
3.2.19. İzolatların bakteriyosin aktivitesi üzerine bazı organik çözücüler ve kimyasalların etkisi	62
3.2.20. İzolat kültür sıvılarından kısmi saf bakteriyosin preparatlarının elde edilmesi	63
3.2.21. Kısmi saf bakteriyosin preparatı örneklerinin protein tayini	64
3.2.22. Kısmi saf bakteriyosin preparatlarının moleküler büyüklüğünün sds-page ile belirlenmesi	64
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA.....	67
4.1. Anne Sütü Örneklerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Cins ve Tür Düzeyinde Tanımlanması	67
4.2. İzolatların Enzimatik Aktivite Profilleri	79
4.3. Suşların Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi.....	84
4.4. İzolatların Biyojen Amin Oluşturma Özellikleri	90
4.5. İzolatların Antimikrobiyel Aktivite Özellikleri.....	93
4.6. İzolatların Antimikrobiyel Aktivitesinin Bakteriyosinlerden Kaynaklanıp Kaynaklanmadığının Belirlenmesi	100
4.7. İzolatların Yüksek Sıcaklığa Direnç Özellikleri.....	106
4.8. İzolatların Düşük pH'ya Direnç Özellikleri.....	109
4.9. İzolatların Safraya Direnç Özellikleri.....	113
4.10. İzolatların Nitrite Direnç Özellikleri.....	116
4.11. Suşların Tuza (NaCl) Direnç Özellikleri	119
4.12. Suşların Kolesterolü <i>In-Vitro</i> Azaltma Özellikleri.....	121
4.13. İzolatların Besiyerinde Gelişimi İle Bakteriyosin Üretim İlişkisinin Belirlenmesi	123
4.14. İzolatların Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Enzim, pH, Isıl İşlem, Bazı Organik Çözücüler Ve Kimyasalların Etkisi	129
4.15. Kısmi Saf Bakteriyosin Preparatlarının Moleküler Büyüklüğünün SDS-PAGE İle Belirlenmesi	136
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	141

6. KAYNAKLAR.....	145
ÖZGEÇMİŞ	176

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Disk difüzyon yöntemi ile izolatların antibiyotik direnç testi.....	52
Şekil 2. Disk difüzyon yöntemi ile izolatların antibiyotik duyarlılıkları (örnek: <i>E. faecium</i> LB A13-01).....	85
Şekil 3. Suşların antibakteriyel etkinliği (a. agar damlatma yöntemi, b. agar difüzyon yöntemi)	94
Şekil 4. Laktik asit bakteri suşlarının 60 °C ve 70 °C sıcaklıklara karşı direnç durumları	106
Şekil 5. Laktik asit bakteri suşlarının düşük pH'ya (pH 2, 3 ve 4) karşı direnç durumları	110
Şekil 6. Laktik asit bakteri suşların % 0.5'lik (w/v) safra derişimine karşı direnç durumları	113
Şekil 7. Laktik asit bakteri suşlarının nitrit dirençleri	116
Şekil 8. Laktik asit bakteri suşlarının Suşların % 6.5, % 10 ve %15'lik (w/v) tuz derişimlerine karşı direnç durumları	120
Şekil 9. Laktik asit bakteri suşlarının kolesterol in-vitro kullanım özellikleri.....	122
Şekil 10. <i>Pediococcus acidilactici</i> LB A06-02 suşunun gelişimi ile bakteriyosin üretimi.....	124
Şekil 11. <i>Lactobacillus gasseri</i> LB A14-01 suşunun gelişimi ile bakteriyosin aktivitesi arasındaki ilişki	124
Şekil 12. <i>Enterococcus faecium</i> LB A01-01 suşunun gelişimi ile bakteriyosin aktivitesi arasındaki ilişki	125
Şekil 13. <i>Enterococcus faecium</i> LB K04-03 suşunun gelişimi ile bakteriyosin aktivitesi arasındaki ilişki	126
Şekil 14. <i>Enterococcus faecium</i> M17 K09-02 suşunun gelişimi ile bakteriyosin aktivitesi arasındaki ilişki	127
Şekil 15. <i>Enterococcus faecium</i> LB A13-01 suşunun gelişimi ile bakteriyosin aktivitesi arasındaki ilişki	127

Şekil 16. <i>Streptococcus salivarius</i> LB A15-01 suşunun gelişimi ile bakteriyosin aktivitesi arasındaki ilişki	128
Şekil 17. Moleküler marker (A), <i>Pediococcus acidilactici</i> LB A06-02 (B), <i>Lactobacillus gasseri</i> LB A14-01 (C), <i>Streptococcus salivarius</i> LB A15-01 (D) suşları Trisin-SDS-PAGE jeli	137
Şekil 18. <i>Pediococcus acidilactici</i> LB A06-02 (A), <i>Lactobacillus gasseri</i> LB A14-01 (B) ve <i>Streptococcus salivarius</i> LB A15-01 (C) suşlarının <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644'e karşı inhibitör etkisi gösteren Trisin-SDS-PAGE jeli.....	138
Şekil 19. Moleküler marker (A); <i>Enterococcus faecium</i> LB A01-01 (B), <i>Enterococcus faecium</i> LB K04-03 (C), <i>Enterococcus faecium</i> M17 K09-02 (D) ve <i>Enterococcus faecium</i> LB A13-01 (E) suşları Trisin-SDS-PAGE jeli.	138
Şekil 20. <i>Enterococcus faecium</i> LB A01-01 (A), <i>Enterococcus faecium</i> LB K04-03 (B), <i>Enterococcus faecium</i> M17 K09-02 (C) ve <i>Enterococcus faecium</i> LB A13-01 (D) suşlarının <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644'e karşı inhibitör etkisi gösteren Trisin-SDS-PAGE jeli.	139

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Orla-Jensen'e göre laktik asit bakterilerinin ayrımı ve günümüzdeki taksonomik sınıflandırılmaları.....	5
Çizelge 2. Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan bazı testler	7
Çizelge 3. Streptokokların Sherman'a göre sınıflandırılmaları.....	10
Çizelge 4. Bazı fermente gıdalarda kullanılan laktik asit bakterileri	13
Çizelge 5. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bazı bakteriyosinler.....	18
Çizelge 6. Bazı bakteriyosin üreticisi laktik asit bakterileri ve kullanıldıkları gıdalardaki etkileri	27
Çizelge 7. Anne sütü bileşimi	30
Çizelge 8. Laktik asit bakteri izolatları için inhibisyon zon çap standartları (NCCLS, 2006).....	52
Çizelge 9. Dekarboksilaz Besiyeri	53
Çizelge 10. Anne sütü kaynaklı laktik asit bakteri şüpheli izolatların cins düzeyinde doğrulama test sonuçları.....	68
Çizelge 11. API 20 Strep test kiti ile tür düzeyinde tanımlanan anne sütü kaynaklı laktik asit bakteri izolatları	74
Çizelge 12. API 50 CHL test kiti ile tür düzeyinde tanımlanan anne sütü kaynaklı laktik asit bakteri izolatları	76
Çizelge 13. Sağlıklı annelerin sütlerinden genellikle izole edilen bakteri türleri	78
Çizelge 14. Anne Sütünden izole edilen laktik asit bakteri suşların API-ZYM sonuçları.....	80
Çizelge 15. Laktik asit bakteri suşlarının çeşitli antibiyotiklere karşı dirençlilik durumları	86
Çizelge 16. Laktik asit bakteri suşlarının dekarboksilaz aktiviteleri.....	90
Çizelge 17. Agar damlatma tekniğine göre laktik asit bakteri suşlarının antibakteriyel etkinliği	95

Çizelge 18. Agar difüzyon tekniğine göre laktik asit bakteri suşlarının antibakteriyel etkinliği	97
Çizelge 19. Agar difüzyon tekniğine göre nötralizasyon sonrasında laktik asit bakteri suşlarının antibakteriyel etkinliği	102
Çizelge 20. Kuyucuk yöntemi ile test suşlarının <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644'e karşı antimikrobiyel aktivitesi üzerine proteinaz-K, pepsin, tripsin ve katalazın etkisi.....	105
Çizelge 21. Laktik asit bakteri suşlarının farklı yüksek sıcaklık derecelerine direnç özelliklerini gösteren sayım sonuçları [log (kob/mL)]	107
Çizelge 22. Laktik asit bakteri suşların düşük pH ortamına direnç özelliklerini gösteren sayım sonuçları log (kob/mL).....	111
Çizelge 23. Laktik asit bakteri suşlarının % 0.5 (w/v) safra derişimine direnç özelliklerini gösteren sayım sonuçları log (kob/mL)	114
Çizelge 24. Laktik asit bakteri suşların farklı nitrit derişimlerine direnç özelliklerini gösteren sayım sonuçları log (kob/mL)	117
Çizelge 25. Farklı NaCl derişimlerine maruz bırakılan laktik asit bakteri suşların canlı bakteri sayıları log (kob/mL).....	121
Çizelge 26. Suşların bakteriyosin aktiviteleri üzerine enzimlerin etkisi	130
Çizelge 27. Suşların bakteriyosin aktiviteleri üzerine pH'ın etkisi	131
Çizelge 28. Suşların bakteriyosin aktiviteleri üzerine metanol, kloroform, SDS ve β-merkaptetanol'ün etkisi.....	134
Çizelge 29. Yüksek sıcaklık uygulamasının suşların bakteriyosin aktiviteleri üzerine etkisi	135

Bu alışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından

4753 no'lu proje ile desteklenmiştir.

1. GİRİŞ

Anne sütünden izole edilen laktik asit bakteri türleri (*Lactobacillus gasseri*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, vb.) probiyotik veya starter kültür olarak kullanılabilecek suşları içermeleri bakımından önemlidir (Martin et al., 2004).

Laktik asit bakterileri (LAB) güvenli kabul edilebilir (GRAS, Generally Recognized as Safe) listesinde yer almakta ve ürettikleri organik asitler, hidrojen peroksit ve bakteriyosin gibi antimikrobiyel maddeler ile gıdalarda patojen ve bozulma yapıcı mikroorganizmaların inhibisyonunda önemli bir rol oynamaktadırlar (O'Sullivan et al., 2002; Parada et al., 2007). LAB grubunda yer alan bazı probiyotik suşların (*E. faecium*, *E. faecalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lb. acidophilus*, *Lb. gasseri*, *P. acidilactici*) *Listeria monocytogenes*, enterohemorajik *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* (*Sal. Typhimurium*), *Bacillus cereus*, *Shigella flexneri* ve *Yersinia enterocolitica* gibi patojen bakterilerin üremesini önlediği bilinmektedir (Fernandez et al., 2003; Karaoğlu et al., 2003; Klingberg et al., 2005; Aslim and Kilic, 2006; Delgado et al., 2007; Pelinescu, et al., 2011). Probiyotik LAB türleri ayrıca serum kolesterol seviyesinin düşürülmesi, laktoz sindirimindeki bozuklukların düzeltilmesi, immün sistemin güçlendirilmesi, kanser oluşumunda rol alan fekal enzimlerin azaltılması, ishal tedavisi, rotavirus ve kolite neden olan *Clostridium difficile*'nin kontrolü ve *Helicobacter pylori* kaynaklı ülserin önlenmesinde de etkin roller üstlenebilmektedirler (Franz et al., 1999; Saavedra, 2001; Foulquie Moreno et al., 2006; Parvez et al., 2006).

Günümüzde artan tüketici bilincine paralel olarak gıdaların korunmasında koruyucu kültürlerin veya bunların metabolitlerinin kullanımına eğilim artmıştır. Biyo-koruyucu olarak bakteriyosinlerin kullanılması gıda güvenliğinde yeni bir yaklaşım olarak kabul görmektedir. Bakteriyosinler, ribozomal olarak sentezlenen ve diğer bakterilere, özellikle de bakteriyosin üreten bakterilere yakın akraba olan türlere karşı antimikrobiyal aktivite gösteren peptid veya protein yapısında biyolojik aktif maddelerdir (Parada et al., 2007). Laktik asit bakterilerinin ürettiği nisin, pediosin, laktokoksin A, vb. bakteriyosinler genel olarak antimikrobiyel etkilerini

Gram-pozitif bakterilerin hücre membranı üzerinde göstermektedir. LAB, gıdalarda bozucu ve patojen bakterilere karşı geniş spektrumda antimikrobiyel etkili bakteriyosin üretme yeteneğine sahip olmaları nedeniyle direkt olarak kullanılmakta ya da bu kültürlerden elde edilen saflaştırılmış bakteriyosinler gıda formülasyonlarına katılmaktadırlar. Nisin, gıdalarda yasal olarak kullanımına izin verilen tek bakteriyosindir (Cleveland et al, 2001; De Vuyst, 2007; Heng et al, 2007). Nisin, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından güvenli kabul edilebilir (GRAS) olarak onaylanmış koruyucu gıda katkı maddesidir. Nisin günümüzde 50'den fazla ülkede fermente süt ürünleri, yumurta ürünleri, konserve sebzeler, salata sosları ve fermente alkollü içkilerin üretiminde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Galvez et al., 2007; Heng et al, 2007).

Gıdalar ile alınan kolesterolün sindirim sisteminde kana geçişini azaltma yeteneği laktik asit bakterilerinin probiyotik etkileri arasında önemli bir yer tutmaktadır (Saavedra et al, 2003). Kolesterol tüm vücut dokuları için temel bir yapı taşı olmasına rağmen, kandaki kolesterol seviyesinin yüksek olması, koroner kalp hastalığına yol açan en önemli risk faktörlerinden birisi olarak kabul edilmektedir (Sirilun et al., 2010; Raghavan et al., 2011). Son yıllarda yapılan çalışmalar kan kolesterol seviyesinin azaltılmasıyla bu hastalık risklerinin düşürülebileceğini de göstermektedir (Al-Saleh, et al., 2006; Sirilun, et al., 2010). Yapılan çalışmalarda LAB'nin kolesterol azaltıcı etkileri bu bakterilerin safra tuzlarını dekonjuge edebilme yetenekleri ile ilişkilendirilmektedir. LAB'nin sahip olduğu safra tuzu hidrolaz (STH) enzimi tarafından gerçekleştirilen safra tuzlarının dekonjugasyonu sonucu ortamdaki safra tuzu miktarı azalmaktadır. Azalan safra tuzu karaciğerde kolesterolden sentezlenerek sindirim sistemine salgılanmakta ve böylelikle de yeni safra tuzu oluşumu için kolesterolün harcanmasıyla kolesterol seviyesi düşmektedir (Begley, et al., 2006; Tok ve Aslim, 2007; Raghavan et al., 2011). LAB ayrıca, kolesterolü hücre duvarına bağlayarak ya da kolesterolü kısa zincirli yağ asitlerine fermente ederek de kolesterol miktarının azaltılmasına katkıda bulunmaktadır (Begley, et al., 2006; Sirilun, et al., 2010).

Gıda ürünlerinde probiyotik olarak kullanılacak suşların transfer edilebilir antibiyotik direnç geni bakımından kontrol edilmesi gerekmektedir. Transfer

edilebilir antibiyotik direnci, özellikle patojen olan diğer bakterilere aktarılma olasılığı nedeniyle önem arz etmektedir. Antibiyotiklere dirençli suşların kullanıldığı fermente et, sebze ve süt ürünleri ile hazır gıdalar gibi ürünlerin tüketilmesi antibiyotiğe dirençli bakterilerle kolon florasının interaksiyona girmesine yol açmaktadır.

Starter ya da probiyotik olarak kullanılan LAB'nin enzimatik aktivite profillerinin ortaya konulması, bu bakterilerin gıda teknolojisi ve insan sağlığı açısından yararlarının belirlenmesinde oldukça önemli bir aşama olarak değerlendirilmektedir. Fermente ürünlerde kullanılacak starter LAB suşlarının lösin arilamidaz, valin arilamidaz ve sistin arilamidaz gibi peptidolitik enzim aktivitesi ile esteraz, esteraz lipaz ve lipaz gibi lipolitik enzim aktivitesine sahip olması, üründe istenen tat, koku ve yapının gelişimi açısından önem arz etmektedir (Thapa et al., 2006; Dewan and Tamang, 2007). β -galaktosidaz enzim aktivitesine sahip LAB kültürlerinin fermente süt ürünlerde kullanımı ise laktozu hidrolize eden bu enzimi üretemeyen laktoz intolerant bireylerin beslenmesi bakımından önem taşımaktadır (Dewan and Tamang, 2007; Cebrian et al., 2012).

Starter olarak LAB'nin seçiminde dikkate alınması gereken diğer önemli bir husus ise biyojen amin oluşturma yetenekleridir. Biyojen aminler insan, hayvan, bitki ve mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri sonucunda doğal olarak oluşmaktadır ve protein, hormon ile nükleik asit sentezinin ilk basamağını oluşturmaları, kan basıncının kontrolü ve hücre büyümesi gibi önemli doğal biyolojik proseslerde rol almaları bakımından önem taşımaktadırlar. Diğer taraftan deniz ürünleri, peynir, şarap, bira ve sosis gibi biyojen aminleri yüksek miktarlarda içerebilen gıdaların tüketimi insan sağlığı açısından zararlı olabilmektedir (Çolak ve Aksu, 2002; EFSA, 2011; Garcia-Ruiz et al., 2011). Toksikolojik etkilerinin yanı sıra biyojen aminler gıdalarda bozulma indikatörü olarak kullanılma potansiyeline de sahiptir. Gıda endüstrisi açısından en önemli biyojen aminler histamin, tiramin, putresin ve kadaverindir (Garai et al., 2007). Biyojen aminler gıdalarda genellikle ortamdaki öncül aminoasitlerin bakteriyel dekarboksilasyonu sonucu oluşmakta ve bakterilerin amino asitleri dekarboksilize etme yetenekleri tür, suş ve çevre etmenlerine bağlı olarak değişebilmektedir (Munoz-Atienza et al., 2011). Bu

nedenle gıdalarda kullanılacak starter kültürlerin amino asit dekarboksilaz aktivitesi göstermemesi istenmektedir (Çolak ve Aksu, 2002).

Probiyotik veya starter kültür olarak kullanılacak LAB'nin gıda ve sindirim sistemi ortamındaki canlılıkları ve gelişim hızları teknolojik açıdan ayrı bir önem arz etmektedir. Starter kültür olarak kullanılacak LAB ortam sıcaklığı, pH'sı, tuz ve nitrit içeriği gibi koşullara, probiyotik olarak kullanılacak LAB ise midedeki düşük pH ve bağırsaklardaki safra tuzu ortamı gibi koşullara direnç gösterebilmelidir (Ammor and Mayo, 2007a).

Bu tez çalışmasında, "Doğal fermente gıdalar ve anne sütünden entorokokların izolasyonu, karakterizasyonu ve bunların probiyotik kültür olarak kullanılabilme potansiyelinin araştırılması" isimli bir araştırma projesi (Toğay, 2010) kapsamında anne sütü örneklerinden izole edilip stoklanan LAB şüpheli izolatlar araştırma materyali olarak kullanılmıştır. LAB şüpheli izolatlar API 50 CHL ve API 20 Strep test kitleri kullanılarak tanımlanmış ve tanımlama sonuçları 16S rRNA dizi analizi kullanılarak doğrulanmıştır. Laktik asit bakterisi olarak tanımlanan suşların enzimatik aktivite profilleri, antibiyotik dirençlilikleri, biyojen amin oluşturma yetenekleri ve antimikrobiyel aktiviteleri belirlenmiştir. Antimikrobiyel aktiviteye sahip suşlarda, antimikrobiyel aktivitenin bakteriyosin kaynaklı olup olmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen bakteriyosinler yüksek sıcaklık, enzimlere karşı duyarlılık, kimyasallar ve organik çözücülere karşı direnç özellikleri yönüyle karakterize edilmiş ve molekül büyüklükleri tespit edilmiştir. Bakteriyosin ürettiği belirlenen suşların yüksek sıcaklıklara, düşük pH ve safra ortamlarına, çeşitli tuz ve nitrit derişimlerine karşı direnç özellikleri, kolesterolü *in-vitro* ortamda azaltma gibi fonksiyonel ve teknolojik bazı özellikleri değerlendirilerek bu suşun ülkemiz gıda endüstrisinde kullanım potansiyeli tartışılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

“Laktik asit bakterileri (LAB)” terimi ilk defa sütteki laktozu fermente ederek laktik asit oluşturan ve buna bağlı olarak da sütü ekşitip koagüle eden bakteri grubunu isimlendirmek amacıyla kullanılan bir terim olarak ortaya çıkmıştır (Khalid, 2011). *Bacterium lactis* (muhtemelen *Lactococcus lactis*), J. Lister tarafından 1873 yılında izole edilerek saf kültürü yapılan ilk laktik asit bakteri kültürüdür (Axelsson, 2004).

LAB'nin doğru bir tanımı ve sınıflandırılması ilk defa Orla-Jensen tarafından 1919 yılında yapılmıştır (Çizelge 1). Orla-Jensen LAB'nin sınıflandırmasını morfolojik özellikleri (kok, çubuk, tetrad), glukoz fermantasyonu (homofermantatif, heterofermantatif), belli sıcaklıklarda üreme (10 °C ve 45 °C) ve şeker kullanım özellikleri üzerinden gerçekleştirmiştir (Orla- Jensen, 1919).

Çizelge 1. Orla-Jensen'e göre laktik asit bakterilerinin ayrımı ve günümüzdeki taksonomik sınıflandırılmaları (Savadojo et al., 2006)

Cins ^a	Hücre Şekli	Fermantasyon	Günümüzdeki Cins
<i>Betabacterium</i>	Çubuk	Hetero-	<i>Lactobacillus</i> <i>Weisella</i>
<i>Thermobacterium</i>	Çubuk	Homo-	<i>Lactobacillus</i>
<i>Streptobacterium</i>	Çubuk	Homo-	<i>Lactobacillus</i> <i>Carnobacterium</i>
<i>Streptococcus</i>	Kok	Homo-	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i>
<i>Betacoccus</i>	Kok	Hetero-	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weisella</i>
<i>Tetracoccus</i>	Kok	Homo-	<i>Pediococcus</i> <i>Tetragenococcus</i>

^aOrla-Jensen'e göre

Bu sınıflandırmaya göre laktik asit bakterileri; Gram-pozitif, sporsuz, katalaz negatif ve karbonhidratlardan temel fermantasyon ürünü olarak laktik asit oluşturmalarıyla karakterize, mikroaerofilik bakterilerdir. Bu grup içine giren *Streptococcus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinsleri kok şekilli, *Lactobacillus* cinsi ise çubuk şekilli olarak tanımlanmıştır. *Streptococcus* ve *Pediococcus* cinsleri homofermantatif, *Leuconostoc* cinsi ise heterofermantatif özellik gösterirler. *Lactobacillus* cinsi ise homofermantatif (*Thermobacterium*), fakültatif

heterofermantatif (*Streptobacterium*) ve heterofermantatif (*Betabacterium*) olarak üç gruba ayrılmışlardır (Temiz, 1989). Bu sınıflandırma günümüzde birçok değişikliğe uğramış olmasına rağmen temel olarak geçerliliğini korumaktadır.

LAB, günümüzde Gram-pozitif, mikroaerofilik, spor oluşturmeyen, çubuk, kok veya kokobasil formda, oksidaz ve katalaz negatif ve karbonhidrat fermentasyonu sonucunda ana ürün olarak laktik asit üreten ve % G+C oranı 50'in altında olan bakteriler olarak tanımlanmaktadır. Laktik asit bakterileri *Lactobacillaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae* ve *Streptococcaceae* familyalarına üye pek çok bakteri grubundan oluşmaktadır (Stiles and Holzapfel, 1997; Axelsson, 2004; Khalid, 2011).

LAB toprak, bitki, hayvan, su ve çeşitli gıda ürünlerinin de içinde bulunduğu farklı kaynaklardan izole edilebilmektedir. Gıda kaynaklı çoğu laktik asit bakterisi insan ve hayvan sindirim sisteminin doğal mikroflorasını oluşturmaktadırlar (Stiles and Holzapfel, 1997; Holzapfel et al., 1998; Kılıç, 2001). LAB, özellikle de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus* *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Carnobacterium* cinsleri günümüzde fermente gıdalarda starter kültür olarak yapı, tat ve koku geliştirilmesi amacıyla kullanılmaktadır (De Vuyst and Vandamme, 1994; Stiles and Holzapfel, 1997; Axelsson, 2004; Aslim et al., 2005; Urso et al., 2006).

LAB'nin cins düzeyinde sınıflandırılmalarında morfoloji, farklı sıcaklıklarda gelişim, üretilen laktik asidin konfigürasyonu, yüksek tuz oranında gelişim, glukoz fermentasyonu tipi ve asit ve alkali ortamlara tolerans gibi özelliklerinden yararlanılmaktadır. LAB glukoz fermentasyonunda izledikleri metabolik yollar temel alınarak homofermantatif ve heterofermantatif olarak iki grupta incelenmektedir. Homolaktik fermentasyonda glikoliz (Embden–Meyerhof-Parnas yolu) ile son ürün olarak laktik asit, heterolaktik fermentasyonda ise 6-fosfoglukonat/fosfoketolaz yolu sonucunda laktik asitle birlikte etanol, asetat ve CO₂ oluşmaktadır. *Leuconostoc* spp., *Oenococcus* spp., bazı *Lactobacillus* türleri ve *Weissella* spp. heterofermantatif iken diğer tüm LAB homofermantatiftir (Axelsson, 2004; Khalid, 2011; Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011).

LAB'nin sınıflandırılmasında kullanılan fenotipik testler Çizelge 2'de gösterilmiştir (Axelsson, 2004).

Çizelge 2. Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan bazı testler (Axelsson, 2004)

	Çubuk		Kok							
	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactabacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus/Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc/Oenococcus</i>	<i>Pedicococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weisella</i> ^d
Tetrad	- ^a	-	+ ^b	-	-	-	+	-	+	-
Glukozdan CO ₂	-	±	-	-	-	+	-	-	-	+
Laktik asit	L	L, D, DL	L	L	L	D	L, DL	L	L	L, DL
Gelişim										
10 °C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
45 °C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
% 6.5 NaCl	ND ^c	±	+	+	-	±	±	-	+	±
% 18 NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-

^aÜreme yok

^bÜreme var

^cBelirlenmedi

^dBazı *Weisella* suşları çubuk şekilli olabilmektedir.

Belirli sıcaklıklarda gelişebilme özelliği genel olarak bazı laktik kokları birbirinden ayırmak için kullanılmaktadır. Örneğin, *Enterococcus* 10 °C ve 45 °C'de gelişebilirken *Lactococcus* ve *Vagococcus* 10 °C'de gelişebilir fakat 45 °C'de gelişemezler. *Streptococcus* genel olarak 10 °C'de gelişemezken 45 °C'de gelişimleri türe bağlı olarak değişebilmektedir. Tuz toleransı değişken reaksiyonlar verebilmesine rağmen, % 6.5 NaCl'de gelişim *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* ve *Streptococcus* türlerini birbirinden ayırmada kullanılabilir. Yüksek tuz konsantrasyonunda gelişim (% 18 NaCl) *Tetragenococcus* cinsinin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Asit veya alkali ortama direnç özellikleri de tanımlamada yararlı olmaktadır. *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus* ve *Vagococcus* pH 9.6'da gelişim özellikleriyle karakterize edilmiştir. Glukozdan farklı izomerik formlarda laktik asit sentezi ise *Leuconostoc* ve diğer heterofermantatif laktobasillerin birbirinden ayrılmasında yararlıdır.

Leuconostoc D-laktik asit üretirken, *Lactobacillus* DL-laktik asit üretmektedir. Karbonhidrat fermantasyonu, arjinin hidrolizi, aseton oluşumu, safra toleransı, hemoliz tipi ve bazı enzimlerin (β -galaktosidaz ve β -glukoronidaz gibi) varlığı diğer bazı fenotipik veya biyokimyasal karakterizasyon testleri olarak sıralanabilir. Diğer taraftan, laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler tür düzeyinde çakışmalara ve tanımlama hatalarına neden olabilmektedir. Bu nedenle tanımlama sonuçlarının DNA baz kompozisyonu (G+C), DNA hibridizasyon testi, 16S rRNA diziliminin belirlenmesi gibi moleküler yöntemlerle desteklenmesi gerekmektedir (Yılmaz ve Temiz, 2003; Rattanachaikunsopon and Phumlhachorn, 2010).

Günümüzde, LAB'nin tanımlanması amacıyla geliştirilmiş, şeker fermantasyonu ve enzim aktivitelerinin belirlenmesine dayalı ticari test kitleri bulunmaktadır. Ancak, API 50 CHL ve API 20 Strep gibi ticari biyokimyasal test kitlerinin yararlandığı veri bankalarının güncel olmamasının LAB'nin tanımlanmasında hataya yol açabileceği belirtilmektedir (Martin et al., 2010). Bu sebeple son yıllarda LAB'nin tanımlanmasında 16S rRNA gibi moleküler yöntemlerin kullanımı daha fazla tercih edilmektedir (Brolazo et al., 2011).

Yapılan bir çalışmada 135 kadından izole edilen LAB, API 50 CH testi kiti ve multiplex-PCR yöntemi kullanılarak ayrı ayrı tanımlama yoluna gidilmiştir. Multiplex-PCR yöntemi ile suşların % 32.6'sı *Lb. crispatus*, % 25'i *Lb. jensenii* ve % 20.6'sı *Lb. gasseri* olarak tanımlanmıştır. API 50 CHL test kiti ile ise suşların % 34.8'i *Lb. acidophilus*, % 27.2'si *Lb. crispatus* ve % 13'ü *Lb. fermentum* olarak tanımlanmıştır. Çalışma sonucunda, tanımlamada kullanılan yöntemler arasında bir uyum bulunmadığı ve API tanımlama test kitlerinin LAB'nin tanımlanmasına uygun olmadığı belirtilmiştir (Brolazo et al., 2011).

Dimitova et al. (2008) vajinadan izole edilen 90 adet LAB'nin tanımlanması amacıyla gerçekleştirdikleri bir çalışmada, API 50 CHL tanımlama test kiti ile 16S rRNA analiz sonuçları arasında sadece 4 izolatta uyum olduğunu belirlemişlerdir. Chagnaud et al. (2001) yaptıkları çalışmada *Lb. salivarius* UCC 43321 referans suşunun API 50 CHL test kiti ile *Lb. paracasei* olarak tanımlandığını bildirmişlerdir.

“Bergey’s Manual”de 1986 yılında laktik asit bakterilerinin taksonomisinde yapılan bir değişiklikle *Streptococcus* cinsi; *Enterococcus*, *Lactococcus* ve *Streptococcus* olarak üç cinse ayrılmıştır. Daha sonra, *Lactococcus* benzeri hareketli koklar *Vagococcus* adıyla ayrı bir cins olarak sınıflandırılmıştır (Axelsson, 2004). *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinslerinin taksonomisi genel olarak değişmeden kalmış, fakat bazı *Lactobacillus* cinsleri *Carnobacterium* olarak sınıflandırılmış, *Pediococcus halophilus* türü ise *Tetragenococcus* cinsine dahil edilmiştir. Filogenetik olarak bazı uzak *Lactobacillus* ve *Leuconostoc* türleri *Weissella* cinsi olarak, *Leuconostoc oenos* türü ise *Oenococcus* cinsi olarak verilmeye başlanmıştır (Khalid, 2011).

Laktobasiller zorunlu homofermantatif, fakültatif heterofermantatif ve zorunlu heterofermantatif olarak üç grupta incelenmektedir. Laktobasiller, diğer LAB’nden çubuk şekilli olmalarıyla kolaylıkla ayırt edilebilirler. Ancak bazı laktobasiller kok benzeri morfolojiye sahip olduğundan lökonostoklarla karıştırılabilmektedir. Laktik asit bakterilerinin birbirinden ayrılmasında ilk aşama glukozdan gaz üretimidir ve böylelikle de laktik asit bakterileri cins ve alt cins düzeyinde hızlı bir şekilde ayrılabilirler. Zorunlu homofermantatif ve fakültatif heterofermantatif laktobasiller fermente et süt ve sebze ürünlerinde, bira, şarap ve ekşi ekmek gibi gıda üretiminde kullanılırken, zorunlu heterofermantatif laktobasiller (*Betabacterium*) genellikle gıda bozulmaları ile ilgili LAB’ni içermektedir. Glukozdan gaz üretmeyen homofermantatif (*Thermobacterium*) laktobasiller 45 °C’de gelişebilirken 15 °C’de gelişemez ve glukozu laktik aside fermente ederler. Gıda endüstrisi açısından *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus.*, *Lb. helveticus* ve *Lb. acidophilus* bu grupta yer alan önemli laktobasil türleridir. *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus* yoğurt üretiminde kullanılmakta, *Lb. helveticus* ise emmental, gorgonzola ve mozzarella gibi peynirlerin üretiminde kullanılmaktadır. *Lb. delbrueckii* spp. *delbrueckii* ekşi hamur üretiminde de rol almaktadır. *Lb. acidophilus* “acidophilus sütü” üretiminin yanı sıra probiyotik kültür olarak da kullanılmaktadır. Fakültatif heterofermantatif laktobasiller (*Streptobacterium*) 45 °C sıcaklıkta gelişemezken 15 °C sıcaklıkta gelişebilmekte, heksoz şekerleri laktik aside fermente etmekte, glukonatları gaz oluşturabilmekte ve pentoz şekerleri fermente ederek asetik asit oluşturabilmektedir. Fakültatif heterofermantatif

laktobasillerin gıda endüstrisi açısından önemli olan türleri *Lb. casei*, *Lb. plantarum* ve *Lb. sakei*'dir. *Lb. casei* ekşi hamur ve salamura peynir fermentasyonlarında kullanılmaktadır. *Lb. plantarum* fermente sosislerde ve hububat ürünlerinde starter kültür olarak kullanılmaktadır. *Lb. sakei* ise et ürünlerinde kullanılabilir. Zorunlu heterofermantatif laktobasiller, laktozu laktik asitle beraber asetat, etil alkol ve CO₂'ye fermente ederler. *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. fermentum* ve *Lb. reuteri* bu grupta yer alan laktobasillerdendir (Yaygın ve Kılıç, 1993; Hammes and Vogel, 1995; Stiles and Holzapfel, 1997).

Lancefield tarafından gerçekleştirilen serolojik gruplandırma, streptokokların sınıflandırılmalarında tarihsel olarak önemli bir yer tutmaktadır. Sherman 1937 tarihinde streptokokları hemoliz reaksiyonu, 10 °C ve 45 °C'de, % 6.5 NaCl, pH 9.6 ve % 0.1 metilen mavisi ortamlarında gelişim, 60 °C'de 30 dakika ısıtma işlemine direnç, peptondan amonyak oluşturma özellikleri ve Lancefield grup antijenlerinin varlığına göre, piyojenik streptokoklar, viridans streptokoklar, laktik streptokoklar ve enterokoklar olarak 4 gruba ayırmıştır (Çizelge 3) (Stiles and Holzapfel, 1997). Bu sınıflandırma günümüzde önemini kaybetse de önemli patojenlerin hızlı olarak tanımlanmasında yararlıdır. 1980'lerin ortasında yapılan taksonomik değişikliklere streptokoklar tek bir cins altında incelenmekteydi. 16S rRNA analizi gibi moleküler tekniklerin gelişimiyle streptokoklar *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* ve *Vagococcus* olarak ayrı cinslere bölünmüşlerdir (Hardie and Whitley, 1997; Stiles and Holzapfel, 1997; Axelsson, 2004).

Çizelge 3. Streptokokların Sherman'a göre sınıflandırılmaları (Stiles and Holzapfel, 1997)

	Sherman grubu			
	Piyojenik	Viridans	Laktik	Enterokok
Lancefield antijeni	A, B, C, G	-	N	D
Hemoliz	β	α	-	-
10 °C'de gelişim	-	-	+	+
45 °C 'de gelişim	+	+	-	+
pH 9.6'da gelişim	-	-	-	+
60 °C 30 dakika ısıtma işlemine direnç	-	+	±	+
%0.1 metilen mavisi ortamında gelişim	-	-	+	±

Yeni sınıflandırma sonrasında *Streptococcus* cinsi içerisinde istisnai bir durum olan *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus* hariç olmak üzere *Streptococcus bovis*, *Str. mutans*, *Str. pneumoniae* ve *Str. pyogenes* gibi patojenik bakteriler kalmıştır. Oral streptokoklar içerisinde bulunan *Str. salivarius* spp. *thermophilus* gıda endüstrisi açısından önemli tek streptokoktur. *Str. salivarius* spp. *thermophilus* suşları yoğurt ve peynir üretiminde starter olarak kullanılmaktadır. Bu bakteri 45 °C'de gelişebilirken 15 °C'de gelişemez (Stiles and Holzapfel, 1997; Axelsson, 2004).

Lancefield tanımlamasına göre, hareketsiz N grup streptokoklar *Lactococcus* cinsi altına transfer edilmiştir. Laktokokların, kokobasil şekilli olmaları bunların laktobasil şeklinde yorumlanmalarına yol açabilmektedir. Laktokoklar homofermantatifler ve genel olarak 10 °C'de gelişebilirken, 45 °C'de gelişemezler ve optimum gelişme sıcaklıkları 30 °C'dir (Holt et al., 1994). Bu cins *Lc. lactis*, *Lc. garviae*, *Lc. plantarum*, *Lc. raffinolactis* ve *Lc. piscium* olmak üzere 5 tür içermektedir. *Lc. lactis* suşları biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde büyük ekonomik öneme sahiptir. *Lc. lactis* suşları genel olarak fermente süt ürünlerinde kullanılmaktadır. *Lc. lactis* spp. *diacetylactis*, *Lc. lactis* spp. *cremoris*, *Lc. lactis* spp. *lactis*, *Lc. lactis* spp. *hordniae* olarak alt türlere ayrılmaktadırlar. *Lc. lactis* spp. *diacetylactis* diasetil üretmesi nedeniyle önemlidir. *Lc. lactis* spp. *cremoris* gıda endüstrisinde fermente süt ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. *Lc. lactis* suşlarının önemi bir diğer özelliği ise çeşitli bakteriyosinleri sentezleyebilmeleridir. Bunlardan en önemlisi Gram-pozitif bakterilere karşı geniş bir antibakteriyel etkiye sahip nisin'dir. Nisin, günümüzde 50'den fazla ülkede gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır (Stiles and Holzapfel, 1997). *Vagococcus* cinsi laktokoklardan yağ asidi kompozisyonu farklılığı ve bazı suşlarının hareketli olması ile ayrılabilir (Axelsson, 2004).

Lökonostoklar kokoid şeklinde bazen kısa çubuk görünümünde olan ve genel olarak D-laktik asit ve etanol üreten heterofermantatif LAB'dir. Sitrattan diasetil üretmeleriyle kullanıldıkları ürünlerde tat oluşumunda rol almaktadırlar. *Leu. mesenteroides* spp. *mesenteroides* ve *Leu. lactis* gibi türleri süt ve süt ürünlerinde kullanılmaktadırlar (Dellagio et al., 1995).

Pediokoklar, tetrad oluşturan kok şekilli, homofermantatif, özellikle 25-45 °C arasında gelişebilen ve glukoz fermantasyonunda yüksek miktarda laktik asit üretebilen LAB'dir. Bununla birlikte 50 °C'de gelişebilen türleri de bulunmaktadır. *P. pentosaceus* ve *P. acidilactici* fermente sebze ve et ürünlerinde starter kültür olarak kullanılan bakteriler arasındadır (Stiles and Holzapfel, 1997).

Oenococcus onei, heterofermantatif *Oenococcus* cinsi içindeki tek türdür ve şarap üretiminde malolaktik fermantasyonda rol almaktadır (Dellaglio et al., 1995; Axelsson, 2004).

Tetragenococcus suşları yüksek tuz ortamında (% 18 NaCl) gelişebilme özellikleri nedeniyle soya sosu ve tuşu gibi yüksek tuz içeren ürünlerin fermentasyonlarında kullanılabilir (Axelsson, 2004).

Enterokoklar, karbonhidratları L-laktik aside fermente edebilme özelliklerinden dolayı homofermantatif laktik asit bakterileri içinde yer alan, Gram-pozitif, spor oluşturmayan, bazı suşları pseudo katalaz reaksiyonu göstermesine karşın genellikle katalaz negatif, oksidaz negatif, fakültatif anaerobik, *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* gibi bazı türleri dışında hareketsiz, kok şekilli bakterilerdir. Optimum üreme sıcaklıkları 35 °C olmakla beraber 10-45 °C sıcaklık aralığında, % 6.5 NaCl ve pH 9.6 ortamında da üreyebilmekte ve 60 °C'de 30 dakikalık ısıtma işlemine dayanabilmektedir. Enterokok suşlarının çoğu % 40 safra tuzu varlığında eskulini hidrolize edebilmekte ve bu özellik Bile-Eskulin (BE) agar besiyeri kullanılarak belirlenebilmektedir. Enterokoklar genellikle endokardit, idrar yolu ve nozokomiyal enfeksiyonlara neden olabilen fırsatçı patojenler olarak da değerlendirilmektedir. *E. faecium* enterokok enfeksiyonlarının yaklaşık % 20'sinin nedeni olarak bildirilmektedir. Enterokoklar dışkı kaynaklı olmaları ve sağlık üzerine olumsuz etkileri nedeniyle fekal kontaminasyon indikatörü olarak kullanılabilirler. Bunların yanı sıra enterokoklardan aynı zamanda gıda endüstrisinde starter veya probiyotik kültür olarak da yararlanılabilmektedir (Stiles And Holzapfel, 1997; Franz et al., 1999; Carr et al., 2002; Domig et al., 2003; Franz et al., 2003; Klein, 2003; Foulquie Moreno et al., 2006).

Gıda endüstrisinde uzun yıllardır geniş bir kullanım alanı bulan LAB “gıda sınıfı organizmalar” olarak kabul edilmektedir. LAB gıdalarda tat, aroma ve tekstür oluşumundaki olumlu etkileri yanında mikroorganizmaları inhibe etme özelliklerinden dolayı koruyucu kültür olarak kullanım potansiyeline de sahiptir (Jeevaratnam et al., 2005).

LAB doğada bitkiler, tohumlar, süt ve et ürünleri, fermente sebzeler, hayvan ve insanların mukozal yüzeyleri, ekşi hamur vs. gibi birçok yerden izole edilebilmektedir. Bu bakteriler, günümüzde yoğurt, sosis, peynir ve turşu gibi pek çok fermente gıda üretiminde starter kültür olarak geniş bir kullanım alanına sahiptirler (Çizelge 4) (Rattanachaikunsopon and Phumlhachorn, 2010).

Çizelge 4. Bazı fermente gıdalarda kullanılan laktik asit bakterileri (Rattanachaikunsopon and Phumlhachorn, 2010)

Fermente ürün	Kullanılan Laktik Asit Bakterisi
İsviçre ve İtalyan tipi peynirler	<i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> , <i>Str. thermophilus</i>
Yoğurt	<i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> , <i>Str. thermophilus</i>
Kefir	<i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. kefiranofacies</i> , <i>Lb. brevis</i>
Tereyağı	<i>Lc. lactis</i> spp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> spp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> , <i>Lc. lactis</i> spp. <i>Cremoris</i>
Sosis	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i> <i>P. acidilactici</i> , <i>P. Pentosaceus</i>
Set peynirler	<i>Lc. lactis</i> spp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> spp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> , <i>Lc. lactis</i> spp. <i>Cremoris</i>
Turşu	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> , <i>Lb. Pentosus</i>
Zeytin	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Lb. Plantarum</i>
Fermente sebze	<i>Lb. Fermentum</i>
Ekşi hamur	<i>Lb. sanfransicensis</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. Alimentarius</i>
Fermente balık	<i>Lb. alimentarius</i> , <i>Carnobacterium pisciccola</i>

LAB, ortamdaki şekerlerin fermantasyonu ile pH'yı düşürüp diğer mikroorganizmaların gelişimini engelleme, protein hidrolizi ile tekstüre ve tat oluşumuna katkıda bulunma, çeşitli tat ve aroma bileşikleri oluşturma ve bakteriyosin gibi inhibitör maddeler oluşturma gibi fonksiyonlar üstlenerek son ürünün duyuşal özellikleri ve kalitesi ile güvenliğinin sağlanmasında önemli roller oynamaktadır (Axelsson, 2004). Belirli LAB suşları antimikrobiyel bileşikler

reterek gıdalarda bozulma etmeni mikroorganizmaların gelişimini baskılamakta ve raf ömrünü uzatmaktadır. *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus* ve *Lb. acidophilus*'un sindirim sistemindeki patojenik bakterilerle rekabete girerek bağırsak enfeksiyonlarının oluşum riskini azalttığı bilinmektedir. LAB tarafından pirüvattan sentezlenen diasetil (2,3-btandion), tereyağına kendine özgü aromasını kazandırmaktadır. Diasetil ayrıca mayalar, Gram-negatif bakteriler ve laktik asit bakterileri dışındaki Gram-pozitif bakteriler üzerine antimikrobiyel etki de gösterebilmektedir. Ancak antimikrobiyel etkinin sağlanabilmesi için diasetilin ortamda yüksek miktarda bulunması gerekmektedir. Bu durum ürünün duysal özelliklerini olumsuz olarak etkilemektedir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen hidrojen peroksit de bakteriler, mayalar, küfler, virüsler ve bakteri sporlarına karşı antagonistik aktivite göstermektedir (Guantam and Sharma, 2009; Rattanachaikunsopon and Phumlhachorn, 2010).

LAB'nin insan sağlığı bakımından önem taşıdığı 1908 yılından beri bilinmektedir. Metchnikoff (1908), Bulgar işçilerin uzun yaşam sürelerini fermente süt ürünleri tüketimi ve bu ürünlerde bulunan *Lb. bulgaricus* ile ilişkilendirmiştir.

Probiyotik terimi ise ilk olarak 1989 yılında Fuller (1989) tarafından ortaya atılmış ve probiyotik mikroorganizmalar "bağırsağın mikrobiyel dengesini geliştirerek insan ya da hayvanlara yararlı yönde etki eden canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlanmıştır. Schrenzenmeir and de Verse (2001) probiyotik tanımını revize etmişler ve probiyotik bakterilerin bağırsaklarla beraber vajina gibi diğer vücut bölgelerinde de bulunarak etki gösterebileceğini belirtmişlerdir.

Probiyotik bakterilerin sağlık üzerine yararlı etkisini ortaya koyan pek çok araştırma mevcuttur. İmmun sistemin güçlendirilmesi, kolon mikroflorasının dengelenmesi, kanser oluşumunda rol alan fekal enzimlerin azaltılması, ishal tedavisi, rotavirus ve kolite neden olan *Clostridium difficile*'nin kontrolü ve *Helicobacter pylori* kaynaklı ülserin önlenmesi probiyotik tüketiminin insan sağlığına olumlu etkileri arasında ön plana çıkan fonksiyonel özelliklerdir. Probiyotikler ayrıca serum kolesterol düzeyinin düşürülmesinde, gıda kaynaklı patojenlerin ve diş çürümesine neden olan mikroorganizmaların inaktive edilmesinde, laktoz sindirimindeki bozuklukların düzeltilmesinde, *Candida* ve

üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde de etkin rol oynamaktadır (Saavedra, 2001; Foulquie-Moreno et al., 2006). Bunların yanı sıra, probiyotiklerin metal detoksifikasyonu sağlamaları, kalsiyum, çinko, demir, manganez, bakır ve fosfor gibi mineral ve iz elementlerin biyoyararlanımını arttırmaları, proteinlerin sindirimini kolaylaştırmaları ve vitamin sentezi gerçekleştirmeleri de sağlık üzerinde gösterdikleri olumlu etkiler arasında değerlendirilmektedir (Franz et al., 1999; Saarela et al., 2000; Saavedra, 2001; Ahmed, 2003; Foulquie Moreno et al., 2006).

Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak kabul edilmesi ve bu amaçla kullanılabilmesi için bazı özelliklere sahip olması gerekli görülmektedir. Probiyotik bir mikroorganizma; tercihen insan orijinli olmalı, patojenik veya toksijenik olmamalıdır. Probiyotik suşların seçiminde bazı fonksiyonel ve teknolojik özellikler de dikkate alınmalıdır. Bu konuda önemli ölçütlerden bir tanesi probiyotik bakterinin mide pH'sına (pH 1.5-3.0) kadar düşebilen yüksek asidik ortamlara direnç gösterebilme yeteneğidir. Buna benzer olarak probiyotik bakteri ince bağırsak ortamındaki yüksek safra konsantrasyonuna (% 0.3-0.5) da dirençli olmalıdır. Diğer taraftan, probiyotik bir mikroorganizma; bağırsak epitel hücrelerine tutunabilme özelliğine sahip olmalı, bağırsak sistemindeki normal flora ile rekabet edebilmeli ve bağırsak mikroflorasını stabilize edebilmeli, sağlık üzerine olumlu etkileri klinik çalışmalarla kanıtlanmış olmalı, *H. pylori*, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* ve *C. difficile* gibi patojenlere karşı antagonistik aktiviteye sahip olmalı, antimikrobiyel bileşikler oluşturabilmelidir. Probiyotik mikroorganizmalar bütün bunların yanı sıra teknolojik açıdan da birtakım üstün özelliklere sahip olmalıdırlar. Probiyotik mikroorganizmalar üründe canlı kalabilmeli, depolama koşullarına direnç göstermeli, faj dirençliliğine sahip olmalı, büyük ölçekte üretime uygun olmalı, oksijene direnç göstermeli ve üründe olumsuz değişiklikler oluşturmamalıdır (Hagen and Narvhus, 1999; Klaenhammer and Kulen, 1999; Shortt, 1999; Saarela et al., 2000; Çakır ve Çakmakçı, 2004; Frece et al., 2005).

Probiyotik olarak kullanılan suşlar genellikle insan sindirim sisteminden izole edilen *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerine dahil türlerdir. Bunların yanı sıra *E. faecium*, *E. faecalis*, *Str. thermophilus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. gasseri*, *Lc. lactis*

subsp. *lactis*, *Leu. mesenteroides*, *P. acidilactici* gibi LAB suşlarından da probiyotik olarak yararlanılmaktadır (Holzapfel et al., 1998; Foulquie Moreno et al., 2006; Parvez et al., 2006; Savadago et al., 2006).

Probiyotik olarak kullanılan enterokok suşlarının düşük pH'lara dirençli olduğu, safra tuzlarından etkilenmediği, bireylerin bu bakteriye karşı yüksek tolerans gösterdiği ve bireylerde hiç bir yan etki görülmediği ifade edilmektedir. Bazı enterokok suşlarının ishal tedavisinde antibiyotik uygulamasına alternatif olarak kullanılabileceği ve ayrıca antibiyotik kaynaklı ishalin önlenmesinde ve çocuklardaki ishalin tedavisinde klinik olarak etkili olduğu belirtilmektedir (Franz et al., 1999; Foulquie-Moreno et al., 2006).

Bir araştırmada süt kaynaklı 29 adet *Lactobacillus* suşunun *in-vitro* olarak probiyotik potansiyelleri test edilmiştir. Suşların pH direnci pH 1-3 arasında, safra tuzu direnci ise % 0.3 oxgall ortamında incelenmiştir. Tüm suşların pH 3 ortamına 3 saat boyunca direnç gösterebildiği, fakat pH 1 ortamında 1 saat sonunda suşların büyük bir çoğunluğunun canlılığını yitirdiği belirlenmiştir. Suşların tümü % 0.3 safra tuzu konsantrasyonunda 4 saat sonunda canlılıklarını koruyabilmiştir (Maragkoudakis et al., 2005).

İnsan sütünden izole edilen 2 adet *Lb. gasseri* ve 1 adet *Lb. fermentum* suşunun potansiyel probiyotik özelliklerinin belirlendiği bir çalışmada, suşların düşük pH ve sindirim sistemi koşullarına dayanıklılıkları *Lb. rhamnosus* GG ve *Lb. acidophilus* LA1 ticari probiyotik suşları ile karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda *Lb. gasseri* suşlarından birinin bu koşullara dirençli olduğu ve probiyotik kültür olarak kullanılma potansiyelinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Martin et al., 2005b).

Probiyotik özelliğe sahip LAB'nin kullanıldığı fermente gıdaların tüketimi sağlık üzerine yararlı etkilerinden dolayı her geçen yıl artış göstermektedir. Ancak, probiyotik bakterilerin olumlu etkilerini gösterebilmeleri için belirli düzeyde canlı hücrenin vücuda alınması gerekmektedir. Bu amaçla ortalama ağırlıkta bir bireyin günde $10^6 - 10^9$ düzeyinde canlı hücre alması önerilmektedir (Lee and Salminen, 1995).

Gıda kaynaklı pek çok LAB özellikle gıda bozulma etkeni mikroorganizmalar ile gıda kaynaklı enfeksiyonlara neden olan mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel etki gösteren ve “bakteriyosin” olarak isimlendirilen peptid veya protein yapısında ekstraselüler maddeler sentezlemektedirler. Bakteriyosinler genel olarak hidrofobik veya amfifilik karakterde olup, bakteri hücre membranına etki etmekte ve antimikrobiyal etkilerini özellikle bakteriyosin üreten bakterilere yakın akraba olan türlere karşı göstermektedirler (Parada et al., 2007).

Günümüzde artan tüketici bilincine paralel olarak gıdaların korunmasında koruyucu kültürlerin veya bunların metabolitlerinin kullanımına eğilimde büyük artış gözlenmektedir. Bakteriyosinlerin biyo-koruyucu olarak kullanılması gıda güvenliğinde yeni bir yaklaşım olarak kabul görmektedir (Pingitore et al., 2007; Settanni and Corsetti, 2008).

Gıdalarda kullanılacak bakteriyosinlerin genel olarak aşağıda sıralanan özelliklere sahip olması istenmektedir. (1) Bakteriyosin üreticisi suş tercihen GRAS statüsünde olmalıdır, (2) özellikle patojen bakteriler üzerine geniş spektrumda antimikrobiyel etkiye sahip olmalıdır, (3) yüksek sıcaklığa dirençli olmalıdır, (4) herhangi bir sağlık problemine yol açmamalıdır ve (5) yüksek antimikrobiyel aktiviteye (AU/mL) sahip olmalıdır (O’Sullivan et al., 2002).

LAB, genelde güvenli kabul edilmekte ve GRAS (Generally Recognized as Safe) listesinde yer almaktadırlar. LAB organik asitler, hidrojen peroksit ve bakteriyosin gibi antimikrobiyel maddeleri üretme özelliklerinden dolayı gıdalarda patojen ve bozulma etkeni mikroorganizmaların inhibisyonunda önemli bir rol oynarlar (O’Sullivan et al., 2002; Parada et al., 2007). Literatürde LAB’nin ürettikleri bakteriyosinlerin enterohemorajik *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Shigella flexneri* ve *Yersinia enterocolitica* gibi patojen bakterilerin gelişimini inhibe ettikleri yönünde veriler bulunmaktadır (Ivanova et al., 2000; Saarela et al., 2000; Klingberg et al., 2005; Galvez et al., 2007).

Bugüne kadar LAB’nden birçok bakteriyosin izole edip karakterize edilmiştir. Literatürde etki spektrumu bakımından önemli olarak kabul edilen bakteriyosinler

nisin, diplokoksin, asidofilin, helvetsin, pediosin, ve plantasirin olarak sıralanabilir (Cintas et al., 2001).

LAB tarafından bakteriyosin üretimi genellikle gelişimin logaritmik fazının ilk dönemlerinde başlamaktadır. Bakteriyosin aktivitesi genellikle logaritmik fazın sonunda veya durgun fazın başlangıcında en üst düzeye ulaşmaktadır (Savadogo et al., 2006; Kingcha et al., 2012).

Bakteriyosinler genel olarak üretici organizma türü ve kimyasal yapısına göre sınıflandırılmaktadır. LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin sınıflandırılması günümüzde halen daha bazı değişikliklere uğramakla birlikte, en çok tercih edileni Klaenhammer'in 1993 tarihinde yaptığı sınıflandırmadır. Buna göre bakteriyosinler; moleküler büyüklükleri, termostabiliteleri, enzimatik duyarlılıkları, post translasyonel olarak modifiye olan amino asit varlığı ve etki mekanizmalarına göre 4 grup altında sınıflandırılabilir (Klaenhammer, 1993). Bu sınıflandırmaya göre laktik asit bakterileri tarafından üretilen bazı bakteriyosinler Çizelge 5'de görülmektedir (Chen and Hoover, 2003).

Çizelge 5. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bazı bakteriyosinler (Chen and Hoover, 2003)

Üretilen Bakteriyosin	Üretici laktik asit bakterisi
Sınıf Ia	
Nisin A	<i>Lactococcus lactis</i>
Nisin Z	<i>Lactococcus lactis</i>
Lactocin S	<i>Lactobacillus sake</i>
Lactocin 481	<i>Lactococcus lactis</i>
Carnocin U149	<i>Carnobacterium piscicola</i>
Salivacirin A	<i>Streptococcus salivarius</i>
Sınıf Ib	
Mutacin A	<i>Streptococcus mutans</i>
Sınıf IIa	
Peiocin PA-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Pediocin AcH	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Mesentericin Y105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Sakacin A	<i>Lactobacillus sake</i>
Enterocin A	<i>Enterococcus faecium</i>
Carnobacteriocin BM1	<i>Carnobacterium piscicola</i>
Leucocin A	<i>Leuconostoc gelidum</i>

Çizelge 5. (Devam ediyor)

Sınıf IIb	
Laktococin M	<i>Lactococcus cremoris</i>
Enterocin L50A ve L50B	<i>Enterococcus faecium</i>
Lactacin F	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
Acidocin J1132	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Plantaricin S	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Sınıf IIc	
Acidocin B	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Enterocin P	<i>Enterococcus faecium</i>
Bacteriocin 31	<i>Enterococcus faecalis</i>
Sınıf III	
Helveticin J	<i>Lactobacillus helveticus</i>
Enterolysin	<i>Enterococcus faecalis</i>
Caseicin 80	<i>Lactobacillus casei</i>
Sınıf IV	
Mesenterocin 52	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Lactocin 27	<i>Lactobacillus helveticus</i>

Sınıf I bakteriyosinler, lantibiyotikler olarak isimlendirilmektedir. Lantibiyotikler yapılarında translasyon sonrası modifiye tiyoeter amino asitleri içeren, hücre membranı üzerine etki eden küçük molekül ağırlıklı (< 5 kDa) ve sıcaklığa dirençli peptidlerdir. Bu gruptaki bakteriyosinler diğer bakteriyosinlerden yapılarındaki dehidro amino asitlerin (serin, treonin) ve tiyoeter amino asitlerin (lantionin, β -metil-lantionin) varlıkları ile ayrılmaktadırlar. Lantibiyotik bakteriyosinler yapısal benzerliklerine göre iki alt sınıfa ayrılmaktadır. Alt sınıf Ia uzun, esnek yapıda ve pozitif yüklü peptidleri içermektedir. Genel olarak duyarlı hedef mikroorganizma türlerinin sitoplazmik membranlarında por oluşturarak etki göstermektedirler. Nisin bu grup bakteriyosine örnek olarak verilebilir. Alt sınıf Ib, globuler, yapı olarak daha sıkı, negatif yüklü ya da net yüke sahip olmayan peptidlerdir. Bu sınıfa cinnamycin ve mutacin A örnek gösterilebilir (Cleveland et al., 2001; Jeevaratnam et al., 2005). Etki mekanizmaları elzem enzimatik reaksiyonları engelleme biçimindedir. Sınıf II bakteriyosinler non-lantibiyotikler olarak da bilinmektedir. Bunlar genel olarak 10 kDa'dan daha küçük molekül ağırlığına sahip, yapılarında modifiye amino asit içermeyen sıcaklığa dirençli (100 °C'de 30 dakikadan 121 °C'de 15 dakikaya kadar), membran aktif bakteriyosinlerdir. Bunlar üç alt grubu içermektedir. Sınıf IIa; *Listeria* türlerine karşı etkili ve N terminalinde Tyr-Gly-Asn-

Gly-Val-Xaa-Cys- dizilimine sahip peptidlerdir. Pediocin PA-1 ve sakacin P bu grup bakteriyosinlere örnektir. Sınıf IIb üyeleri iki farklı peptidin kompleks oluşturması ile meydana gelmektedir. Bakteriyosinin aktivite göstermesi için iki peptidin bir arada bulunması gerektiği gibi, iki peptid ayrı ayrı da etki gösterebilirler. Ancak peptidlerin etkilerinin sinerjik olarak arttığı bilinmektedir. Bu grup bakteriyosinlere örnek olarak lactococcin G ve plantaricin EF ve CK verilebilir (O'Sullivan et al., 2002). Sınıf IIc, bakteriyosinler Sınıf II bakteriyosinlerin alt gruplarına uymayan bakteriyosinleri içermektedir. *E. faecium* L50 suşu tarafından üretilen enterocin L50A ve enterocin L50B bu alt gruba örnek verilebilir. Sınıf III bakteriyosinler, moleküler ağırlığı 30 kDa'un üzerinde olan büyük, sıcaklığa duyarlı peptidlerdir. Helveticin J, helveticin V, acidofilicin A, lacticin A ve B bunlara örnektir (Cintas et al., 2001; Parada et al., 2007). Sınıf IV bakteriyosinler yapılarında lipid ve karbonhidrat içeren bakteriyosinler olarak tanımlanmaktadır. Bu bakteriyosinler yapılarındaki lipid veya karbonhidrat kısımlarının kaybı ile aktivitelerini yitirmektedirler (Jeevaratnam et al., 2005; Toomula et al., 2011).

Bakteriyosinlerin biyokimyasal yapılarının karakterize edilebilmesi için yeterli düzeyde ve miktarda homojen olarak saflaştırılmaları gerekmektedir. Fakat bakteriyosinler LAB tarafından düşük miktarlarda üretildiğinden, bunların saflaştırma aşamasından önce konsantre edilmeleri gerekli hale gelmektedir (Pingitore et al., 2007).

Bakteriyosinlerin saflaştırılması zor bir prosestir. Saflaştırma sırasında bakteriyosin molekülleri ortamdaki diğer moleküllerle etkileşime girebilmekte ve yapısı bozulabilmektedir. Bu sebeple her bakteriyosin için farklı saflaştırma protokolleri uygulamak gereklidir. Bakteriyosinlerin saflaştırılmasında ilk aşama bakteriyosin üreticisi hücrelerin santrifüjlenerek ortamdaki uzaklaştırılmasıdır. Sonraki saflaştırma aşamasında ise genellikle doymuş amonyum sülfat çözeltisi kullanılmaktadır. Bakteriyosinler protein kökenli olduklarından proteinlerle benzer reaksiyonlar vermektedirler. Bakteriyosin içeren süpernatant ortamına amonyum sülfat gibi bir nötral tuzun (salting-out) eklenmesi ile ortamın iyonik dengesi değişmekte ve moleküller arası hidrofobik etkileşim sonucu bakteriyosinler çökmektedir. Santrifüj işleminin ardından süpernatantın uzaklaştırılmasıyla elde

edilen bakteriyosin çökeltisi uygun bir tamponda çözülerek kullanılabilir. Genel olarak kullanılan amonyum sülfat konsantrasyonu % 40 - 75 (w/w) arasında değişmekle beraber, bakteriyosin yapılarında görülen büyük farklılıklar nedeniyle uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun ön çalışmalar ile belirlenmesinde fayda görülmektedir (Pingitore et al., 2007). Bakteriyosinlerin çöktürülmesi amacıyla trikloroasetik asit, etanol, metanol veya aseton gibi organik çözücüler de kullanılabilir. Amonyum sülfat uygulamasıyla benzer şekilde organik çözücü uygulamasından sonra çöken bakteriyosin santrifüjlenerek çözelti ortamından alınır. Çöktürme işleminde kullanılan amonyum sülfat vb. maddeler ile diğer safsızlıklar ultrafiltrasyon, dializ veya jel filtrasyon yöntemleri kullanılarak giderilebilir (Guantam and Sharma, 2009).

Bakteriyosinlerin ileri düzeyde saflaştırılmaları amacıyla iyon değişim kromatografisi, hidrofobik interaksiyon kromatografisi, ters faz yüksek basınç sıvı kromatografisi (RP-HPLC), izoelektrik odaklama (isoelectric focusing), jel filtrasyonu gibi yöntemlerin biri veya birkaçı birlikte kullanılabilir. İyon değişim kromatografisi ve hidrofobik interaksiyon kromatografisi laktik asit bakterileri tarafından üretilen çoğu bakteriyosinin pozitif yüklü amino asitleri içermeleri ve güçlü hidrofobik yapıları nedeniyle uygun saflaştırma yöntemleri olarak öne çıkmaktadır (Parada et al., 2007; Pingitore et al., 2007). Diğer bir saflaştırma yöntemi ise bakteriyosin üreticisi suşların ürettikleri bakteriyosinleri nötral pH'da hücre duvarına adsorblayabilmesi ve adsorblanan bakteriyosinin asidik pH'larda hücre duvarından desorbsiyonuna dayanmaktadır. Saflaştırılan bakteriyosin molekül ağırlığı sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) veya kütle spektroskopisi yöntemleri kullanılarak belirlenebilir. Bakteriyosin yapısı en son aşamada bakteriyosin üretici gen diziliminin PCR yöntemleri ile belirlenmesi ve bakteriyosin yapısında yer alan aminoasitlerin diziliminin saptanması ile kesin olarak belirlenebilir (Pingitore et al., 2007; Settanni and Corsetti, 2008).

Yang et al. (1992) yaptıkları bir çalışmada salivaricin bakteriyosinini saflaştırmışlardır. Araştırmacılar bu amaçla öncelikle bakteriyosin ortamındaki üretici suşu inaktive etmek için 70 °C'de 25 dakika ısıtım uygulamıştır. Sonraki

aşamada ölü hücrelerin ortamdaki bakteriyosini hücre duvarlarına adsorblayabilmeleri için ortam pH'sı 7'ye ayarlanmış ve bakteriyosin bu ortamda bir saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler santrifüjlenerek ortamdaki alınmış ve bu hücreler tampon ortamında alınarak 4 °C de 1 saat çalkalanarak hücre yüzeyinden bakteriyosinlerin ayrılması sağlanmıştır. Bu bakteriyosin çözeltisindeki hücreler santrifüjlenerek ortamdaki uzaklaştırılmış ve bakteriyosin çözeltisi elde edilmiştir. Araştırmacılar, elde edilen bakteriyosinin amonyum sülfat yöntemi ile elde edilen bakteriyosine göre daha az protein kontaminantı içermesi nedeniyle bu yöntemin daha avantajlı olduğunu belirtmişlerdir.

Kingcha et al. (2012) yaptıkları çalışmada *P. pentosaceus* BCC 3772 suşunun ürettiği bakteriyosini sırasıyla hidrofobik interaksiyon kromatografisi, katyon değişim kromatografisi ve ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile saflaştırmışlardır. Saflaştırılan bakteriyosin molekül ağırlığı matris ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI–TOF) ile 4.62 kDa olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar, Edman N-terminal sekans analizi sonucunda bakteriyosinin 44 amino asitten oluştuğunu tespit etmişlerdir.

Saflaştırma işlemleri sonucunda bakteriyosinlerin stabilitesinde azalmalar meydana gelebilmektedir. Bununla beraber sıcaklık ve pH değişimleri sonucunda da bakteriyosinlerin aktivitelerinde değişim olabilmektedir. LAB tarafından üretilen çoğu bakteriyosin asidik veya nötral pH'larda stabilitesini korumakta, pH 8 ve üzeri pH'larda ise aktivitelerinde inhibisyon görülebilmektedir (nisin, pediocin AcH, lecocin A-UAL 187). Sıcaklık direnci LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin birçoğunun ana karakteristiklerindendir. Genel olarak 60 -100 °C'de 30 dakika (lactocin 27, lactocin S) ve 121 °C'de 15 dakikalık ısıtma işlemi (lactacin B, nisin vb) dayanabilmektedirler. LAB'nin ürettikleri bakteriyosinlerin yüksek sıcaklığa karşı dayanıklılıkları, bunların küçük globüler yapıda peptidler olması, yapılarında güçlü hidrofobik bölgelerin ve dayanıklı çapraz bağların bulunması ve yüksek glisin içerikleri ile açıklanmaktadır (De Vuyst and Vandamme, 1994; Jeevaratnam et al., 2005). Bakteriyosinlerin yüksek sıcaklığa gösterdiği direnç gıdalarda koruyucu olarak kullanımında göz önüne alınan temel faktörlerdendir.

Bakteriyosinlerin antimikrobiyel etkileri “Barrel-Stave”, “Wedge-Model” ve “Lipid Model” modelleri ile açıklanmaktadır. Bu üç modelde de antimikrobiyel etki tipinde; bakteriyosinlerin katyonik yapıları ile hücre membranında bulunan anyonik lipidlerin reaksiyona girmesi ve hücre membranında oluşturulan porlar aracılığıyla hücre içi amino asit, ATP ve iyonlar gibi küçük moleküllerin hücre dışına sızması temel alınmaktadır. Gram-negatif bakteriler hücre duvarı yapılarındaki farklılıklar nedeniyle Gram-pozitif LAB’nin ürettikleri bakteriyosinlere karşı daha fazla direnç göstermektedir (Moll et al., 1999; Cotter et al., 2005; Settanni and Corsetti, 2008; Guantam and Sharma, 2009).

Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler genel olarak yakın türdeki Gram-pozitif bakterilere karşı antimikrobiyel aktivite göstermektedir. Örneğin, nisin Gram-pozitif bakterilerin hücre membranında hasarlara neden olarak etki göstermektedir. Membranda oluşan hasarlardan amino asit ve katyon kaybı sonucunda hücre içi biyosentez engellenmekte ve membran potansiyeli çökerek hücre ölmektedir. Ayrıca, membran üzerinde oluşan hasarlardan içeri giren su, ozmotik basıncı artırarak hücrenin ölümüne neden olabilmektedir. Pediocin ve lactococcin A gibi diğer bakteriyosinler de nisinin etki mekanizmasına benzer olarak membran potansiyelinin kaybına yol açmakta ve membran geçirgenliğinin artması sonucu hücre ölmektedir. Bakterisid etkili bakteriyosinlerden farklı olarak, lactocin 27 ve leucocin A-UAL 187 gibi bazı bakteriyosinlerin ise bakteriyostatik etki gösterdikleri belirtilmektedir (Jeevaratnam et al., 2005; Guantam and Sharma, 2009).

Bakteriyosinler, bakteriyosin üreticisi suşun gıda üretiminde direkt olarak kullanılması veya saflaştırılmış bakteriyosinin gıda formülasyonuna eklenmesi yolları ile gıdalarda kullanılabilmektedirler. Direkt olarak bakteriyosinin gıdalarda kullanımı minimum işlem görmüş et ürünleri gibi yüksek asitliğin istenmediği, düşük sıcaklığın tek koruma metodu olarak kullanıldığı gıdalar için uygun olabilmektedir. Bakteriyosin kullanımı, bu gıdalara uygulanacak olan ısıtma işlemdeki sıcaklık derecesini düşürülebilmekte, böylelikle de gıdanın besinsel ve duyu özellikleri iyileştirilebilmekte ve ısıtma işlem maliyeti azaltılabilmektedir (Galvez et al., 2007; Guantam and Sharma, 2009).

Rodriguez et al. (2005) peynirlerde olgunlaşma sırasında peynir ortamında bulunan *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7'in üzerine bakteriyosin üreticisi yardımcı kültürlerin etkisini incelemişlerdir. Söz konusu patojenler peynir üretiminde kullanılan süte 6 log düzeyinde eklenmiştir. İçinde patojen bakteriler bulunan süt dörde bölünmüş ve her birine yardımcı kültür olarak bakteriyosin üreticisi 4 adet LAB kültürü ayrı ayrı % 1 oranında inoküle edilmiştir. LAB kültürü olarak *Lc. lactis* CL1 (nisin üreticisi), *Lc. lactis* ES1 515 (nisin üreticisi), *Lc. lactis* CL2 (nisin ve pediosin üreticisi) ve *P. acidilactici* 347 (pediosin üreticisi) kullanılmıştır. Peynirler üretimden sonra 12 °C'de 30 gün depolanmıştır. Depolamanın sonunda *L. monocytogenes* sayısında kontrol örneğine (yardımcı kültür içermeyen) göre; üretimde *P. acidilactici* 347 kullanılan peynirlerde 0.63 log, *Lc. lactis* ES1 515 kullanılan peynirlerde 0.17 log, *Lc. lactis* CL1 kullanılan peynirlerde 2.97 log ve *Lc. lactis* CL2 kullanılan peynirlerde ise 1.64 log düzeyinde azalmalar meydana gelmiştir. *S. aureus* sayısında kontrol örneğine göre; üretimde *P. acidilactici* kullanılan peynirlerde 0.57 log, *L. lactis* ES1 515 kullanılan peynirlerde 0.64 log, *L. lactis* CL1 kullanılan peynirlerde 0.98 log ve *L. lactis* CL2 kullanılan peynirlerde ise 0.40 log, düzeyinde azalmalar olmuştur. *E. coli* O157:H7 sayısında ise kontrol örneğine göre; üretimde *P. acidilactici* kullanılan peynirlerde 0.47 log, *L. lactis* ES1 515 kullanılan peynirlerde 0.15 log, *L. lactis* CL1 kullanılan peynirlerde 0.84 log ve *L. lactis* CL2 kullanılan peynirlerde ise 1.69 log düzeyinde azalmalar meydana gelmiştir. Çalışma sonucunda kontrol grubuna göre bakteriyosin üreticisi yardımcı kültürlerin kullanımı ile test edilen patojen bakterilerin tümünün sayısında azalma olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar bakteriyosin üreticisi suşların çeşitli gıda patojenlerinin kontrolünde kullanılabileceğine dikkat çekmişlerdir.

Olivares et al. (2006) anne sütünden izole ettikleri LAB'nin *S. aureus*, *L. monocytogenes* ve *E. coli* test bakterileri üzerine antimikrobiyel etkilerini incelemişlerdir. *Lactobacillus gasseri* CECT5715 suşunun *L. monocytogenes* ve *S. aureus* üzerine antimikrobiyel etkisi olduğu, *E. coli* üzerine ise antimikrobiyel etkisinin bulunmadığı gözlenmiştir. *Lb. gasseri* CECT5714 suşunun ise üç test bakterisi üzerine de antimikrobiyel etkili olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar,

antimikrobiyel etkili bakterilerin bebek bağırsak florasında potansiyel patojenlere karşı yararlı olabileceğini belirtmişlerdir.

Sirilun et al. (2010) fermente domuz ve balık ürünlerinden izole ettikleri 4 adet *Lb. plantarum* suşunun *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 11778, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Sal. typhii* ve *Shigella sonnei* test bakterileri üzerine antimikrobiyel etkilerini araştırmışlardır. İzolatlardan elde edilen hücre içermeyen süpernatantların tümünün test bakterilerine karşı antimikrobiyel etkili olduğu tespit edilmiştir.

Ananou et al. (2005) peynirden izole ettikleri bakteriyosin üreticisi *E. faecalis* A-48-32 suşunu sosis üretiminde kullanmışlardır. Çalışmada, sosis üretiminde test bakterisi olarak *L. monocytogenes* CECT 4032 kullanılmıştır. Sosis üretiminde 3 farklı yol izlenmiştir. *E. faecalis* A-48-32 sosis üretiminde kullanılan ete 6 log veya 7 log düzeyinde eklenmiş ya da ilgili bakteriyosin üreticisinden elde edilen saf enterosin et ortamına direkt olarak ilave edilmiştir. Sosis örnekleri üretimden sonra 20 °C'de 9 gün depolanmıştır. Direkt olarak enterosin katılan sosilerde depolamanın 3. gününde *L. monocytogenes* sayısı belirlenebilir seviyenin altına düşmüştür. Üretiminde 6 log *E. faecalis* A-48-32 ilave edilen örneklerde depolamanın 9. gününde *L. monocytogenes* sayısında bir değişim gözlenmezken, 7 log kültür ilave edilen örneklerde depolamanın 9. günü sonunda *L. monocytogenes* sayısı belirlenebilir seviyenin altına düşmüştür. Araştırmacılar sosis üretiminde *L. monocytogenes*'in kontrolü amacıyla *E. faecalis* A-48-32 suşunun kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Starter kültür olarak *P. pentosaceus* BCC 3772 suşunun kullanıldığı geleneksel Tayvan domuz sosisi üretiminde fermentasyon (18-24 saat) sonunda *L. monocytogenes* ATCC 19115 sayısında 3.2 log düzeyinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu suşun geleneksel sosis üretiminde ürün kalitesini etkilemeden kullanılabileceği belirtilmiştir (Kingcha et al., 2012).

Matijasic et al. (2007) peynir üretiminde bakteriyosin üreticisi *Lb. gasseri* K7 suşunun *C. tyrobutyricum* üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar, süte 3 log/mL düzeyinde *C. tyrobutyricum* sporu inoküle edilerek ve *Lb. gasseri* K7 ile

Üretilen peynirlerde depolamanın 8. haftası sonunda gaz oluşumuna baēlı olarak hafif çatlamalar gözlemlerken, kontrol grubu peynirlerin (*Lb. gasseri* K7 içermeyen) yapısının tamamen bozulduēunu bildirmişlerdir. Çalışmada, *Lb. gasseri* K7 ile üretilen peynirlerde 8 hafta sonunda oluşan bütrik asit miktarının kontrol rneēine göre 0.55 g/kg daha az olduēu tespit edilmiştir. Araştırmacılar peynir retiminde *Lb. gasseri* K7 kullanımı ile bozucu mikroorganizmaların gelişiminin ve etkilerinin azaltılabileceēini bildirmişlerdir.

Sofralık yeşil zeytin üretimi ile ilgili yapılan bir çalışmada *Lb. plantarum* LPC010 suşunun teknolojik özellikleri incelenmiştir. Çalışmada, *Lb. plantarum* LPC010 suşunun rettiēi antimikrobiyel madde aracılıēı ile ortamda bulunan doēal bakterilerin gelişiminin engellenebildiēi ve bu sayede ortama *Lb. plantarum* LPC010 suşunun hakim olması ile üründe istenen asitlik gelişiminin daha hızlı olduēu bildirilmiştir (Jiménez-Díaz et al., 2003).

Ekşi hamur üretimi ile ilgili yapılan araştırmalarda da üretimde bakteriyosin üreticisi suşların kullanılması ile üründe snme etmeni *Bacillus* suşlarının gelişiminin engellenebileceēi belirtilmiştir (Menteş et al., 2007).

Gıda endstirisinde gıda formülasyonuna eklenmesine izin verilen ve üzerinde en çok çalışılan bakteriyosin *Lc. lactis* suşları tarafından üretilen nisindir (Savadogo et al., 2006). *Lc. lactis* suşları tarafından üretilen nisin, ticari olarak gıdalarda kullanılmasına izin verilen tek bakteriyosindir. Nisin, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından genel olarak güvenli kabul edilebilir (GRAS) olarak onaylanan nisin 50'den fazla ülkede fermente süt ürünleri, yumurta ürünleri, konserve sebzeler, salata sosları ve fermente alkollü içkilerin üretiminde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (O'Sullivan et al., 2002)

Nisin, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından güvenli kabul edilebilir (GRAS) olarak onaylanmış koruyucu gıda katkı maddesidir. Nisin günümüzde 50'den fazla ülkede fermente süt ürünleri, yumurta ürünleri, konserve sebzeler, salata sosları ve fermente alkollü içkilerin üretiminde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Spelhaug and Harlander, 1989; O'Sullivan et al., 2002; Settanni and Corsetti, 2008).

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin gıdalarda antimikrobiyel olarak kullanımına yönelik diğer bazı araştırmalar Çizelge 6'da özetlenmiştir.

Antimikrobiyel etki gösteren bakteriyosinlerin veya bunları üreten suşların gıdalarda biyo-koruyucu olarak kullanılmasındaki en büyük problem bakteriyosin etkinliğinin; gıda ortamında bulunan bakteriyosinlerin çeşitli gıda bileşenlerine bağlanması, proteazlar veya diğer inhibitörlerle antimikrobiyel aktivitenin kaybolması, gıda ortamında bakteriyosin çözünürlüğündeki azalma gibi nedenlerle değişebilmesidir. LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin diğer bir olumsuz tarafı ise bu bakteriyosinlerin genellikle Gram-negatif bakteriler üzerine etkili olmamalarıdır (Settanni and Corsetti, 2008).

Çizelge 6. Bazı bakteriyosin üreticisi laktik asit bakterileri ve kullanıldıkları gıdalardaki etkileri

Bakteriyosin üreticisi LAB	Üretilen Bakteriyosin	Kullanılan ürün	İnhibisyon etkisi	Referans
<i>Lb. sakei</i>	Sakasin	Sucuk	<i>L. monocytogenes</i>	Leroy and De Vuyst, 2005
<i>P. acidilactici</i>	Pediosin	Sucuk	<i>L. monocytogenes</i>	Albano et al., 2009a
<i>Lc. lactis</i>	Nisin	Vidiago peyniri	<i>C. tyrobutyricum</i>	Rilla et al., 2003
<i>Lc. lactis</i>	Nisin	Gouda peyniri	<i>L. monocytogenes</i>	Bouksaim et al., 2000
<i>Lc. lactis</i>	Nisin	Camembertii peyniri	<i>L. monocytogenes</i>	Maisnier-Patin et al., 1992
<i>Lc. lactis</i>	Nisin	Bira ve Şarap	İstenmeyen laktik asit bakterileri	Ogden et al., 1988; Daeschel et al., 1991
<i>P. acidilactici</i>	Pediosin	Çiğ tavuk	<i>L. monocytogenes</i>	Goff et al., 1996
<i>P. pentosaceus</i>	Pediosin	Kıyma	<i>L. monocytogenes</i>	Skytta et al., 1991
<i>Lb. gasseri</i>	Gassericin	Peynir	<i>C. tyrobutyricum</i>	Matijasic et al., 2007
<i>E. faecalis</i>	Enterosin	Elma şırası	<i>B. licheniformis</i>	Grande et al ., 2006
<i>E. faecalis</i>	Enterosin	Meyve suyu	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	Grande et al ., 2005
<i>E. faecium</i>	Enterosin	Peynir	<i>L. monocytogenes</i> ve <i>L. inocua</i>	Saavedra et al., 2003
<i>E. faecium</i>	Enterosin	Sucuk	<i>L. monocytogenes</i>	Ananou et al., 2005

LAB suşlarının bakteriyosin üreticisi olup olmadığını belirlemek için çeşitli yöntemlerden yararlanılabilmektedir. Bu amaçla kullanılan yöntemler direkt ve indirekt yöntemler olarak iki ana grup altında toplanabilir.

“Agar damlatma yöntemi” yaygın olarak kullanılan direkt yöntemdir. Bu yöntemde bakteriyosin üreticisi olduğu düşünülen test suşu agarlı besiyeri yüzeyine nokta halinde aşılansak kolonilerin oluşması için uygun sıcaklıkta bir gece boyunca inkübe edilmektedir. Elde edilen kültür yüzeyine, duyarlılığı test edilecek bakteri suşu eklenmiş agarlı besiyeri ikinci kat olarak dökülmektedir. İnkübasyon sonucunda bakteriyosin üreticisi olduğu düşünülen test suşunun geliştiğı damlatma kültür alanı etrafında oluşan inhibisyon zonu test edilen suşun bakteriyosin ürettiğine işaret etmektedir (Du Toit et al., 2000; Pingitore et al., 2007).

“Kuyu difüzyon yöntemi” yaygın olarak kullanılan indirekt yöntemdir. Bu yöntemde bakteriyosin üreticisi suşun sıvı besiyerinde inkübasyonu sonucunda elde edilen kültür santrifüjlenerek hücre içermeyen süpernatant elde edilmektedir. Bu arada, duyarlılığı test edilecek bakteri suşu aşılansak agarlı besiyeri steril Petri kutularına dökülmekte ve katılaşma sağlandıktan sonra besiyerinde uygun sayıda kuyucuklar açılmaktadır. Daha önce elde edilmiş olan süpernatant kuyucuklara eklenerek inkübasyonu sağlanmaktadır. İnkübasyon sonunda kuyucuklar etrafında oluşan inhibisyon zonları gözlenerek, zon çapları ölçülmektedir. Kuyucuk çevresinde zon oluşumu süpernatantın bakteriyosin içerdiğine işaret etmektedir. Bakteriyosin aktivitesinin kantitatif olarak belirlenebilmesi için 2 katlı seri bakteriyosin dilüsyonlarının hazırlanarak antimikrobiyel aktiviteleri test edilmektedir. Antimikrobiyel aktivite gösteren en yüksek dilüsyonun oranı kullanılarak aktivite (AU/mL) belirlenebilmektedir (Coşansu et al., 2007; Pingitore et al., 2007).

LAB suşlarının bakteriyosin üreticisi olup olmadığını belirlenmesi amacıyla yapılan testlerde, duyarlılığı test edilecek olan test bakterisinin seçiminde bakterilerin bakteriyosinlere karşı gösterdikleri direnç farklılıkları göz önüne alınmalıdır. Dikkate alınması gereken bir başka husus ise inhibisyon zonunun LAB tarafından üretilen organik asit, hidrojen peroksit vb. antogonostik maddelerin etkisiyle oluşma olasılığıdır. LAB tarafından üretilen laktik asit ve hidrojen peroksitten kaynaklanabilecek inhibisyon etkilerinin, nötralize edilmiş (pH 6-7) ve

içine katalaz eklenmiş süpernatantların kullanımı ile elimine edilmesi gerekmektedir (Oh et al., 2000; Karaoğlu et al., 2003; Sirilun et al., 2010).

Yukarıda belirtilen yöntemlerle bakteriyosin aktivitesi kolaylıkla belirlenebilmekteyse de tam olarak ortamda hangi bakteriyosinin sentezlendiği ancak ileri saflaştırma teknikleri ve amino asit sekansının belirlenmesi ile mümkün olabilmektedir (Parada et al., 2007).

Proteaz duyarlılığı, LAB'nin inhibitör etkili maddesinin bakteriyosin olup olmadığının ortaya konulmasında kilit bir testtir. Bakteriyosinler protein yapısında bileşikler olduklarından genel olarak tripsin, α -kimotripsin, pepsin ve proteinaz-K gibi proteolitik enzimler ile inaktive olurlar. Ayrıca bakteriyosinlerin proteolitik enzimlere olan dirençleri arasındaki farklılıklar izole edilen bakteriyosinin yapısı hakkında da bilgi verebilmektedir. Bakteriyosinlerin sindirim sistemindeki proteolitik enzimlere karşı direnci, koruyucu olarak kullanıldıkları gıdanın tüketilmesi sonucu sindirim sistemi mikrobiyel florasında neden olacağı değişim bakımından önem taşımaktadır (Parada et al., 2007).

Bazı bakteriyosinler yapısında lipid yada karbonhidrat bileşenler içermektedir. Yapıda bu tip bileşenlerin bulunup bulunmadığı α -amilaz ve lipaz uygulamaları ile doğrulanabilmektedir. Thermophilin (Aslam et al., 2011) ve lactocin 27 (Upreti et al., 1975) lipo-karbonhidrat bakteriyosin yapılarına ve pediocin HA 6111 (Albano et al., 2007) ve pediocin SJ-1 (Schved et al., 1993) glikoprotein yapılarına örnek olarak verilebilirler. *Lb. plantarum* LPCO 10 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin proteaz ile glikolitik ve lipolitik enzim uygulamaları sonucunda aktivitesini kaybettiği tespit edilmiştir. Söz konusu bakteriyosinin belirtilen enzimlere duyarlı olmasının, bu bakteriyosinin yapısında karbonhidrat ve lipid yapısında bileşenler bulunduğuna işaret ettiği belirtilmektedir (Jiménez-Díaz et al., 1993).

Anne sütü, tüm beslenme ihtiyaçlarını karşılaması nedeniyle yeni doğan bebekler için en iyi gıda olarak bilinmektedir (Çizelge 7) (Prentice, 1996).

Çizelge 7. Anne sütü bileşimi (Prentice, 1996)

Bileşen	
Yağ	Yağ asitleri, çoklu doymamış yağ asitleri
Protein	Kazein, α -laktoalbumin, laktoferrin, IgA, IgG, lisozim, serum albumin, β -laktoglobulin
Karbonhidrat	Oligosakkartiler, laktoz
Mineral	Kalsiyum, fosfor, sodyum, potasyum, klor

Anne sütü bebeklerin hastalıklara karşı korunmasında önemli rol oynamaktadır. Anne sütündeki bu koruyucu etkinin yapısındaki immunoglobulinler, immunokomponent hücreler veya bazı antimikrobiyel bileşikler gibi bazı bileşenlerin tümleşik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bileşimindeki prebiyotik maddeler ise yeni doğmuş bağırsak florasının oluşumunu desteklemektedir. Anne sütündeki mikroorganizmaların yeni doğan bebeklerin bağırsak florasının oluşumunda ve gelişiminde önemli bir faktör olarak rol aldığı belirtilmiştir (Martin et al., 2004).

Anne rahminde normal bir fetusun steril olduğu bilinmektedir. Yeni doğanların bağırsak dokusunun oluşumunda bakteri kolonizasyonunun doğum kanalından geçerken başladığı ve annenin fekal ve vajinal mikroflorası ile çapraz kontaminasyonundan oluştuğu görüşü büyük oranda kabul görmektedir. İşaretlenmiş *E. faecium* suşu ile beslenen gebe fareler ile yapılan çalışmalar suşun bebek bağırsağına düşük oranda ve meme bezlerine yüksek oranda taşındığını göstermiştir. Genel olarak, bu sonuç bir kaç kommensal bakteri türünün plasentaya geçebildiğini ve bu nedenle de bağırsak dokusunda kolonizasyonun doğumdan önce başlayabildiği görüşünü kuvvetle desteklemektedir (Martin et al., 2003; Martin et al., 2004).

Bebeklerin bağırsak mikroflorasının kompozisyonu bebeğin beslenme tipinden büyük ölçüde etkilenmektedir. Anne sütü ve bebek mamasının mikrobiyolojik kompozisyonundaki farklılıklar, bunlarla beslenen bebeklerin bağırsak mikroflorasının bakteriyel kompozisyonundaki farklılıkların kaynağını oluşturmaktadır. Anne sütüyle beslenen bir bebeğin günde 800 mL süt emerek

yaklaşık 10^5 – 10^7 adet/gün kommensal bakteriyi aldığı tahmin edilmektedir. Böyle bir tüketim sonucu yeni doğan bağırsak florası kompozisyonunun anne sütü florasını yansıtması sürpriz değildir (Martin et al., 2004; Martin et al., 2005b; Olivares et al., 2006). Nitekim, anne sütüyle beslenen bebeklerin bağırsak mikroflorasının tıpkı anne sütündeki gibi birkaç predominant Gram-pozitif türden oluştuğu, süttten kesilmenin ardından bebeğin bağırsak mikroflorasının daha çeşitlendiği belirtilmektedir (Heikkila and Saris; 2003; Martin et al., 2004; Martin et al., 2005b; Reviriego et al., 2005). Rinne et al. (2005) anne sütü ile beslenen bebeklerin dışkılarında, mama ile beslenen bebeklere göre daha fazla oranda LAB'ne rastlandığını belirtmişlerdir. Ayrıca literatürde anne sütü ile beslenen bebeklerde enfeksiyon hastalıklara rastlanma oranının mama ile beslenen bebeklere göre daha az olduğu belirtilmektedir.

Anne sütünde bulunan bakterilerin kaynağı halen tartışma konusu olmakla birlikte, bazı türlerin anne bağırsağından meme bezlerine endojen olarak taşınmış olabileceği düşünülmektedir (Martin et al., 2003; Martin et al., 2004).

Anne sütünün doğal mikroflorasında bulunan ve genellikle izole edilen bakteriler stafilokoklar, streptokoklar, mikrokoklar, laktobasiller ve enterokoklardır (Heikkila and Saris, 2003; Martin et al., 2004). Sağlıklı annelerin sütünden izole edilen LAB türleri bakteriyoterapötik ya da probiyotik ajan olarak kullanılabilecek suşları içermektedir. Bu LAB türlerinin genellikle *Lb. gasseri*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *E. faecium* ve *E. faecalis* olduğu belirtilmektedir. Bu bakterilerden *Lb. gasseri*, *Lb. rhamnosus* ve *E. faecium* potansiyel probiyotik bakteriler arasında değerlendirilmekte ve bunlardan bazıları ticari probiyotik ürünlerde kullanılmaktadır (Martin et al., 2004).

Albesharat et al. (2011) yaptıkları çalışmada anne sütünden *Lb. brevis*, *Lb. oris*, *Lb. animalis*, *E. durans*, *E. hirae*, *Pediococcus* spp., *Str. gallolyticus*, *Str. vestibularis*, *Str. australis* ve *S. haemolyticus* bakterilerini izole etmişlerdir. Araştırmacılar, çalışma sonucunda anne mide bağırsak sisteminden anne sütüne, anne sütünden de bebek mide bağırsak sistemine dikey olarak bakteri transferleri olabildiğini belirtmişlerdir.

Son yıllarda klinik öneme sahip patojen bakterilerin, antibiyotiklere karşı yaygın olarak direnç kazanma özelliklerinden dolayı, konakçının mikroflorasında baskın hale geldiği bilinen bir gerçektir. Bu patojenlerin baskın hale gelmesini önleyebilecek ya da bu patojenlerden koruyacak yararlı bakterilerin kullanımı enfeksiyonların tedavisinde antibiyotik kullanımına karşı alternatif bir yaklaşım oluşturmuştur. Bu yaklaşım, kommensal ya da probiyotik bakterilerin potansiyel patojenlerle başarılı bir şekilde rekabet edebilme özelliğine dayanmaktadır. Sağlıklı annelerin sütleri, anneleri ve/veya bebekleri enfeksiyon hastalıklarına karşı korumada rolü olan potansiyel probiyotik ya da biyoterapotik LAB'nin kaynağı olabilmektedir. Anne sütünden izole edilen bakteriler patojenlere karşı koruma sağlamanın yanı sıra insan probiyotikleri için genel olarak önerilen insan orijinli olma, bebekler tarafından uzun süre güvenle tüketilebilme, süt ve bağırsak mukoza yapısına adaptasyon ve mukozaya tutunabilme gibi özellikleri de taşıdığından dikkatleri üzerlerine çekmiştir (Martin et al., 2004; Martin et al., 2005b).

Yapılan çalışmalar sağlıklı annelerin sütlerinden izole edilen laktobasillerin probiyotik potansiyellerinin ticari probiyotik ürünlerinde kullanılan suşlarla benzerlik gösterdiklerini ortaya koymaktadır. Anne sütünden izole edilen kommensal bakterilerin, *S. aureus*'un neden olduğu yeni doğan enfeksiyonları ve annedeki meme enfeksiyonlarını önlemede bakteriyoterapötik ajan olarak kullanılma potansiyeli olduğu gösterilmiştir (Heikkila and Saris, 2003).

Anne sütünde bulunan *Lactobacillus* spp. gibi LAB'nin bulundukları ortamda pH'yı düşürerek patojen bakterilerin üremesine engel olduğu ve bu şekilde enfeksiyonlara karşı savunma geliştirdiğine inanılmaktadır (Lönnerdal, 2000). Bununla beraber anne sütündeki LAB ürettikleri bakteriyosin gibi antimikrobiyel etkili metabolitler sayesinde patojenleri inhibe ederek yararlı etki de sağlayabilmektedir (Olivares et al., 2006).

Anne sütünün pediatrik patojenlere (*Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Vibrio cholera*, *Shigella flexneri*) karşı antimikrobiyel aktivitesinin *in-vitro* olarak araştırıldığı bir çalışmada, test edilen tüm patojen bakterilerin çeşitli oranlarda inhibe olduğu bildirilmiştir. Bu

inhibisyonların, sütte bulunan imminoglobulinler, lökositler, laktoperoksidaz, lizozim ve laktoferrinin yanı sıra ortamdaki LAB'nin metabolitlerinden kaynaklanabileceğine de dikkat çekilmiştir (Esperanza and Ricarchito, 1989). Benzer bir çalışmada, anne sütünden izole edilen *Lb. gasseri* CECT 5715, *Lb. gasseri* CECT 5714 ve *Lb. fermentum* CECT 5716 suşlarının pediatrik patojenlere (*Salmonella Choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp.*) karşı antimikrobiyel etkili olduğu tespit edilmiştir (Olivares et al., 2006).

Martin et al. (2004) anne sütünden izole edilen ve *Leu. mesenteroides*, *Lc. lactis*, *Lb. crispatus*, *Lb. rhamnosus* ve *E. faecalis* olarak tanımlanan LAB suşlarının yeni doğan bebeklerde *S. aureus* enfeksiyonlarına karşı korunmasında rol alabileceklerini belirtmişlerdir. Bebeklerin diyareye karşı korunmasında anne sütünün yararlı olduğu pek çok çalışma bulgularıyla desteklenmektedir (Brown et al., 1989; Janice and Vickerstaff, 1992; Lopez-Alarcon et al., 1997).

Antibiyotiklerin klinik olarak kullanımı ile enfeksiyon hastalıkları kaynaklı ölümlerde önemli oranda azalma sağlanmıştır. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan antibiyotikler ve etki mekanizmaları aşağıdaki gibi sıralanabilir. Streptomisin, kanamisin ve gentamisin aminoglikozit grubu antibiyotikler olup ribozomun 30S alt birimine bağlanarak protein sentezini inhibe ederler. Vankomisin glikopeptid yapısında olup Gram-pozitif bakteriler üzerine etkilidir ve hücre duvarı sentezini engellerler. Tetrasiklin'ler ise ribozom 30S alt birimine bağlanarak protein sentezini önlerler. Makrolid grubu antibiyotiklerden olan eritromisin ise ribozom 50S alt birimine bağlanarak protein sentezini engellerler. β -laktam grubu antibiyotiklerden penisilin ve ampisilin hücre duvarı sentezini engelleyerek etki göstermektedirler. Kloramfenikol ise ribozom 50S alt birimine bağlanarak protein sentezini inhibe ederek etki göstermektedir (Cingi ve Erol, 1996).

Antibiyotik kullanımının giderek yaygınlaşması normal hücre genlerinin mutasyonu ya da hücre dışından antibiyotik direnç genlerinin kazanımına neden olmakta ve bu şekilde oluşan antibiyotik dirençliliği, giderek artan bir problem halini almaktadır (Mathur and Singh, 2005; Ammor et al., 2007b; Pan et al., 2011). Bu durum, çeşitli antimikrobiyel direnç determinantlarının (antibiyotik dirençliliğine neden olan faktörler) kazanım ve yayılımına yol açmaktadır.

Mikroorganizmaların antibiyotiklere direnç özellikleri doğal ve kazanılmış direnç olarak ikiye ayrılmaktadır (Çıtak et al., 2004). Doğal antibiyotik direnç özellikleri bakteriden bakteriye transfer edilemez. Fakat mutasyon veya bakteriyel genoma gen kazanımı ile elde edilen antibiyotik direnç özelliği mikroorganizmalar arasında paralel olarak transfer edilebilir özelliktedir (Mathur and Singh, 2005).

Antibiyotik direnç genlerinin transferinde plazmidlerin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Çataloluk and Gögebakan, 2004). Yapılan çalışmalarda bazı bakterilerde plazmide bağlı antibiyotik direnç özelliğinin ortamdaki plazmidin uzaklaştırılması ile kaybolduğu belirtilmektedir (Morelli et al., 1983). Ülkemizde yapılan bir çalışmada, yoğurtlardan izole edilen 34 adet *Str. thermophilus* suşunun plazmid DNA içeriği ve antibiyotik dirençlilik özellikleri araştırılmış ve bazı suşlarda antibiyotik dirençlilik ve plazmid içeriği arasında bir etkileşim olduğu gözlenmiştir (Aslım ve Beyatlı, 2004). Bu çalışmada bir adet plazmid içeren veya plazmide sahip olmayan bazı suşların birçok antibiyotiğe duyarlı olduğu, buna karşılık 5 adet plazmid DNA'ya sahip üç suşun da birçok antibiyotiğe dirençli olduğu bildirilmiştir. Elde edilen bulgular antibiyotik direnç özelliği ile plazmid arasındaki ilişkiyi doğrular niteliktedir.

LAB'inde belirlenen antibiyotik dirençliliklerinin çoğu doğal olsa da yapılan çalışmalarda LAB'inde bugüne kadar transfer edilebilir kloramfenikol asetiltransferaz (cat-TC), eritromisin [erm(B)] ve tetrasiklin [tet(M) ve tet (S)] direnç genleri de tanımlanmıştır (Tannock et al., 1994; Ammor and Mayo, 2007b). Plazmide bağlı antibiyotik direnci içeren LAB suşlarının insan ve hayvanlarda probiyotik olarak kullanımının güvenli olmadığı belirtilmektedir. Plazmide bağlı antibiyotik direnci, bu özelliğin suşların yapısındaki plazmidler aracılığı ile gıda ortamında bulunabilecek patojen ya da starter bakterilere aktarılma olasılığı nedeniyle önem arz etmektedir (Salminen et al., 1998).

Gıda endüstrisinde ve klinik uygulamalarda probiyotik olarak giderek kullanımı artan LAB'nin antibiyotiklere karşı direnç kazanımının ve antibiyotik direnç genlerinin yayılmasının bu bakterilerin güvenilirliği açısından üzerinde önemle durulması gereken bir konu olduğu belirtilmektedir. Antibiyotiklere dirençli suşların kullanıldığı fermente et, sebze ve süt ürünleri ile hazır gıdalar gibi ürünlerin

tüketilmesi, ortamda bulunabilecek antibiyotiğe dirençli bakterilerle kolon florasının interaksiyona girmesine yol açabilir. Yapılan çalışmalarda, laktik asit bakterilerinden bağırsak florasında bulunan patojen bakterilere sınırlı oranda da olsa antibiyotik direnç genlerinin transferinin mümkün olabileceği bildirilmektedir (Mathur and Singh, 2005). Bu nedenle sağlık ve gıda güvenliği açılarından bakıldığında, tespit edilen fenotipik antibiyotik dirençlilik mekanizmalarının moleküler düzeyde açıklığa kavuşturulması gerekmektedir (Eaton and Gasson, 2001; Franz et al., 2001; Semedo et al., 2003; Çataloluk and Gögebakan, 2004; Foulquie-Moreno et al., 2006; Ammor and Mayo, 2007b; Ortu et al 2007).

Gıdalardan izole edilen enterokokların antibiyotik dirençlilik özelliklerinin belirlenmesi üzerine yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Franz et al., 2001; Mannu et al., 2003; Peters et al., 2003; Çıtak et al., 2004; Canzek-Majhenic et al., 2005; Çıtak et al., 2005; Jurkovic et al., 2006; Cariolato et al., 2008; Gomes et al., 2008; Sanchez-Valenzuela et al., 2009). Slovenya’da yöresel “Tolminc” peynirlerinden izole edilen *E. faecium* suşlarının ampisilin, vankomisin, kanamisin, penisilin, eritromisin ve klindamisin gibi antibiyotiklere direnç durumları değerlendirilmiş ve suşların sadece klindamisine direnç gösterdikleri bunun yanında vankomisin direnç genleri olan *vanA* ve *vanB* genlerini de taşımadıkları belirlenmiştir (Canzek-Majhenic et al., 2005). Peters et al. (2003) et ve süt ürünlerden elde ettiği 101 adet *E. faecalis* suşu ile yaptığı çalışmada, bu suşların tümünün ampisilin, penisilin ve vankomisine duyarlı olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada bu suşların % 74’ünün eritromisine karşı orta ve yüksek derecede, % 38’inin ise tetrasiklin’e karşı yüksek derecede direnç sahibi olduğu belirlenmiştir. Cariolato et al. (2008), İtalya’da üretilen süt ürünlerinden ve doğal starter kültürlerden izole edilen *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarının çeşitli antibiyotiklere direnç durumlarını değerlendirmiş ve suşların genellikle tetrasiklin, streptomisin ve eritromisin’e karşı direnç gösterdiğini belirlemiştir. Brezilya’da süt, et ürünleri, peynir ve sebze gibi bazı gıdalardan izole edilen *Enterococcus* suşlarının karakterize edildiği bir araştırmada gentamisin, tetrasiklin ve eritromisine direnç gösteren *E. faecalis* suşlarının sayısının *E. faecium*’dan daha fazla olduğu, ayrıca söz konusu antibiyotiklere çoklu direnç gösteren *E. faecalis* izolatlarının varlığı tespit edilmiştir (Gomes et al., 2008).

Laktobasillerin hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotiklerden penisiline duyarlı, oksasilin ve sefalosporinlere ise daha dirençli; protein sentezini inhibe eden antibiyotiklerden kloramfenikol, eritromisin ve tetrasikline duyarlı, kanamisin, streptomisin ve gentamisine ise dirençli olduğu bildirilmiştir (Ammor et al., 2007b).

Zhou et al. (2005) *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum* ve *Lc. lactis* suşları ile yaptığı çalışmada, bu izolatların eritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol, penisilin ve ampisiline karşı duyarlı, gentamisin ve kanamisine karşı ise dirençli olduklarını belirlemişlerdir. Söz konusu çalışmada kullanılan *Lb. plantarum* izolatlarının tümü vankomisine karşı dirençli bulunmuştur.

Temmerman et al. (2003) 55 adet probiyotik üründen izole ettiği 187 adet LAB izolatının % 79'unun kanamisin, % 65'inin vankomisin, % 26'sının tetrasiklin, % 23'ünün penisilin, % 16'sının eritromisin, % 11'inin ise kloramfenikole dirençli olduğunu bildirmiştir. Bu suşlarının % 64 ünde ise çoklu antibiyotik dirençliliği bulunmuştur.

Martin et al. (2005b) anne sütünden izole ettikleri *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. fermentum* CECT5714, *Lb. gasseri* CECT5714 ve *Lb. gasseri* CECT5715 suşlarının gentamisin, siprofloksasin, kanamisin, nalidiksik asit ve trimethoprime karşı dirençli, ampisilin, amoksisilin, kloramfenikol, sefalotin, eritromisin, penisilin ve tetrasikline ise duyarlı olduğunu belirlemişlerdir.

Str. salivarius spp. *thermophilus*'un genel olarak kloramfenikol, tetrasiklin, eritromisin ve siprofloksasin'e duyarlı, gentamisin, kanamisin ve streptomisin'e ise dirençli olduğu bildirilmiştir (Ammor et al., 2007b). Aslim ve Beyatli (2004) yaptıkları çalışmada yoğurttan izole ettikleri *Str. salivarius* spp. *thermophilus* suşlarının % 79'unun gentamisin ve % 64'ünün penisilin'e dirençli, % 94'ünün kloramfenikol ve % 88'inin ise tetrasikline duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Pediokoklara karşı penisilin, gentamisin, eritromisin, kloramfenikol, daptomisin, ve ramoplanin'in etkili olduğu bildirilmiştir. Buna karşılık, pediokokların vankomisin, streptomisin, kanamisin, tetrasiklin ve siprofloksasin'e dirençli oldukları yapılan çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Ammor et al., 2007b). Danielsen et al.

(2007) yaptıkları çalışmada, pediokok suşlarının penisilin, gentamisin, eritromisin ve kloramfenikol'e genel olarak duyarlı; vankomisin kanamisin ve tartasikline ise genel olarak daha dirençli oldukları bildirilmiştir.

Biyojen aminler amino asitlerin dekarboksilasyonu veya aldehit ve ketonların aminasyon ya da transaminasyonu ile oluşan, uçucu olmayan ve düşük molekül ağırlıklı, biyolojik aktiviteye sahip azotlu organik bileşiklerdir. Biyojen aminler insan, hayvan, bitki ve mikroorganizmaların normal metabolik aktiviteleri sonucunda oluşmaktadır. Protein, hormon ve nükleik asit sentezinin ilk basamağını oluşturmalarının yanı sıra, kan basıncının kontrolü, hücre büyümesi ve sinaptik transmisyon gibi önemli doğal biyolojik proseslerde de rol alırlar. Biyojen aminler yapısına göre heterosiklik aminler (histamin, triptamin), alifatik aminler (putresin, kadaverin) veya aromatik aminler (tiramin, feniletil amin) olarak sınıflandırılabilirler. İçerdiği amin grubunun sayısına göre ise monoaminler (tiramin, feniletil amin) ve diaminler (histamin, putresin, kadaverin) olarak ikiye ayrılırlar (EFSA, 2011).

Yüksek miktarda biyojen amin içeren deniz ürünleri, peynir, şarap, bira ve sos gibi fermente gıdaların tüketimi ile çeşitli toksikolojik problemler ortaya çıkabilmektedir. Histamin, triptamin, tiramin, kadaverin, putresin ve feniletilamin bilinen toksik etkilerinden dolayı gıdalarda bulunmaları istenmeyen biyojen aminlerdir. Histamin vücutta alerjik reaksiyonlar, kızarıklık, baş ağrısı, baş dönmesi, karın ağrısı, ishal ve bulantı gibi reaksiyonlara neden olabilmektedir. Tiraminin vücutta etkileri baş dönmesi, kusma, migren hipertansiyon ve baş ağrısı olarak görülebilmektedir, ayrıca mono-amin oksidaz inhibitörü ile antidepresyon tedavi edilen hastalarda migren ve yüksek tansiyon nedeni olarak belirlenmişlerdir. Putresin ve kadaverin gibi diaminler ise nitritlerle reaksiyona girerek potansiyel karsinojen nitrozamin oluşturmaları nedeniyle, mutajenik öncül maddeler olarak değerlendirilirler. Putresin ve kadaverin ayrıca diğer biyojen aminleri detoksifiye eden enzimlerle reaksiyona girmeleri nedeniyle yukarıda sözü edilen biyojen aminlerin toksik etkilerini arttırabilmektedir (Çolak ve Aksu, 2002; EFSA, 2011; Garcia-Ruiz et al., 2011). Biyojen aminlerin detoksifikasyonunu sağlayan amin oksidaz enzimlerinin bulunmadığı bireylerin sayısındaki artış biyojen aminlere olan ilginin artmasına yol açmıştır (Ammor and Mayo, 2007a).

Gıdalarda mikrobiyolojik amino asitlerin dekarboksilasyon aktivitesi sonucu oluşan biyojen amin miktarı ve çeşidi su aktivitesi, pH, kompozisyon, depolama sıcaklığı ve mikroflora gibi faktörlerden etkilenmektedir (EFSA, 2011). Biyojen aminler yüksek sıcaklığa dirençli olup gıda proseslerinde uygulanan ısı ilemlerle inaktive edilemezler. Bakterilerin amino asitleri dekarboksilize etme yetenekleri tür, suş ve çevre etmenlerine bağlı olarak değişmektedir (Munoz-Atienza et al., 2011). LAB'nin starter kültür ve probiyotik olarak kullanımında biyojen amin oluşturma potansiyelleri istenmeyen bir özelliktir. Bu nedenle gıda endüstrisinde kullanılacak laktik asit bakterilerinin teknolojik özelliklerinin belirlenmesinde biyojen amin oluşturma potansiyelinin araştırılması gerekliliği üzerinde de önemle durulmaktadır (Dewan and Tamang, 2007). Amino asit dekarboksilasyon aktivitesi bulunmayan veya düşük olan starter kültürlerin kullanımı ile fermente gıdalarda biyojen amin oluşumu azaltılabilmektedir. Bununla beraber fermente ürünlerde kullanılan starter kültürler, doğal floradaki LAB ve diğer bakteriler ile rekabet ederek ortamda diğer bakteriler tarafından oluşturulabilecek biyojen amin miktarında azalmaya yol açabilmektedirler (Çolak ve Aksu, 2002). Ayrıca amin oksidaz aktivitesine sahip starter kültürlerin kullanımı ile ortamda oluşan biyojen amin miktarı düşürülebilmektedir. Sosis üretimde kullanılan *Lb. plantarum* ve *Lb. casei* suşlarının amin oksidaz aktivitesine sahip olduğu ortaya konulmuştur (Ammor and Mayo, 2007a).

Gıdalarda oluşan en önemli biyojen aminler histamin, tiramin, putresin ve kadaverindir (Çolak ve Aksu, 2002; Yıldız ve Yetişmeyen, 2005). *Oenococcus oeni*, *P. parvulus*, *P. damnosus*, *Tetragenococcus* ssp., *Leuconostoc* ssp., *Lb. curvatus* ve *Lb. buchnerii* suşlarının histamin oluşturduğu bildirilmiştir. Genel olarak tiramin oluşturan LAB ise *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Lactococcus* cinsleridir. Putresin ve kadaverinin ise *Lb. plantarum*, *Lb. hilgardii* ve *O. oeni* tarafından oluşturulduğu bildirilmiştir (Bover-Cid and Holzapfel, 1999; Çolak ve Aksu, 2002; EFSA, 2011).

Fermente sosislerden izolen edilen laktik asit bakterileri ile yapılan bir çalışmada izole edilen 16 adet enterokok suşunun tamamının tiramin üretme yeteneğine sahip olduğu, diğer LAB'nin ise sadece % 42'sinin tiramin oluşturabildiği

belirlenmiştir. Çalışmada izole edilen *Lb. brevis* ve *Lb. curvatus* suşlarının putresin ve kadaverin oluşturabildiği belirlenirken, enterokok suşlarında bu bakteriyosinleri oluşturma yeteneği tespit edilememiştir (Bover-Cid et al., 2001). Garai et al. (2007) *P. parvulus*, *Lb. plantarum* ve *Lb. suebicus* suşlarının histamin tiramin ve putresin oluşturmadağını tespit etmişlerdir.

Tiramin üretimi enterokoklar arasında yaygın olarak görülmektedir (Munoz-Atienza et al., 2011). Leuschner et al. (1999) *E. faecalis* LTH 4159 suşunu kullanarak yaptıkları peynir üretimi çalışmasında, üretimi takiben depolamanın 6. haftası sonunda üründe putresin ve histidin oluşumu bulunmadığını ancak 170 mg/kg konsantrasyonunda tiramin oluşumu bulunduğunu bildirmişlerdir. Durlu-Ozkaya et al. (2001) yaptıkları çalışmada çiğ koyun sütünden üretilmiş beyaz peynirlerden izole edilen tüm *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının tirozini dekarboksile ederek tiramin oluşturabildiğini belirtmişler ve bu suşlar tarafından sütte üretilen tek biyojen aminin tiramin olduğunu vurgulamışlardır.

Starter ya da probiyotik olarak kullanılan LAB'nin enzimatik profillerinin ortaya konulması, bu bakterilerin gıda teknolojisi ve insan sağlığı açısından yararlarının belirlenmesinde oldukça önemli bir aşama olarak değerlendirilmektedir (Denkova et al., 2012). LAB'nin ürettikleri peptidolitik (lösin arilamidaz, valin arilamidaz, sistin arilamidaz) enzimler ürünün duyusal özelliklerinin gelişimi açısından önemlidir (Ghraiiri et al., 2008; Dewan and Tamang, 2007). Proteolitik enzim aktivitesi sonucunda oluşan peptid ve amino asitler, ürünün yapı, tat ve aromasının oluşumuna katkı sağlanmaktadır (Barry and Kolstad, 1983; Visser, S., 1993). Lipolitik enzim (esteraz, lipaz) aktivitesi sonucunda oluşan yağ asitleri, keton ve aldehitler de ürün aromasının gelişiminde rol üstlenebilmektedirler (Longo and Sanromán, 2006; Dewan and Tamang, 2007). Bütün bunların yanı sıra, laktoz intolerant bireylerin süt ürünlerini güvenle tüketmeleri için bu ürünlerde yüksek β -galaktosidaz aktivitesine sahip LAB'nin starter kültür olarak kullanımı ayrı bir önem taşımaktadır (Dewan and Tamang, 2007).

API-ZYM (Bio-Merieux, Fransa) test kiti mikroorganizmaların enzimatik aktivite profillerini belirlemek amacıyla sık olarak başvurulanan bir test kitidir. Bu test kiti ile bakterilerin alkalın fosfataz, esteraz, esteraz lipaz, lipaz, lösin arilamidaz, valin

arilamidaz, sistin arilamidaz, tripsin, α -kimotripsin, asit fosfataz, naftol-AS-BI-fosfohidrolaz, α -galaktosidaz, β -galaktosidaz, β -glukuronidaz, α -glukosidaz, β -glukosidaz ve N-asetil- β -glukozaminidaz, α -mannosidaz ve α -fukosidaz enzim aktivitelerine sahip olup olmadıkları test edilebilmektedir (Dewan and Tamang, 2007).

Literatürde enterokokların sahip oldukları glikolitik, proteolitik ve lipolitik enzim aktiviteleri ile sucuk vb. geleneksel fermente gıdaların tat, koku ve kalite gelişiminde önemli role sahip olduğunu belirten pek çok çalışma bulunmaktadır. (Sarantinopoulos et al., 2001; Hugas et al., 2003; Foulquie-Moreno et al., 2006; Ayhan ve Durlu-Özkaya; 2007). Belgacem et al. (2010) tarafından API-ZYM test kiti kullanılarak yapılan bir çalışmada fermente et ürünlerinden izole edilen enterokok suşlarının geniş bir enzim spektrumuna sahip olduğu, suşların düşük proteinaz (tripsin ve kimotripsin) ve yüksek peptidaz (lösin aminopeptidaz) aktivitesine sahip oldukları belirlenmiş ve bu özelliğin fermente süt ürünleri gibi bazı gıdaların olgunlaştırılmasında ve tipik aromalarının oluşumunda arzu edilen bir kalite kriteri olduğu belirtilmiştir. Çalışmada enterokok suşlarının diğer LAB'den daha yüksek düzeyde esterolitik aktiviteye sahip oldukları ifade edilmiştir. Ayrıca β -glukosidaz gibi karbonhidrat metabolizmasında görevli enzimlerin aktivitelerinin izolatların gıdalarda bulunan şekerleri kullanabilme potansiyelleri yönüyle önemli olduğu vurgulanmıştır. Enterokoklar proteolitik ve lipolitik aktiviteleri ve diasetil gibi önemli uçucu bileşikleri üretebilme özellikleri ile peynirlerin olgunlaşması ve aroma gelişiminde de katkı sağlamaktadır.

LAB et ürünlerinde miyofibriler proteinler üzerine zayıf proteolitik aktiviteye sahiptir. Fakat bazı *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* ve *Lb. sakei* suşlarının sarkoplazmik proteinleri de hidrolize edebildiği bildirilmiştir. Sosislerden izole edilmiş *Lb. curvatus*, *Lb. sakei* ve *Lb. plantarum* suşlarında API-ZYM test kiti ile yapılan analiz sonucunda peptidaz (lösin ve amino peptidaz) aktivitesi rapor edilmiştir (Ammor and Mayo, 2007a).

Martin et al. (2005b) anne sütünden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin enzim profillerini API-ZYM test kiti kullanarak belirlemişlerdir. *Lb. rhamnosus* GG suşunda alkalın fosfotaz, asit fosfataz, esteraz, esteraz lipaz, lösin ve valin

arilamidaz, naftol, AS-BI-fosfohidrolaz ve β -galactosidaz aktivitesi belirlemişlerdir. *Lb. fermentum* CECT5714 suşunda ise *Lb. rhamnosus* GG suşundan farklı olarak alkalın ve asit fosfataz aktivitesi belirlenmemiştir. *Lb. gasseri* CECT5714 ve *Lb. gasseri* CECT5715 suşlarında sadece lösin arilamidaz ve naftol-AS-BI-fosfohidrolaz aktivitesi tespit edilmiştir.

Dewan and Tamang (2006) geleneksel fermente süt ürününden (Chhu) izole ettikleri LAB'nin (*Lb. salivarius*, *Lb. brevis*, *Lb. farmicinis*, *Lb. alimentarius*, *Lc. lactis* spp. *cremoris*, *Lb. bifementans*) enzim profillerini belirlemişlerdir. Suşlarda yüksek derecede peptidaz aktivitesi (lösin arilamidaz) ve esteraz-lipaz (C4 ve C8) aktivitesi bulunmasının üründe tipik tat, aroma ve kalitenin oluşumda rol aldığı ve bu enzim aktivitelerinin "Chhu" üretiminde kullanılacak kültürlerde istenildiği belirtilmiştir. Suşlarda tespit edilen yüksek β -galaktosidaz aktivitesinin ise "Chhu" üretiminde kullanılan LAB'nin elzem özelliklerinden birisi olduğu vurgulanmıştır.

Fermente süt ürünlerinden izole edilen *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus* ve *Str. salivarius* spp. *thermophilus* suşlarında laktoz intolerant bireylerin diyetlerinde önem taşıyan yüksek β -galaktosidaz aktivitesi tespit edilmiştir (Trojanova and Rada, 2005).

LAB gibi starter kültür olarak kullanılabilen bakterilerin gıda ortamında canlı kalabilmesi ve gelişim hızı gıda teknolojisi açısından ayrı bir önem arz etmektedir. Bakterilerin bu özellikleri ortam sıcaklığı, gıdanın pH'sı, tuz ve nitrit içeriği gibi faktörlerden büyük ölçüde etkilenmektedir (Ammor and Mayo, 2007a).

Tuz toleransı, fermente ürünlerde (sucuk, peynir, tuşu vb.) kullanılacak starter kültürlerin seçiminde istenilen özellikler arasındadır. Ayrıca, et ürünlerinde kullanılacak olan starter kültürlerin nitriti de değişik düzeylerde (50-150 ppm) tolere edebilmesi gerekmektedir (Sawitzki et al., 2009).

Safra direnci probiyotik LAB'nin sahip olması gereken önemli özelliklerinden bir tanesidir. Safra (% 0,30) ortamına dirençli 114 adet laktobasil ile yapılan bir çalışmada, 43 adet suşun pH 3 - 5 aralığındaki ortamlarda 2 saat sonunda % 90'dan fazla oranda canlılıklarını korudukları tespit edilmiştir. Ancak pH 2

ortamında bu suşların sadece 27 tanesinin % 50 oranında canlılığını koruduğu belirtilmiştir (Sirilun et al., 2010).

Kolesterol, başta kardiyovasküler rahatsızlıklar ve kolon kanseri olmak üzere birçok hastalığın oluşumunda bir risk faktörü olarak rol oynamaktadır. Kandaki kolesterol seviyesinin normal değere göre 1 mmol yükselmesi kalp hastalıklarından ölüm riskini % 45 oranında arttırmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar kan kolesterol seviyesinin azaltılmasıyla bu hastalık risklerinin de düşürüleceğini göstermektedir (Dilmi-Bouras, 2006; Lavanya et al., 2011; Raghavan et al., 2011). Kolesterol serum seviyesinin % 1 oranında azalmasının kalp hastalıkları riskini % 2 -3 oranında azalttığı belirtilmektedir (Sirilun et al., 2010). Yüksek kolesterol tedavisinde kullanılan çeşitli farmakolojik ajanlar ile kolesterol seviyelerini etkili bir şekilde düşürmek mümkündür, ancak bu ilaçlar pahalı olmalarının yanı sıra bir takım yan etkilere de sahiplerdir. Son yıllarda, kandaki yüksek kolesterol seviyelerinin düşürülmesinde yeni yaklaşımlar ortaya çıkmıştır. Bu uygulamalar arasında, probiyotik LAB'nin kullanımı konusunda yapılan çalışmalar ön plana çıkmaktadır. Konu üzerinde yapılan *in-vitro* ve *in vivo* çalışmalarda özellikle belirli *Lactobacillus* veya *Bifidobacterium* türlerini içeren probiyotik ürünlerin kandaki yüksek kolesterol düzeylerini önemli derecede azalttığı gösterilmiştir (Pereira et al. 2003; Tok ve Aslım, 2007; Sirilun et al., 2010).

Fermente gıdalarla birlikte kolesterol düşürücü etkisi olan LAB'nin tüketimi vücuttaki kolesterol seviyesinin azaltılmasına yardımcı olmaktadır (Raghavan et al., 2011). Gıdalar ile alınan kolesterolün sindirim sisteminde kana geçişini azaltma yeteneği laktik asit bakterilerinin probiyotik etkileri arasında önemli bir yer tutmaktadır. Yapılan çalışmalarda LAB'nin kolesterol azaltıcı etkileri bu bakterilerin safra tuzlarını dekonjuge edebilme yetenekleri ile ilişkilendirilmektedir (Saavedra et al., 2003; Sirilun et al., 2010). Safra tuzları karaciğerde kolesterolün oluşturulurlar ve kolesterolün safra içerisinde çözünürlüğünü sağlayarak vücuttan kolesterolün atılımında rol alırlar (Önür and Beyler, 2000). Safra tuzu hidrolaz aktivitesi sonucunda oluşan dekonjuge olan safra tuzları karaciğer tarafından daha az geri absorbe olmakta ve büyük bir kısmı dışkıyla birlikte atılmaktadır. Böylece safra tuzunu absorbe edemeyen karaciğerin, safra tuzu sentezlemek için fazla miktarda

serum kolesterolü kullanmasıyla serum kolesterol miktarı azalabilmektedir. Ayrıca bağırsakta laktik asit bakterilerinin aktivitesi ile dekonjuge olan safra tuzları yağları ve kolesterolü daha az çözdüğünden gıdalarla birlikte alınan kolesterolün bağırsaklardaki emilimi de azalmaktadır (Begley et al., 2006).

Ramasamy et al. (2010) safra tuzu hidrolaz aktivitesi ile serum kolesterol seviyesi arasındaki ilişkiyi inceledikleri araştırmada test ettikleri *Lb. reuteri*, *Lb. brevis*, *Lb. salivarius*, *Lb. gallinarum*, *Lb. panis* suşlarının tümünün safra tuzlarını dekonjuge edebildiğini ve *in-vitro* kolesterol seviyesini düşürebildiklerini (% 26.74 - 85.41 oranlarında) belirtmişlerdir. Araştırmacılar suşlardaki safra tuzu hidrolaz aktivitesi ile kolesterol miktarını düşürme etkileri arasında tam bir korelasyon olmadığını ve düşük safra tuzu hidrolaz aktivitesi bulunan suşların da kolesterolü etkili bir şekilde düşürebildiğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde Usman (1999) 28 adet *Lb. gasseri* suşu ile yaptığı bir çalışmada, bu suşların 27 adedinin kolesterolü % 29 - 87 oranında azalttığını fakat safra tuzu hidrolaz aktivitesi ile kolesterol düşürme yetenekleri arasında önemli bir korelasyon ($p<0.05$) bulunmadığını bildirmiştir. Yapılan bu çalışmalar LAB'nin kolesterol azaltıcı etkisinin sadece safra tuzu hidrolaz aktivitesi ile açıklanamayacağını ve başka mekanizmaların da bu konuda etkili olduğunu göstermektedir. Literatürde, kolesterol miktarındaki azalmanın, kolesterolün bu bakteriler tarafından asimile edilmesi ya da kolesterolün bakteri hücre duvarına bağlanarak vücuttan atılması yoluyla olabileceği de belirtilmektedir (Begley et al., 2006; Ramasamy et al., 2010).

LAB'nin *in-vitro* ortamda kolesterol azaltıcı etkisine ilişkin yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Pereira and Gibson, 2002; Dilmi-Bouras, 2006; Ziarno et al., 2007; Ziarno, 2008). Hlivak et al. (2005) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise probiyotik kontrol suşu olarak kullanılan *E. faecium* M74'ün klinik çalışmalarda serum kolesterol seviyesini % 12 oranında azalttığı ifade edilmiştir. Ev yapımı geleneksel peynirlerden izole edilen 9 adet probiyotik *E. faecium* izolatu kullanılarak yapılan bir çalışmada, izolatların *in-vitro* olarak kolesterol konsantrasyonunu (% 28.8-47.2 oranında) azalttıkları bildirilmiştir (Saavedra et al., 2003). İnsan kaynaklı 4 adet *Lb. plantarum* suşu ile yapılan çalışmada ise suşların *in-vitro* kolesterol miktarını % 25.41-81.46 oranlarında düşürdüğü tespit edilmiştir.

Ramasamy et al. (2010) tavuklardan izole edilen *Lb. reuteri*, *Lb. brevis*, *Lb. salivarius* ve *Lb. gallinarum* suşlarının besiyeri ortamında bulunan kolesterol konsantrasyonunu % 31-85 oranlarında azaltabildiğini bildirmişlerdir. Hyeong Jun ve ark (Lavanya et al., 2011) *Streptococcus* HJS-1 ve *Lactobacillus* HJL-37 suşlarının *in-vitro* kolesterol seviyesini sırasıyla % 57 ve % 64.4 oranlarında düşürdüklerini tespit etmişlerdir.

Yüksek yağ içerikli diyetle beslenen farelerin diyetlerine probiyotik bakterilerin eklenmesi sonucunda farelerdeki serum kolesterol seviyesinin % 22-33 oranında azaldığı ya da kolesterol seviyesinin yükselmesinin engellendiği belirtilmiştir (Begley et al., 2006).

Yapılan bir çalışmada, *Lb. plantarum* TGCM 26 ve *Lb. plantarum* TCGM 128 suşlarının safra tuzu hidrolaz aktivitesi göstermemesine rağmen kolesterol seviyesini sırasıyla % 25.41 ve % 32.76 oranında düşürebildiği belirtmiştir. Bu durum, *Lb. plantarum* TGCM 26 ve *Lb. plantarum* TCGM 128 suşlarının laktik asit fermantasyonu sonucu ortam pH'ını düşürmeleri ile ilişkilendirilmiştir. Düşük pH'da safra tuzlarının çözünürlüğünün azaldığı bildirilmektedir. Bu durumda çözünürlüğün azalması sonucu safra tuzları ile birlikte kolesterolün de çökelebileceği belirtilmiştir (Sirilun et al., 2010).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Laktik asit bakteri şüpheli izolatlar

Bu çalışmada; Toğay (2010) tarafından gerçekleştirilen “Doğal Fermente Gıdalar ve Anne Sütünden Enterokokların İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Bunların Probiyotik Kültür Olarak Kullanılabilme Potansiyelinin Araştırılması” isimli doktora tez çalışması kapsamında toplanan 60 adet anne sütü örneğinden izole edilip stoklanan laktik asit bakteri şüpheli 204 adet izolat kullanılmıştır. Anne sütü örneklerinden laktik asit bakteri suşlarının izolasyonu amacıyla MRS (*Lactobacillus* Agar acc. to De Man, Rogosa and Sharpe) agar (Merck, Almanya), M17 agar (Merck, Almanya) ve KAA (Kanamycin Aesculine Azide) agar (Merck, Almanya) besiyerleri kullanılmıştır. Laktik asit bakteri izolatları -20 °C’de % 30 gliserol içeren MRS broth (Merck, Almanya) besiyerinde muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Kontrol ve test bakteri suşları

Bu çalışmada *Enterococcus faecium* M74, *E. faecalis* NCIMB 700584, *E. faecalis* ATCC 292112, *E. faecalis* H1, *E. faecalis* S01-05, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lb. plantarum*, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *L. monocytogenes* H1, *L. monocytogenes* H2, *L. innocua*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 35211 ve *Salmonella* Typhimurium ATCC 19302 kontrol ve test bakteri suşları olarak kullanılmışlardır. *E. faecium* M74 suşu İsveç’deki Medifarm firmasından liyofilize formda, *E. faecalis* NCIMB 700584 suşu İngiltere Ulusal Kültür Koleksiyonu’ndan liyofilize formda, *E. faecalis* ATCC 292112 suşu Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı’ndan gliserol içerisindeki soğuk stok kültürü şeklinde temin edilmiştir. Diğer kontrol suşlarının tümü Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı’ndan gliserol içerisindeki soğuk stok kültürü şeklinde temin edilmiştir. Aktifleştirilen laktik asit bakterileri % 30 gliserol içeren MRS broth besiyerinde, diğer bakteriler ise % 30 gliserol içeren BHI (Brain Heart Infusion) broth (Himedia, Hindistan) besiyerinde -20 °C’de saklanmışlardır.

3.2. Metot

3.2.1. İzolatların aktifleştirilmesi ve saf kültürlerinin elde edilmesi

MRS agar besiyeri kullanılarak izole edilen ve -20 °C'de gliserol içerisinde muhafaza edilen izolatlar MRS broth besiyerinde 37 °C'de 24-48 saat süre ile aerobik ve anaerobik koşullarda (Anaero B, Bio-Merieux, Fransa) ayrı ayrı aktifleştirilmeye alınmıştır. M17 agar ve KAA agar besiyerleri kullanılarak izole edilen ve -20 °C'de gliserol içerisinde muhafaza edilen izolatlar ise BHI broth ve MRS broth besiyerleri kullanılarak 37 °C'de 24-48 saat aerobik koşullarda aktifleştirilmeye alınmıştır.

MRS broth ve BHI broth besiyerinde aktifleştirilemeyen ve saf kültürleri elde edilemeyen 32 adet izolat çalışma kapsamından çıkarılmıştır.

Aktifleştirilen izolatların Petri kutusundaki MRS agar ve M17 agar besiyerleri kullanılarak elde edilen kültürleri üzerinden morfolojileri incelenerek saflık kontrolleri yapılmış ve daha sonra da MRS broth ve BHI broth besiyeri kullanılarak izolatların saf kültürleri elde edilmiştir. Saf kültürlerden preparatlar hazırlanarak kristal violet ile basit boyama yapılmış ve mikroskopik morfolojileri üzerinden izolatların saflık kontrolü doğrulamasına gidilmiştir.

MRS agar besiyerinden izole edilen izolatlar aktifleştirilmeleri ve saf kültürlerinin elde edilmesi aşamalarında hem aerobik hem de anaerobik koşullarda başarıyla gelişebildikleri için, bu izolatlarla yapılan ileri çalışmaların tümü aerobik koşullarda gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. İzolatların tanımlanması

3.2.2.1. İzolatların cins düzeyinde tanımlanması

Laktik asit bakteri şüpheli izolatlar ilk aşamada cins düzeyinde tanımlanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla izolatların saf kültürlerine Gram boyama ile katalaz, glukozdan gaz üretimi, 10 °C ve 45 °C'de üreme, % 2 , % 4 ve % 6.5'lik tuz ortamında üreme, pH 9.6'da üreme, arjinin hidrolizi ve hemoliz testleri

uygulanmıştır (Schillinger and Lucke, 1987; Temiz, 1989; Sinton et al., 1993; Harwood et al., 2004).

Gram boyama

İzolatlar ve kontrol suşları olarak kullanılan *S. aureus* ATCC 25923 ve *E. coli* ATCC 35211 bakterilerinin 18 - 24 saatlik kültürlerine Gram boyama işlemi uygulanmıştır. Gram-pozitif çubuk ve kok şekilli bakterilere daha sonra aşağıdaki biyokimyasal ve fizyolojik testler uygulanmıştır. Gram-negatif izolatlar ise çalışma kapsamından çıkarılmıştır.

Katalaz testi

İzolatlar MRS agar'da geliştirilerek üzerine 1 mL % 3'lük hidrojen peroksit aktarılmıştır. Gaz kabarcıklarının görülmesi pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir. Testte pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 25923 kültürü kullanılmıştır.

Hemoliz testi

İzolatların 18 – 24 saatlik kültürlerinden Koyun Kanlı agar (Salubris, ABD) besiyerine yüzeye sürme yöntemiyle ekim yapılarak 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda izolatların hemolitik aktivitesi belirlenmiştir (Temiz, 2010). Pozitif kontrol olarak α -hemolitik *S. aureus* ATCC 25923 suşu kullanılmıştır.

Glukozdan gaz üretimi

Bu test izolatların homofermantatif ya da heterofermantatif olup olmadığını belirlemek amacıyla uygulanmıştır. Bu testte Durham tüplü test tüpleri içerisinde 10'ar mL olarak hazırlanan sitrat içermeyen MRS broth besiyeri kullanılmıştır. İzolatlardan besiyerine 0.1 mL ekim yapılmış ve 37 °C'de 24 - 48 saat inkübasyon sonunda gaz oluşumu gözlemlenen tüpler pozitif, gözlemlenmeyen tüpler ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

Farklı sıcaklıklarda gelişim

İzolatlarının 10 °C ve 45 °C sıcaklıklarda gelişiminin belirlenmesi için 18 – 24 saatlik kültürlerden MRS broth besiyerine ekimler yapılmış ve 2 – 7 gün inkübasyonun ardından besiyerinde kültür gelişimi kontrol edilmiştir.

Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişim

İzolatlarının farklı tuz konsantrasyonlarında gelişiminin belirlenmesi amacıyla % 2, % 4 ve % 6.5 oranında tuz (NaCl) içeren MRS broth besiyerleri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerlerine izolatların 18 – 24 saatlik kültürlerinden ekimler yapılmış ve 37 °C'de 2 – 7 gün inkübasyonun ardından besiyerinde kültür gelişimi kontrol edilmiştir.

pH 9.6'da gelişim

İzolatlarının pH 9.6'da gelişiminin belirlenmesi amacıyla 6 N NaOH kullanılarak pH'sı 9.6'ya ayarlanmış MRS broth besiyerinden yararlanılmıştır. Hazırlanan besiyerlerine izolatların 18 – 24 saatlik kültürlerinden ekimler yapılmış ve 37 °C'de 2 – 7 gün inkübasyonun ardından besiyerinde kültür gelişimi kontrol edilmiştir.

Arjinin hidrolizi

İzolatların arjininden amonyak oluşumunu belirleyebilmek amacıyla % 0.3 oranında arjinin içerecek şekilde hazırlanan MRS broth besiyeri kullanılmıştır. Hazırlanan besiyerlerine izolatların 18 – 24 saatlik kültürlerinden 0.1 mL ekimler yapılarak 37 °C'de 24 - 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerle Nessler reaktantı eklenerek renkteki değişim gözlemlenmiştir. Parlak turuncu renk oluşumu pozitif, sarı renk ise negatif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Albano et al., 2009).

3.2.2.2. İzolatların tür düzeyinde tanımlanması

Cins düzeyinde doğrulanan laktik asit bakteri şüpheli izolatlar daha sonra API 50 CHL ve API 20 Strep (Bio-Merieux, Fransa) biyokimyasal test kitleri kullanılarak tür

düzeyinde tanımlanmıştır. Tanımlanan izolatlar 16S rRNA dizi analizi ile tür düzeyinde doğrulanmıştır.

API 50 CHL testleri

Bu test Gram-pozitif, katalaz negatif ve spor oluşturmadağı belirlenen tüm izolatlara uygulanmıştır. Bu amaçla ilk aşamada izolatların saf kültürlerinden Petri kutusundaki MRS Agar besiyerine ekimler yapılarak 37 °C'de 18 – 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan koloniler steril eküvyon yardımıyla toplanarak steril serum fizyolojik içerisinde süspanse edilmiştir. Bu bakteri süspansiyonundan API 50 CHL Medium besiyerine belli ölçüde aktararak (10 – 20 damla) homojenize edilmiştir. Daha sonra bu besiyeri ile API 50 stribindeki kuyucuklar inoküle edilmiş ve kuyucukların üzeri mineral yağ ile kaplanmıştır. Strip 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiş, 24. ve 48. saatin sonunda stripteki biyokimyasal gelişimler değerlendirmeye alınmıştır. Bir test stribi gliserol, eritritol, D-arabinoz, L-arabinoz, riboz, D-ksiloz, L-ksiloz, adonitol, β -metil-D-ksilozid, galaktoz, D-glukoz, D-fruktoz, D-mannoz, L-sorboz, ramnoz, dulkitol, inositol, mannitol, sorbitol, α -metil-D-mannosid, α -metil-D-glukozid, N-asetil-glukozamin, amigdalın, arbutin, eskulin, salisin, sellobioz, maltoz, laktoz, melibioz, sakkaroz, trehaloz, inulin, melezitoz, D-raffinaz, amidon, glikojen, ksilitol, β -gentiobioz, D-turanoz, D-liksoz, D-tagatoz, D-fukoz, L-fukoz, D-arabitol, larabitol, glukonat, 2-keto-glukonat, 5-keto-glukonat ve kontrolden oluşan 50 adet biyokimyasal testi içermektedir.

Besiyeri içindeki bromkresol moru indikatörünün asitlik gelişimine bağılı olarak renginin sarıya dönmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Eskulin hidrolizinde ise pozitif sonuç kuyucuk renginin mordan siyaha dönüşmesidir.

API 20 Strep testleri

Bu test Gram-pozitif, katalaz negatif kok şekilli izolatlara uygulanmıştır. Bu amaçla ilk aşamada izolatların saf kültürlerinden Kanlı Agar besiyerine ekim yapılarak 37 °C'de 18 – 24 saat inkübe edilmiştir. Besiyerinde gelişen koloniler hemoliz yönünden değerlendirilmiş ve daha sonra da koloniler steril eküvyon ile toplanarak API Suspension Medium içerisinde 4 McFarland tübidite değerinde homojenize

edilmiştir. Bu homojenizattan yaklaşık 0.5 mL API GP medium içerisine aktarılmıştır. Stripler üretici firmanın verdiği direktifler doğrultusunda inoküle edilerek 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiş ve 4. ve 24. saatin sonunda değerlendirmeye alınmıştır. Bir test stribi pirüvat, hippurat, eskulin, pirolidonil 2 naftilamid, 6-bromo-2 naftil α D-galaktopiranozid, Naftol AS-BI β -D-glukuronat, 2-naftil- β -D-galaktopiranozid, 2-naftilfosfat, L-lösin-2-naftilamid, arjinin, riboz, L-arabinoz, mannitol, sorbitol, laktoz, trehaloz, inülin, raffinoz, nişasta ve glikojen substratlarını içeren 20 adet biyokimyasal testten oluşmaktadır.

API 50 CHL ve API 20 Strep tanımlama kitlerinden elde edilen izolatlarla sonuçlar Apiweb™ (Bio-Merieux, Fransa) yazılımıyla karşılaştırılarak tür düzeyinde tanımlanmışlardır. API 50 CHL ve API 20 Strep test kiti ile tanımlama sonuçları “% tanımlama” ve “T (yakınlık)” değerleri olarak alınmaktadır.

İzolatların 16S rRNA dizi analizi ile tür düzeyinde doğrulanması

API 50 CHL ve API 20 Strep tanımlama test kitlerinden alınan sonuçlar bir bütün halinde değerlendirilerek izolat seçimi yönüne gidilmiş ve bu anlamda 53 adet izolat 16S rRNA analizlerine alınmıştır. Seçilen izolatların 16S rRNA analizleri Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Genom Bilim Anabilim Dalı’nda hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir. İzolatların tür düzeyinde doğrulanması amacıyla yapılan 16S rRNA dizi analizlerinde 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) ve 907R (CCGTCAATTCMTTTRAGTTT) evrensel primerleri kullanılmıştır.

3.2.3. İzolatların enzimatik aktivite profilleri

Laktik asit bakterisi olarak tanımlanan izolatların enzimatik aktivite profilleri API-ZYM (Bio-Merieux, Fransa) test kiti kullanılarak belirlenmiştir. API-ZYM test kiti ile izolatların; alkalın fosfotaz, esteraz (C4), esteraz (C8), lipaz (C14), lösin arilamidaz valine arilamidaz, sistein arilamidaz, tripsin, α -kimotipsin, asit fosfotaz, naftol-AS-BI-fosfohidrolaz, α -galaktosidaz, β -galaktosidaz, β -glukurodinaz, α -glukosidaz, β -glukosidaz, N-asetil- β -glukoaminidaz, α -mannosidaz, α -fukosidaz’dan oluşan 19 adet enzim aktivitesinin varlığı test edilebilmektedir.

İzolatların saf kültürlerinden MRS Agar besiyerine ekimler yapılarak 37 °C'de 18 – 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan koloniler steril eküvyon yardımıyla toplanmış ve 2 mL API Suspension Medium içerisinde 5 McFarland tübidite değerinde homojenize edilmiştir. Strip üzerinde bulunan 20 adet mikro kuyucuğa 65 µl hacimde izolat süspansiyonundan aktarılmış ve 4 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucuklara 1'er damla ZYM A ve ZYM B reaktantı eklenerek 5 dakika renk oluşumu için bırakılmıştır. Kuyucuklarda meydana gelen renk oluşumuna, 0 ile 5 arasında değer verilerek test sonuçları alınmıştır. Verilen değer aralığında "0" negatif reaksiyonu ifade ederken, "5" maksimum reaksiyon yoğunluğunu ifade etmektedir. Pozitif reaksiyon olarak 3, 4 ve 5 değerleri kabul edilmiştir.

3.2.4. İzolatların antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi

İzolatların antibiyotik dirençlilik özelliklerinin belirlenmesinde Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (NCCLS, 2006) tarafından önerilen disk difüzyon test yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan ticari antibiyotik diskler (Oxoid, UK) gentamisin (10 µg), ampicilin (10µg), eritromisin (15µg), penicilin G (10µg), tetrasiklin (30 µg), vankomisin (30µg), kloramfenikol (30 µg) ve kanamisin (30 µg)'dir.

Test edilecek izolatlar MRS Agar besiyerine ekilip 24 saat süreyle inkübe edilerek canlandırılmış ve bu kültürlerden 0.5 McFarland standardına uygun bulanıklıkta süspansiyon hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonlardan steril eküvyon yardımıyla Petri kutusundaki Müller Hinton Agar besiyeri (Merck, Almanya) yüzeyine yayılmış ve ardından antibiyotik diskler Antibiyotik Disk Dispenser (Oxoid, UK) kullanılarak her Petri kutusuna 4 adet disk olacak şekilde yerleştirilmiştir. 35-37 °C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından antibiyotik diskler etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek (Şekil 1) izolatların antibiyotiklere duyarlılık ya da dirençlilik durumları ilgili standartlarla (Çizelge 8) karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 1. Disk difüzyon yöntemi ile izolatların antibiyotik direnç testi

Çizelge 8. Laktik asit bakteri izolatları için inhibisyon zon çap standartları (NCCLS, 2006)

Antibiyotik	Diskteki antibiyotik derişimi (µg)	Zon Çapı (mm)*		
		R	I	S
Penisilin G	10	≤14	-	≥15
Ampisilin	10	≤16	-	≥17
Vankomisin	30	≤14	15-16	≥17
Eritromisin	15	≤13	14-22	≥23
Tetrasiklin	30	≤14	15-18	≥19
Kloramfenikol	30	≤12	13-17	≥18
Gentamisin*	10	≤12	-	≥13
Kanamisin*	30	≤13	14-17	≥18

* : R: dirençli, I: orta, S: duyarlı

3.2.5. İzolatların biyojen amin oluşturma özellikleri

Tür düzeyinde tanımlanan laktik asit bakteri izolatlarının biyojen amin (tiramin, histamin, putresin veya kadaverin) oluşturma özellikleri incelenecek öncül aminoasiti (tirozin, histidin, ornitin veya lizin) içeren dekarboksilaz besiyerleri (Çizelge 9) kullanılarak belirlenmiştir.

Çizelge 9. Dekarboksilaz Besiyeri (Bover-Cid and Holzapfel, 1999)

Bileşen	%
Tripton	0.5
Yeast Ekstrakt	0.5
Meat Ekstrakt	0.5
NaCl	0.25
Glukoz	0.05
Tween 80	0.1
MgSO ₄	0.02
MnSO ₄	0.005
FeSO ₄	0.004
Amonyum sitrat	0.2
Tiamin	0.001
K ₂ PO ₄	0.2
C _a CO ₃	0.01
Piridoksal-5-fosfat	0.005
Amino asit (tirozin, histidin, ornitin veya lizin)	1.0
Bromkresol moru	0.006
Agar	2
pH = 5.3	

Hazırlanan besiyeri yüzeyine izolatların 18 - 24 saatlik kültürlerinden yüzeye sürme ekimler yapılarak 37 °C'de 24 - 48 saat inkübe edilmiştir. Besiyeri içindeki bromkresol moru indikatörünün asitlik değişimine bağlı olarak renginin mora dönmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Bover-Cid and Holzapfel, 1999).

3.2.6. İzolatların antimikrobiyel aktivite özellikleri

Laktik asit bakteri izolatların antimikrobiyel aktivitelerin belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.1.2.'de verilen kontrol ve test bakterileri kullanılmıştır. Test suşlarının aktifleştirilmesinde ve antimikrobiyel aktivitenin belirlenmesinde laktik asit bakterileri için MRS broth ve MRS agar, diğer test bakterileri için ise TSA (tryptic soy agar, Merck) ve TSB (tryptic soy broth, Merck) besiyerleri kullanılmıştır.

İzolatların antimikrobiyel aktivitesinin belirlenmesi için “agar damlatma” ve “agar difüzyon” teknikleri ayrı ayrı uygulanmıştır (Harris et al., 1989; Arihara et al., 1991; Saavedra et al., 2003; Hajikhani ve ark., 2007).

Agar damlatma tekniğinin ilk aşamasında, 10 mL MRS broth besiyerinde 37 °C'de 24 saat süre ile geliştirilmiş laktik asit bakteri izolatlarından steril kürdan

kullanılarak Petri kutusundaki MRS agar yüzeyine nokta ekimler yapılmıştır. Petri kutuları daha sonra 30 °C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. MRS broth veya TSB besiyerinde 37 °C'de 24 saat aktifleştirilmiş test bakterisi kültürlerinden % 0.75 agar içeren 10 mL MRS agar veya TSA besiyerine 10 µl miktarda eklenip karıştırılmış ve bu karışım MRS agar veya TSA besiyerinde geliştirilen damlatma kültürlerin üzerine dökülmüştür. Petri kutuları daha sonra 37 °C'de 24 saat daha inkübe edilmiştir. Laktik asit bakteri izolatlarının test bakterilerine karşı antimikrobiyel aktiviteleri, inkübasyon sonunda damlatma kültürler etrafında oluşan şeffaf inhibisyon zonları yönüyle değerlendirilmiştir.

Agar difüzyon tekniğinde ise MRS broth besiyerinde 37 °C'de 24 saat süre ile aktifleştirilen laktik asit bakteri izolatları 10000 rpm'de 10 dakika süre ile 4 °C'de santrifüjlenerek süpernatant kısım kullanılmak üzere ayrılmıştır. Elde edilen süpernatantlar 0.22 µm gözenek çaplı steril membran filtreden (Millipore, USA) geçirilerek hücre içermeyen süpernatantlar elde edilmiştir. Aktifleştirilmiş 0.1 mL test bakteri kültürü % 0.75 agar (w/v) içeren 20 mL miktardaki MRS agar veya TSA besiyeri içine ilave edilip karıştırılarak steril Petri kutularına dökülmüş ve buzdolabı içerisinde 2 saat bekletilerek katılaşması sağlanmıştır. Katılaşan agar yüzeyine 1 mL'lik steril otomatik pipet uçları kullanılarak 9 mm çapında kuyucuklar açılmış ve her bir kuyucuk içine çalışılan izolatların hücre içermeyen süpernatantlarından 100 µl miktarda ayrı ayrı eklenmiştir. Laktik asit bakteri izolatlarının antimikrobiyel aktiviteleri, Petri kutularının 37 °C'de 24 saat inkübasyonunun ardından kuyucuklar etrafında oluşan şeffaf inhibisyon zonları kumpas yardımı ile ölçülerek belirlenmiştir (Todorov and Dicks, 2006).

3.2.7. İzolatların yüksek sıcaklığa direnç özellikleri

Yüksek sıcaklığa direnç özellikleri sadece antimikrobiyel etkiye sahip olduğu belirlenen izolatlara uygulanmış ve yüksek sıcaklığa karşı direnç özelliği 60 °C ve 70 °C'lerde belirlenmiştir. Çalışılan izolatların saf kültürleri 10 mL MRS broth besiyerine ekilerek 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Gelişen kültürler 10000 rpm'de 10 dakika süreyle soğutmalı santrifüjde (Sigma, USA) 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen bakteri hücresi pelletleri 7 mL steril serum fizyolojik

kullanılarak süspanse edilmiştir. Kültürel sayım yöntemi ile söz konusu bakteri süspansiyonlarında 10^9 - 10^{10} kob/mL düzeyinde bakteri bulunduğu tespit edilmiştir.

İki farklı su banyosunda 60 °C ve 70 °C sabit sıcaklıklara getirilen 50 mL steril serum fizyolojik çözeltileri içerisine her bir test bakteri süspansiyonundan % 2 (v/v) oranında aşılama yapılmıştır. Örnekler söz konusu sıcaklıklarda 30 dakika süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0., 5., 10. ve 30. dakikalarında her bir örnekten 1 mL alınıp seri seyreltmeleri yapılarak MRS agar besiyerine dökme plak yöntemiyle mikrobiyolojik ekimleri gerçekleştirilmiş ve 37 °C'de 48-72 saat inkübe edilen Petri kutularından sayım sonuçları alınmıştır. Kontrol amacıyla bakteri süspansiyonlarından % 2 (v/v) oranında steril serum fizyolojik içine inokulasyon yapılarak 37 °C'de 30 dakika inkübasyona alınmıştır. İnkübasyonun 0., 10. ve 30. dakikalarda alınan örneklerden de yukarıda sözü edilen şekilde ekimler yapılmıştır. Örneklerin sayım sonuçları yine 37 °C'de 48-72 saat inkübasyonun ardından alınmıştır. Çalışma, iki tekrarlı olarak yürütülmüştür (Ahmad et al., 2003).

3.2.8. İzolatların düşük pH'ya direnç özellikleri

Düşük pH'ya karşı direnç özellikleri sadece antimikrobiyel etkiye sahip olduğu belirlenen izolatlara uygulanmış ve düşük pH'a karşı direnç özelliği pH 2, 3 ve 4'de belirlenmiştir. Çalışılan izolatların saf kültürleri Bölüm 3.2.7.'de anlatıldığı şekilde süspanse edilmiştir. Çalışma, 1 N steril HCl çözeltisi kullanılarak pH 2, 3 ve 4'e ayarlanmış 50 mL steril serum fizyolojik çözeltileri içerisine bakteri süspansiyonlarının % 2 (v/v) oranında aşılama şeklinde gerçekleştirilmiştir. Aşılama örnekler daha sonra 37 °C'de 1 ve 3 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0., 1. ve 3. saatlerinde her bir örnekten 1 mL alınıp seri seyreltmeleri yapılarak MRS agar besiyerine dökme plak yöntemiyle ekimleri gerçekleştirilmiş ve 37 °C'de 48-72 saat inkübe edilen Petri kutularından sayım sonuçları alınmıştır. Kontrol amacıyla bakteri süspansiyonlarından % 2 (v/v) oranında steril serum fizyolojik (pH 6.5) içine aşılama yapılarak 37 °C'deki inkübasyonun 0., 1. ve 3. saatlerinde yukarıda sözü edilen şekilde ekimler yapıp sayım sonucu alınmıştır. Çalışma, iki tekrarlı olarak yürütülmüştür (Prasad et al., 1998; Lian et al., 2003; Şener ve Temiz, 2008; Şener, 2009).

3.2.9. İzolatların safraya direnç özellikleri

Safraya direnç özellikleri sadece antimikrobiyel etkiye sahip olduğu belirlenen izolatlar uygulanmıştır. İzolatların safraya direnç özellikleri, insan sindirim sistemini modellemesi amacıyla seçilen % 0.5'lik (w/v) derişimindeki safra çözeltisi içerisinde test edilmiştir. Çalışmada kullanılan bakteri süspansiyonları Bölüm 3.2.7.'de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Bakteri süspansiyonlarından, saf su kullanılarak % 0.5 (w/v) derişimde hazırlanıp 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilize edilen safra çözeltisine (Oxgall, Merck) % 2 (v/v) düzeyinde aşılama gerçeleştirilmiştir. Aşılama örnekler daha sonra 37 °C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0. 4. ve 24. saatlerinde her bir örnekten 1 mL alınıp seri seyreltmeleri yapılarak MRS agar besiyerine dökme plak yöntemiyle ekimleri gerçeleştirilmiş ve 37 °C'de 48 saat inkübe edilen Petri kutularından sayım sonuçları alınmıştır. Kontrol amacıyla bakteri süspansiyonlarından % 2 (v/v) oranında steril serum fizyolojik içine aşılama yapılarak 37 °C'de inkübasyona alınmıştır. İnkübasyonun 0., 4. ve 24 saatlerinde yukarıda sözü edilen şekilde ekimler yapıp sayım sonucu alınmıştır. Çalışma, iki tekrarlı olarak yürütülmüştür (Lian et al., 2003; Şener ve Temiz, 2008; Şener, 2009).

3.2.10. İzolatların nitrite direnç özellikleri

Nitrite direnç özellikleri sadece antimikrobiyel etkiye sahip olduğu belirlenen izolatlar uygulanmış ve nitrite direnç özellikleri; 50, 100 ve 200 ppm nitrit derişimindeki çözeltiler içerisinde test edilmiştir. Çalışmada kullanılan bakteri süspansiyonları Bölüm 3.2.7.'de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Bakteri süspansiyonlarından 50, 100 ve 200 ppm derişimlerinde hazırlanarak otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilen 50 mL'lik nitrit çözeltilerine ayrı ayrı olmak üzere % 2 oranında aşılama yapılmıştır. Örnekler daha sonra 37 °C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0. ve 24. saatlerde her bir örnekten 1 mL alınıp seri seyreltmeleri yapılarak MRS agar besiyerine dökme plak yöntemiyle ekimleri gerçeleştirilmiş ve 37 °C'de 48-72 saat inkübe edilen Petri kutularından sayım sonuçları alınmıştır. Kontrol amacıyla bakteri süspansiyonlarından % 2 oranında steril serum fizyolojik içine aşılama ve 37 °C'de inkübasyonun 0. ve 24.

saatlerinde yukarıda sözü edilen şekilde ekimler yapıp sayım sonucu alınmıştır. Çalışma, iki tekrarlı olarak yürütülmüştür (Houben, 2003; Şener, 2009).

3.2.11. İzolatların tuza (NaCl) direnç özellikleri

Tuza (NaCl) direnç özellikleri sadece antimikrobiyel etkiye sahip olduğu belirlenen izolatlar uygulanmıştır. İzolatların tuza direnç özellikleri; % 6.5 (w/v), % 10 (w/v) ve % 15'lik (w/v) tuz (NaCl) derişimindeki çözeltiler içerisinde test edilmiştir. Çalışmada kullanılan bakteri süspansiyonları Bölüm 3.2.7.'de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Bakteri süspansiyonlarından % 6.5 (w/v), % 10 (w/v) ve % 15'lik (w/v) derişimlerinde hazırlanarak otoklavda 121 °C'de 15 dakikada sterilize edilen 50 mL'lik tuz çözeltilerine ayrı ayrı olmak üzere % 2 (v/v) oranında aşılamlar yapılmıştır. Aşılaman örnekler daha sonra 37 °C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0. ve 24. saatlerde her bir örnekten 1 mL alınıp seri seyreltmeleri yapılarak MRS agar besiyerine dökme plak yöntemiyle ekimleri gerçekleştirilmiş ve 37 °C'de 48 saat inkübe edilen Petri kutularından sayım sonuçları alınmıştır. Kontrol amacıyla bakteri süspansiyonlarından % 2 oranında steril serum fizyolojik içine aşılamanmış ve 37 °C'de inkübasyonun 0. ve 24 saatlerinde yukarıda sözü edilen şekilde ekimler yapıp sayım sonucu alınmıştır. Çalışma, iki tekrarlı olarak yürütülmüştür (Houben, 2003; Şener, 2009).

3.2.12. İzolatların *in-vitro* olarak kolesterolü düşürme özellikleri

Kolesterolü düşürme özelliği sadece antimikrobiyel etkiye sahip olduğu belirlenen izolatlar uygulanmış ve *in-vitro* olarak kolesterolü düşürme özelliklerinin araştırılması amacıyla Pereira and Gibson (2002) ve Ziarno (2008) tarafından belirtilen yöntemler modifiye edilerek uygulanmıştır.

Bu amaçla ilk aşamada steril serum fizyolojik içine % 0.3 (w/v) safra ve % 0.1 (v/v) oranında Tween 80 eklenerek hazırlanan ve otoklavda sterilize edilen çözeltiliye derişimi 100 mg/L olacak şekilde suda çözünür kolesterol (Sigma, ABD) aktarılıp karıştırılmış ve elde edilen çözeltili 10 mL olacak şekilde tüplere dağıtılmıştır.

Çalışılan izolatların saf kültürleri 10 mL MRS broth besiyerine ekilerek 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Gelişen kültürlerin 10000 rpm'de 15 dakika süreyle 4 °C'de

santrifüjlenmesi (Sigma, USA) ile elde edilen hücre peletleri 1 mL steril serum fizyolojik içinde çözülerek bakteri süspansiyonları elde edilmiştir. Kültürel sayım yöntemi ile söz konusu bakteri süspansiyonlarında 10^9 - 10^{10} kob/mL düzeyinde bakteri bulunduğu tespit edilmiştir. Bakteri süspansiyonlarından kolesterol içeren tüplere 1 mL aşılama yapılmış ve tüpler 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonucunda her bir kültür tüpünden elde edilen süpernatantlarda spektrofotometrik ölçüm tekniğine dayalı Kolesterol CHOD/POD (Spinreact, İspanya) test kiti kullanılarak kolesterol miktar tayini yapılmıştır.

3.2.13. İzolatların antimikrobiyel aktivitesinin bakteriyosinlerden kaynaklanıp kaynaklanmadığının belirlenmesi

Test bakterilerine karşı antimikrobiyel aktivite belirlenen izolatların antimikrobiyel etkisinin bakteriyosinden kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirlemek için bakteriyosinler dışındaki inhibisyon etkenlerinin elimine edilerek bir çalışma yapılması gerekmektedir. Bu amaçla antimikrobiyel etkinin kültür ortamındaki düşük pH (organik asit oluşumuna bağlı) ve hidrojen peroksit kaynaklı olup olmadığının belirlenmesi yoluna gidilmiştir. Düşük pH ve hidrojen peroksit etkisinin aşağıda belirtildiği şekilde elimine edilmesinden sonra proteolitik enzimler kullanılarak antimikrobiyel etkiye neden olan maddenin protein yapısında olup olmadığı ortaya konmaya çalışılmıştır (Todorov and Dicks 2005).

3.2.13.1. Düşük pH'ın izolatların antimikrobiyel aktivitesinden sorumlu olup olmadığının belirlenmesi

Laktik asit bakteri izolatlarının test bakterileri üzerindeki antimikrobiyel aktivitelerinin yüksek asitlikten kaynaklanıp kaynaklanmadığı kültür süpernatantlarının pH değerleri nötralleştirilerek, agar difüzyon tekniği ile belirlenmiştir.

MRS broth besiyerinde 37 °C'de 24 saat süre ile aktifleştirilen laktik asit bakteri izolat kültürleri 10000 rpm'de 10 dakika süre ile 4 °C'de santrifüjlenerek süpernatantlar elde edilmiştir. Süpernatant pH'ları, 6 N NaOH veya 6 N HCl kullanılarak pH 6.5 – 7.0 olarak ayarlanmıştır. Nötral pH'lardaki süpernatantlar

0.22 µm gözenek çaplı steril membran filtreden (Millipore, USA) geçirilerek sterilize edilmiş ve bunların antimikrobiyel etkileri agar difüzyon tekniği ile Bölüm 3.2.6.'da belirtilen şekilde test edilmiştir (Akçelik et al., 2006).

3.2.13.2. Hidrojen peroksit varlığının izolatların antimikrobiyel aktivitesinden sorumlu olup olmadığının belirlenmesi

Laktik asit bakteri izolatlarının test bakterileri üzerindeki antimikrobiyel aktivitelerinin hidrojen peroksit varlığından kaynaklanıp kaynaklanmadığı katalaz enzimi (Sigma, USA) kullanılarak, agar damlatma ve agar difüzyon teknikleriyle ayrı ayrı belirlenmiştir.

Agar damlatma tekniğinde, 10 mL MRS broth besiyerinde 37 °C'de 24 saat süre ile geliştirilmiş izolat kültürlerinden steril kürdan kullanılarak Petri kutusundaki MRS agar yüzeyine nokta ekim yapılmıştır. Petri kutuları daha sonra 30 °C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Gelişen koloniler üzerine olası hidrojen peroksit etkisinin elimine edilmesi amacıyla 1 mg/mL derişimindeki katalaz enzim çözeltisi uygulanmış ve 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Laktik asit bakteri izolatlarının antimikrobiyel etkileri Bölüm 3.2.6.'da belirtilen şekilde kültürler etrafında oluşan şeffaf inhibisyon zonları belirlenerek değerlendirilmiştir.

Agar difüzyon tekniğinde ise MRS broth besiyerinde 37 °C'de 24 saat süre ile aktiveleştirilen izolat kültürleri 10000 rpm'de 10 dakika süre ile 4 °C'de santrifüjlenerek süpernatantlar elde edilmiştir. Süpernatantlar Bölüm 3.2.13.1'de anlatıldığı şekilde nötrale edildikten sonra 0.22 µm gözenek çaplı steril membran filtreden (Millipore, USA) geçirilerek sterilize edilmiştir. Süpernatantlara olası hidrojen peroksit etkisinin elimine edilmesi amacıyla 1 mg/mL derişiminde katalaz enzim çözeltisi uygulanmış ve 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda 80 °C'de 5 dakika ısı işlem uygulanarak enzim aktivitesi inhibe edilmiştir. Bu süpernatantların antimikrobiyel etkileri Bölüm 3.2.6.'da belirtilen şekilde test edilmiştir (Du Toit et al., 2000; Uymaz et al. 2009).

3.2.13.3. Protein yapıdaki maddelerin izolatların antimikrobiyel aktivitesinden sorumlu olup olmadığının belirlenmesi

İzolatların antimikrobiyel etkisinin protein yapıda bir madde olup olmadığı proteolitik enzimler kullanılarak Agar damlatma ve Agar difüzyon teknikleri kullanılarak belirlenmiştir.

Agar damlatma tekniğinde, 10 mL MRS broth besiyerinde 37 °C'de 24 saat süre ile geliştirilmiş izolat kültürlerinden steril kürdan kullanılarak Petri kutusundaki MRS agar yüzeyine nokta ekimler yapılmıştır. Petri kutuları daha sonra 30 °C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Gelişen koloniler üzerine 1 mg/mL derişiminde proteaz (Sigma, USA), pepsin (Sigma, USA) veya tripsin (Sigma, USA) enzimleri ayrı ayrı uygulanmış ve 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Antimikrobiyel etki Bölüm 3.2.6.'da belirtilen şekilde değerlendirilmiştir.

Agar difüzyon tekniğinde ise MRS broth besiyerinde 37 °C'de 24 saat süre ile aktifleştirilen izolat kültür sıvıları 10000 rpm'de 10 dakika süre ile 4 °C'de santrifüjlenerek (Sigma, USA) süpernatantlar elde edilmiştir. Süpernatantlar Bölüm 3.2.13.1'de anlatıldığı şekilde nötralize edildikten sonra 0.22 µm gözenek çaplı steril membran filtreden (Millipore, USA) geçirilerek sterilize edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar üçe ayrılmış ve her bir süpernatanta 1 mg/mL konsantrasyonda proteaz, pepsin veya tripsin enzimi ayrı ayrı uygulanmış ve 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda 80 °C'de 5 dakika ısı işlem uygulanarak enzim aktivitesi inhibe edilmiştir. Bu süpernatantların antimikrobiyel etkileri Bölüm 3.2.6.'da belirtilen şekilde test edilmiştir (Akçelik et al., 2006).

3.2.14. İzolatların besiyerinde gelişimi ile bakteriyosin üretim ilişkisinin belirlenmesi

Bakteriyosin üreticisi olduklarına karar verilen laktik asit bakteri izolatları MRS broth besiyerinde 37 °C'de 18 saat süre ile aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilen her bir kültürden, içinde 10'ar mL MRS broth besiyeri bulunan 9 adet test tüpünün her birine ayrı ayrı olmak üzere % 0.1 oranında ekimler yapılmış ve tüpler 37 °C'de 27 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresince her 3 saatte bir olmak üzere

bir test tüpü alınarak 600 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmıştır (Cheigh et al., 2002). Okunan absorbans değerleri inkübasyon süresine karşı grafiğe geçirilerek test edilen izolatın gelişim eğrisi elde edilmiştir.

İnkübasyon süresince her 3 saatte bir olmak üzere bir test tüpünün alınarak 600 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapıldıktan sonra bu tüp içeriği ayrıca izolatın bakteriyosin aktivitesinin belirlenmesi amacıyla antimikrobiyel aktivite testine alınmıştır. Laktik asit bakteri izolatlarının zamana karşı bakteriyosin aktivitelerindeki değişim “kritik dilüsyon yöntemi” kullanılarak agar difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntemde test bakterisi olarak daha önceki denemelerde bakteriyosin üreten suşlara karşı en duyarlı test bakterisi olduğu belirlenen *L. monocytogenes* ATCC 7644’e kullanılmıştır (Khedid et al., 2009). Kritik dilüsyon yönteminde, incelenmekte olan izolat kültürünün Bölüm 3.2.6.’da belirtildiği şekilde süpernatantı hazırlanmış ve bu süpernatanttan iki katlı dilüsyon serileri hazırlanarak kuyucuklara bu dilüsyonlardan 100 µl miktarlarda eklenmiştir.

Laktik asit bakteri izolatlarının bakteriyosin aktivitesi aşağıdaki formüle göre AU/mL (arbitrary unit) olarak belirlenmiştir (Abriouel et al. 2006);

$$BA \text{ (AU/mL)} = D \times 1000 / V$$

Bakteriyosin aktivitesi (AU/mL)	:BA
İnhibisyon zonu belirlenen en yüksek dilüsyon faktörü	:D
Aktarılan miktar (µl)	:V

3.2.15. Kaba bakteriyosin preparatlarının hazırlanması

Bakteriyosin üreticisi olduklarına karar verilen laktik asit bakteri izolatlarından MRS Broth besiyerine % 1 oranında aşılama yapıp 37 °C’de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen kültür 10000 rpm’de 10 dakika süre ile 4 °C’de santrifüjlenerek süpernatantlar elde edilmiştir. Süpernatant pH’ları 6 N HCl kullanılarak pH 6.5 – 7.0 olarak ayarlanmıştır. Bu süpernatantlar 0.22 µm gözenek çaplı steril membran filtrelerden (Millipore, USA) geçirilerek hücre içermeyen süpernatantlar elde edilmiştir. Hücre içermeyen bu süpernatantlar “kaba bakteriyosin preparatı” olarak -20 °C’de muhafaza edilmiştir (Krier et al., 1998).

3.2.16. İzolatların bakteriyosin aktivitesi üzerine enzimlerin etkisi

Laktik asit bakteri izolatlarının bakteriyosin aktivitesi üzerine enzimlerin etki derecesini belirlemek amacıyla lipaz (Sigma, USA), pepsin (Sigma, USA), katalaz (Sigma, USA), tripsin (Sigma, USA), α -amilaz (Sigma, USA) veya proteinaz K (Sigma, USA) enzimleri kullanılmıştır. Test edilen enzim kaba bakteriyosin preparatı içerisine 1 mg/mL derişiminde eklenmiş ve 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Enzim ile muamele edilmiş kaba bakteriyosin preparatının bakteriyosin aktivitesi Bölüm 3.2.14'de belirtildiği şekilde “kritik dilüsyon yöntemi” kullanılarak agar difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu denemelerde kontrol olarak bakteriyosin içermeyen enzim çözeltileri ile enzim içermeyen bakteriyosin örnekleri kullanılmıştır (Xiraphi et al., 2008).

3.2.17. İzolatların bakteriyosin aktivitesi üzerine pH'ın etkisi

Kaba bakteriyosin preparatlarının pH'ları 6 N NaOH veya 6 N HCl kullanılarak pH 2 – 12 arasında birer birim artırılarak ayarlanmıştır. Buzdolabı sıcaklığında 24 saat bekletildikten sonra örneklerin aktiviteleri kritik dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. MRS broth besiyeri (pH'ları 2 – 12 arasında birer birim artırılarak ayarlanmış) kontrol olarak kullanılmıştır (Akçelik et al., 2006).

3.2.18. İzolatların bakteriyosin aktivitesi üzerine ısı işlemin etkisi

Bakteriyosin aktivitesi üzerine ısı işlemin etkisini belirlemek amacıyla kaba bakteriyosin preparatları 60 °C, 80 °C ve 100 °C'de 10 dakika ve 30 dakika, 121 °C'de ise 15 dakika ısı işleme tabi tutulmuştur. Örneklerin antimikrobiyel aktiviteleri oda sıcaklığına soğutulduktan sonra kritik dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Isıl işlem uygulanmamış kaba bakteriyosin örnekleri kontrol olarak kullanılmıştır (Robin et al., 2006).

3.2.19. İzolatların bakteriyosin aktivitesi üzerine bazı organik çözücüler ve kimyasalların etkisi

Bu aşamada organik çözücüler ve kimyasallar olarak proteinlerin saflaştırılması esnasında (Bölüm 3.2.20) da kullanılabilen; etanol, metanol, kloroform, SDS

(sodyum dodesil sülfat) ve β -merkaptotanol test edilmiştir. Kaba bakteriyosin preparatları ayrı ayrı olmak üzere % 10 etanol, % 10 metanol, % 10 β -merkaptotanol, % 10 kloroform, % 1 SDS ve % 10 SDS varlığında 37 °C'de 2 saat süre ile inkübe edilmiş ve daha sonra bakteriyosin aktiviteleri kritik dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bakteriyosin içermeyen organik çözücüler ve kimyasallar ile bunları içermeyen kaba bakteriyosin preparatları kontrol olarak kullanılmıştır.

Proteinlerin saflaştırılması aşamasında kullanılan β -merkaptotanol ve SDS karışımının bakteriyosin aktivitesine etkisini belirlemek için ayrı bir deneme yapılmıştır. Bu amaçla kaba bakteriyosin preparatı supernatantına % 10 β -merkaptotanol ve % 1 SDS ilave edilerek 100 °C'de 5 dk ısıtılmasına tabi tutulmuştur. Daha sonra karışım oda sıcaklığına soğutulmuş ve bakteriyosin aktivitesi kritik dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Kontrol olarak ısıtılma uygulanmış bakteriyosin içermeyen β -merkaptotanol - SDS çözeltisi ile ısıtılma uygulanmamış ve uygulanmış kaba bakteriyosin preparatları kullanılmıştır (Rehaem et al., 2010).

3.2.20. İzolat kültür sıvılarından kısmi saf bakteriyosin preparatlarının elde edilmesi

Bakteriyosin üreticisi olduklarına karar verilen laktik asit bakteri izolatları MRS broth besiyerinde 37 °C'de 18 saat süre ile aktifleştirildikten sonra 10000 rpm'de 10 dakika süre ile 4 °C'de santrifüjlenerek süpernatantları elde edilmiştir. Elde edilen süpernatantların pH'ları 6 N NaOH kullanılarak pH 6.5 – 7.0'a ayarlanmıştır. Süpernatant çözeltilerine % 45 oranında amonyum sülfat ilave edilmiş ve 4 °C'de gece boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Karışım 10000 rpm'de 1 saat süre ile 4 °C'de santrifüjlendikten sonra pellet alınarak 10 mL 50 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 6.5) çözündürülmüştür. Daha sonra üzerine 15 mL kloroform– metanol (2:1, v/v) karışımı ilave edilerek manyetik karıştırıcıda 4 °C'de 1 saat tutulmuştur. Karışım 10000 rpm'de 1 saat süreyle 4 °C'de santrifüjlenmiş ve elde edilen pellet açık havada kurutulduktan sonra “kısmi saf bakteriyosin preparatı” olarak -20 °C'de muhafaza edilmiştir (Menozzi et al., 2006).

3.2.21. Kısmi saf bakteriyosin preparatı örneklerinin protein tayini

Amonyum sülfat presipitasyonu ile kısmen saflaştırılan bakteriyosin örneklerindeki toplam protein miktarı Bradford yöntemi (Bradford, 1976) kullanılarak belirlenmiştir. Protein standardı olarak BSA (Bovine serum albumin, Merck) kullanılmıştır.

BSA ile 0.25 - 2 mg/mL derişimleri arasında standart protein çözeltileri hazırlanmıştır. Standart protein çözeltileri örneklerinden 100'er mL alınarak üzerine 5 mL Bradford çözeltisi ilave edilmiş ve 5 dakika sonra UV-visible spektrofotometre (Agilent, USA) ile 595 nm'de absorbansları okunmuştur. Standartlardan elde edilen derişim – absorbans verilerinden yararlanarak standart eğri çizilmiştir.

Protein tayini yapılacak “kısmi saf bakteriyosin preparatı” örnekleri, yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanarak absorbansları ölçülmüş ve bakteriyosin örneklerindeki protein miktarı standart eğriden yararlanarak hesaplanmıştır.

3.2.22. Kısmi saf bakteriyosin preparatlarının moleküler büyüklüğünün SDS-PAGE ile belirlenmesi

Kısmi saf bakteriyosin preparatlarının molekül ağırlığı trisin sodyum dodezil sülfat-poliakrilamit jel elektroforez (Trisin-SDS-PAGE) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Elektroforez jelleri % 16 ve % 10'luk ayırma ve % 4'lük yığma jel kullanılarak hazırlanmıştır. Molekül ağırlıkları 1.7 ile 42 kDa arasında olan marker (Fermentas, USA) standart olarak kullanılmıştır.

Bakteriyosin içeren örnekler “örnek tamponu” ile 2:1 oranında karıştırılıp 100 °C'de 5 dakika ısıtılmıştır. Hazırlanan örnekler 10 µl hacimde jelle iki paralel olarak yüklendikten sonra örnekler yığma jeli terk edene kadar 30 mA'de, sonrasında ise 50 mA sabit akımda elektroforez işlemi uygulanmıştır. Elektroforez sonrasında paralel spotlama yapılan jel iki kısma bölünmüştür.

Jelin bir kısmı gümüş boyama yöntemi ile boyanmıştır. Jel fiksasyon çözeltisinde 1 saat tutulmuş, iki kere saf su ile yıkandıktan sonra 1 saat % 0.005 sodyum tiyosülfat çözeltisi içinde tutularak boyamaya duyarlı hale getirilmiştir. Jel bunu

takiben % 0.1 AgNO₃ çözeltisi içerisinde 1 saat bekletildikten sonra üzerine geliştirme çözeltisi (% 0.036 formaldehit, % 2 amonyum karbonat) ilave edilip protein bantları gözlemlene kadar 1 – 2 dakika bu çözelti içinde tutulmuştur. Jel daha sonra 50mM EDTA çözeltisi içinde 1 saat bekletilerek protein bantlarının gelişimi durdurulmuştur.

Diğer jel kısmı ise “fiksasyon çözeltisi”nde 1 saat bekletildikten sonra 1’er saat süre ile iki kere damıtık su ile yıkanmıştır. Daha sonra jel 20 cm çaplı büyük Petri kutusuna alınarak üzerine içerisinde %1 oranında *L. monocytogenes* ATCC 7644 test bakterisi (bu test bakterisi daha önceki denemelerde bakteriyosin üreten suşlara karşı en duyarlı test bakterisi olarak belirlenmiştir) içeren % 0.75’lik BHI agar besiyeri dökülmüştür. Petri kutusu 37 °C’de 24 saat inkübe edilerek oluşan inhibisyon zonları gözleme alınmıştır. Kısmi saf bakteriyosin preparatının elektroforezinde inhibisyon zonu gözlenen bölge, boyama yapılmış elektroforez jelindeki bölgenin yeri ile karşılaştırılarak inhibisyon zonu veren protein bandı tespit edilmiştir.

Kısmi saf bakteriyosin preparatının molekül büyüklükleri inhibisyon zon oluşumu gözlenen protein bandının R_f (bağıl hareketlilik) değerleri ve marker proteinlerinin R_f değerleri kullanılarak belirlenmiştir (Du Toit et al., 2000).

Trisin-SDS-PAGE yönteminde kullanılan jel ve çözeltiler aşağıda verilmiştir;

Örnek Tamponu

1 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.2 mL
Gliserol (%50)	10 mL
SDS (%10)	4 mL
2-merkaptoetanol	1 mL
Bromfenol mavisi (%1)	2 mL
Damıtık Su	1.8 mL

Ayırma Jeli Tamponu (pH 8.45)

Tris	36.3 g
SDS	0.3 g
Damıtık su	100 mL

Ayırma jeli tamponu (3X)

Gliserol	3 mL
Damıtık Su	11 mL

APS (%10)	150 mL
TEMED (N'N'N'N'-Tetra-Metilendiamin)	15 mL

Katot tamponu (10X, pH 8.25)

Tris	12.1 g
Trisin	18 g
SDS	1 g
Damıtık su	100 mL

Anot tamponu (10X, pH 8.9)

Tris	121 g
Damıtık su	500 mL

Ayırma Jeli (%16)

Akrilamit (%46.5)-Bisakrilamit (%3)	10 mL
Ayırma jeli tamponu (3X)	10 mL
Gliserol	3 mL
Damıtık Su	7 mL
APS (Amonum persülfat, %10)	100 mL
TEMED (N'N'N'N'-Tetra-Metilendiamin)	10 mL

Ayırma Jeli (%10)

Akrilamit (%46.5)-Bisakrilamit (%3)	6 mL
Ayırma jeli tamponu (3X)	10 mL
Gliserol	3 mL
Damıtık Su	11 mL
APS (Amonum persülfat, %10)	150 ml
TEMED (N'N'N'N'-Tetra-Metilendiamin)	15 mL

Yığma Jel (%4)

Akrilamit (%46.5)-Bisakrilamit (%3)	1 mL
Ayırma jeli tamponu (3X)	3 mL
Damıtık Su	8 mL
APS (%10)	90 mL
TEMED (N'N'N'N'-Tetra-Metilendiamin)	9 mL

Fiksasyon çözeltisi

Metanol	400 mL
Asetik asit	100 mL
Damıtık su	500 mL

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Anne Sütü Örneklerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Cins ve Tür Düzeyinde Tanımlanması

Bu çalışmada, anne sütü örneklerinden izole edilmiş olan laktik asit bakteri şüpheli toplam 204 adet izolat incelemeye alınmıştır.

Bu laktik asit bakteri şüpheli izolatlar ilk aşamada, Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı şekilde hareket edilerek cins düzeyinde tanımlanmıştır. Laktik asit bakteri şüpheli izolatların cins düzeyinde doğrulama test sonuçları Çizelge 10’da topluca gösterilmiştir. Bu izolatlardan 74 adedi MRS agar, 23 adedi M17 agar ve 23 adedi KAA agar besiyerleri kullanılarak izole edilen laktik asit bakteri şüpheli izolatlardır. Bu aşamada; katalaz pozitif bulunan 50 adet izolat ile Gram-negatif bulunan 2 adet izolat ve aktiveleştirilemeyen ve saf kültürleri elde edilemeyen 32 adet izolat çalışma kapsamı dışına alınmıştır.

Cins düzeyinde tanımlaması gerçekleştirilen izolatların, daha sonra Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı şekilde hareket edilerek API 50 CHL ve API 20 strep test kitleri ile tür düzeyinde tanımlanmasına geçilmiştir. Laktik asit bakteri şüpheli izolatların tür düzeyinde doğrulama test sonuçları Çizelge 11 ve Çizelge 12’de topluca gösterilmiştir. Bu aşamada 40 adet laktik asit bakteri izolatının API 20 strep test kiti ile, 13 adet laktik asit bakteri izolatının ise API 50 CHL test kiti ile tür düzeyinde % 90 ve üzerinde tanımlama yüzdesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatlardan 23 tanesinin *Enterococcus faecalis*, 6 tanesinin *E. faecium*, 4 tanesinin *Streptococcus mitis*, 4 tanesinin *Str. salivarius*, 8 tanesinin *Leuconostoc lactis*, 1 tanesinin *Str. salivarius* spp. *thermophilus*, 1 tanesinin *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, 2 tanesinin *Lactobacillus delbrueckii* spp. *delbrueckii*, 1 tanesinin *Lb. acidophilus*, 1 tanesinin *Pediococcus* spp, 1 tanesinin *Str. pneumoniae* ve 1 tanesinin *Gamella haemolysans* oldukları belirlenmiştir (Çizelge 11 ve Çizelge 12).

Çizelge 10. Anne sütü kaynaklı laktik asit bakterisi şüpheli izolatların cins düzeyinde doğrulama test sonuçları

Sıra No	izolat No	10 °C'de Üreme	45 °C'de Üreme	pH 9.6'da Üreme	% 2 NaCl	% 4 NaCl	% 6.5 Tuzda Üreme	Katalaz Testi	Glukozdan Gaz Oluşumu	Hemoliz Reaksiyonu	Arjinin Hidrolizi	Gram Reaksiyonu	Mikroskopik Morfoloji
1	EK A17-01	+	+	+	+	+	+	- _b	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
2	EK A17-02	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
3	EK A17-03	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
4	EK A17-04	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
5	EK A17-05	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
6	EK A17-06	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
7	EK A17-07	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
8	EK A17-08	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
9	EK A17-09	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
10	EK A17-10	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
11	EK A21-01	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
12	EK A21-02	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
13	EK A21-03	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
14	EK A40-01	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
15	EK A40-02	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
16	EK A40-03	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
17	EK A40-04	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
18	EK A40-05	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
19	EK K19-01	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
20	EK K19-02	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
21	EK K19-03	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
22	EK K19-04	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
23	EK K19-05	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok

Çizelge 10. (Devam ediyor)

Sıra No	izolat No	10 °C'de Üreme	45 °C'de Üreme	pH 9,6'da Üreme	% 2 NaCl	% 4 NaCl	% 6.5 Tuzda Üreme	Katalaz Testi	Glukozdan Gaz Oluşumu	Hemoliz Reaksiyonu	Arjinin Hidrolizi	Gram Reaksiyonu	Mikroskopik Morfoloji
24	LB A01-01	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
25	LB A01-03	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	Gram-pozitif	Kok
26	LB A01-04	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
27	LB A01-05	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	Gram-pozitif	Kok
28	LB A01-06	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
29	LB A02-02	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	Gram-pozitif	Kok
30	LB A02-04	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	Gram-pozitif	Kok
31	LB A02-05	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
32	LB A02-06	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
33	LB A02-07	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
34	LB A03-01	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
35	LB A03-04	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
36	LB A04-01	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
37	LB A04-03	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
38	LB A04-04	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
39	LB A04-05	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	Gram-pozitif	Kok
40	LB A04-06	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
41	LB A05-01	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
42	LB A06-02	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
43	LB A07-01	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
44	LB A07-02	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
45	LB A07-03	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
46	LB A07-04	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok

Çizelge 10. (Devam ediyor)

Sıra No	İzolat No	10 °C'de Üreme	45 °C'de Üreme	pH 9.6'da Üreme	% 2 NaCl	% 4 NaCl	% 6.5 Tuzda Üreme	Katalaz Testi	Glukozdan Gaz Oluşumu	Hemoliz Reaksiyonu	Arjinin Hidrolizi	Gram Reaksiyonu	Mikroskopik Morfoloji
47	LB A09-01	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
48	LB A09-02	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
49	LB A11-02	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
50	LB A12-01	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
51	LB A12-03	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	Gram-pozitif	Kok
52	LB A13-01	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
53	LB A13-03	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
54	LB A14-01	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Basil
55	LB A15-01	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
56	LB A15-02	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	Gram-pozitif	Kok
57	LB A15-03	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
58	LB A17-01	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
59	LB A17-02	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
60	LB A17-03	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
61	LB A18-02	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
62	LB A21-02	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
63	LB A22-02	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
64	LB A23-02	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
65	LB A23-03	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
66	LB A24-01	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
67	LB A24-02	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
68	LB A24-03	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
69	LB A30-01	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	Gram-pozitif	Kok

Çizelge 10. (Devam ediyor)

Sıra No	İzolat No	10 °C'de Üreme	45 °C'de Üreme	pH 9.6'da Üreme	% 2 NaCl	% 4 NaCl	% 6.5 Tuzda Üreme	Katalaz Testi	Glukozdan Gaz Oluşumu	Hemoliz Reaksiyonu	Arjinin Hidrolizi	Gram Reaksiyonu	Mikroskopik Morfoloji
70	LB A30-02	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
71	LB A32-02	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
72	LB A33-01	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
73	LB A33-02	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
74	LB A34-01	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
75	LB A36-01	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
76	LB A39-01	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
77	LB A41-02	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Basil
78	LB K01-05	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
79	LB K02-03	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
80	LB K03-02	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
81	LB K04-02	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
82	LB K04-03	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
83	LB K05-01	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
84	LB K05-02	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
85	LB K05-03	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
86	LB K06-01	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
87	LB K06-02	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
88	LB K07-03	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
89	LB K09-01	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
90	LB K09-02	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
91	LB K09-03	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok

Çizelge 10. (Devam ediyor)

Sıra No	İzolat No	10 °C'de Üreme	45 °C'de Üreme	pH 9.6'da Üreme	% 2 NaCl	% 4 NaCl	% 6.5 Tuzda Üreme	Katalaz Testi	Glukozdan Gaz Oluşumu	Hemoliz Reaksiyonu	Arjinin Hidrolizi	Gram Reaksiyonu	Mikroskopik Morfoloji
92	LB K11-02	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
93	LB K15-01	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
94	LB K15-02	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok
95	LB K17-01	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
96	LB K17-02	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	Gram-pozitif	Kok
97	LB K18-02	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	Gram-pozitif	Kok
98	M17 A11-01	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
99	M17 A21-02	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
100	M17 A37-02	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
101	M17 K19-01	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
102	M17 K19-03	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
103	M17 A17-01	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	Gram-pozitif	Kok
104	M17 A17-03	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
105	M17 A18-01	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
106	M17 A27-01	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
107	M17 A28-01	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
108	M17 A29-01	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	Gram-pozitif	Kok
109	M17 A33-01	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
110	M17 A35-01	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
111	M17 A36-01	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
112	M17 K03-01	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
113	M17 K04-02	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
114	M17 K05-01	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok

Çizelge 10. (Devam ediyor)

Sıra No	İzolat No	10 °C'de Üreme	45 °C'de Üreme	pH 9.6'da Üreme	% 2 NaCl	% 4 NaCl	% 6.5 Tuzda Üreme	Katalaz Testi	Glukozdan Gaz Oluşumu	Hemoliz Reaksiyonu	Arjinin Hidrolizi	Gram Reaksiyonu	Mikroskopik Morfoloji
115	M17 K07-02	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
116	M17 K17-01	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Gram-pozitif	Kok
117	M17 A21-03	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	Gram-pozitif	Kok
118	M17 K04-03	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	Gram-pozitif	Kok
119	M17 K05-03	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	Gram-pozitif	Kok
120	M17 K09-02	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Gram-pozitif	Kok

a) Üreme var. b) Üreme yok.

Çizelge 11. API 20 Strep test kiti ile tür düzeyinde tanımlanan anne sütü kaynaklı laktik asit bakterisi izolatları

Sıra No	İzolat No	API 20 Strep Test kiti ile Tanımlanan Tür	% ID * Tanımlama Yüzdesi	T* Yakınlık	16 S rRNA ile Tanımlanan Tür
1	EK A17-01	<i>E. faecalis</i>	99.1	0.99	<i>E. faecalis</i>
2	EK A17-02	<i>E. faecalis</i>	99.1	0.99	<i>E. faecalis</i>
3	EK A17-03	<i>E. faecalis</i>	99.1	0.99	<i>E. faecalis</i>
4	EK A17-04	<i>E. faecalis</i>	99.1	0.99	<i>E. faecalis</i>
5	EK A17-05	<i>E. faecalis</i>	99.1	0.99	<i>E. faecalis</i>
6	EK A17-06	<i>E. faecalis</i>	99.1	0.99	<i>E. faecalis</i>
7	EK A17-07	<i>E. faecalis</i>	99.1	0.99	<i>E. faecalis</i>
8	EK A17-08	<i>E. faecalis</i>	99.1	0.99	<i>E. faecalis</i>
9	EK A17-09	<i>E. faecalis</i>	99.1	0.99	<i>E. faecalis</i>
10	EK A17-10	<i>E. faecalis</i>	99.1	0.99	<i>E. faecalis</i>
11	EK A21-01	<i>E. faecalis</i>	99.7	1	<i>E. faecalis</i>
12	EK A21-02	<i>E. faecalis</i>	99.1	0.99	<i>E. faecalis</i>
13	EK A21-03	<i>E. faecalis</i>	99.1	0.99	<i>E. faecalis</i>
14	EK A40-01	<i>E. faecalis</i>	99.1	0.99	<i>E. faecalis</i>
15	EK A40-02	<i>E. faecalis</i>	99.1	0.99	<i>E. faecalis</i>
16	EK A40-03	<i>E. faecalis</i>	99.1	0.99	<i>E. faecalis</i>
17	EK A40-04	<i>E. faecalis</i>	99.1	0.99	<i>E. faecalis</i>
18	EK A40-05	<i>E. faecalis</i>	99.1	0.99	<i>E. faecalis</i>
19	EK K19-01	<i>E. faecalis</i>	99.1	0.99	<i>E. faecalis</i>

*Mükemmel Tanımlama : % ID ≥ 99.9 T ≥ 0.75
Çok İyi Tanımlama : % ID ≥ 99.0 T ≥ 0.50
İyi Tanımlama : % ID ≥ 90.0 T ≥ 0.25
Kabul Edilebilir Tanımlama : % ID ≥ 80.0 T ≥ 0

Çizelge 11. (Devam ediyor)

Sıra No	İzolat No	API 20 Strep Test kiti ile Tanımlanan Tür	% ID * Tanımlama Yüzdesi	T* Yakınlık	16 S rRNA ile Tanımlanan Tür
20	EK K19-02	<i>E. faecalis</i>	99.1	0.99	<i>E. faecalis</i>
21	EK K19-03	<i>E. faecalis</i>	99.1	0.99	<i>E. faecalis</i>
22	EK K19-04	<i>E. faecalis</i>	99.1	0.99	<i>E. faecalis</i>
23	EK K19-05	<i>E. faecalis</i>	99.1	0.99	<i>E. faecalis</i>
24	LB A01-01	<i>E. faecium</i>	99.3	0.96	<i>E. faecium</i>
25	LB A07-03	<i>Str. mitis</i>	89.1	0.41	<i>Str. salivarius</i>
26	LB A13-01	<i>E. faecium</i>	99.2	0.98	<i>E. faecium</i>
27	LB A15-01	<i>Leu. lacits</i>	99.5	0.50	<i>Str. salivarius</i>
28	LB A18-02	<i>Str. mitis</i>	82.3	0.58	<i>Str. mitis</i>
29	LB A32-02	<i>Str. salivarius</i>	99.2	0.55	<i>Str. salivarius</i>
30	LB A33-01	<i>Str. salivarius</i>	99.2	0.55	<i>Str. salivarius</i>
31	LB A36-01	<i>Str. salivarius</i>	99.2	0.55	<i>Str. salivarius</i>
32	LB A39-01	<i>E. faecium</i>	99.2	0.98	<i>E. faecium</i>
33	LB K02-03	<i>E. faecium</i>	99.3	0.83	<i>E. faecium</i>
34	LB K04-03	<i>E. faecium</i>	98.2	0.85	<i>E. faecium</i>
35	M17 A21-03	<i>Gamella haemolysans</i>	97.2	0.75	<i>Str. mitis</i>
36	M17 A36-01	<i>Str. salivarius</i>	98.3	0.40	<i>Str. salivarius</i>
37	M17 K04-03	<i>Str. mitis</i>	90.1	0.55	<i>Streptococcus spp.</i>
38	M17 K05-03	<i>Str. mitis</i>	92.6	0.26	<i>Str. mitis</i>
39	M17 K09-02	<i>E. faecium</i>	99.3	0.85	<i>E. faecium</i>
40	M17 K17-01	<i>Str. pneumoniae</i>	95.2	0.79	<i>Str. salivarius</i>

*Mükemmel Tanımlama : % ID ≥ 99.9 T ≥ 0.75
Çok İyi Tanımlama : % ID ≥ 99.0 T ≥ 0.50
İyi Tanımlama : % ID ≥ 90.0 T ≥ 0.25
Kabul Edilebilir Tanımlama : % ID ≥ 80.0 T ≥ 0

Çizelge 12. API 50 CHL test kiti ile tür düzeyinde tanımlanan anne sütü kaynaklı laktik asit bakterisi izolatları

Sıra No	İzolat No	API 50 CHL Test kiti ile Tanımlanan Tür	% ID* Tanımlama Yüzdesi	T* Yakınlık	16 S rRNA ile Tanımlanan Tür
1	LB A01-06	<i>Leu. lactis</i>	94.6	0.87	<i>Str. mitis</i>
2	LB A02-02	<i>Leu. lactis</i>	97.6	0.72	<i>Streptococcus</i> spp.
3	LB A04-06	<i>Leu. lactis</i>	85.1	0.97	<i>Str. peroris</i>
4	LB A06-02	<i>Pediococcus</i> spp.	92.6	0.29	<i>P. acidilactici</i>
5	LB A09-02	<i>Leuconostoc lactis</i>	99.4	0.97	Tanımlanamadı
6	LB A11-02	<i>Lc. lactis</i> spp. <i>lactis</i>	89.7	0.32	<i>E. durans</i>
7	LB A12-03	<i>Leu. lactis</i>	96.4	0.87	<i>Str. mitis</i>
8	LB A14-01	<i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>delbrueckii</i>	96.2	0.59	<i>Lb. gasserii</i>
9	LB A15-02	<i>Leu. lactis</i>	99.4	0.97	Tanımlanamadı
10	LB A34-01	<i>Lb. acidophilus</i>	96.5	0.94	Tanımlanamadı
11	LB A41-02	<i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>delbrueckii</i>	82.3	0.58	<i>Lb. gasserii</i>
12	LB K05-01	<i>Leu. lactis</i>	99.4	0.97	<i>Str. parvasanguinis</i>
13	M17 A11-01	<i>Str. thermophilus</i>	92.5	0.93	<i>Str. salivarius</i>

*Mükemmel Tanımlama : % ID ≥ 99.9 T ≥ 0.75

Çok İyi Tanımlama : % ID ≥ 99.0 T ≥ 0.50

İyi Tanımlama : % ID ≥ 90.0 T ≥ 0.25

Kabul Edilebilir Tanımlama : % ID ≥ 80.0 T ≥ 0

API test kitleriyle fizyolojik ve biyokimyasal olarak tür düzeyinde tanımlanan izolatlara, tanımlama sonuçlarının doğrulanması amacıyla 16S rRNA analizi uygulanmıştır (Bölüm 3.2.2.2). İzolatların 16S rRNA doğrulama test sonuçları Çizelge 11 ve Çizelge 12’de gösterilmiştir. 16S rRNA analizleri sonucunda izolatlardan 23 adedinin *E. faecalis*, 6 adedinin *E. faecium*, 8 adedinin *Str. salivarius*, 5 adedinin *Str. mitis*, 1 adedinin *Str. perois*, 2 adedinin *Lb. gasseri*, 1 adedinin *Str. parasanguinis*, 1 adedinin *E. durans* ve 1 adedinin *P. acidilactici* suşu oldukları belirlenmiş, 5 adet izolat ise 16S rRNA analizi ile tür düzeyinde tanımlanamamıştır.

Bu çalışmada yalnızca API 50 CHL ve API 20 strep test kiti tanımlama yüzdeleri % 90 ve üzerinde bulunan izolatlar dikkate alınmış, API tanımlama yüzdeleri % 90’ın altında bulunan izolatlar çalışma kapsamı dışına alınmışlardır.

API tanımlama yüzdeleri % 90 ve üzerinde bulunan izolatların 16S rRNA dizi analizi sonuçlarıyla karşılaştırması yapıldığında bazı izolatlar için çelişkili tür tanımlamaları olduğu ortaya çıkmıştır. API ve 16S rRNA test sonuçlarının çelişkili olduğu durumlarda 16S rRNA analiz sonuçları esas alınmıştır. Bakteri kromozomunda yer alan yüksek düzeyde korunmuş rRNA (5S, 16 S ve 23 S) operonlarının tanımlama ve sınıflandırma çalışmalarında güvenilir bir şekilde kullanılabileceği bildirilmektedir (Yılmaz ve Temiz, 2003).

API test kiti sonuçları ile 16S rRNA analizleri karşılaştırıldığında, bu iki yöntem arasında yaklaşık % 26 oranında farklı tanımlama sonuçları alındığı görülmüştür. Dimitonova et al. (2008) vajinal salgılardan laktik asit bakterilerinin fenotipik ve moleküler olarak tanımlanması ile ilgi yaptıkları bir çalışmada API 50 CH test kiti ile moleküler tanımlama sonuçları arasında tutarsızlıklar olduğunu bildirmiştir. Laktik asit bakterilerinin API 50 CH test kiti ve kromozomal DNA problemleri ile tanımlanmasının yapıldığı başka bir çalışmada ise moleküler analizler ile tanımlanan 90 adet izolat içersinde sadece 4 adedinin API testi ile uyumlu sonuç verdiği bildirilmiştir (Boyd et al., 2005). İnsan kaynaklı laktobasil türlerinin API kitleri ile tanımlandığı bir çalışmada, test kiti ile *Lb. acidophilus* olarak tanımlanan türlerin çoğunlukla *Lb. crispatus*’a ait olduğu bildirilmiştir (Dimitonova et al., 2008). Chagnaud et al. (2001) API test kiti kullandıkları tanımlama çalışmalarında *Lb.*

salivarius UCC 43321 referans suşunu *Lb. paracasei* olarak belirtmişlerdir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, API tanımla sisteminin veri tabanının güncellenmesi ve yeni türlerin eklenmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Anne sütünde bulunan bakteriler ile ilgili bilgiler sınırlı olmakla beraber, yapılan çalışmalarda anne sütünden izole edilen bakterilerin genellikle stafilocok, streptokok, laktobasil ve enterokok cinsleri olduğu bildirilmektedir (Martin et al., 2004) (Çizelge 13).

Çizelge 13. Sağlıklı annelerin sütlerinden genellikle izole edilen bakteri türleri (Martin et al., 2004)

Bakteri cinsi	Tür
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. epidermidis</i> <i>S. hominis</i> <i>S. capitis</i> <i>S. aureus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Str. salivarius</i> <i>Str. mitis</i> <i>Str. parasanguis</i> <i>Str. peroris</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. gasseri</i> <i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. fermentum</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>

Bu çalışmada tanımlanan laktik asit bakteri izolatları (Çizelge 11 ve 12) ile anne sütünde genel olarak bulunan laktik asit bakterileri arasında genelde bir uyum olduğu görülmektedir. Ancak bu çalışmada, anne sütünden Çizelge 13'deki bakterilerden farklı olarak *E. durans* ve *P. acidilactici* suşları da izole edilmiştir.

Bu çalışmada anne sütünden izole edilen katalaz pozitif bakterilerin annenin göğüs yüzeyinden kontamine olduğu düşünülmektedir. Literatürde de bu yönde benzeri tespitler mevcuttur (Heikillä and Saris 2003; Martín, et al. 2003; Martín, et al. 2004; Martín, et al. 2005; Reviriego et al., 2005).

Tez çalışmasının amacı doğrultusunda gıda teknolojisi açısından önemi olan laktik asit bakterileri 16S rRNA sonuçları göz önüne alınarak seçilmiş ve yalnızca bu izolatlar ileri aşama testlerine alınmıştır. Buna göre de; *E. faecalis* (EK A17-01, EK A17-02, EK A17-03, EK A17-04, EK A17-05, EK A17-06, EK A17-07, EK A17-08, EK A17-09, EK A17-10, EK A21-01, EK A21-02, EK A21-03, EK A40-01, EK A40-02, EK A40-03, EK A40-04, EK A40-05, EK K19-01, EK K19-02, EK K19-03, EK K19-04 ve EK K19-05) , *E. faecium* (LB A01-01, LB A13-01, LB A39-01, LB K02-03, LB K04-03 ve M17 K09-02), *Str. salivarius* (LB A07-03, LB A15-01, LB A32-02, LB A33-01, LB A36-01, M17 A36-01, M17 K17-01 ve M17 A11-01), *Lb. gasseri* (LB A14-01 ve LB A41-02) ve *P. acidilactici* (LB A06-02) türlerinden oluşan toplam 40 adet laktik asit bakteri suşu ileri denemeler için seçilmiş, diğer izolatlar çalışma kapsamı dışında bırakılmıştır (Çizege 11 ve Çizelge 12).

4.2. İzolatların Enzimatik Aktivite Profilleri

Starter ya da probiyotik olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin (LAB) enzimatik profillerinin ortaya konulması, bu bakterilerin gıda teknolojisi ve insan sağlığı açısından yararlarının belirlenmesinde oldukça önemli bir aşama olarak değerlendirilmektedir. LAB'ların peptidaz, proteaz ve esteraz gibi enzimleri, bu bakterilerin kullanılacağı fermente ürünlerde olgunlaşmanın yanı sıra tat, koku ve yapının gelişiminde de etkin bir şekilde rol oynamaktadır (Dewan and Tamang, 2006).

Tez kapsamında anne sütünden izole edilen 40 adet LAB suşunun enzimatik aktiviteleri yarı kantitatif API-ZYM sistemi kullanılarak belirlenmiştir (Çizelge 14). Bu enzim kitinde 19 adet farklı enzim aktivitesi aynı anda belirlenebilmektedir (Alkalın fosfataz, esteraz (C4), esteraz (C8), lipaz (C14), lösin arilamidaz, valin arilamidaz, sistein arilamidaz, tripsin, α -kimotripsin, asit fosfataz, naftol-AS-BI-fosfohidrolaz, α -galaktosidaz, β -galaktosidaz, β -glukoronidaz, α -glukosidaz, β -glukosidaz, N-asetil- β -glukoaminidaz, α -mannosidaz, α -fukosidaz).

Çizelge 14. Anne Sütünden izole edilen laktik asit bakterisi suşlarının API-ZYM sonuçları

API-ZYM enzimleri ^a																				
İzolat No	Suş	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
EK A17-01	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
EK A17-02	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
EK A17-03	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
EK A17-04	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
EK A17-05	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
EK A17-06	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
EK A17-07	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
EK A17-08	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
EK A17-09	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
EK A17-10	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
EK A21-01	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A21-02	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
EK A21-03	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
EK A40-01	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
EK A40-02	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
EK A40-03	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
EK A40-04	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
EK A40-05	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
EK K19-01	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
EK K19-02	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
EK K19-03	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-

Çizelge 14. (Devam ediyor)

API-ZYM enzimleri ^a																				
Izolat No	Suş	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
EK K19-04	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
EK K19-05	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
LB A01-01	<i>E. faecium</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
LB A06-02	<i>P. acidilactici</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
LB A07-03	<i>Str. salivarius</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
LB A13-01	<i>E. faecium</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
LB A14-01	<i>Lb. gasseri</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
LB A15-01	<i>Str. salivarius</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
LB A32-02	<i>Str. salivarius</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
LB A33-01	<i>Str. salivarius</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
LB A36-01	<i>Str. salivarius</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
LB A39-01	<i>E. faecium</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
LB A41-02	<i>Lb. gasseri</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
LB K02-03	<i>E. faecium</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB K04-03	<i>E. faecium</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M17 A11-01	<i>Str. salivarius</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M17 A36-01	<i>Str. salivarius</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
M17 K09-02	<i>E. faecium</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M17 K17-01	<i>Str. salivarius</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

^{a)} 1. Fosfat azot, 2. Esteraz (C4), 3. Esteraz (C8), 4. Lipaz (C14), 5. Lösin arilamidaz, 6. Valin arilamidaz, 7. Sistein arilamidaz, 8. Tripsin, 9. α -kimotripsin, 10. Asit fosfat, 11. Naftol-AS-BI-fosfolizolaz, 12. α -galaktosidaz, 13. β -galaktosidaz, 14. β -glukuronidaz, 15. α -glukosidaz, 16. β -glukosidaz, 17. N-asetil- β -glukoaminidaz, 18. α -mannosidaz, 19. α -fukosidaz.

Suşların hiçbirinde tripsin, α -mannosidaz, lipaz (C14) ve α -fukosidaz aktivitesine rastlanmamıştır. β -glukoronidaz aktivitesi ise sadece *Lb. gasseri* olarak tanımlanmış suşlarda görülmüştür. Delgado et al. (2007) yaptıkları çalışmada insan mide-bağırsak kanalından izole edilen *Lb. gasseri* suşunda β -glukorinidaz, lösin arilamidaz ve Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz aktivitesi tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar çalışmamızda izole edilen *Lb. gasseri* suşlarının enzim profili ile uyum göstermektedir.

E. faecalis olarak tanımlanan suşların tümünde lösin arilamidaz aktivitesi görülürken; esteraz (C4), esteraz (C8) ve asit fosfataz aktivitesi *E. faecalis* EK K19-03 suşu dışındaki tüm izolatlarda, β -glukosidaz, aktivitesi ise *E. faecalis* EK A21-01 suşu dışındaki tüm izolatlarda gözlemlenmiştir. *E. faecalis* olarak tanımlanan 23 adet suş diğer enzim aktiviteleri bakımından incelendiğinde; 6 adet suş valin arilamidaz, 19 adet suş sistein arilamidaz, 17 adet suş α -kimotripsin, 19 adet suş Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz, 1 adet suş β -galaktosidaz, 12 adet suş α -glukosidaz ve 1 adet suş N-asetil- β -glukoaminidaz aktivitesi açısından pozitif bulunmuştur. *E. faecalis* izolatlarının hiç birinde α -galaktosidaz aktivitesi görülmemiştir.

E. faecium olarak tanımlanan suşların tümünde esteraz (C4) ve esteraz (C8) aktivitesi gözlemlenmiştir. Ayrıca *E. faecium* olarak tanımlanan 6 adet suştan 3 adedi lösin arilamidaz, 1 adedi Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz, 1 adedi α -galaktosidaz, 3 adedi β -glukosidaz ve 2 adedi ise N-asetil- β -glukoaminidaz aktivitesi bakımından pozitif bulunurken; bu izolatların hiç birinde fosfataz alkalın, lipaz (C14), valin arilamidaz, sistein arilamidaz, tripsin, α -kimotripsin, asit fosfataz, β -glukoronidaz, α -glukosidaz, α -mannosidaz ve α -fukosidaz aktivitesine rastlanmamıştır.

Belgacem et al. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada fermente et ürünlerinden izole edilen enterokok suşlarının geniş bir enzim spektrumu bulunduğu, suşların düşük proteinaz (tripsin ve kimotripsin) ve yüksek peptidaz (lösin aminopeptidaz) akitivitesine sahip oldukları belirlenmiş ve bu özelliğin fermente süt ürünleri gibi bazı gıdaların olgunlaştırılmasında ve tipik aromalarının oluşumunda arzu edilen bir kalite kriteri olduğu belirtilmiştir.

Lb. gasseri olarak tanımlanan 2 adet suş lösin arilamidaz, valin arilamidaz, Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz, β -glukoronidaz, β -glukosidaz ve N-asetil- β -glukoaminidaz aktivitesi pozitif olarak bulunurken diğer enzim aktivitelere rastlanılmamıştır.

P. acidilactici olarak tanımlanan suş ise lösin arilamidaz, valin arilamidaz ve Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz aktivitesi açısından pozitif bulunmuştur.

Str. salivarius olarak tanımlanan 8 adet suşun tümünde fosfataz alkalın, lösin arilamidaz ve asit fosfataz aktivitesi görülürken; bu suşların hiçbirinde lipaz (C14), tripsin, β -glukoronidaz, β -glukosidaz, α -mannosidaz ve α -fukosidaz aktivitesine rastlanmamıştır. Diğer enzimler açısından ise 2 adet suş esteraz (C4) ve esteraz (C8), 4 adet suş valin arilamidaz, 1 adet suş sistein arilamidaz, 7 adet suş Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz aktivitesi açısından pozitif bulunmuştur.

API-ZYM test kiti ile suşların enzim profilinin ortaya konması potansiyel starter kültürlerin seçilmesinde faydalı olabilmektedir (Ling et al., 1994; Trojanova and Rada, 2005). Lipolitik aktiviteye sahip kültürlerin peynir veya fermente süt ürünlerinde starter veya yardımcı kültür olarak kullanılması bu ürünlerde aroma oluşumunda önemli bir rol almaktadır. β -galaktosidaz aktivitesi bulunan izolatlar ise laktoz intolerans gösteren bireyler açısından ilgi çekmektedir (De Vrese et al., 2001; Mathara et al., 2004; Cebrian et al., 2012).

Asit fosfataz aktivitesinin vücutta kalsiyum ve fosfor absorpsiyonunun artırılmasında önemli rol oynadığı rapor edilmiştir. Yüksek fosfataz aktivitesi gösteren suşlar fermente süt ürünlerinde fitik asit degradasyonu amacıyla kullanılabilir. Ayrıca bu enzimler tahıl ürünlerindeki fitat molekülünün parçalanmasında rol alarak minerallerin kullanılabilirliğini arttırmaktadır (Cebrian et al., 2012).

İzolatların proteinaz aktivitesi göstermemesi (tripsin, kimotripsin), lösin arilamidaz ve sistein arilamidaz gibi peptidaz aktivitesine sahip olması ve esteraz (C4, C8) aktivitesi göstermesi, bu izolatların kullanılacakları üründe istenen tipik aroma ve istenen özelliklerin oluşumuna katkı sağlamaktadır (Thapa et al., 2006; Dewan and Tamang, 2007). *Str. salivarius* ve *E. faecium* suşlarında belirlenen β -galaktosidaz

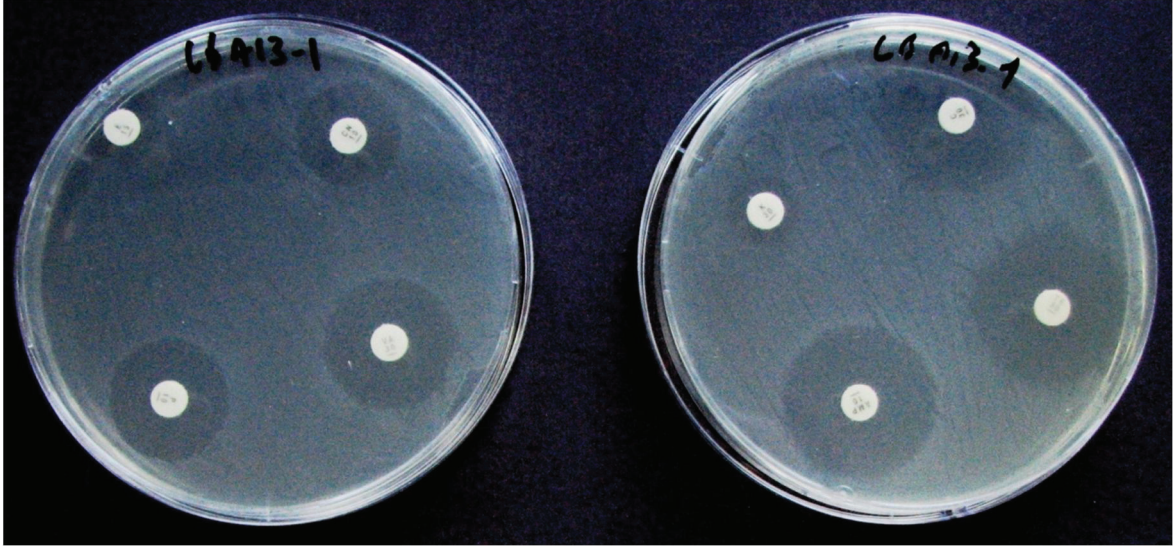
aktivitesi ise yoğurt kültürleri için karakteristik bir enzimdir (Trojanova and Rada, 2005).

Probiyotik olarak kullanılacak kültürlerde prosesin gereğine göre bazı durumlarda yüksek probiyotik bakteri sayısı ve düşük enzimatik aktivite istenebilmektedir (Trojanova and Rada, 2005). Yapılan bir çalışmada suşların API-ZYM kullanılarak belirlenen enzimatik aktiviteleri ile bu suşların doğal ortamda belirlenen enzimatik aktiviteleri arasında bir eşleşme olmadığı, API-ZYM testinin sadece potansiyel enzimatik aktivite hakkında bilgi verdiği bildirilmektedir (Mudryk and Podgórska, 2006). Bu nedenle izolatların belirlenen enzimatik aktivitelerin ürün denemeleri ile doğrulanması gerekmektedir.

Esteraz ve lipaz aktivitesi, yağları yağ asitlerine ve gliserole dönüştürmesi nedeniyle bebeklerin ve yaşlıların diyetlerinde yararlı olabilmektedir. Ayrıca bu enzimlerin hiperkolesterol gibi metabolik hastalıkların tedavisinde de rol alabileceği vurgulanmaktadır (Huang and Zheng, 2009; Cebrian et al., 2012). β -glukoronidaz, β -glukosidaz ve N-asetil- β -glukoaminidaz enzimlerinin bağırsak hastalıklarıyla ilişkili olmaları nedeni ile bu enzimlerin kolon üzerine zararlı olabileceği belirtilmektedir (Delgado et al., 2007). β -glukoronidaz enzimi kolona ulaşan safra glukuronidlerini hidrolize etmesi açısından önemlidir. Bu glukuronidlerin çoğu karaciğerde oluşan detoksifiye edilmiş ürünlerdir ve bunların hidrolize edilmesi ile yapılarındaki toksin serbest hale geçebilmekte ve bağırsak tarafından emilebilmektedir. Kolondaki mikrobiyel β -glukoronidaz aktivitesi kolon kanseri riskini arttırabilmektedir (Malini et al., 1998; Wollowski et al., 2001).

4.3. Suşların Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi

Çalışılan laktik asit bakteri suşlarının antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç (Şekil 2) ve duyarlılık özellikleri Çizelge 15’de topluca gösterilmiştir.



Şekil 2. Disk difüzyon yöntemi ile izolatların antibiyotik duyarlılıkları (örnek: *E. faecium* LB A13-01)

Çalışmamızda, antibiyotik dirençlilik testinin sonucunda, suşların test edilen antibiyotiklere karşı genellikle duyarlı oldukları belirlenmiştir. Literatürde laktik asit bakterilerinin özellikle kloramfenikol, ampisilin, gentamisin, vankomisin ve penisiline karşı duyarlılığın daha yüksek olduğu vurgulanmaktadır (Zhou et al., 2005; Ammor et al., 2007b).

Tez kapsamında izole edilen bazı enterokok suşlarının yüksek düzeyde kanamisin (% 65.5), tetrasiklin (% 17.2) ve eritromisin (% 10.3) direnci gösterdikleri belirlenmiştir. Buna ek olarak izole edilen bazı enterokok suşlarının orta düzeyde kanamisin (% 41.4) ve eritromisin'e (% 37.9) dirençli oldukları tespit edilmiştir.

Lb. gasseri suşlarında yüksek düzeyde gentamisin (% 100) ve orta düzeyde kanamisin (% 50) direnci tespit edilmiştir. *P. acidilactici* suşunda ise orta düzeyde kloramfenikol ve tetrasiklin direnci görülürken, yüksek düzeyde vankomisin direnci tespit edilmiştir.

Bazı *Str. salivarius* suşlarında yüksek düzeyde kanamisin (% 25), tetrasiklin (%12.5), gentamisin (%12.5), eritromisin (%12.5) ve vankomisin (%12.5) direnci tespit edilmiştir. *Str. salivarius* suşlarında ayrıca orta düzeyde tetrasiklin (%25) ve eritromisin (%50) direnci gözlemlenmiştir.

Çizelge 15. Laktik asit bakterisi suşlarının çeşitli antibiyotiklere karşı dirençlilik durumları

İzolat No	Tür	Kloramfenikol (30 µg)	Kanamisin (30 µg)	Tetrasiklin (30 µg)	Ampisilin (10 µg)	Gentamisin (10 µg)	Vankomisin (30 µg)	Penisilin G (10 µg)	Eritromisin (15 µg)
EK A17-01	<i>E. faecalis</i>	S ^a	I ^b	S	S	S	S	S	S
EK A17-02	<i>E. faecalis</i>	S	I	S	S	S	S	S	I
EK A17-03	<i>E. faecalis</i>	S	I	S	S	S	S	S	S
EK A17-04	<i>E. faecalis</i>	S	I	S	S	S	S	S	S
EK A17-05	<i>E. faecalis</i>	S	R ^c	S	S	S	S	S	S
EK A17-06	<i>E. faecalis</i>	S	I	S	S	S	S	S	S
EK A17-07	<i>E. faecalis</i>	S	I	S	S	S	S	S	S
EK A17-08	<i>E. faecalis</i>	S	I	S	S	S	S	S	S
EK A17-09	<i>E. faecalis</i>	S	I	S	S	S	S	S	R
EK A17-10	<i>E. faecalis</i>	S	R	S	S	S	S	S	I
EK A21-01	<i>E. faecalis</i>	S	R	S	S	S	S	S	S
EK A21-02	<i>E. faecalis</i>	S	R	S	S	S	S	S	S
EK A21-03	<i>E. faecalis</i>	S	R	S	S	S	S	S	I
EK A40-01	<i>E. faecalis</i>	S	R	R	S	S	S	S	S
EK A40-02	<i>E. faecalis</i>	S	I	R	S	S	S	S	S
EK A40-03	<i>E. faecalis</i>	S	R	R	S	S	S	S	S
EK A40-04	<i>E. faecalis</i>	S	R	R	S	S	S	S	S
EK A40-05	<i>E. faecalis</i>	S	I	R	S	S	S	S	S
EK K19-01	<i>E. faecalis</i>	S	R	S	S	S	S	S	I
EK K19-02	<i>E. faecalis</i>	S	R	S	S	S	S	S	I
EK K19-03	<i>E. faecalis</i>	S	R	S	S	S	S	S	S
EK K19-04	<i>E. faecalis</i>	S	R	S	S	S	S	S	I
EK K19-05	<i>E. faecalis</i>	S	R	S	S	S	S	S	I

Çizelge 15. (Devam ediyor)

İzolat No	Tür	Kloramfenikol (30 µg)	Kanamisin (30 µg)	Tetrasiklin (30 µg)	Ampisilin (10 µg)	Gentamisin (10 µg)	Vankomisin (30 µg)	Penisilin G (10 µg)	Eritromisin (15 µg)
LB A01-01	<i>E. faecium</i>	S	R	S	S	S	S	S	I
LB A06-02	<i>P. acidilactici</i>	S	I	I	S	S	R	S	S
LB A07-03	<i>Str. salivarius</i>	S	S	S	S	S	R	S	S
LB A13-01	<i>E. faecium</i>	S	I	S	S	S	S	S	I
LB A14-01	<i>Lb. gasseri</i>	S	I	S	S	R	S	S	S
LB A15-01	<i>Str. salivarius</i>	S	R	S	S	S	S	S	I
LB A32-02	<i>Str. salivarius</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
LB A33-01	<i>Str. salivarius</i>	S	S	I	S	S	S	S	R
LB A36-01	<i>Str. salivarius</i>	S	S	S	S	S	S	S	I
LB A39-01	<i>E. faecium</i>	S	R	S	S	S	S	S	R
LB A41-02	<i>Lb. gasseri</i>	S	S	S	S	R	S	S	S
LB K02-03	<i>E. faecium</i>	S	I	R	R	S	S	R	R
LB K04-03	<i>E. faecium</i>	S	R	S	S	S	S	S	I
M17 A11-01	<i>Str. salivarius</i>	S	R	R	S	S	S	S	S
M17 A36-01	<i>Str. salivarius</i>	S	S	S	S	S	S	S	I
M17 K09-02	<i>E. faecium</i>	S	R	S	S	S	S	S	I
M17 K17-01	<i>Str. salivarius</i>	S	S	I	S	R	S	S	I

a,b,c ; R: dirençli, I: orta, S: duyarlı

Çalışılan anne sütü kaynaklı laktik asit bakteri suşlarında ayrıca çoklu antibiyotik direnci olduğu da ortaya çıkmıştır. Anne sütü izolatlarında çoklu yüksek antibiyotik direnci görünen 3 adet *E. faecalis* suşunun tetrasiklin ve kanamisine, 1 adet *E. faecium* suşunun ise kanamisin ve eritromisine, 1 adet *E. faecium* suşunun tetrasiklin, ampisilin, penisilin ve eritromisine ve 1 adet *Str. salivarius* suşunun kanamisin ve tetrasikline direnç gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca 40 adet suşun 22 adedinde 2 farklı ve 1 adedinde ise 4 farklı antibiyotiğe karşı orta veya yüksek düzeyde direnç olduğu tespit edilmiştir.

E. faecalis ve *E. faecium* türleri penisilin, tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, gentamisin ve vankomisin'den bir veya birkaçına karşı dirençli olabilmektedirler (Çıtak et al., 2004). Temmerman et al. (2003) probiyotik ürünlerden izole edilen 29 adet *E. faecium* suşunun kanamisin (% 90), tetrasiklin (% 24), penisilin G (% 41), eritromisin (% 97), kloramfenikol (% 34) ve vankomisin'e (% 38) dirençli olduğunu belirterek probiyotik suşların seçiminde aktarılabılır antibiyotik direnç özelliği yönünden güvenilirliğin kontrol edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır. Çıtak et al. (2004) yaptıkları çalışmada peynirden izole edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının eritromisin, vankomisin ve kloramfenikol'e karşı dirençli, gentamisin ve ampisiline karşı ise duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Peters et al. (2003) et ve süt ürünlerinden izole ettiği 101 adet *E. faecalis* suşu ile yaptıkları bir çalışmada suşların tümünün ampisilin, penisilin ve vankomisin'e duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada bu suşların %74'ünün eritromisin'e karşı orta ve yüksek derecede ve % 38'inin tetrasiklin'e karşı yüksek derecede dirence sahip olduklarını bildirilmiştir. İncelenen enterokok suşlarının %43'ünde kloramfenikol direncine rastlanmıştır. Bu tez kapsamında ise, söz konusu çalışmadan elde edilen sonuçlardan farklı olarak, incelenen tüm *E. faecalis* suşlarının kloramfenikol'e duyarlı olduğu gözlemlenmiştir.

Pediokokların antibiyotik duyarlılıkları üzerine literatürde yeterince veri bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda pediokokların penisilin, gentamisin, eritromisin ve kloramfenikol'e genel olarak duyarlı; vankomisin kanamisin ve tetrasiklin'e ise genel olarak daha dirençli oldukları bildirilmiştir (Temmerman et al., 2003, Ammor et al., 2007b; Danielsen et al., 2007). *Str. salivarius* suşları genel

olarak kloramfenikol, tetrasiklin ve eritromisin'e karşı duyarlı olmakla beraber gentamisin ve kanamisin'e karşı dirençlidir. Penisilin ve ampisiline karşı direnç özellikleri ise değişken olabilmektedir (Temmerman et al., 2003; Aslim and Beyatlı, 2004; Ammor et al., 2007b). Aslim and Beyatlı (2004) yoğurttan izole ettikleri *Str. thermophilus* suşlarının gentamisin ve penisiline dirençli, kloramfenikol ve tetrasiklin'e duyarlı olduklarını tespit etmişlerdir.

Laktobasiller genel olarak penisilin, kloramfenikol, eritromisin ve tetrasiklin'e karşı duyarlı iken, vankomisin, kanamisin ve gentamisin'e karşı ise dirençlidir (Zhou et al., 2005; Ammor et al., 2007b). Zhou et al. (2005) *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum* ve *Lb. lactis* ile yaptıkları çalışmada bu suşların eritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol, penisilin ve ampisilin'e karşı duyarlı, gentamisin ve kanamisine karşı ise dirençli bulmuşlardır. Çalışılan tüm *Lb. plantarum* suşlarının vankomisine karşı dirençli olduklarını tespit etmişlerdir. Pan et al. (2011) 11 farklı fermente Çin gıdasından izole ettikleri laktik asit bakterileri ile yaptıkları çalışma sonucunda, bu suşların tetrasiklin ve ampisilin'e duyarlı, eritromisin ve kanamisin'e ise dirençli olduklarını belirtmişlerdir.

Bu çalışmada tanımlanan laktik asit bakterilerinin en dirençli olduğu antibiyotiğin kanamisin olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuca paralel olarak, Herreros et al. (2005) peynirden izole ettiği 18 adet laktik asit bakterisi ile yaptıkları bir çalışmada, bu bakterilerin en dirençli olduğu antibiyotiğin kanamisin olduğunu belirtmişlerdir.

Antibiyotiklerin klinik olarak kullanımının giderek yaygınlaşması bunlara karşı dirençli suşların oluşumuna yol açmaktadır (Mathur and Singh, 2005; Ammor et al., 2007b; Pan et al., 2011). Fermente ve probiyotik ürünlerde laktik asit bakterilerinin kullanılması bu bakterilerin yüksek oranda vücuda alınmasına ve bu bakterilerin kolon florası ile etkileşime girmesine yol açar. Yapılan çalışmalar kısıtlı olmasına rağmen bağırsak florasında patojen bakterilere antibiyotik direnç genlerinin transferinin mümkün olabileceği bildirilmektedir (Mathur and Singh, 2005). Laktik asit bakterilerinin güvenliği açısından bu bakterilerde fenotipik olarak tespit edilen antibiyotik direnç mekanizmalarının moleküler düzeyde açıklığa kavuşturulması gerekmektedir. Transfer edilebilir antibiyotik direnç genlerinin

varlığının belirlenmesi laktik asit bakterilerin gıdalarda ya da yemlerde kullanımından önce belirlenmesi gereken önemli fizyolojik ve teknolojik özelliklerinden birisidir (Ammor et al., 2007b). Bu açıdan bakıldığında çalışmamızda tanımlanan laktik asit bakteri suşlarının transfer edilebilir antibiyotik direnç genleri varlığının araştırılması gereği ortaya çıkmaktadır.

4.4. İzolatların Biyojen Amin Oluşturma Özellikleri

Bu aşamada, seçilen laktik asit bakteri izolatlarının ortamda bulunan tirozin, histidin, ornitin ve lizin gibi serbest aminoasitlerden biyojen amin (tiramin, histamin, putresin ve kadaverin) oluşturma potansiyelleri test edilmiştir.

Çalışmamızda elde edilen bulgular toplu olarak değerlendirildiğinde çalışılan laktik asit bakteri suşlarının hiçbirisinin histidin'i dekarboksilize edemediği, buna karşılık yüksek oranda tirozin dekarboksilasyonu gösterdikleri belirlenmiştir. *E. faecalis* suşlarının tümünün tirozini dekarboksilize ettiği; ornitin, lizin ve histidin'i ise dekarboksilize edemedikleri tespit edilmiştir. *Lb. gasseri* ve *P. acidilactici* suşlarının hiçbir amino asiti dekarboksilize edemediği gözlemlenmiştir. *Str. salivarius* LB A07-03, *Str. salivarius* LB A15-01, *Str. salivarius* M17 A11-01, *E. faecium* LB A01-01, *E. faecium* LB A13-01, *E. faecium* LB A39-01, *E. faecium* LB K04-03 ve *E. faecium* LB K09-02, suşlarının tirozini hidrolize edebildikleri tespit edilmiştir. *Str. salivarius* suşlarının tümünde histidin dekarboksilizasyon özelliği bulunmazken, sadece *Str. salivarius* LB A07-03 suşunun ornitin, tirozin ve lizini dekarboksilize edebildiği tespit edilmiştir (Çizelge 16).

Çizelge 16. Laktik asit bakteri suşlarının dekarboksilaz aktiviteleri

İzolat No	Tür	Ornitin	Tirozin	Lizin	Histidin
EK A17-01	<i>E. faecalis</i>	- ^a	+ ^b	-	-
EK A17-02	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-
EK A17-03	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-
EK A17-04	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-
EK A17-05	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-
EK A17-06	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-
EK A17-07	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-
EK A17-08	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-
EK A17-09	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-

Çizelge 16. (Devam ediyor)

İzolat No	Tür	Ornitin	Tirozin	Lizin	Histidin
EK A17-10	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-
EK A21-01	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-
EK A21-02	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-
EK A21-03	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-
EK A40-01	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-
EK A40-02	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-
EK A40-03	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-
EK A40-04	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-
EK A40-05	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-
EK K19-01	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-
EK K19-02	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-
EK K19-03	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-
EK K19-04	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-
EK K19-05	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-
LB A01-01	<i>E. faecium</i>	-	+	-	-
LB A06-02	<i>P. acidilactici</i>	-	-	-	-
LB A07-03	<i>Str. salivarius</i>	+	+	+	-
LB A13-01	<i>E. faecium</i>	-	+	-	-
LB A14-01	<i>Lb. gasseri</i>	-	-	-	-
LB A15-01	<i>Str. salivarius</i>	-	+	-	-
LB A32-02	<i>Str. salivarius</i>	-	-	-	-
LB A33-01	<i>Str. salivarius</i>	-	-	-	-
LB A36-01	<i>Str. salivarius</i>	-	-	-	-
LB A39-01	<i>E. faecium</i>	-	+	-	-
LB A41-02	<i>Lb. gasseri</i>	-	-	-	-
LB K02-03	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-
LB K04-03	<i>E. faecium</i>	-	+	-	-
M17 A11-01	<i>Str. salivarius</i>	-	+	-	-
M17 A36-01	<i>Str. salivarius</i>	-	-	-	-
M17 K09-02	<i>E. faecium</i>	-	+	-	-
M17 K17-01	<i>Str. salivarius</i>	-	-	-	-

^a dekarboksilaz aktivitesi yok.

^b dekarboksilaz aktivitesi var.

Straub et al. (1995) streptokok ve pediokoklarda aminoasit dekarboksilaz aktivitesine çok sık rastlanılmadığını bildirmiştir. Çalışmamızda bu sonuca benzer olarak *P. acidilactici* suşunda amino asit dekarboksilaz aktivitesi bulunmazken, *Str. salivarius* suşlarında düşük düzeyde aminoasit dekarboksilaz aktivitesi görülmüştür.

Bover-Cid et al. (2001) fermente domuz sosisinden izole ettiği 66 laktik asit bakterisinden 21 adet laktobasil ve 16 adet enterokok'un biyojen amin ürettiğini bildirmiştir. Tiramin başlıca oluşan biyojen amin olmakla beraber putresin ve kadaverin oluşumu da gözlemlenmiştir. Araştırmacılar izole ettikleri laktobasillerin % 42'sinde tiramin oluşumu belirlemişlerdir. Putresin ve kadaverin oluşumu ise sadece *Lb. brevis* (sırasıyla % 33 ve % 33 oranlarında) ve *Lb. curvatus* suşlarında (sırasıyla % 25 ve %17 oranlarında) gözlemlenmiştir. Araştırmada izole edilen enterokok suşlarının tamamında tiramin oluşumuna rastlanırken, diğeri biyojen amin oluşumları tespit edilmemiştir. Çalışmamızda elde edilen bulguların bu sonuçlarla uyum içerisinde olduğu görölmektedir.

Enterokoklar arasında genel olarak tiramin oluşumu yaygın olarak görölmektedir (Suzzi and Gardini, 2003; Munoz-Atienza et al., 2011). Leuschner et al. (1999) *E. faecalis* LTH 4159 suşu ile yaptıkları peynir üretim çalışmalarında depolamanın 6. haftası sonunda peynirlerde putresin ve histidin oluşumu belirlemezken, 170 mg/kg konsantrasyonunda tiramin oluşumu tespit etmişlerdir. Bu sonuç çalışmamızda izole edilen *E. faecalis* suşlarının biyojen amin oluşturma sonuçları ile uyum göstermektedir. Bover-Cid and Holzapfel (1999) *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp. ve *Streptococcus* spp. ile yaptıkları bir çalışmada enterokokların tümünde, diğeri bakterilerin ise %38.9'unda tiramin oluşumu belirlemişlerdir. Putresin, kadaverin ve histamin oluşumu ise daha düşük oranda tespit edilmiştir. Histamin oluşumu *Lb. acidophilus* (% 20) ve *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus* (% 50), putresin oluşumu *Lb. brevis* (% 25) ve *Lb. curvatus* (% 20), kadaverin oluşumu ise *Lb. brevis* (% 25) ve *Lb. curvatus* (% 13) suşlarında belirlenmiştir.

Durlu-Ozkaya et al. (2001) yaptıkları çalışmada çiğ koyun sütünden üretilmiş beyaz peynirlerden izole edilen tüm enterokok suşlarının tirozin amino asidini dekarboksile ettiğini ve tiraminin serbest aminoasit varlığında *E. faecalis* ve *E. faecium* tarafından sütte üretilen tek biyojen amin olduğunu vurgulamışlardır.

Çalışmamızda izole edilen *P. acidilactici* ve *Lb. gasseri* suşlarının biyojen amin oluşturma özellikleri Garai et al. (2007) yaptıkları çalışma sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Bu araştırmacıların çalışmasında *P. parvulus*, *Lb. plantarum* ve *Lb. suebicus* izolatlarının histamin, tiramin ve putresin oluşturmadağı belirtilmiştir.

Yapılan alışmalarda *Str. salivarius* spp. *thermophilus*, *Lc. lactis* ve *Lb. plantarum* gibi bazı laktik asit bakterilerinin tiramin oluşturduğu bildirilmiştir (Kuley et al., 2011). Çalışmamızda tanımlanan 8 adet *Str. salivarius* suşundan sadece 3 adedinde tiramin oluşumu belirlenmiştir.

İnsan ve hayvanların biyolojik fonksiyonlarında önemli görevleri sahip olan biyojen aminler, bunları içeren gıdaların fazla tuketilmesiyle sağlık problemlerine neden olabilmektedirler (olak ve Aksu, 2002; EFSA, 2011). Gıdalarda biyojen amin oluşumu gıda işleme ve depolama sırasında bakteriyel aktivite sonucunda olmaktadır. Yüksek miktarda biyojen amin içeren gıdalar daha iyi hijyen ve kontrollere ihtiyaı ortaya koyarken, bu gıdaların tuketimi gıda intoksikasyonlarına yol açabilmektedir (olak ve Aksu, 2002). Laktik asit bakterileri hızlı üremesi ve asit oluşturması ile bulundukları ortamdaki amin üreten doğal mikrofloranın gelişimini engelleyerek amin oluşumunu azaltabilmektedir. Ayrıca amin oksidaz aktivitesine sahip kültürlerin kullanımı ortamda oluşan amin miktarının azaltılması için bir alternatif olabilmektedir (Ammor and Mayo, 2007a).

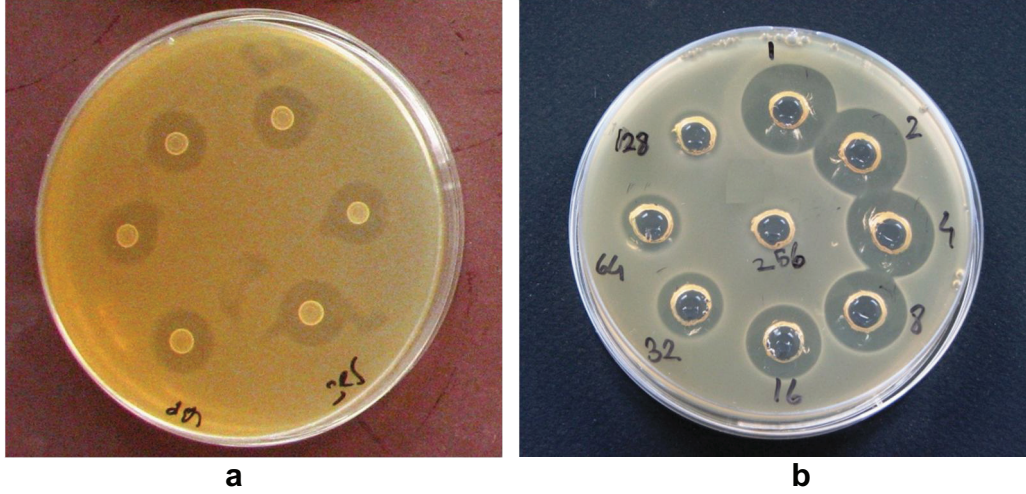
Tüm bu özellikler dikkate alındığında starter ya da probiyotik kültür olarak kullanılacak laktik asit bakterilerinin biyojen amin oluşturma özelliklerinin incelenmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızda incelenen laktik asit bakteri suşlarının hiçbirisinin histidin'i dekarboksilize edemediği belirlenmiştir. Laktik asit bakteri suşlarında genel olarak tirozin dekarboksilizasyon aktivitesi tespit edilirken, *Str. salivarius* LB A07-03 suşu haricinde hiçbir suşun lizin ve ornitin dekarboksilizasyon aktivitesine sahip olmadığı belirlenmiştir.

4.5. İzolatların Antimikrobiyel Aktivite zellikleri

İzolatların antimikrobiyel aktivite zellikleri Bölüm 3.2.6'da anlatıldığı şekilde agar damlatma ve agar difüzyon yöntemiyle ayrı ayrı test edilmiştir. Laktik asit bakteri izolatlarının antimikrobiyel aktivitelerinin belirlenmesinde *Enterococcus faecium* M74, *E. faecalis* NCIMB 700584, *E. faecalis* ATCC 292112, *E. faecalis* H1, *E. faecalis* S01-05, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lb. plantarum*, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *L. monocytogenes* H1, *L. monocytogenes* H2, *L. innocua*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538,

Escherichia coli ATCC 35211 ve *Salmonella Typhimurium* ATCC 19302 suşları kontrol bakteri suşları olarak kullanılmıştır (Bölüm 3.1.2).

Agar damlatma ve agar difüzyon yönteminden elde edilen inhibisyon zonu sonuçlarına Şekil 3’de bir örnek verilmiştir.



Şekil 3. Suşların antibakteriyel etkinliği (a. agar damlatma yöntemi, b. agar difüzyon yöntemi)

Agar damlatma yönteminden elde edilen test sonuçları Çizelge 17’de, agar difüzyon yönteminden elde edilen test sonuçları ise Çizelge 18’de ayrı ayrı verilmiştir.

Agar damlatma testi sonuçlarına göre; antimikrobiyel aktivitesi test edilen laktik asit bakteri suşlarının büyük çoğunluğu *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 35211, *S. aureus* ATCC 25923, *L. inocua*, *E. faecalis* NCIMB 700584, *E. faecalis* ATCC 292112, *E. faecium* M74 ve *Sal. Typhimurium* ATCC 19302 kontrol suşlarına karşı antimikrobiyel etkili bulunmuştur. *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. monocytogenes* H1 ve *L. monocytogenes* H2 kontrol suşlarının ise antimikrobiyel aktivitesi test edilen tüm laktik asit bakterisi suşlarına karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Bunlara karşılık, *Lb. acidophilus* ATCC 4356, *Lb. plantarum* ve *E. faecium* S1-5 kontrol suşları antimikrobiyel aktivitesi test edilen laktik asit bakterilerinin büyük çoğunluğa karşı dirençli bulunmuştur.

Çizelge 17. Agar damlatma tekniğine göre laktik asit bakterleri suşlarının antibakteriyel etkinliği^a

Test Suşları	Test edilen kontrol suşları ^b ve inhibisyon zon çapları (mm)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
EK A17-01	- ^c	-	1.96±0.78	4.36±0.89	-	6.16±1.48	4.20±0.60	4.12±1.70	5.42±1.02	-	-	-	-	-	-
EK A17-02	-	-	2.06±0.26	7.72±0.56	5.42±2.02	9.36±2.06	7.76±3.60	2.10±0.67	5.26±0.65	4.06±0.47	3.30±1.32	-	-	-	-
EK A17-03	-	-	4.80±0.95	8.00±2.39	7.06±0.66	8.84±3.46	7.02±1.95	2.20±1.92	5.60±1.20	2.92±0.20	-	-	-	-	6.16±2.75
EK A17-04	-	-	2.98±0.78	3.56±0.62	-	6.22±1.26	3.22±0.45	3.16±1.45	4.40±1.30	-	-	-	-	-	-
EK A17-05	2.60±0.15	-	3.80±2.82	2.66±0.81	-	7.26±2.21	5.14±1.74	3.26±0.58	5.70±0.92	-	-	-	-	-	5.98±1.48
EK A17-06	-	-	4.24±0.60	5.52±0.59	6.40±3.02	4.36±1.05	4.66±3.18	3.12±0.56	3.36±0.66	4.54±0.66	3.70±1.64	-	-	-	-
EK A17-07	-	4.16±1.76	2.08±1.01	5.72±0.70	5.66±1.86	6.26±2.42	5.06±1.38	6.84±1.76	8.80±3.20	3.86±0.88	4.56±0.96	-	-	-	9.36±3.04
EK A17-08	-	3.10±1.10	4.22±1.39	4.66±0.80	4.46±1.56	5.26±2.13	3.90±1.28	6.52±1.46	6.82±3.04	3.32±1.42	4.16±0.94	-	-	-	6.30±2.02
EK A17-09	-	-	2.26±0.58	3.30±0.62	-	5.16±1.27	5.22±0.96	3.18±1.46	6.40±1.19	-	-	-	-	-	-
EK A17-10	5.52±1.26	-	4.72±2.46	4.06±0.56	4.84±0.66	7.26±0.34	7.86±2.16	-	5.06±1.76	4.20±0.54	5.02±2.96	3.42±0.96	-	-	9.46±3.64
EK A21-01	3.56±0.73	-	3.82±0.90	6.96±0.68	8.36±0.42	10.32±2.62	9.42±1.40	7.36±0.86	10.32±1.50	6.00±0.50	7.16±1.78	-	-	-	9.86±0.48
EK A21-02	4.46±1.40	-	-	5.34±1.16	7.36±0.76	6.46±1.80	4.16±2.04	5.30±0.20	5.40±1.90	3.56±0.68	-	-	-	-	6.68±1.64
EK A21-03	-	-	3.76±0.70	3.30±1.32	-	7.56±0.60	4.76±0.81	3.80±1.42	4.46±1.22	-	3.30±0.60	-	-	-	6.26±0.81
EK A40-01	5.66±0.68	-	1.76±0.40	6.08±1.38	4.06±0.44	9.96±2.37	6.08±3.02	3.22±1.93	7.06±2.12	5.52±0.80	-	-	-	-	3.36±1.13
EK A40-02	3.81±1.18	-	4.22±1.36	2.93±0.53	5.16±0.82	5.94±1.18	4.22±1.10	4.40±1.14	5.42±1.11	2.12±0.64	-	-	-	-	6.84±1.16
EK A40-03	3.02±0.46	3.48±0.24	9.76±2.28	7.76±0.82	5.74±0.61	8.32±1.90	5.60±1.71	4.46±1.24	4.40±0.68	2.90±1.02	5.10±1.50	3.16±1.34	-	-	7.10±1.80
EK A40-04	4.16±0.68	-	2.42±0.36	9.30±2.57	3.26±0.62	6.58±2.16	5.32±3.11	-	3.04±0.78	4.54±0.86	5.60±1.92	-	-	-	3.30±0.96
EK A40-05	3.36±1.03	-	3.88±1.56	3.96±1.02	4.12±0.72	5.72±1.08	4.30±1.08	4.10±1.04	5.20±0.83	1.98±0.66	-	-	-	-	7.82±1.29
EK K19-01	-	-	3.06±0.30	5.80±0.96	4.92±0.97	11.30±2.43	6.44±0.54	5.12±0.53	10.20±2.20	5.14±1.62	7.20±0.80	4.20±1.16	-	-	7.46±2.50
EK K19-02	-	-	2.16±0.77	2.30±0.4	3.46±0.08	11.40±2.18	-	-	2.50±0.50	3.40±1.12	2.60±0.69	-	-	-	-
EK K19-03	4.96±0.68	-	2.20±0.26	10.20±2.68	3.12±0.52	6.60±2.36	5.56±3.48	-	3.06±0.79	4.16±0.56	5.16±1.88	-	-	-	3.58±0.76

Çizelge 17. (Devam ediyor)

Test Suşları	Test edilen kontrol suşları ^b ve inhibisyon zon çapları (mm)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
EK K19-04	- ^c	-	3.16±0.40	6.62±0.88	4.74±0.95	8.30±2.78	6.20±0.76	5.86±0.98	9.22±2.32	4.14±1.05	6.28±1.81	5.26±1.07	-	-	6.46±2.51
EK K19-05	-	-	7.24±0.62	6.63±1.16	6.48±1.04	10.16±1.04	7.94±1.86	-	3.96±0.65	-	3.86±1.25	2.06±0.51	-	-	6.10±1.05
LB A01-01	8.16±0.84	4.36±0.34	9.36±0.64	11.20±1.40	8.66±0.52	10.30±1.12	8.26±2.36	6.66±1.18	12.06±0.92	7.20±0.48	9.12±1.15	6.46±1.25	-	2.33±4.04	12.22±1.96
LB A06-02	18.92±1.55	20.46±1.86	19.90±0.28	7.40±4.12	21.02±0.38	20.56±5.58	13.66±1.74	13.59±2.64	14.96±1.68	15.66±5.86	16.46±5.15	20.18±1.38	3.26±0.85	12.63±2.17	16.44±6.25
LB A07-03	-	-	7.74±2.62	4.90±0.95	6.64±0.88	-	-	-	-	1.96±0.65	-	-	-	-	-
LB A13-01	8.54±1.06	8.26±0.51	9.68±1.24	8.52±0.34	11.16±0.68	7.42±2.08	6.42±1.66	5.42±0.44	7.08±0.87	7.72±0.55	9.76±1.06	5.06±0.17	-	7.10±6.15	7.16±0.56
LB A14-01	11.66±2.16	8.74±1.28	4.64±0.72	14.40±6.58	8.12±1.80	14.22±3.86	15.42±3.16	11.76±6.68	-	11.36±1.05	-	-	-	-	15.46±3.79
LB A15-01	9.06±0.53	8.78±0.26	9.02±0.68	6.56±1.34	9.30±0.42	7.14±3.16	9.42±4.26	6.72±0.37	7.22±1.61	9.26±0.85	8.82±0.55	6.20±0.43	-	-	9.40±3.10
LB A32-02	-	-	9.28±1.42	3.16±0.78	3.36±0.54	-	-	2.66±1.17	-	-	3.24±0.40	-	-	-	2.36±4.04
LB A33-01	-	-	7.60±1.12	1.60±0.78	2.38±0.32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB A36-01	-	-	7.60±1.78	4.58±0.74	6.12±0.60	4.42±2.56	-	-	3.04±0.66	-	-	-	-	-	1.90±0.92
LB A39-01	4.64±0.80	-	2.76±0.80	4.50±1.71	2.56±0.62	10.72±4.20	10.72±2.54	5.96±0.89	7.24±1.34	2.86±0.87	6.46±1.85	-	-	-	7.16±1.56
LB A41-02	9.60±2.76	8.46±0.89	6.08±2.02	8.40±2.26	9.46±2.26	8.40±1.82	8.90±6.28	8.30±0.62	9.22±1.75	11.42±1.27	10.66±1.36	6.56±1.19	-	-	9.52±1.19
LB K02-03	2.78±0.64	-	3.34±0.92	3.16±1.06	6.76±1.04	7.10±1.20	4.76±0.52	5.18±0.81	6.80±1.72	4.16±2.27	3.06±0.87	-	-	-	5.36±1.92
LB K04-03	8.10±0.86	7.90±0.57	6.56±1.42	8.72±2.83	10.23±2.16	10.26±3.40	4.76±0.32	5.72±1.35	9.26±2.34	7.38±1.05	10.03±0.57	-	-	3.03±5.25	9.18±1.15
M17 A11-01	7.12±1.18	-	10.20±2.80	9.20±1.98	9.28±1.36	8.50±3.62	7.64±0.88	7.46±1.55	6.22±2.2	-	6.86±0.57	3.58±1.20	-	-	8.40±1.51
M17 A36-01	-	-	10.30±1.12	8.16±0.80	4.36±0.30	-	-	6.66±1.17	-	-	7.28±0.42	-	-	-	2.38±4.04
M17 K09-02	8.06±0.32	7.56±0.50	7.50±1.40	7.30±1.50	10.76±1.62	8.72±0.28	10.50±2.50	5.88±1.25	7.44±1.16	7.76±0.3	9.70±0.45	5.88±1.15	-	-	11.24±1.73
M17 K17-01	-	-	8.10±0.85	1.10±0.80	9.16±2.16	5.54±2.82	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a) Sayılar iki tekrar çalışmanın ortalamasıdır

b) (1) *E. faecalis* H1, (2) *E. faecium* S01-05, (3) *L. monocytogenes* ATCC 7644, (4) *L. monocytogenes* H1, (5) *L. monocytogenes* H2, (6) *S. aureus* ATCC 6538, (7) *E. coli* ATCC 35211, (8) *S. aureus* ATCC 25923, (9) *L. inoucia*, (10) *E. faecalis* NCIMB 700584, (11) *E. faecalis* ATCC 292112, (12) *E. faecium* M74, (13) *Lb. plantarum*, (14) *Lb. acidophilus* ATCC 4536, (15) *Sal. Typhimurium* ATCC 19302,

c) Antimikrobiyel aktivite yok

Çizelge 18. Agar difüzyon tekniğine göre laktik asit bakteri suşlarının antibakteriyel etkinliği^a

Test Suşları	Test edilen kontrol suşları ^b ve inhibisyon zon çapları (mm)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
EK A17-01	- ^c	-	11.64±0.21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A17-02	-	-	10.56±0.86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A17-03	-	-	11.44±0.27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A17-04	-	-	11.66±0.34	11.80±1.20	11.16±0.04	-	-	-	11.26±0.67	-	-	-	-	-	-
EK A17-05	-	-	11.62±0.67	11.52±0.28	11.12±0.51	-	-	-	11.50±0.10	-	-	-	-	-	-
EK A17-06	-	-	11.00±0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A17-07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A17-08	-	-	11.66±0.12	11.46±0.23	11.08±0.21	-	-	-	11.26±0.64	-	-	-	-	-	-
EK A17-09	-	-	11.68±0.27	11.56±0.31	11.18±0.17	-	-	-	11.50±0.10	-	-	-	-	-	-
EK A17-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A21-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A21-02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A21-03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A40-01	-	-	10.96±0.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A40-02	-	-	11.82±0.31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A40-03	-	-	11.88±0.27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A40-04	-	-	11.80±0.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A40-05	-	-	11.70±0.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK K19-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK K19-02	-	-	10.96±0.81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK K19-03	-	-	10.92±0.17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 18. (Devam ediyor)

Test Suşları	Test edilen kontrol suşları ^b ve inhibisyon zon çapları (mm)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
EK K19-04	-	-	11.80±0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK K19-05	-	-	11.40±0.28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB A01-01	14.96±0.73	14.35±1.51	14.85±1.44	-	14.13±1.47	-	-	14.42±0.98	12.25±0.35	11.46±0.51	14.66±0.57	12.15±1.62	-	-	-
LB A06-02	19.98±3.35	18.12±0.73	21.04±1.71	-	19.16±1.36	-	-	21.84±2.85	18.92±1.17	16.78±2.02	19.16±3.05	19.66±2.02	-	-	-
LB A07-03	-	-	11.42±0.17	-	11.20±0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB A13-01	14.00±1.44	13.86±0.75	18.78±7.95	-	14.04±0.65	-	-	14.25±0.07	10.55±0.07	11.46±0.21	13.64±0.76	12.05±0.07	-	-	-
LB A14-01	-	13.55±0.63	15.16±0.76	-	-	-	-	-	12.0±0.00	16.22±0.37	-	15.22±1.48	-	-	-
LB A15-01	14.02±1.27	13.5±0.00	18.26±7.13	11.8±0.00	13.76±0.62	-	-	15.20±0.00	-	11.50±0.00	13.94±0.18	12.06±1.48	-	-	-
LB A32-02	-	-	10.60±0.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB A33-01	-	-	12.92±0.67	-	10.60±0.00	-	-	-	-	11.00±0.00	-	-	-	-	-
LB A36-01	-	-	11.55±0.02	10.5±0.00	10.65±0.07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB A39-01	-	-	11.36±0.07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB A41-02	-	-	16.05±0.06	-	-	-	-	-	-	11.1±0.89	-	-	-	-	-
LB K02-03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB K04-03	14.20±1.18	13.7±0.55	14.88±1.64	12.5±1.41	13.66±1.32	-	-	15.36±1.45	-	11.00±0.00	14.54±0.51	11.86±1.09	-	-	-
M17 A11-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M17 K17-01	-	-	11.20±0.13	-	10.52±0.09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M17 A36-01	-	-	10.73±1.02	10.92±0.06	11.95±0.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M17 K09-02	15.36±0.83	14.24±1.06	15.35±0.64	-	14.05±1.13	-	-	14.60±0.42	-	11.20±0.56	14.36±0.62	13.22±0.53	-	-	-

a) Sayılar iki tekrar çalışmanın ortalamasıdır

b) (1) *E. faecalis* H1, (2) *E. faecium* S01-05, (3) *L. monocytogenes* ATCC 7644, (4) *L. monocytogenes* H1, (5) *L. monocytogenes* H2, (6) *S. aureus* ATCC 6538, (7) *E. coli* ATCC 35211, (8) *S. aureus* ATCC 25923, (9) *L. innocua*, (10) *E. faecalis* NCIMB 700584, (11) *E. faecalis* ATCC 29212, (12) *E. faecium* M74, (13) *Lb. plantarum*, (14) *Lb. acidophilus* ATCC 4536, (15) *Salmonella typhimurium* ATCC 19302,

c) Antimikrobiyel aktivite yok

Agar difüzyon testi sonuçlarına göre; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 35211, *Lb. acidophilus* ATCC 4356, *Lb. plantarum* ve *Sal. Typhimurium* ATCC 19302 kontrol suşları antimikrobiyel aktivitesi test edilen tüm suşlara, ürettikleri antimikrobiyel maddeler bazında dirençli bulunmuştur. Antimikrobiyel aktivitesi test edilen suşların hiçbirisi *E. faecalis* EK A17-07, *E. faecalis* EK A17-10, *E. faecalis* EK A21-01, *E. faecalis* EK A21-02, *E. faecalis* EK A21-03, *E. faecalis* EK K19-01, *E. faecium* LB K02-03 ve *Str. salivarius* M17 A11-01 kontrol suşları üzerinde inhibitör etki göstermemiştir. *L. monocytogenes* kontrol suşları, agar damlatma testinde olduğu gibi, antimikrobiyel aktivitesi test edilen laktik asit bakterilerine karşı en duyarlı bakteriler olarak tespit edilmiştir. *E. faecium* LB A01-01, *P. acidilactici* LB A06-02, *E. faecium* LB A13-01, *Lb. gasseri* LB A14-01, *Str. salivarius* LB A15-01, *E. faecium* LB K04-03 ve *E. faecium* M17 K09-02 kontrol bakterilerine karşı antimikrobiyel açıdan en etkili suşlar olarak belirlenmiştir. Daha düşük düzeyde antimikrobiyel aktivitesi belirlenen diğer suşlar, genel olarak *L. monocytogenes*, *L. innocua* ve *E. faecalis* NCIMB 700584 kontrol suşları üzerine etkili bulunmuştur. Agar difüzyon testi sonuçlarına göre Gram-negatif bakterilere (*E. coli* ATCC 35211, *Sal. Typhimurium* ATCC 19302) karşı herhangi bir antimikrobiyel etki belirlenmemiştir. Literatüre göre, bakteriyosinler genellikle üretici suşlara yakın türlere karşı etki göstermektedir (Saavedra et al., 2003). Çalışmamızda elde edilen sonuçlar da bunu doğrular niteliktedir.

Agar damlatma testi ve agar difüzyon testi sonuçları karşılaştırmalı olarak incelendiğinde; agar damlatma yönteminde antimikrobiyel aktivitesi test edilen suşların kontrol bakterilerine karşı daha yüksek oranda etkili olduğu şeklinde bir sonuca varılmaktadır. Agar difüzyon testinden ise kontrol bakterileri üzerinde antimikrobiyel etkiye sahip sınırlı sayıda suş olduğu şeklinde bir sonuç elde edilmiştir.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlara paralel olarak, literatürde de agar damlatma tekniği ve agar difüzyon yöntemleri arasında antimikrobiyel etkinin belirlenmesi açısından farklı sonuçlar elde edildiği bildirilmektedir (Schillinger and Lücke, 1989; Çon and Gökalp, 2000). Altuntaş ve ark. (2010) çiğ süt ve peynir örneklerinden izole ettikleri 25 adet laktik asit bakterisinin *L. monocytogenes* ve *S. aureus*'a karşı

antimikrobiyel etkisi üzerine bir araştırma gerçekleştirmişlerdir. Bu araştırmacılar agar damlatma yöntemine göre incelenen tüm suşların, agar difüzyon yöntemine göre ise sadece 7 suşun bu kontrol bakterilerine karşı antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Çon ve Gökalp (2000) sucuk örneklerinden izole edilen laktik asit bakteri izolatlarıyla agar damlatma tekniği ile gerçekleştirdikleri antimikrobiyel aktivite testinde 19 adet *Lb. plantarum* suşunun indikatör bakterilere karşı inhibitör aktivitesini gözlemlerken, agar difüzyon yönteminde sadece 2 *Lb. plantarum* suşunun inhibitör etkisini tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada 57 adet laktik asit bakteri suşunun agar damlatma yöntemi ile *C. perfringens*'e karşı inhibitör etkisi olduğu belirlenirken, agar difüzyon yöntemi ile bu suşların sadece 7 adedinin *C. perfringens*'e inhibitör etkisi olduğu saptanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre agar damlatma yönteminde tespit edilen inhibisyon etkisinin bakteriyosin veya diğer metabolitlerden kaynaklanabileceği belirtilmiş ve bu nedenle de agar damlatma yöntemi ile bulunan sonuçlardaki inhibisyon etkisinin bakteriyosin kaynaklı olup olmadığını belirlemek için agar difüzyon yöntemiyle doğrulama yapılmasının gerekli olduğu üzerinde durulmuştur. Uymaz et al. (2009) yaptıkları çalışmada agar difüzyon ve agar damlatma yöntemleri sonuçları arasında benzer farklıklar tespit etmişlerdir. Araştırmacılar sonuçlardaki bu farklılığı kullanılan yöntemlerdeki bakteriyosin miktarı ile ilişkilendirmiştir. Agar damlatma yöntemindeki bakteriyosin konsantrasyonunun agar difüzyon yönteminde bulunan bakteriyosin konsantrasyonundan daha yüksek olmasından dolayı, agar difüzyon testinde gözlenen antimikrobiyel etkinin daha düşük olduğunu belirtmişlerdir.

4.6. İzolatların Antimikrobiyel Aktivitesinin Bakteriyosinlerden Kaynaklanıp Kaynaklanmadığının Belirlenmesi

Bu kapsamda yalnızca agar difüzyon yöntemi ile antimikrobiyel etkisi belirlenen izolatlar denemeye alınmıştır.

Laktik asit bakterileri gelişme ortamında bakteriyosinlerin yanı sıra antimikrobiyel etkili bir takım metabolitler (asitler ve hidrojen peroksit gibi) de üretebilmektedirler. Bu nedenle, bu denemelerde izolatların antimikrobiyel etkisinin bakteriyosinden mi yoksa gelişme ortamında oluşturdıkları asitlikten veya hidrojen peroksitten

kaynaklı olup olmadığının belirlenmesi gerekmektedir. Antimikrobiyel etkiye neden olan metabolitin protein yapısında olup olmadığının test edilmesi ise antimikrobiyel etkinin bakteriyosn kaynaklı olup olmadığının belirlenmesi açısından önemlidir.

Laktik asit bakteri izolatlarının antimikrobiyel aktivitelerinin besiyerinde oluşan asitlikten kaynaklı olup olmadığının belirlenmesi amacıyla agar difüzyon yöntemi ile antimikrobiyel etkisi belirlenen izolatların hücre içermeyen süpernatantları Bölüm 3.2.13.'de anlatıldığı şekilde 6N NaOH ile nötralize edilmiş ve pH'ları 6.5-7.0 düzeyine getirilmiştir. Laktik asit bakteri izolatlarının agar difüzyon tekniğine göre nötralizasyon sonrasındaki antibakteriyel etkinliği Çizelge 19'da gösterilmiştir.

Süpernatant nötralizasyonu öncesinde çeşitli kontrol bakterilerine karşı antimikrobiyel etkisi olduğu tespit edilen *E. faecalis* EK A17-01, *E. faecalis* EK A17-02, *E. faecalis* EK A17-03, *E. faecalis* EK A17-04, *E. faecalis* EK A17-05, *E. faecalis* EK A17-06, *E. faecalis* EK A17-08, *E. faecalis* EK A17-09, *E. faecalis* EK A40-01, *E. faecalis* EK A40-02, *E. faecalis* EK A40-03, *E. faecalis* EK A40-04, *E. faecalis* EK A40-05, *E. faecalis* EK K19-02, *E. faecalis* EK K19-03, *E. faecalis* EK K19-04, *E. faecalis* EK K19-5, *Str. salivarius* LB A07-03, *Str. salivarius* LB A32-02, *Str. salivarius* LB A33-01, *Str. salivarius* LB A36-01, *E. faecium* LB A39-01, *Lb. gasseri* LB A41-02, *Str. salivarius* M17 K17-01 ve *Str. salivarius* M17 A36-01 suşlarının süpernatant nötralizasyonu sonrasında herhangi bir antimikrobiyel aktivite göstermediği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, söz konusu izolat suşlarının antimikrobiyel etkisinin gelişme ortamında oluşturdıkları asitlikten kaynaklandığına işaret etmektedir.

Çizelge 19. Agar difüzyon tekniğine göre nötralizasyon sonrasında laktik asit bakteri suşlarının antibakteriyel etkinliği^a

Test Suşları	Test edilen kontrol suşları ^b ve inhibisyon zon çapları (mm)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
EK A17-01	- ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A17-02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A17-03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A17-04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A17-05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A17-06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A17-07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A17-08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A17-09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A17-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A21-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A21-02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A21-03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A40-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A40-02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A40-03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A40-04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A40-05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK K19-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK K19-02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK K19-03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 19. (Devam ediyor)

Test Suşları	Test edilen kontrol suşları ^b ve inhibisyon zon çapları (mm)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
EK K19-03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK K19-04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK K19-05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A21-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A21-02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK A21-03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB A01-01	13.15±0.79	12.32±0.26	13.36±1.62	-	13.30±1.79	-	-	13.00±0.00	11.65±1.27	-	12.11±1.22	-	-	-	-
LB A06-02	18.62±2.57	16.82±0.17	20.65±1.86	-	18.72±1.17	-	-	22.75±0.07	18.26±1.85	16.20±1.16	17.32±2.51	19.65±2.26	-	-	-
LB A07-03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB A13-01	13.03±0.98	12.75±0.31	17.78±5.07	-	12.80±0.85	-	-	13.50±0.07	-	-	11.96±1.12	10.50±0.00	-	-	-
LB A14-01	-	13.00±0.00	14.82±0.07	-	-	-	-	-	11.52±0.31	16.15±0.22	-	14.66±0.57	-	-	-
LB A15-01	12.37±1.37	12.72±0.13	17.14±4.93	-	12.74±1.18	-	-	14.52±0.07	-	-	12.15±0.93	-	-	-	-
LB A32-02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB A33-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB A36-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB A39-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB A41-02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB K04-03	12.65±1.14	12.70±0.05	13.74±1.63	10.75±0.35	12.72±1.38	-	-	13.30±0.14	-	-	11.62±1.21	11.56±0.17	-	-	-
M17 K17-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M17 A36-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M17 K09-02	13.10±1.77	12.90±0.14	14.15±1.19	-	12.75±1.21	-	-	13.20±0.05	-	-	12.45±1.69	-	-	-	-

a) Sayılar iki tekrar çalışmanın ortalamasıdır

- b) (1) *E. faecalis* H1, (2) *E. faecium* S01-05, (3) *L. monocytogenes* ATCC 7644, (4) *L. monocytogenes* H1, (5) *L. monocytogenes* H2, (6) *S. aureus* ATCC 6538, (7) *E. coli* ATCC 35211, (8) *S. aureus* ATCC 25923, (9) *L. innocua*, (10) *E. faecalis* NCIMB 700584, (11) *E. faecalis* ATCC 292112, (12) *E. faecium* M74, (13) *L. plantarum*, (14) *L. acidophilus* ATCC 4536, (15) *Sal. typhimurium* ATCC 19302,
- c) antimikrobiyel aktivite yok

Arici et al. (2004) bebek dışkılarından izole ettikleri laktobasil suşlarıyla (*Lb. rhamnosus*, *Lb. fermentum*, *Lb. buchneri*, *Lb. paracasei* spp. *paracasei*) agar difüzyon metoduna göre yaptıkları çalışmada patojen test bakterilerine (*B. cereus* FMC 19, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 2392, *S. aureus* ATCC 28213, *Y. enterocolitica* ATCC 1501) karşı nötralizasyon öncesi inhibisyon etkisini tespit etmiş, süpernatant pH'larının 6.5'e ayarlanması ve ortama katalaz ilave edilmesi sonrasında ise patojenik bakterilere karşı oluşan inhibisyon etkisinde önemli azalma meydana geldiği ve bazı suşlarda inhibisyon etkisinin kaybolduğunu belirtmişlerdir.

Süpernatant nötralizasyonu sonrasında kontrol suşlarına karşı antimikrobiyel etkisi belirlenen *E. faecium* LB A01-01, *P. acidilactici* LB A06-02, *E. faecium* LB A13-01, *Lb. gasseri* LB A14-01, *Str. salivarius* LB A15-01, *E. faecium* LB K04-03 ve *E. faecium* M17 K09-02 izolatları ileri aşama testler için olası bakteriyosin üreticisi suşlar olarak seçilmiştir. Bu suşlara karşı en duyarlı olan *L. monocytogenes* ATCC 7644 daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere kontrol bakterisi olarak seçilmiştir.

Literatürde genel olarak tüm bakterilerin en az bir bakteriyosin ürettiği belirtilmektedir (Klaenhammer, 1993). Ancak bakteriyosinlerin antimikrobiyel etkisi hedef mikroorganizmanın cinsi, türü ve suşuna, test yönteminde kullanılacak ortamın bileşimine, antimikrobiyel maddeye uygulanacak işlemlere (filtrasyon vb.), ortamın pH'sına ve inkübasyon koşullarına bağlı olarak değişebilmektedir (Yıldırım and Johnson, 1998; Todorov and Dicks, 2005). Kullanılan test koşullarında diğer suşların üretmesi olası antimikrobiyel metabolitlerinin tespit edilememesinin yukarıda belirtilen nedenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yukarıda değinilen nedenlerden dolayı ileri aşamalarda agar difüzyon yöntemi sonuçları baz alınarak devam edilmiş, agar damlatma yöntemi ile elde edilen sonuçlar ise göz önüne alınmamıştır.

Olası bakteriyosin üreticisi olarak belirlenen suşların antimikrobiyel etkisinin hidrojen peroksit kaynaklı olup olmadığı ve antimikrobiyel etkiye neden olan metabolitin protein yapısında olup olmadığının belirlenmesi amacıyla mikrobiyel aktiviteye sahip hücre içermeyen süpernatantlar üzerinde ayrı ayrı olmak üzere

katalaz, proteinaz-K, pepsin ve tripsin uygulaması yapılmıştır. Proteinaz-K, pepsin (*Lb. gasseri* LB A14-01 hariç) ve tripsin enzimlerinin antimikrobiyel aktivitesi test edilen suşların süpernatantları üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir. Katalaz'ın ise suşların süpernatantları üzerine herhangi bir etkisi bulunmamıştır (Çizelge 20).

Bu sonuçlar elde edilen süpernatantlardaki antimikrobiyel etkinin hidrojen peroksit kaynaklı olmadığı ve bu süpernatantlarda aktivite gösteren metabolitin protein yapısında olduğuna işaret etmektedir.

Çizelge 20. Kuyucuk yöntemi ile test suşlarının *Listeria monocytogenes* ATCC 7644'e karşı antimikrobiyel aktivitesi üzerine proteinaz-K, pepsin, tripsin ve katalazın etkisi

Test suşu	Zon Çapı (mm)				
	Kontrol	Katalaz	Proteinaz K	Pepsin	Tripsin
<i>E. faecium</i> LB A01-01	14.5	12.3	- ^a	-	-
<i>P. acidilactici</i> LB A06-02	18.3	19.1	-	-	-
<i>E. faecium</i> LB A13-01	15.0	12.3	-	-	-
<i>Lb. gasseri</i> LB A14-01	12.8	12.4	-	10.6	-
<i>S. salivarius</i> LB A15-01	14.4	11.6	-	-	-
<i>E. faecium</i> LB K04-03	15.1	13.2	-	-	-
<i>E. faecium</i> M17 K09-02	14.7	13.1	-	-	-

^aantimikrobiyel aktivite yok

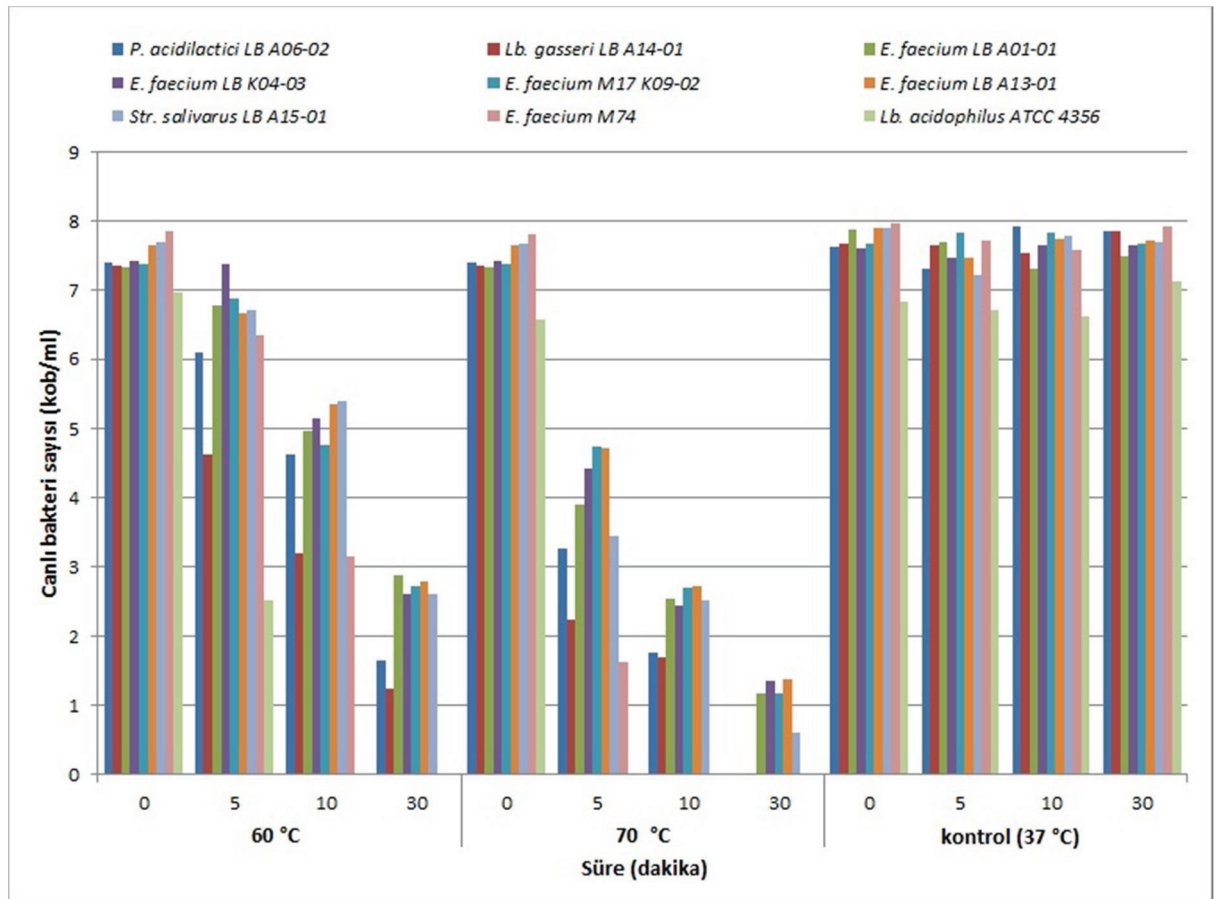
Laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosinlerin proteolitik enzimlere genellikle duyarlı olduğu daha önce yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Du Toit et al. (2000) domuz dışkısından izole ettikleri *E. faecium* ve *E. faecalis* suşları ile yaptıkları çalışmada bu bakterilerin ürettiği enterosinlerin proteinaz K, tripsin ve pepsine duyarlı olduğunu bildirmiştir. Tükel et al. (2007) *Lc. lactis* spp. *lactis* MC38 suşunun ürettiği bakteriyosinin tripsin ve pepsin'e dirençli, proteinaz K ve kimotripsin'e duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. Fermente sosisten izole edilen *P. acidilactici* suşlarının ürettiği bakteriyosinlerin proteinaz K ve tripsin uygulamalarına duyarlı olduğu bildirilmiştir (Osmanağaoğlu et al., 1998; Albano et al., 2007).

Elde edilen analiz sonuçlarına göre *E. faecium* LB A01-01, *P. acidilactici* LB A06-02, *E. faecium* LB A13-01, *Lb. gasseri* LB A14-01, *Str. salivarius* LB A15-01, *E.*

faecium LB K04-03 ve *E. faecium* M17 K09-02 suşlarının antimikrobiyel aktivite gösteren metabolitlerinin protein yapısında bakteriyosinler olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 20’de görüldüğü gibi bu hususta yalnızca *Lb. gasseri* LB A14-01 suşunun düşük düzeyde de olsa pepsine dirençli olduğu ortaya çıkmıştır. Bu durumun pepsinin spesifikliğıindeki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.7. İzolatların Yüksek Sıcaklığa Direnç Özellikleri

İzolatların yüksek sıcaklığa direnç özellikleri sadece antimikrobiyel etkiye sahip olduğu belirlenen yedi adet izolat ve iki adet kontrol (*Lb. acidophilus* ATCC 4356 ve *E. faecium* M74) uygulanmış ve yüksek sıcaklığa karşı direnç özelliğı 60 °C ve 70 °C’lerde belirlenmiştir. İzolatların 60 °C ve 70 °C sıcaklık değerlerine karşı direnç durumlarına ilişkin sonuçlar Çizelge 21 ve Şekil 4’de verilmiştir.



Şekil 4. Laktik asit bakteri suşlarının 60 °C’ve 70 °C sıcaklıklara karşı direnç durumları

Çizelge 21. Laktik asit bakteri suşlarının farklı yüksek sıcaklık derecelerine direnç özelliklerini gösteren sayım sonuçları [log (kob/mL)]

Isıl işlem (°C)	Süre (Dakika)	Canlı Hücre Sayısı (log kob/mL) ^a								
		<i>P. acidilactici</i> LB A06-02	<i>Lb. gasseri</i> LB A14-01	<i>E. faecium</i> LB A01-01	<i>E. faecium</i> LB K04-03	<i>E. faecium</i> M17 K09-02	<i>E. faecium</i> LB A13-01	<i>Str. salivarius</i> LB A15-01	<i>E. faecium</i> M74	<i>Lb. acidophilus</i> ATCC 4356
60 °C	0	7.40±0.09	7.34±0.90	7.32±0.16	7.41±0.16	7.37±0.02	7.65±0.21	7.68±0.14	7.86±0.18	6.98±0.09
	5	6.08±1.22	4.61±0.25	6.77±0.74	7.37±0.94	6.87±0.24	6.64±1.35	6.70±0.82	6.33±0.17	2.53±0.11
	10	4.62±0.61	3.19±0.45	4.95±0.58	5.15±0.10	4.76±0.28	5.35±1.49	5.38±0.56	3.16±0.18	<1
	30	1.64±0.24	1.22±0.18	2.89±0.31	2.62±0.44	2.72±0.42	2.78±0.62	2.60±0.14	<1	<1
70 °C	0	7.40±0.09	7.34±0.90	7.32±0.11	7.41±0.16	7.37±0.02	7.65±0.21	7.68±0.14	7.81±0.08	6.57±0.18
	5	3.26±1.62	2.22±1.72	3.90±0.75	4.41±0.73	4.73±0.36	4.70±0.33	3.44±0.66	1.61±0.12	<1
	10	1.76±0.74	1.69±1.22	2.54±0.15	2.43±0.22	2.69±0.15	2.73±0.21	2.51±0.27	<1	<1
	30	<1	<1	1.17±0.13	1.36±0.23	1.18±0.05	1.37±0.29	0.61±0.87	<1	<1
Kontrol (37 °C)	0	7.62±0.66	7.66±0.58	7.88±0.42	7.61±0.55	7.68±0.13	7.90±0.38	7.90±0.48	7.97±0.13	6.83±0.15
	5	7.30±0.19	7.64±0.35	7.69±0.36	7.47±0.52	7.84±0.26	7.47±0.42	7.21±0.69	7.71±0.16	6.71±0.19
	10	7.91±0.42	7.54±0.32	7.31±0.45	7.64±0.27	7.84±0.35	7.74±0.15	7.78±0.35	7.59±0.09	6.62±0.31
	30	7.86±0.41	7.85±0.31	7.50±0.41	7.64±0.44	7.68±0.25	7.71±0.31	7.69±0.39	7.91±0.14	7.14±0.32

^a Sayılar iki tekrar çalışmanın ortalamasıdır.

Test edilen yüksek sıcaklık derecelerine en dayanıklı suşlar *E. faecium* LB A01-01, *E. faecium* LB K04-03, *E. faecium* M17 K09-02, *E. faecium* LB A13-01 ve *Str. salivarius* LB A15-01 olarak belirlenmiştir. Bu suşlar 60 °C’de nispeten canlılıklarını koruyabilmiştir. Bu sıcaklıkta 30 dakika sonunda suşların canlı bakteri sayısında yaklaşık 4-5 log birimlik bir azalma olduğu belirlenmiştir. *E. faecium* LB A01-01, *E. faecium* LB K04-03, *E. faecium* M17 K09-02, *E. faecium* LB A13-01 ve *Str. salivarius* LB A15-01 70 °C’lik sıcaklıkta da 30 dakika ısıtma işlemi sonunda canlılığını korumuş ve canlı bakteri sayısında yaklaşık 6-7 log birimlik azalma olduğu belirlenmiştir. *P. acidilactici* LB A06-02 ve *Lb. gasseri* LB A14-01 suşları 60 °C’de 30 dakika ısıtma işlemi sonunda canlılığını korurken 70 °C’de 30 dakika sonunda canlılıklarını kaybetmişlerdir. Kontrol suşu olarak çalışmaya dahil edilen *E. faecium* M74 suşunun 60 °C sıcaklıkta 10 dakika, *Lb. acidophilus* ATCC 4356 suşunun ise aynı sıcaklıkta 5 dakika canlı kalabildiği belirlenmiştir. Söz konusu suşların da 70 °C’lik sıcaklık uygulamasında 10 ve 30 dakikada canlılığını tamamen kaybettikleri gözlenmiştir.

Panagea ve Chadwick (1996) tarafından enterokokların 60 °C’de 30 dakikalık ısıtma işlemi uygulamasında canlı kalabilen sıcaklığa nispeten dirençli bakteriler olduğu, bunun yanında 71 °C’deki ısıtma işlemi tabii tutulan enterokokların canlı bakteri sayısında 6 log birimden daha fazla düzeyde azalma görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca 65 °C’de 10 dakikalık ısıtma işlemi uygulamasının enterokokların canlı bakteri sayısında 5 log birime kadar azalma sağladığı ve *E. faecium* suşlarının çalışılan *E. faecalis* kontrol suşlarına göre sıcaklığa daha dirençli bulunduğu bildirilmiştir.

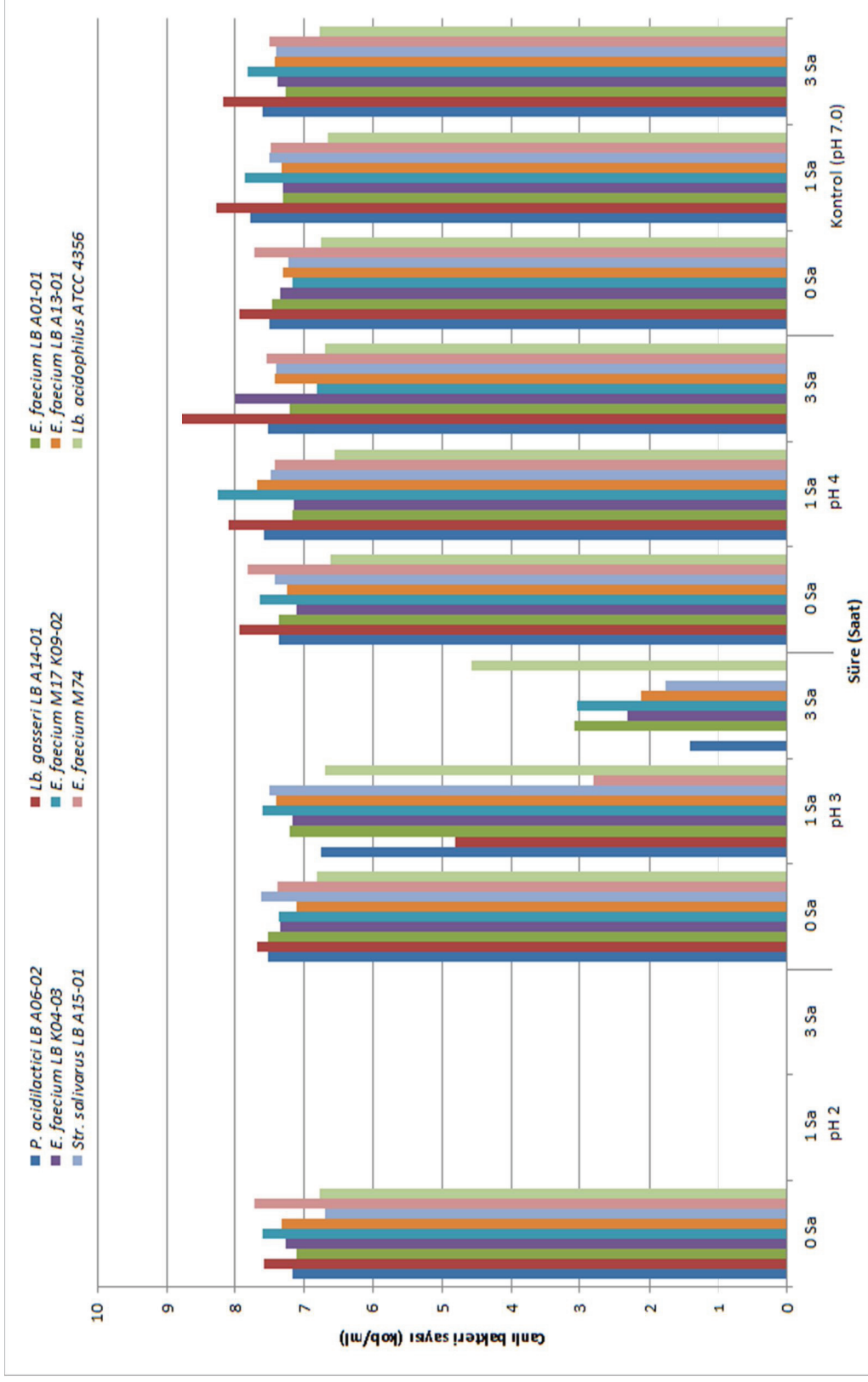
Sustackova et al. (2004) yaptıkları çalışmada ısıtma işlemi görmüş (70 °C’de 10 dakika) et ürünlerinden enterokokların % 46,2 oranında izole edilebildiği ve bu durumun da söz konusu bakterilerin yüksek sıcaklığa direnç özelliklerini kanıtladığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca çeşitli çalışmalarda *E. faecium* suşlarının başlangıç bakteri yükünün yüksek olduğu durumlarda 68 °C’de 30 dakika ve 80 °C’de 1 dakika gibi yüksek ısıtma işlemlerinde canlı kalabildiğinin belirtilmesine karşılık kendi araştırmalarında yüksek ısıtma işlemi görmüş et ürünlerinden *E. faecalis* suşları izole edildiğini, *E. faecium* suşlarının izole edilemediğini bildirmişlerdir.

Araştırma sonuçlarına göre test edilen *E. faecium* LB A01-01, *E. faecium* LB K04-03, *E. faecium* M17 K09-02, *E. faecium* LB A13-01 ve *Str. salivarius* LB A15-01 suşlarının 60 °C' ve 70 °C'deki ısı işlemlere dayanıklı oldukları belirlenmiştir.

4.8. İzolatların Düşük pH'ya Direnç Özellikleri

Çalışmada antimikrobiyel aktivitesi belirlenen suşların düşük pH ortamlarına direnç özellikleri ile ilgili veriler; Şekil 5 ve Çizelge 22'de gösterilmiştir.

Çalışmada antimikrobiyel aktivitesi belirlenen yedi suş ile kontrol suşlarının pH 2 ortamında 1. ve 3. saatin sonunda canlı kalamadıkları belirlenmiştir. pH 3 ortamında ise *P. acidilactici* LB A06-02 suşunun 1. saatin sonunda canlılığını koruduğu 3. saatin sonunda ise canlı kalamadığı tespit edilmiştir. Diğer suşların ise pH 3 ortamında 3. saatin sonunda canlılıklarını korudukları fakat canlı bakteri sayısında 3. saat sonunda 4 - 6 log birimlik azalma olduğu tespit edilmiştir. *E. faecium* M74 kontrol suşunun sayısında pH 3 ortamında 1. saat sonunda 4.57 log birimlik azalma olmuş ve bu suşun 3. saat sonunda canlılığını tamamen kaybettiği görülmüştür. *Lb. acidophilus* ATCC 4356 probiyotik kontrol suşunun ise pH 3 ortamına en dirençli suş olduğu ve 3 saat sonunda bu suştan alınan sayımda 2.25 log düzeyinde bir azalma olduğu tespit edilmiştir. İzolatların hepsinin pH 4 ortamında canlılıklarını 3 saat süresince koruyabildikleri belirlenmiştir.



Şekil 5. Laktik asit bakteri suşlarının düşük pH'ya (pH 2, 3 ve 4) karşı direnç durumları

Çizelge 22. Laktik asit bakterisi suşların düşük pH ortamına direnç özelliklerini gösteren sayım sonuçları log (kob/mL)^a

		Suş Adı								
pH	Süre (Saat)	<i>P. acidilactici</i> LB A06-02	<i>Lb. gasseri</i> LB A14-01	<i>E. faecium</i> LB A01-01	<i>E. faecium</i> LB K04-03	<i>E. faecium</i> M17 K09-02	<i>E. faecium</i> LB A13-01	<i>Str. salivarius</i> LB A15-01	<i>E. faecium</i> M74	<i>Lb. acidophilus</i> ATCC 4356
2	0	7.18±0.25	7.58±0.15	7.11±0.16	7.27±0.03	7.59±0.25	7.32±0.33	6.69±0.21	7.71±0.16	6.78±0.11
	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	3	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
3	0	7.52±0.10	7.67±0.03	7.51±0.25	7.34±0.36	7.35±0.41	7.10±0.15	7.62±0.21	7.38±0.18	6.83±0.27
	1	6.76±0.19	4.85±0.04	7.26±0.58	7.17±0.66	7.59±0.52	7.39±0.19	7.56±0.37	2.81±0.19	6.71±0.21
	3	1.41±0.19	<1	3.07±0.22	2.30±0.24	3.03±0.69	2.12±0.28	1.77±0.14	<1	4.58±0.14
4	0	7.36±0.08	7.93±0.15	7.36±0.16	7.11±0.15	7.64±0.65	7.24±0.07	7.41±0.25	7.81±0.09	6.62±0.13
	1	7.57±0.28	8.09±0.26	7.17±0.17	7.15±0.21	8.25±0.85	7.68±0.49	7.49±0.01	7.42±0.10	6.57±0.24
	3	7.53±0.23	8.77±0.43	7.21±0.12	7.98±0.63	6.81±0.38	7.43±0.37	7.46±0.28	7.54±0.18	6.71±0.19
Kontrol	0	7.51±0.04	7.93±0.09	7.47±0.01	7.35±0.11	7.18±0.01	7.31±0.11	7.23±0.02	7.72±0.17	6.76±0.13
	1	7.77±0.11	8.27±0.06	7.30±0.07	7.36±0.02	7.85±0.08	7.33±0.01	7.50±0.14	7.49±0.31	6.66±0.21
	3	7.61±0.08	8.17±0.11	7.26±0.15	7.38±0.06	7.81±0.30	7.43±0.36	7.40±0.25	7.51±0.28	6.79±0.16

^a Sayılar iki tekrar çalışmanın ortalamasıdır

Gıdalarla birlikte alınan probiyotik bakterilerin bağırsak sistemine ulaşmadan önce mide asitliğinde, starter bakterilerin ise kullanılacağı gıda ortamında canlı kalabilmesi zorunludur (Dunne et al., 2001). Gıdaların mideden yaklaşık geçiş süresi 3 saat ve pH'ı ise yaklaşık 1 - 4 olarak bildirilmiştir (Fernandez et al., 2003; Vinderola. and Reinheimer, 2003). Houben (2003), enterokok suşlarının pH 4.0-5.5 gibi düşük pH ortamlarına dirençli olduklarını belirtirken, Vassos et al. (2009) geleneksel süt ürünleri ve bebeklerin sindirim sisteminden izole ettikleri *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarının çoğunun pH 3.0-6.5 aralığındaki ortamlara direnç gösterdiklerini, pH 2 ortamında ise 15 *E. faecium* suşundan 4'ünün, 12 *E. faecalis* suşundan ise 2'sinin inhibe olduğunu belirtmiştir.

Süt ürünlerinden izole edilen 29 adet laktobasil suşu ile yapılan bir başka çalışmada, bu suşların pH 1 – 3 değerleri arasında direnç özellikleri araştırılmıştır. İncelenen tüm suşların pH 3'de 3 saat boyunca canlı kaldığı, pH 1'de ise çoğunun 1 saat sonra canlılığını yitirdiği belirlenmiştir (Maragkoudakis et al., 2005).

Park et al. (2006) insan ve hayvan dışkılarından izole edilen potansiyel probiyotik *Lb. acidophilus* suşlarının pH 3 ortamında 3 saat boyunca canlı kaldığını belirlemişlerdir. Fermente zeytinlerden elde edilen *Lb. plantarum* suşları ile yapılan bir çalışmada, pH 3 ortamında 4 saat sonunda suşların %50 -74'ünün canlılığını koruduğu, pH 2 ortamında ise canlı kalma oranlarının %18 – 54'e düştüğünü bildirmişlerdir (Mourad and Nour-Eddine, 2006).

Tavuk bağırsağından izole edilen *Enterococcus* 1LC, *Pediococcus* L4 ve *Lactococcus* NPL suşları ile yapılan çalışmada, bu bakterilerin pH 2'de 2 saat sonunda canlılıklarını yitirdikleri, pH 3'de ise 3 saat sonunda *Pediococcus* L4 suşunun %80, *Enterococcus* 1LC suşunun %55, *Lactococcus* NPL suşunun ise %75 oranında canlılıklarını yitirdikleri bildirilmiştir (Bakari et al., 2011).

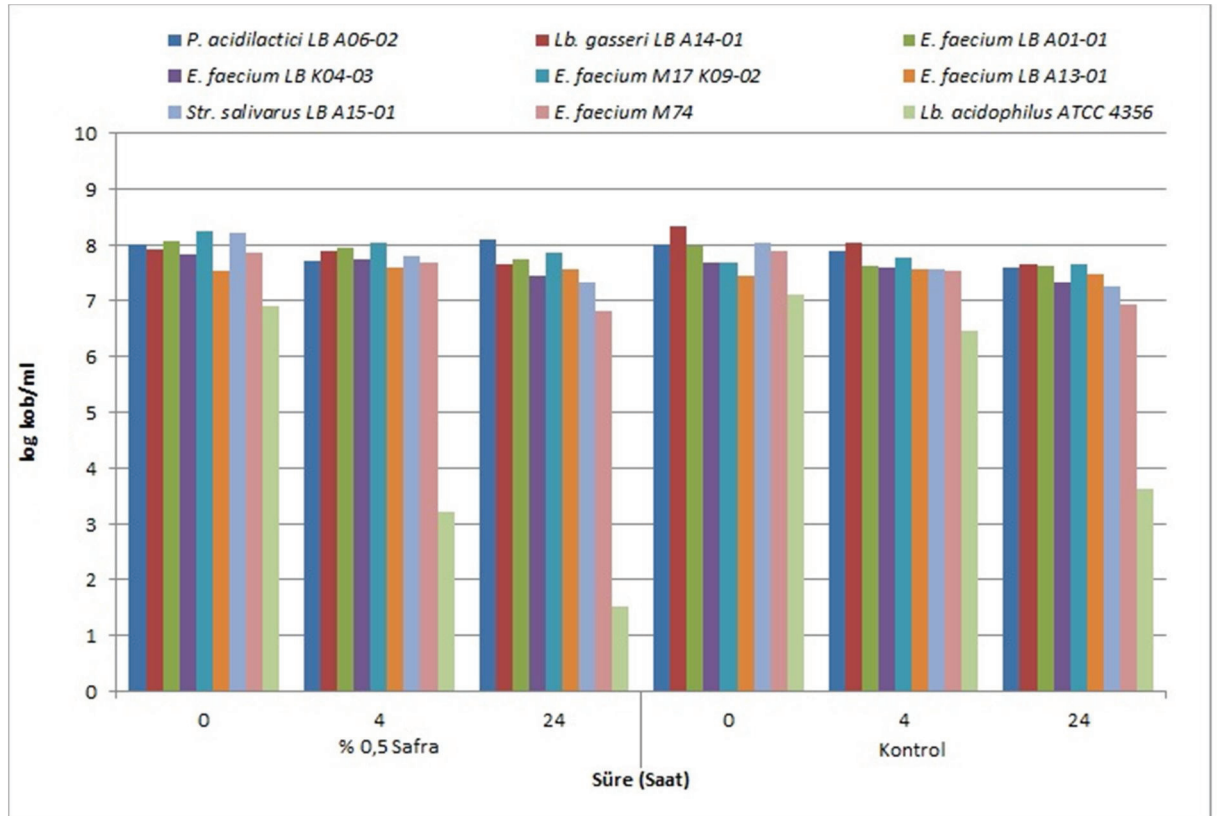
Kabore et al. (2012) gerçekleştirdikleri çalışmada yöresel fermente Boabab ağacı tohumlarından izole edilen 3 adet *E. faecium* ve 2 adet *P. acidilactici* suşunun asit ortama dirençlerini incelemişlerdir. Araştırmacılar *E. faecium* suşlarının pH 2,5 ortamında 4 saat sonunda 2 tanesinin canlılığını yitirdiğini, 1 tanesinin canlılığında

ise yaklaşık 5 log düşüş olduğunu ve 2 adet *P. acidilactici* suşunun ise aynı şartlarda canlılıklarını koruduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda laktik asit bakterilerinin pH 2 ortamında canlılıklarını büyük oranda yada tamamen kaybettikleri bildirilmiştir (Bakari et al., 2011; Pelinescu et al., 2011). Çalışmamızda düşük pH direnci açısından incelemeye alınan suşlar pH 2 ortamına duyarlı, pH 3 ortamına daha dirençli bulunmuşlardır. Genel olarak suşların direncine yönelik elde edilen bulgular yukarıda değinilen literatür verileriyle uyum içerisindedir.

4.9. İzolatların Safraya Direnç Özellikleri

Çalışmada antimikrobiyel aktivitesi belirlenen suşların % 0.5 (w/v) safra derişimine direnç özellikleri; Çizelge 23 ve Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6. Laktik asit bakteri suşların % 0.5'lik (w/v) safra derişimine karşı direnç durumları

Suşların tamamının % 0.5 (w/v) safra derişimine dirençli olduğu ve bu ortamda 4 ve 24 saat inkübasyon sonunda kontrol grubuna kıyasla canlı bakteri sayılarında belirgin bir azalma olmadığı tespit edilmiştir. *E. faecium* M74 kontrol suşunun % 0.5 (w/v) safra derişimine dirençli olduğu ve bu ortamda 4 ve 24 saat inkübasyon sonunda kontrol grubuna kıyasla canlı bakteri sayılarında belirgin bir azalma olmadığı tespit edilmiştir. Buna karşılık *Lb. acidophilus* ATCC 4356 probiyotik kontrol suşunun % 0.5 safra derişimine fazlaca dirençli olmadığı ve bu ortamda 4 saat sonundaki canlı bakteri sayısında kontrol grubuna göre 3.24 log düzeyinde, 24 saat sonunda ise 2.10 log düzeyinde bir azalma olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 23. Laktik asit bakteri suşlarının % 0.5 (w/v) safra derişimine direnç özelliklerini gösteren sayım sonuçları log (kob/mL)

Suş Adı	Canlı hücre sayısı log (kob/mL) ^a					
	Safra (% 0.5)			Kontrol		
	0. saat	4. saat	24. saat	0. saat	4. saat	24 .saat
<i>P. acidilactici</i> LB A06-02	8.01±0.04	7.73±0.05	7.61±0.09	8.02±0.02	7.91±0.12	7.33±0.04
<i>Lb. gasseri</i> LB A14-01	7.91±0.33	7.90±0.10	7.67±0.12	8.33±0.01	8.05±0.01	7.66±0.25
<i>E. faecium</i> LB A01-01	8.07±0.10	7.96±0.02	7.76±0.16	7.99±0.01	7.63±0.08	7.65±0.06
<i>E. faecium</i> LB K04-03	7.83±0.01	7.76±0.12	7.47±0.07	7.69±0.12	7.62±0.06	7.35±0.17
<i>E. faecium</i> M17 K09-02	8.26±0.08	8.04±0.02	7.89±0.31	7.69±0.09	7.77±0.09	7.67±0.24
<i>E. faecium</i> LB A13-01	7.84±0.06	7.60±0.12	7.58±0.37	7.47±0.24	7.59±0.02	7.48±0.01
<i>Str. salivarius</i> LB A15-01	8.22±0.20	7.86±0.03	7.35±0.26	8.04±0.31	7.58±0.15	7.27±0.08
<i>E. faecium</i> M74	7.88±0.09	7.71±0.13	6.82±0.28	7.90±0.19	7.54±0.21	6.94±0.42
<i>Lb. acidophilus</i> ATCC 4356	6.91±0.18	3.22 ± 0.19	1.53±0.16	7.11±0.14	6.46±0.11	3.63±0.17

^aSayılar iki tekrar çalışmanın ortalamasıdır

E. faecium M74 ve *Lb. acidophilus* ATCC 4356 suşlarının kontrol grupları çalışmasının 24. saat inkübasyon sonunda alınan canlı bakteri sayım sonuçlarında

sırasıyla 2.16 log ve 3.48 log birimlik azalma tespit edilmiştir. Bu sonuçların, serum fizyolojik içindeki suşların 24 saat süresince canlılıklarını belli oranda kaybediyor olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Safra tuzuna direnç mekanizmasının suşların safra tuzu hidrolaz aktiviteleri ve membran yapıları ile ilgili olduğu belirtilmektedir (Begley et al., 2006). Saavedra et al. (2003) geleneksel peynirlerden izole edilen *E. faecium* suşlarının % 0.3'lük safra ortamına direnç gösterdiğini belirtirken, Vassos ve ark. (2009) geleneksel süt ürünleri ve bebeklerin sindirim sisteminden izole edilen tüm *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarının % 0.15 ve % 0.5'lik safra ortamına 24 saat süresince direnç gösterdiklerini ifade etmişlerdir.

Uymaz et al. (2009) insan dışkılarından izole edilen *E. faecium* ve *P. pentosaceus* suşlarının % 0.3 safra ortamında 4 saat sonunda canlılıklarında herhangi bir azalma olmadığını belirtmişlerdir.

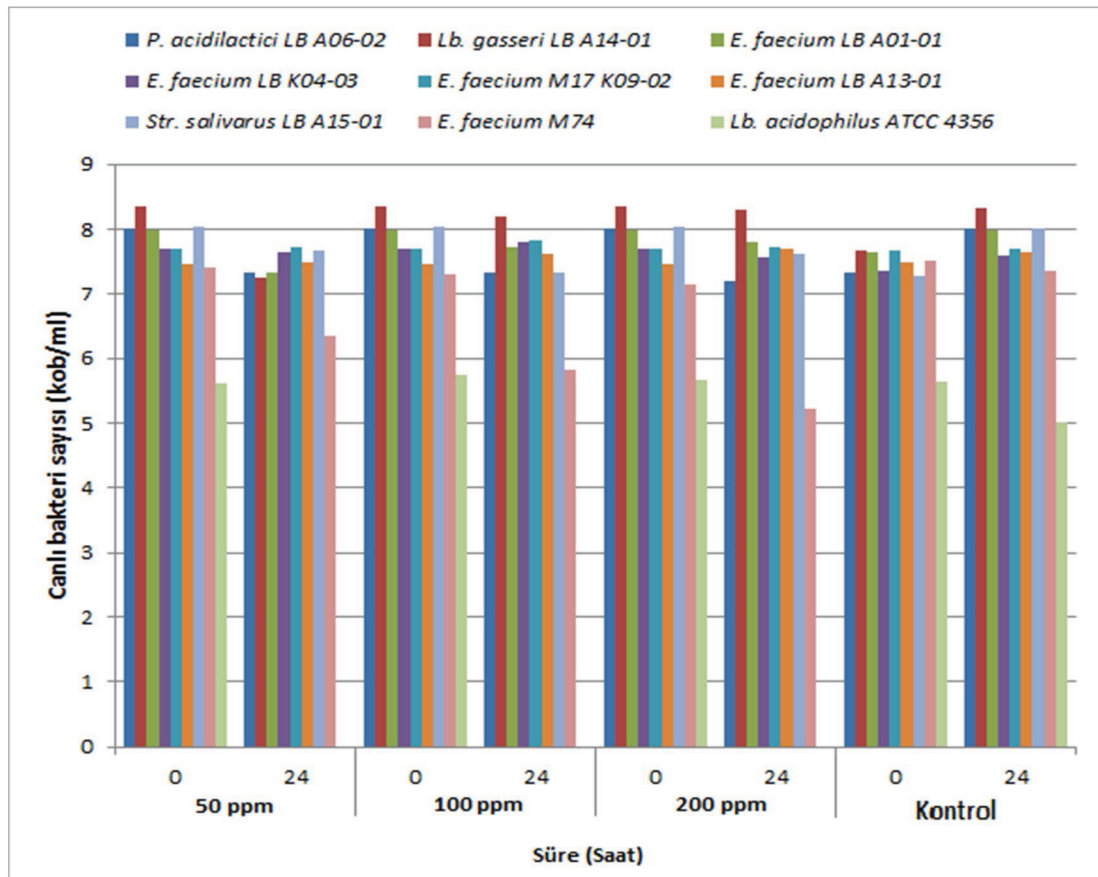
Maragkoudakis et al. (2005) süt ürünlerinden izole edilen 29 adet laktobasil suşunun % 0.3 safra ortamında 4 saat sonunda canlılıklarını koruduklarını tespit etmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda % 0.3 - 0.5 safra konsantrasyonlarının laktik asit bakterileri üzerine inhibisyon etkisi yaratabileceği de gösterilmiştir. Papamanoli et al. (2003) *Lb. curvatus* ve *Lb. sakei* suşları üzerine % 0.3 lük safra çözeltisinin inhibisyon etkisi gösterdiği bildirilmişlerdir. Tavuk bağırsağından izole edilen *Enterococcus* 1LC, ve *Pediococcus* L4 suşları ile yapılan çalışmada bu bakterilerin % 0.4 safra ortamında 4 saat sonunda suşların canlılıklarında sırasıyla % 40 ve % 45, 24 saat sonunda ise % 55 ve % 58 oranında azalma olduğu belirlenmiştir (Bakari et al., 2011). Mourad and Nour-Eddine (2006) fermente zeytinlerden elde edilen *Lb. plantarum* suşları ile yaptıkları çalışmada % 2 safra ortamında 24 saat sonunda bu suşların canlılıklarında % 35 - % 89 oranları arasında düşüş olduğunu bildirmişlerdir

4.10. İzolatların Nitrite Direnç Özellikleri

Antimikrobiyel aktivitesi belirlenen suşların 50, 100 ve 200 ppm'lik nitrit derişimlerine karşı gösterdikleri direnç özellikleri; Şekil 7 ve Çizelge 24'de verilmiştir.

Çalışmada, suşların 50, 100 ve 200 ppm'lik nitrit konsantrasyonlarına dirençli oldukları, ancak *Lb. acidophilus* ATCC 4356 probiyotik suşunun her üç nitrit konsantrasyonunda da 24 saat inkübasyon sonucunda canlılığını kaybettiği belirlenmiştir. Suşlarda 24 saatlik inkübasyon sonucunda canlı bakteri sayılarında kontrol grubuna göre büyük bir düşme gözlenmezken; *E. faecium* M74 probiyotik kontrol suşunun 50, 100 ve 200 ppm'lik nitrit ortamlarında 24 saatlik inkübasyon sonucundaki canlı bakteri sayısında sırasıyla 1.08, 1.50 ve 1.94 log düzeyinde bir azalma olduğu görülmüştür. *Lb. acidophilus* ATCC 4356 probiyotik kontrol suşunun 24 saat inokulasyon sonundaki canlı bakteri sayısındaki azalmalar uygulanan üç nitrit konsantrasyonu için de yaklaşık 5.60 log düzeyindedir.



Şekil 7. Laktik asit bakteri suşlarının nitrit dirençleri

Çizelge 24. Laktik asit bakteri suşların farklı nitrit derişimlerine direnç özelliklerini gösteren sayım sonuçları log (kob/mL)^a

Nitrit (ppm)	Süre (Saat)	<i>P. acidilactici</i> LB A06-02	<i>Lb. gasseri</i> LB A14-01	<i>E. faecium</i> LB A01-01	<i>E. faecium</i> LB K04-03	<i>E. faecium</i> M17 K09-02	<i>E. faecium</i> LB A13-01	<i>Str. salivarius</i> LB A15-01	<i>E. faecium</i> M74	<i>Lb. acidophilus</i> ATCC 4356
50	0	8.12±0.16	8.21±0.44	7.91±0.23	7.76±0.08	7.55±0.31	7.51±0.19	7.96±0.27	7.41±0.32	5.61±0.27
	24	7.33±0.32	7.26±0.59	7.32±0.21	7.63±0.11	7.71±0.09	7.49±0.22	7.67±0.16	6.33±0.49	< 1
100	0	8.06±0.21	8.11±0.33	7.96±0.27	7.88±0.10	7.86±0.21	7.81±0.24	8.06±0.18	7.32±0.12	5.73±0.08
	24	7.33±0.24	8.19±0.84	7.73±0.46	7.79±0.34	7.83±0.49	7.61±0.59	7.33±0.15	5.82±1.48	< 1
200	0	8.09±0.12	8.16±0.20	7.93±0.16	7.82±0.13	7.7±0.07	7.66±0.24	8.01±0.29	7.16±0.05	5.66±0.14
	24	7.19±0.28	8.31±0.62	7.81±0.22	7.56±0.01	7.71±0.27	7.69±0.31	7.63±0.35	5.22±0.49	< 1
Kontrol	0	8.02±0.02	8.33±0.01	7.99±0.01	7.69±0.13	7.69±0.03	7.47±0.24	8.04±0.31	7.52±0.21	5.65±0.07
	24	7.33±0.04	7.66±0.25	7.65±0.06	7.35±0.17	7.67±0.24	7.48±0.01	7.27±0.08	7.37±0.07	5.02±0.07

^a Sayılar iki tekrar çalışmanın ortalamasıdır

Nitrit direnci et ürünlerinde kullanılacak starter kültürler için istenen özellikler arasındadır. Doğal fermente sosisler den izole edilen *Lb. plantarum* suşları ile yapılan çalışmada, bu suşların 150 ppm nitrit konsantrasyonunda MRS agar ortamında gelişebildiklerini tespit edilmiştir (Sawitzki et al., 2009). Korkeala et al. (1992) vakum paketli sosislerden izole ettikleri 24 adet laktik asit bakterisinin 400 ppm nitrit konsantrasyonunda gelişimlerinin önemli ölçüde azaldığını, 200 ppm nitrit konsantrasyonunda ise gelişimlerdeki azalmanın daha az olduğunu belirtmiştir.

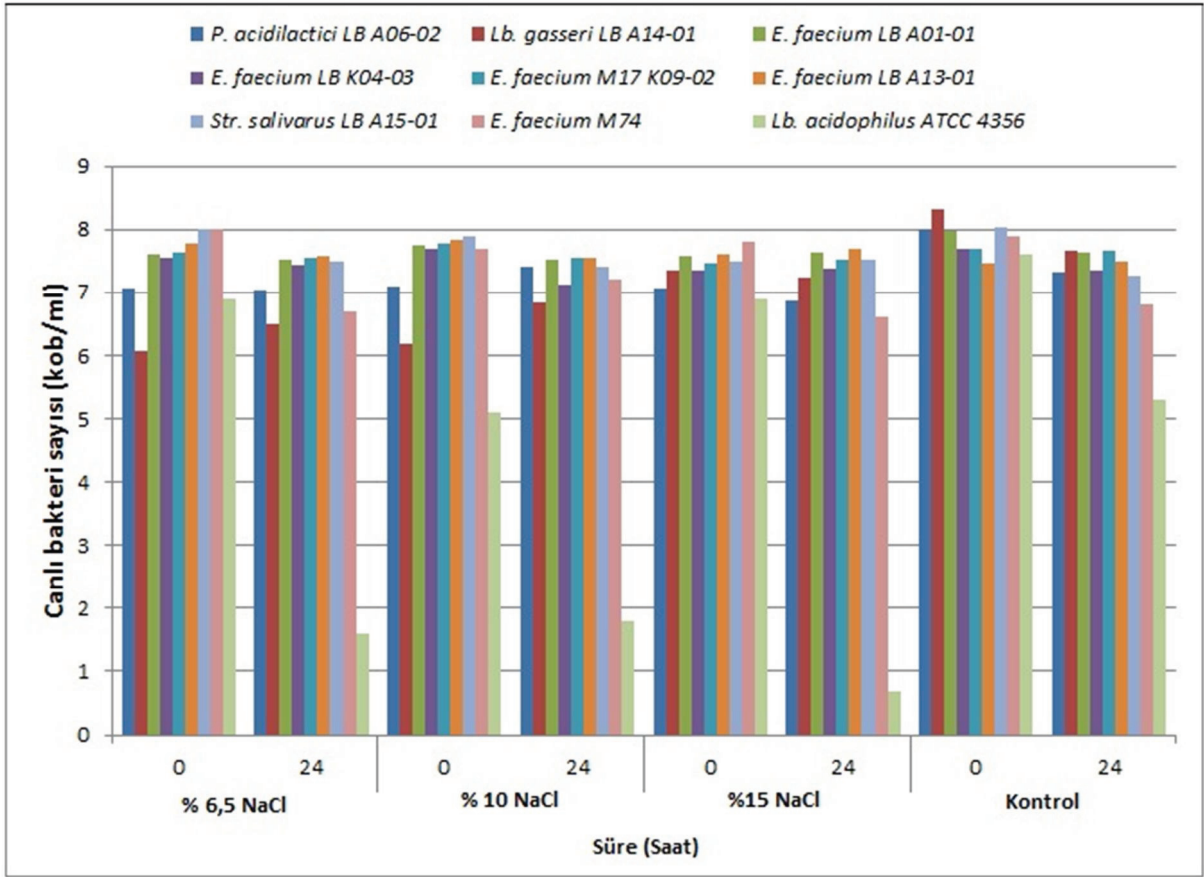
Houben (2003) et ürünlerinden izole edilen *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae* ve *E. gallinarum* suşlarının yüksek tuz ve nitrit derişimlerinde (200 ppm - 800 ppm) ve düşük pH ortamlarında üreme potansiyellerini değerlendirmiş ve test edilen tüm suşların söz konusu koşulları tolere edebildiğini bildirmiştir.

Benzer şekilde çeşitli çalışmalarda laktik asit bakterilerinin et ürünlerinin fermentasyonu sırasında nitrit ve tuz toleranslarından dolayı ortamda canlı kalıp üreyebildikleri ve bu nedenle fermente et ürünlerinden bu bakterilerin sıklıkla izole edilebildiği bildirilmiştir (Giraffa, 2002; Martin et al., 2005a; Gardini et al., 2008).

4.11. Suşların Tuza (NaCl) Direnç Özellikleri

Antimikrobiyel aktivitesi belirlenen suşların % 6.5, % 10'luk ve %15 (w/v) NaCl içeren ortamlara gösterdikleri direnç durumları Şekil 8 ve Çizelge 25'de verilmiştir.

Yapılan denemelerde anne sütünden izole edilen suşların tümünün % 6.5, % 10 ve % 15 NaCl konsantrasyonlarına dirençli oldukları bulunmuştur. *E. faecium* M74 kontrol suşunun % 6.5, % 10 ve % 15'lik tuz derişimlerine dirençli oldukları, ancak *Lb. acidophilus* ATCC 4356 probiyotik suşunun her üç tuz derişimine de dirençli olmadığı belirlenmiştir. *Lb. acidophilus* ATCC 4356 suşunun 24. saat sonundaki sayım sonucunda % 6.5 tuz ortamında kontrole göre 3.64 log, % 10 tuz ortamında 3.78 log, % 15 tuz ortamında ise 4.73 log düzeyinde bir azalma olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 8. Laktik asit bakteri suşlarının Suşların % 6.5, % 10 ve %15'lik (w/v) tuz derişimlerine karşı direnç durumları

Enterokokların yüksek tuz derişimi içeren ortamlarda canlı kalarak üreyebildiğine ilişkin çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Giraffa, 2002; Houben, 2003; Martin et al., 2005a). Rince et al. (2000) çalışmalarında *E. faecalis* ATCC 19433 suşunun BHI broth besiyerinde çözülebilen en yüksek tuz derişimi olan % 28.5 tuz derişiminde dahi canlı kalabildiğini ifade etmiştir.

Papamanoli et al. (2003) doğal fermente sosislerden izole ettikleri 7 adet *Lb. plantarum* suşunun % 6.5 ve % 10 NaCl konsantrasyonlarında gelişebildiklerini bildirmişlerdir.

Çizelge 25. Farklı NaCl derişimlerine maruz bırakılan laktik asit bakteri suşların canlı bakteri sayıları log (kob/mL)^a

NaCl	Süre (Saat)	Kullanılan Suş								
		<i>P. acidilactici</i> LB A06-02	<i>Lb. gasseri</i> LB A14-01	<i>E. faecium</i> LB A01-01	<i>E. faecium</i> LB K04-03	<i>E. faecium</i> M17 K09-02	<i>E. faecium</i> LB A13-01	<i>Str. salivarius</i> LB A15-01	<i>E. faecium</i> M74	<i>Lb. acidophilus</i> ATCC 4356
Kontrol	0	8.02±0.02	8.33±0.02	7.99±0.02	7.69±0.12	7.69±0.21	7.47±0.24	8.04±0.31	7.78±0.27	7.10±0.19
	24	7.33±0.04	7.66±0.25	7.65±0.06	7.35±0.17	7.67±0.24	7.48±0.01	7.27±0.08	7.26±0.07	5.42±0.14
% 6.5	0	7.08±0.04	6.07±0.92	7.62±0.08	7.54±0.39	7.63±0.07	7.77±0.16	8.01±0.45	7.96 ± 0.26	6.76 ± 0.21
	24	7.04±0.04	6.51±0.92	7.52±0.08	7.43±0.39	7.54±0.07	7.59±0.16	7.48±0.45	6.98±0.92	1.78±0.25
% 10	0	7.09±0.47	6.17±1.12	7.75±0.27	7.68±0.5	7.77±0.32	7.83±0.41	7.89±0.65	7.82 ± 0.14	6.68±0.37
	24	7.4±0.47	6.84±1.12	7.51±0.27	7.12±0.5	7.54±0.32	7.54±0.41	7.42±0.65	7.06±0.28	1.64±1.13
% 15	0	7.07±0.18	7.36±1.53	7.59±0.09	7.36±0.05	7.46±0.08	7.62±0.1	7.49±0.05	7.88 ± 0.14	6.92±0.17
	24	6.88±0.18	7.23±1.53	7.65±0.09	7.39±0.05	7.52±0.08	7.69±0.1	7.52±0.05	6.71±0.08	0.69±0.11

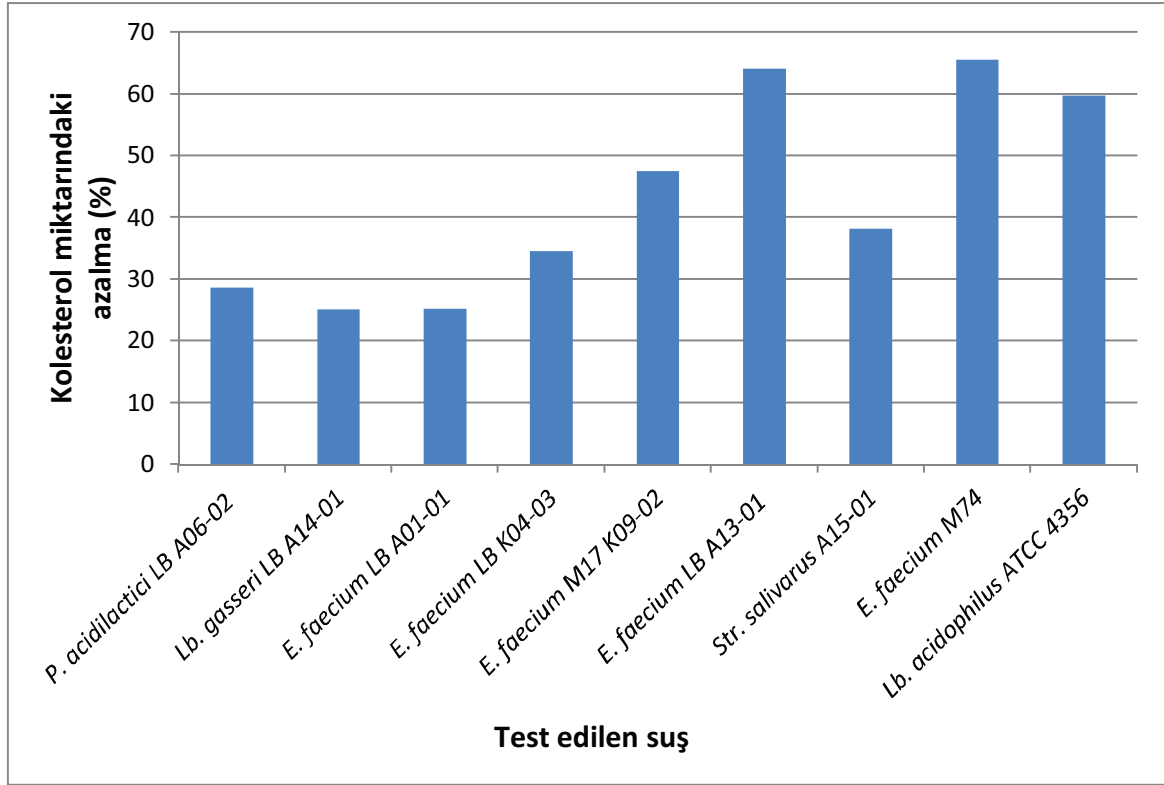
^a Sayılar iki tekrar çalışmanın ortalamasıdır

4.12. Suşların Kolesterolü *in-vitro* Azaltma Özellikleri

Çalışmamızda antimikrobiyel aktivitesi belirlenen *P. acidilactici* LB A06-02, *Lb. gasseri* LB A14-01, *E. faecium* LB A01-01, *E. faecium* LB K04-03, *E. faecium* M17 K09-02, *E. faecium* LB A13-01 ve *Str. salivarius* LB A15-01 suşlarının *in-vitro* kolesterol miktarını sırasıyla % 28.7, % 25.1, % 25.3, % 47.5, % 64.1 ve % 38.2 oranında azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 9). *E. faecium* M74 ve *Lb. acidophilus* ATCC 4356 probiyotik kontrol suşlarının ise kolesterolü sırasıyla % 65.6 ve % 59.8 oranlarında azalttıkları görülmüştür.

Kalp-damar hastalıkları günümüzde en önemli ölüm nedenlerinden biridir. Yüksek kolesterol ise kalp-damar hastalıklarının başlıca nedenleri arasındadır (Lim et al., 2004; Sirilun et al., 2010). Serum kolesterol seviyesinin 1 mmol'den yukarı

ıkmasının kalp-damar hastalıklarını ve ölüm oranını yaklaşık % 35-45 arttırdığı gösterilmiştir. (Liong and Shah, 2005). Serum kolesterolünün % 1 oranında azaltılması kalp damar hastalıkları riskini % 2-3 oranında azaltabilmektedir (Sirilun et al., 2010). Bu nedenle serum kolesterol seviyelerinin azaltılması bu hastalıkların önlenmesi açısından önemlidir.



şekil 9. Laktik asit bakteri suşlarının kolesterol *in-vitro* kullanım zellikleri

Laktik asit bakterileri kolesterolün hücre duvarlarına bağlanması ya da fizyolojik olarak kısa zincirli yağ asitlerine fermentasyonu ile kolesterol miktarını azaltabilmektedir (Begley et al., 2006). Laktik asit bakterilerinin *in-vitro* ortamda kolesterol azaltıcı etkisine ilişkin yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Pereira and Gibson, 2002; Dilmi-Bouras, 2006; Ziarno et al., 2007; Ziarno, 2008). Hlivak ve ark. (2005) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise probiyotik kontrol suşu olarak kullanılan *E. faecium* M74'n klinik çalışmalarda serum kolesterol seviyesini % 12 oranında azalttığı ifade edilmiştir.

Ramasamy et al. (2010) tavuklardan izole edilen *Lb. reuteri*, *Lb. brevis*, *Lb. salivarius* ve *Lb. gallinarum* suşlarının besiyeri ortamındaki kolesterol miktarını % 31 - 85 oranında azalttığını bildirmişlerdir.

Saavedra et al. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada geleneksel peynirlerden izole edilen 11 adet *E. faecium* suşundan 9'unun kolesterolü miktarını % 28.8 - 47.2 oranında azalttığı ifade edilmiştir.

Çalışmada elde edilen veriler ışığında, anne sütünden izole edilen suşların kolesterolü in-vitro olarak azaltıcı etkisi olduğu tespit edilmiş ve suşların söz konusu bu özellik bakımından fonksiyonel kültür olarak kullanılma potansiyelinin bulunabileceği sonucuna varılmıştır.

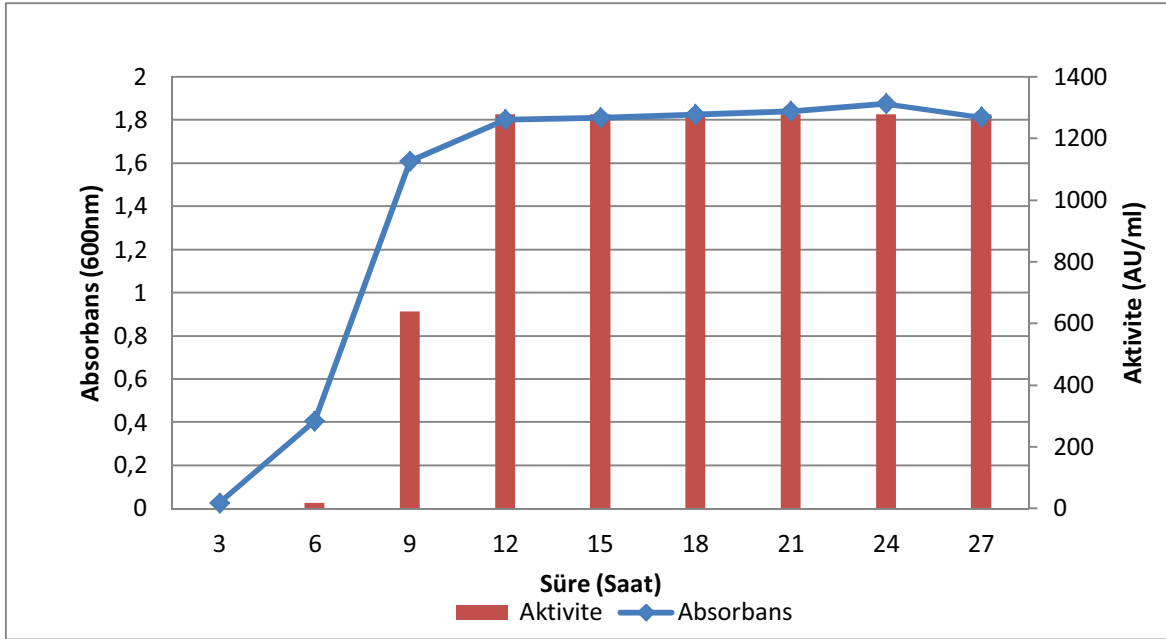
4.13. İzolatların Besiyerinde Gelişimi İle Bakteriyosin Üretim İlişkisinin Belirlenmesi

İzolatların besiyerinde gelişimi ile bakteriyosin üretim ilişkisinin belirlenmesi Bölüm 3.2.14'de belirtildiği şekilde bakterinin üreme eğrisi üzerinden değerlendirme yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde bakteriyosin aktivitesini belirlemek amacıyla test bakterisi olarak daha önceki denemelerde bakteriyosin üreten suşlara karşı en duyarlı olduğu belirlenen *L. monocytogenes* ATCC 7644'e kullanılmıştır. Bakteriyosinlerin antimikrobiyel aktiviteleri bakteri gelişiminin belli zaman aralıklarında örnekler alınarak agar difüzyon yöntemi ile ortaya konulmuştur.

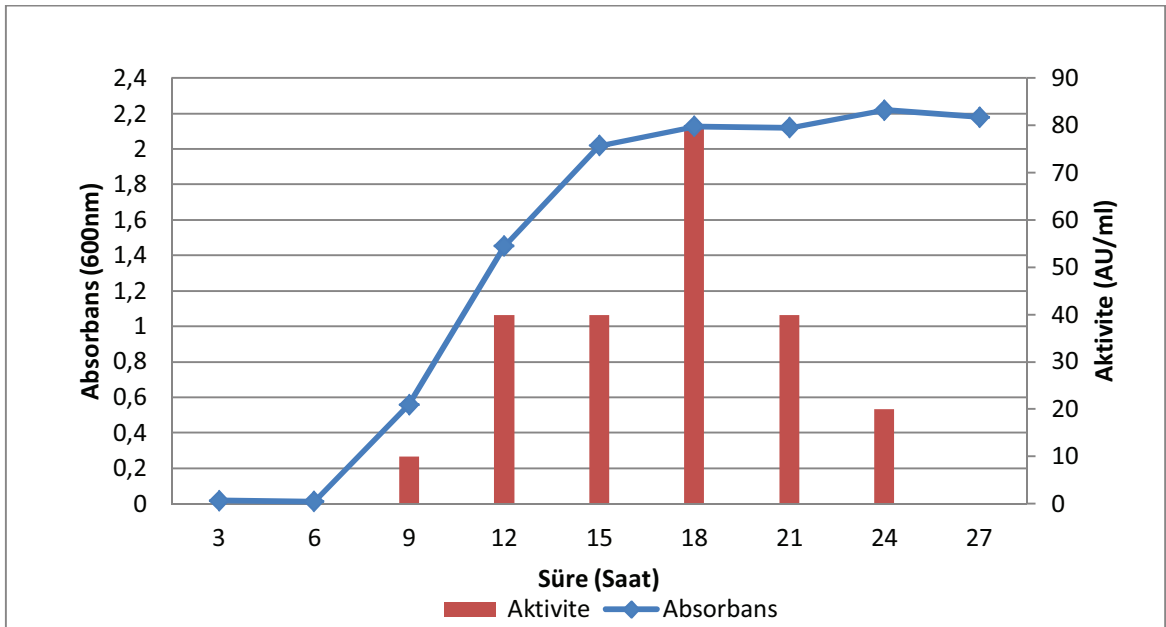
P. acidilactici LB A06-02 suşunun üreme eğrisi ve zamana bağlı bakteriyosin üretim miktarı Şekil 10'da gösterilmiştir. Bakteriyosin üretimi gelişimin logaritmik fazında başlamış (6. Saat, 20 AU/mL) ve durgun fazın başlangıcında (12. Saat, 1280 AU/mL) en yüksek seviyeye gelmiştir. Bakteriyosin aktivitesi 27. saatin sonunda 1280 AU/mL olarak belirlenmiştir.

Lb. gasseri LB A14-01 suşunun üreme eğrisi ve zamana bağlı bakteriyosin üretim miktarı Şekil 11'de gösterilmiştir. Bakteriyosin üretimi gelişimin logaritmik fazında başlamış (9. Saat, 10 AU/mL) ve durgun fazda (18. Saat, 80 AU/mL) en yüksek

seviyeye gelmiştir. Bakteriyosin aktivitesi 21. saatten itibaren azalmaya başlamış 27. saatin sonunda ise bakteriyosin aktivitesi görülmemiştir.

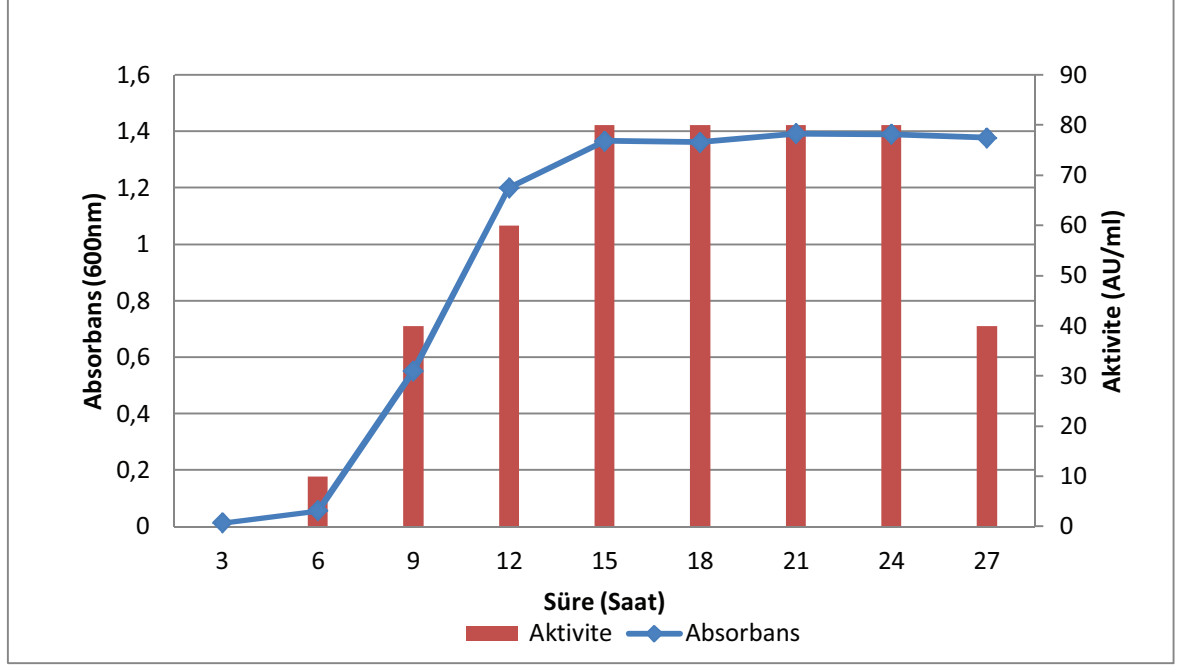


Şekil 10. *Pediococcus acidilactici* LB A06-02 suşunun gelişimi ile bakteriyosin üretimi



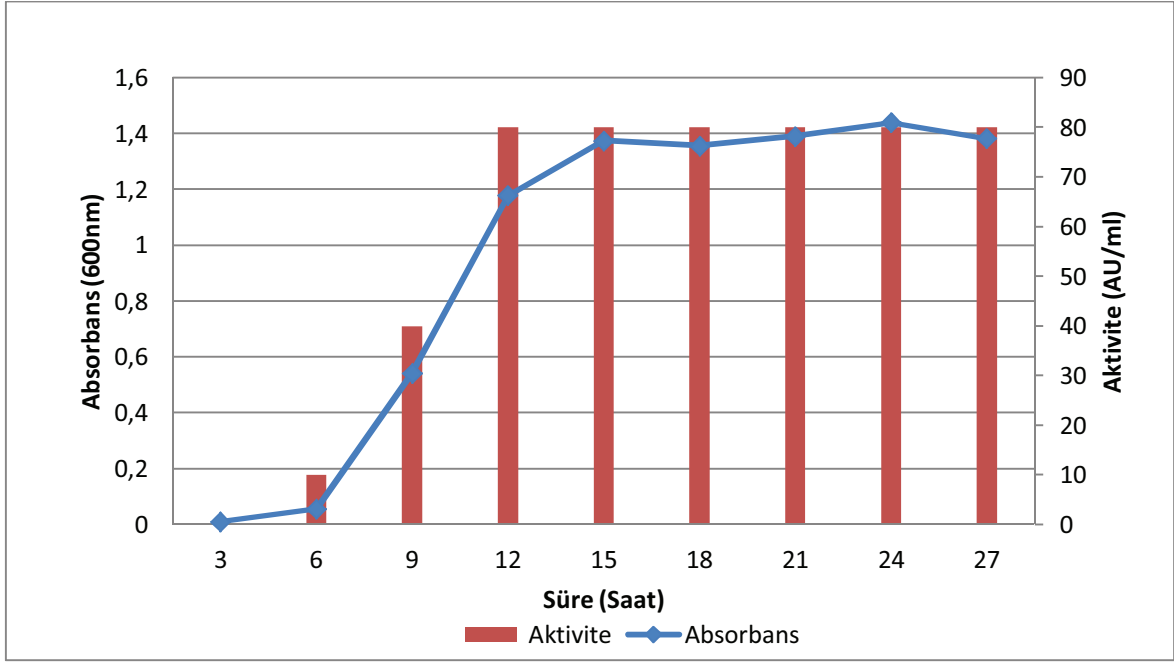
Şekil 11. *Lactobacillus gasseri* LB A14-01 suşunun gelişimi ile bakteriyosin aktivitesi arasındaki ilişki

E. faecium LB A01-01 suşunun bakteriyosin üretimi gelişimin logaritmik fazında başlamış (6. Saat, 10 AU/mL) ve durgun fazın başlarında (15. Saat, 80 AU/ml) en yüksek seviyeye gelmiştir (Şekil 12). Bakteriyosin aktivitesi 24. saatten itibaren azalmaya başlamış 27. saatin sonunda ise bakteriyosin 40 AU/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 12. *Enterococcus faecium* LB A01-01 suşunun gelişimi ile bakteriyosin aktivitesi arasındaki ilişki

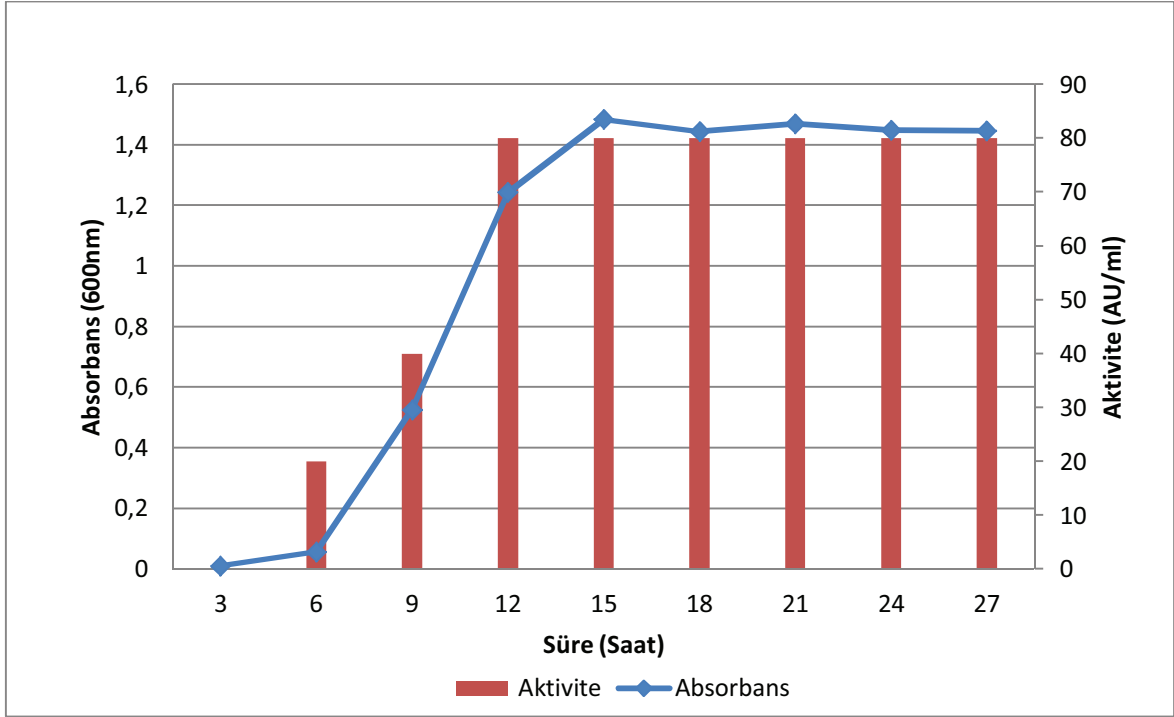
E. faecium LB K04-03 suşunun bakteriyosin üretimi gelişimin logaritmik fazında başlamış (6. Saat, 10 AU/mL) ve logaritmik fazın sonlarına doğru (12. Saat, 80 AU/mL) en yüksek seviyeye gelmiştir (Şekil 13). Bakteriyosin aktivitesi 27. saatin sonunda 80 AU/mL olarak belirlenmiştir.



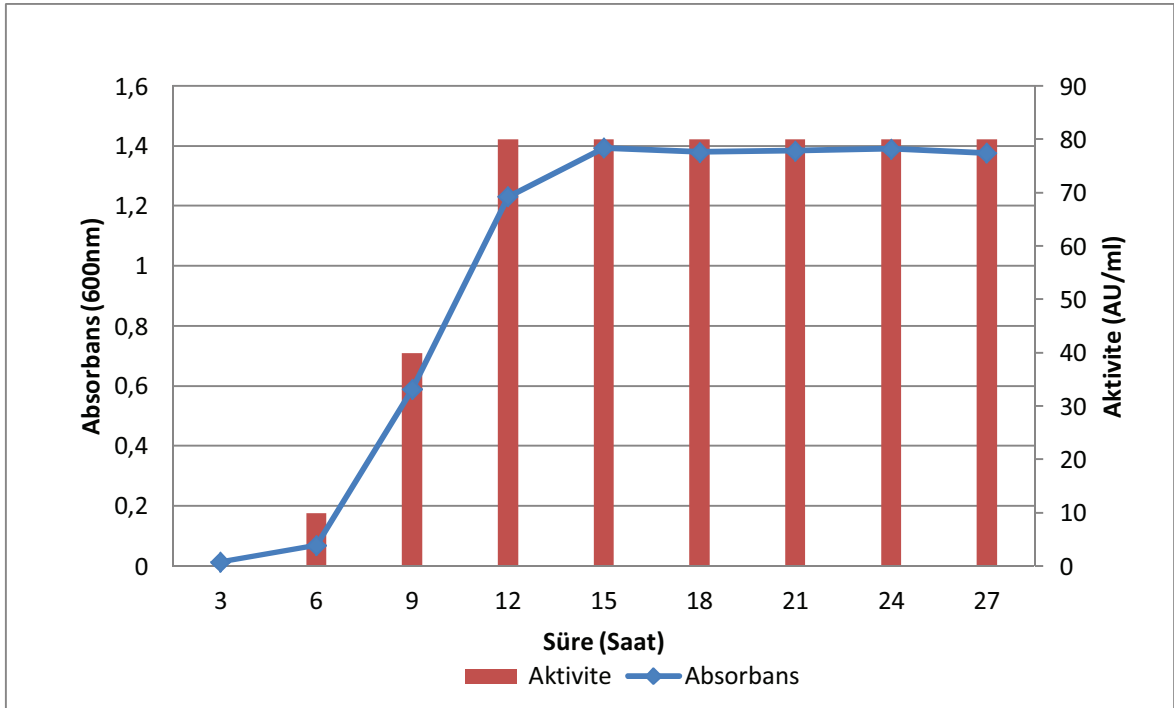
Şekil 13. *Enterococcus faecium* LB K04-03 suşunun gelişimi ile bakteriyosin aktivitesi arasındaki ilişki

E. faecium M17 K09-02 suşunun bakteriyosin üretimi gelişimin logaritmik fazında başlamış (6. Saat, 20 AU/mL) ve logaritmik fazın sonlarına doğru (12. Saat, 80 AU/mL) en yüksek seviyeye gelmiştir (Şekil 14). Bakteriyosin aktivitesi 27. Saatin sonu kadar 80 AU/ml olarak saptanmıştır.

E. faecium LB A13-01 suşunun bakteriyosin üretimi gelişimin logaritmik fazında başlamış (6. Saat, 10 AU/mL) ve logaritmik fazın sonlarına doğru (12. Saat, 80 AU/mL) en yüksek seviyeye gelmiştir (Şekil 15). Bakteriyosin aktivitesi 27. Saatin sonu kadar 80 AU/mL olarak saptanmıştır.

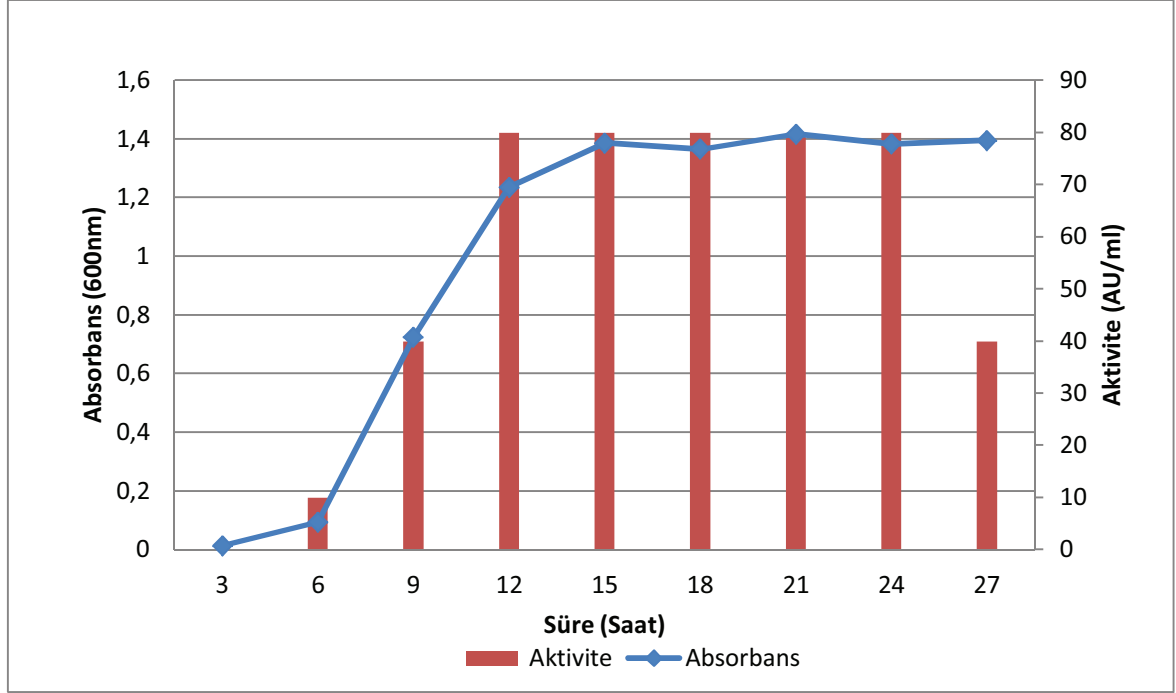


Şekil 14. *Enterococcus faecium* M17 K09-02 suşunun gelişimi ile bakteriyosin aktivitesi arasındaki ilişki



Şekil 15. *Enterococcus faecium* LB A13-01 suşunun gelişimi ile bakteriyosin aktivitesi arasındaki ilişki

Str. salivarius LB A15-01 suşunun bakteriyosin üretimi gelişimin logaritmik fazında başlamış (6. Saat, 10 AU/mL) ve logaritmik fazın sonlarına doğru (12. Saat, 80 AU/mL) en yüksek seviyeye gelmiştir (Şekil 16). Bakteriyosin aktivitesi 24. saatten itibaren azalmaya başlamış 27. saatin sonunda ise bakteriyosin 40 AU/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 16. *Streptococcus salivarius* LB A15-01 suşunun gelişimi ile bakteriyosin aktivitesi arasındaki ilişki

Çoğu bakteri için bakteriyosin üretimi, gelişimin logaritmik fazında başlamakta ve bakteriyosin aktivitesi logaritmik fazın sonunda ya da durgun fazın başlangıcında en üst seviyeye ulaşmaktadır (Strompfova et al., 2007; Ghrairi et al., 2008).

Albano et al. (2007) fermente sosisten izole edilen *P. acidilactic*'nin zamana karşı bakteriyosin üretim yeteneğinin ile belirlenmesi çalışmasında, bu bakterinin bakteriyosinin üretiminin gelişimin logaritmik fazında başladığını (7. saat), duraklama fazında ise en yüksek seviyeye ulaştığını (19.saat), daha sonra ise aktivitenin azalmaya (22. saat) başladığını tespit etmişlerdir. Etten izole edilen *P. parvulus* suşu ile yapılan çalışmada maksimum pediosin aktivitesi inkübasyonun

12. saatinde durgun fazın başlangıcında tespit edilmiştir ve pediosin aktivitesinde 16. saat sonuna kadar bir azalma gözlemlenmemiştir (Schneider et al., 2006).

Ghrai et al. (2008) peynirden izole edilen *E. faecium* ile yaptıkları çalışmada enterosin aktivitesinin logaritmik fazın başlangıcında gözlemlenmeye başladığını (7. Saat) ve logaritmik fazın sonunda (15. Saat) en yüksek aktiviteye ulaştığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar enterosin aktivitesinde 34. saatin sonuna kadar herhangi bir azalma olmadığını belirtmişlerdir.

Str. phocase P180 suşu ile yapılan çalışmada bakteriyosin aktivitesi 2. saatin sonunda gözlemlenmeye başlamış, 12. saatte maksimum aktiviteye ulaşmış ve bakteriyosin aktivitesinde 24. saatin sonuna kadar herhangi bir azalma görülmemiştir. Aynı çalışmada *E. faecium* MC13 suşunun bakteriyosin aktivitesi inkübasyonun 2. saatinde başlamış ve 6 saatte maksimum değere ulaşmıştır. *E. faecium* MC13 bakteriyosin aktivitesi inkübasyonun 16. saatinden sonra azalmaya başlamıştır (Kanmani et al., 2010).

Çalışmamızda bakteriyosin üretimi ile ilgili elde edilen sonuçlar ile literatürde bulunan sonuçlar örtüşmektedir. Buna göre bakteriyosin üretimi gelişimin logaritmik fazında başlamakta ve bakteriyosin aktivitesi logaritmik fazın sonunda ya da durgun fazın başlangıcında en üst seviyeye ulaşmaktadır.

4.14. İzolatların Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Enzim, pH, Isıl İşlem, Bazı Organik Çözücüler ve Kimyasalların Etkisi

Katalaz, proteinaz K, pepsin, tripsin, amilaz ve lipaz enzimlerinin izolatların bakteriyosin aktiviteleri üzerine etkileri Çizelge 26'da verilmiştir. Katalaz uygulaması sonucunda kontrole göre izolatların bakteriyosin aktivitelerinde herhangi bir değişim görülmemiştir. Proteinaz K, ve tripsin uygulamaları sonucunda tüm bakteriyosin örneklerinde aktivite inhibe edilmiştir. Pepsin uygulamasında ise *P. acidilactici* LB A06-02 izolatında bakteriyosin aktivitesi % 97 oranında azalırken, diğer izolatların bakteriyosin aktiviteleri tamamen inhibe olmuştur. Proteolitik enzimler sonucu aktivitenin kaybolması antimikrobiyel aktivite gösteren metabolitin protein kaynaklı olduğunu, dolayısıyla bakteriyosin olduğunu

doğrular niteliktedir. Amilaz ve lipaz enzimleri le *P. acidilactici* LB A06-02 izolatının ürettiği bakteriyosin aktivitesinde herhangi bir değişim görülmezken, diğer suşlarda bakteriyosin aktiviteleri hem amilaz hem de lipaz uygulaması sonucunda kaybolmuştur. Bu sonuçlar *P. acidilactici* LB A06-02 suşu hariç diğer izolatların bakteriyosin yapılarında gliko- ve lipid- yapılarının bulunduğunu göstermektedir.

Çizelge 26. Suşların bakteriyosin aktiviteleri üzerine enzimlerin etkisi

Kullanılan Enzim	Suşlar ve Bakteriyosin Aktiviteleri (AU/mL)						
	<i>P. acidilactici</i> LB A06-02	<i>Lb. gasseri</i> LB A14-01	<i>E. faecium</i> LB A01-01	<i>E. faecium</i> LB K04-03	<i>E. faecium</i> M17 K09-02	<i>E. faecium</i> LB A13-01	<i>Str. salivarius</i> A15-01
Kontrol	1280	80	80	80	80	80	80
Katalaz	1280	80	80	80	40	80	80
Proteinaz K	-	-	-	-	-	-	-
Pepsin	40	-	-	-	-	-	-
Tripsin	-	-	-	-	-	-	-
α -amilaz	1280		-	-	-	-	-
Lipaz	1280	20	-	-	-	-	-

Suşların ürettiği bakteriyosinlerin pH stabiliteleri Çizelge 27’de verilmiştir. Genel olarak test edilen bakteriyosinler pH 2-8 arasında stabilitelerini korumuş, pH 9-10 arasında ise aktivitelerde yaklaşık %50 kayıp olmuştur. pH 11’de *Lb. gasseri* LB A14-01 ve *E. faecium* LB K04-03 suşlarının bakteriyosin aktivitelerinin % 75 oranında azalmasına rağmen devam ettiği, diğer izolatların bakteriyosin aktivitelerinin ise inhibe olduğu tespit edilmiştir. pH 12’de ise çalışılan tüm bakteriyosinler aktivitelerini kaybetmiştir. Çalışmada kullanılan bakteriyosinlerin geniş bir pH aralığında aktif olması bu bakteriyosinlerin probiyotik gıdalarda ve çeşitli gıdaların formülasyonlarında kolaylıkla kullanılabileceğini göstermektedir.

Çizelge 27. Suşların bakteriyosin aktiviteleri üzerine pH'ın etkisi

pH	Suşlar ve Bakteriyosin Aktiviteleri (AU/mL)							
	<i>P. acidilactici</i> LB A06-02	<i>Lb. gasseri</i> LB A14-01	<i>E. faecium</i> LB A01-01	<i>E. faecium</i> LB K04-03	<i>E. faecium</i> M17 K09-02	<i>E. faecium</i> LB A13-01	<i>Str. salivarius</i> A15-01	Kontrol
2	1280	80	80	80	80	80	80	0
3	1280	80	80	80	80	80	80	0
4	1280	80	80	80	80	80	80	0
5	1280	80	80	80	80	80	80	0
6	1280	80	80	80	80	80	80	0
7	1280	80	80	80	80	80	80	0
8	1280	80	80	80	80	80	80	0
9	640	40	40	80	40	40	40	0
10	160	40	40	40	40	40	40	0
11	0	20	0	20	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0

Laktik asit bakterilerinin bakteriyosin aktivitelerinin belirlenmesinde bu bakteriler tarafından üretilen asit ve hidrojen peroksitin gösterdiği antogonist etkinin bakteriyosin aktivitesi ile karıştırılmaması gereklidir. Bu sebeple pH ve hidrojen peroksit kaynaklı inhibitör aktivitelerinin elimine edilmesi gerekmektedir. Katalaz ve pH etkisi elimine edildikten sonra antimikrobiyel etki korunmuş ancak proteaz uygulaması sonucu antimikrobiyel aktivite kaybolmuştur. Bu veriler antimikrobiyel etki yapan maddenin protein doğasında olduğunu doğrular niteliktedir.

Tükel et al. (2007) *Lc. lactis* spp. *lactis* MC38 suşunun ürettiği bakteriyosin aktivitesi üzerine enzim, pH ve sıcaklığın etkisini araştırmıştır. Proteinaz K ve α -kimotripsin uygulaması sonucunda bakteriyosin aktivitesinin kaybolduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar α -amilaz, katalaz, pepsin ve tripsin enzimlerinin bakteriyosin aktivitesine herhangi bir etkisini gözlemlememişlerdir. Bu suşun ürettiği bakteriyosinin 100 °C'de ısıtılma dirençli olduğunu belirlemişlerdir.

Ayrıca söz konusu bakteriyosin aktivitesinde pH 2-8 aralığında herhangi bir etki kaybı olmazken pH 9'dan sonra bakteriyosin etkisinde azalma meydana gelmiş ve pH 11'de herhangi bir bakteriyosin aktivitesine rastlanmamıştır.

Yapılan bir çalışmada *Str. thermophilus* suşunun ürettiği bakteriyosinin pH 3-10 aralığında aktivitesini koruduğu ve 65-100 °C de 30 dakika ısıtma işlemine dayanıklı iken, 121 °C'de 15 dakikada aktivitesini kaybettiği tespit edilmiştir. Bu bakteriyosinin proteinaz K ve proteaz enzimlerine duyarlı olduğu tripsin ve amilaz uygulaması sonucu aktivitesini koruduğu belirtilmiştir. Ayrıca söz konusu bakteriyosin aktivitesinin lipaz uygulaması sonucu kaybolmasının, bakteriyosin yapısında lipid içerikli bileşenlerin bulunduğunu işaret ettiği belirtilmiştir (Aslam et al., 2011).

Osmanağaoğlu et al. (1998) *P. acidilactic*'den izole ettikleri pediosin ile yaptıkları çalışmada bu bakteriyosinin proteaz, proteinaz K, tripsin ve α -kimotripsin uygulamalarına duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. Pediosin katalaz ve lipaz uygulamasına dirençli bulunmuştur. Bu bakteriyosin aktivitesi pH 3-9 (25 °C, 24 sa.) arasında stabil iken, pH10'da kaybolmaktadır.

Bakteriyosinlerin proteolitik enzimlere duyarlı olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Bakteriyosinlerin amilaz ve lipaz enzimlerine karşı duyarlı olması yapılarında karbonhidrat ya da lipid bileşenlerinin bulunduğunun ve bu bileşenlerin bakteriyosin aktivitesini sağlamada yardımcı olduğunun bir göstergesidir. Bakteriyosin aktivitesinin geniş bir pH aralığında stabil olması ise bakteriyosinlerin sindirim sisteminde etki göstermeleri açısından avantaj sağlamaktadır. Sindirim sisteminde pH mideden kalın bağırsağa pH 2-7 arasında değişebilmektedir (Du Toit et al., 2000).

Du Toit et al. (2000) domuz dışkılarından izole ettikleri *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının bakteriyosin aktiviteleri katalaz ve lipaz uygulaması sonucunda devam ederken, pepsin, proteinaz K ve tripsin uygulaması sonucunda kaybolmuştur. Bu suşlarının ürettiği bakteriyosinler pH 2 - 9 arasında aktivitesini sürdürmüştür. pH 10 – 11'de ise *E. faecalis* suşlarının ürettiği bakteriyosin aktivitesinde belirli bir

oranda azalma olmasına rağmen aktivite görülmüş, *E. faecium* suşlarında ise bu pH aralığında bakteriyosin aktivitesi kaybolmuştur.

Çalışmamızda *Lb. gasseri* LB A14-01, *E. faecium* LB A01-01, *E. faecium* LB K04-03, *E. faecium* M17 K09-02, *Enterococcus faecium* LB A13-01 ve *Str. salivarius* LB A15-01 suşlarının bakteriyosin aktivitesi α -amilaz ve lipaz uygulaması sonucu inhibe olmuştur. Bakteriyosinlerin α -amilaz ve lipaz duyarlılığı çok karşılaşılmayan bir durumdur. Bu sonuçlar gliko- ve lipid- yapılarının bakteriyosinlerin aktivitelerinde yer aldığının bir göstergesidir. Literatürde yapılan araştırmalarda çalışmamızdaki sonuçlar ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. *Lb. helveticus* LP27 suşunun ürettiği laktosin ve *Leu. paramesenteroides* tarafından izole edilen leuconocin S α -amilaz enzimine duyarlı bulunmuşlardır (Lewus et al., 1992; Upreti and Hinsdill, 1973).

Metanol, etanol ve kloroformun suşların bakteriyosin aktivitesi üzerine herhangi bir etkisi bulunmamıştır (Çizelge 28). Yüksek konsantrasyonda SDS'nin (% 5) bakteriyosin içermeyen kontrol örneği yüksek inhibisyon etkisi gösterdiğinden dolayı bu konsantrasyonda suşların bakteriyosin aktiviteleri belirlenememiştir. *P. acidilactici* LB A06-02 izolatının bakteriyosin aktivitesi %1 SDS, % 1 β -merkaptetaetanol, % 10 β -merkaptetaetanol ve % 10 β -merkaptetaetanol - % 1 SDS uygulamaları sonucunda sırasıyla %50, %75, %75 ve %75 oranında azalmıştır. Diğer izolatların ürettiği bakteriyosinler ise %1 SDS, % 1 β -merkaptetaetanol, % 10 β -merkaptetaetanol ve % 10 β -merkaptetaetanol - % 1 SDS uygulamalarından etkilenmemiştir.

Yüksek konsantrasyonda SDS ve β -merkaptetaetanol'ün disülfid bağlarını etkileyerek özellikle "sınıf 2" bakteriyosinlerin aktivitesinde azalmaya yol açtığı rapor edilmiştir. Şahingil et al. (2011) bozadan izole edilen *Lc. lactis* spp. *lactis* BZ suşunun ürettiği laktokoksin ile yaptıkları çalışmada, %1 SDS, %10 kloroform ve %10 etanol uygulamasından sonra bakteriyosin aktivitesinde değişim gözlemezken, %10 β -merkaptetaetanol uygulaması sonucunda aktivitede %50 azalma gözlemlenmiştir. Bu sonucun çalışılan laktokoksin aktif bölgesinde sınıf 2a bakteriyosinlere benzer olarak disülfid bağlarının olabileceğini gösterdiğini belirtmişlerdir.

Çizelge 28. Suşların bakteriyosin aktiviteleri üzerine metanol, kloroform, SDS ve β -merkaptetaetanol'ün etkisi

Kullanılan Kimyasal	Suşlar ve Bakteriyosin Aktiviteleri (AU/mL)							
	<i>P. acidilactici</i> LB A06-02	<i>Lb. gasseri</i> LB A14-01	<i>E. faecium</i> LB A01-01	<i>E. faecium</i> LB K04-03	<i>E. faecium</i> M17 K09-02	<i>E. faecium</i> LB A13-01	<i>Str. salivarius</i> A15-01	Kontrol
Kontrol	1280	80	80	80	80	80	80	0
Metanol (% 10)	1280	80	80	80	80	80	80	0
Etanol (% 10)	1280	80	80	80	80	80	80	0
Kloroform (% 10)	1280	80	80	80	80	80	80	0
SDS (% 10)	- ^a	-	-	-	-	-	-	320
SDS (% 1)	640	80	80	80	80	80	80	40
β -merkaptetaetanol (%1)	320	80	80	80	80	80	80	0
β -merkaptetaetanol (%10)	320	80	80	80	80	80	80	0
β -merkaptetaetanol + SDS (%10 + %1)	320	80	80	80	80	80	80	40

a) Kullanılan kimyasalın kontrolünde belirlenen yüksek inhibisyon nedeniyle bakteriyosin antimikrobiyel aktivitesi belirlenememiştir.

Diğer bir çalışmada ise *Str. thermophilus* suşunun ürettiği bakteriyosinde β -merkaptetaetanol uygulaması sonucunda aktivite kaybı olmasının bakteriyosin yapısında disülfid bağlarının bulunduğu bir göstergesi olduğu belirtilmiştir. Çalışmada, bu bakteriyosin etanol (% 5), kloroform (% 5), metanol (% 5) ve SDS (% 1) uygulamalarına dirençli bulunmuştur (Aslam et al., 2011).

Osmanağaoğlu et al. (1998) *P. acidilactici* suşundan izole ettikleri pediosini kloroform (% 10) ve etanol (% 10) uygulamalarına dirençli bulmuşlardır.

İzolatların bakteriyosin aktivesine ısı işlemlerin etkisi Çizelge 29'da verilmiştir. Bakteriyosinlerin tümü 60, 80 ve 100 °C'de ısı işleme dayanıklı bulunmuştur. *P. acidilactici* LB A06-02'nin bakteriyosin aktivitesinde 100 °C'de 30 dakika ısı işlem sonucunda sadece % 50 azalma görülmüş diğer izolatların bakteriyosin aktivitelerinde ise herhangi bir değişim görülmemiştir. Otoklavda 121 °C de 15

dakika ısıtıl işlem sonucunda *E. faecium* LB A01-01 *E. faecium* LB K04-03, *E. faecium* M17 K09-02, *E. faecium* LB A13-01 *Str. salivarius* LB A15-01'in bakteriyosin aktiviteleri inhibe olurken, *P. acidilactici* LB A06-02 ve *Lb. gasseri* LB A14-01 izolatının bakteriyosin aktiviteleri sırasıyla % 98.5 ve % 50 oranlarında azalmıştır. Çalışmada kullanılan bakteriyosinlerin tümü yüksek sıcaklıklara dayanıklı bulunmuştur. Bu bakteriyosinlerin ısıya dayanıklı Sınıf 1 ve ya sınıf 2 bakteriyosinler olduğuna işaret etmektedir.

Çizelge 29. Yüksek sıcaklık uygulamasının suşların bakteriyosin aktiviteleri üzerine etkisi

Süre – Sıcaklık (dakika - °C)	Suşlar ve Bakteriyosin Aktiviteleri (AU/mL)						
	<i>P. acidilactici</i> LB A06-02	<i>Lb. gasseri</i> LB A14-01	<i>E. faecium</i> LB A01-01	<i>E. faecium</i> LB K04-03	<i>E. faecium</i> M17 K09-02	<i>E. faecium</i> LB A13-01	<i>Str. salivarius</i> A15-01
10 dakika							
60 °C	1280	80	80	80	80	80	80
80 °C	1280	80	80	80	80	80	80
100 °C	1280	80	80	80	80	80	80
30 dakika							
60 °C	1280	80	80	80	80	80	80
80 °C	1280	80	80	80	80	80	80
100 °C	640	80	80	80	80	80	80
15 dakika							
121 °C	20	40	0	0	0	0	0

Laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosinler genel olarak 60 ile 100 °C de 30 dakika ısıtıl işlemle dayanabilmekte, bazı bakteriyosinler ise otoklavda 121 °C 15 dakika ısıtıl işlem sonunda (laktasin B, laktasin F) etkilerini gösterebilmektedir. Sınıf 1 ve 2 bakteriyosinlerin ısıtıl işlemlere dayanıklılıkları küçük, hidrofobik yapıda ve üçüncül yapı göstermemeleriyle açıklanabilmektedir (De Vuyst and Vandamme, 1994).

Osmanağaoğlu et al. (1998) *P. acidilactici* suşundan elde ettikleri pediosin aktivitesi 93 °C'de 15 dakika ve 121 °C de 15 dakika ısıtım sonrası aktivitesi devam etmiştir. Pediosinin lipaz ve organik çözücülerden etkilenmemesinin bakteriyosin yapısında lipid bileşenlerinin bulunmadığını gösterdiği belirtilmiştir.

Du Toit et al. (2000) domuz dışkılarından izole ettikleri *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının bakteriyosin aktivitelerini inceledikleri çalışmalarında, bu suşların ürettiği bakteriyosinlerin 65, 80 ve 100 °C 30 dakikalık ısıtım dayanıklı olduklarını görmüş ve genel olarak bakteriyosin aktivitelerinde bir düşüş belirlememişlerdir. 121 °C'de 15 dakikalık ısıtım sonrasında ise bakteriyosin aktivitelerinde %75-94 oranlarında azalma tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda elde edilen bakteriyosinlerin 60, 80 ve 100 °C'de uygulanan ısıtım dayanıklı olduğu, 121 °C'de uygulanan ısıtım ise duyarlı olduğu görülmüştür.

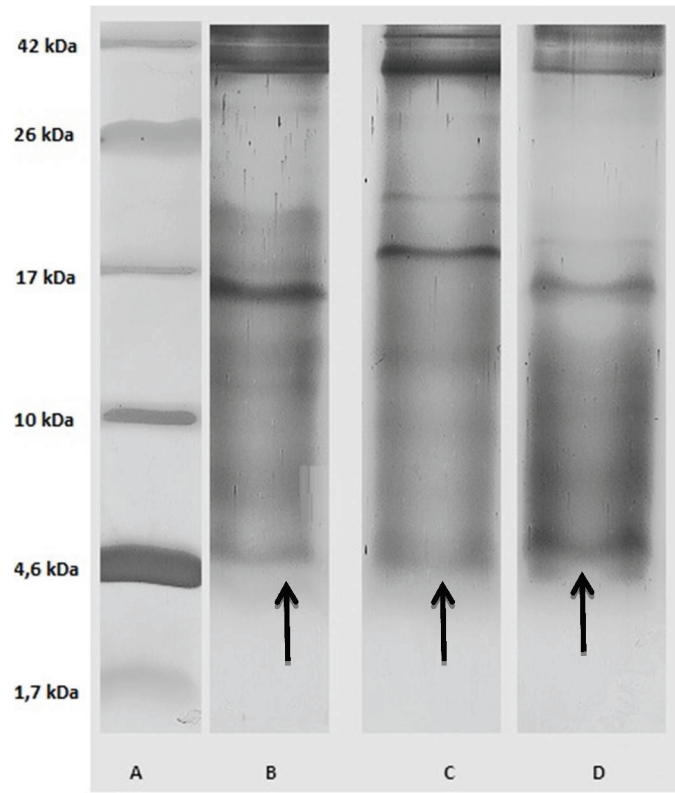
4.15. Kısmi Saf Bakteriyosin Preparatlarının Moleküler Büyüklüğünün SDS-PAGE İle Belirlenmesi

Amonyum sülfat ile çöktürülerek kısmen saflaştırılan *P. acidilactici* LB A06-02, *Lb. gasseri* LB A14-01, *E. faecium* LB A01-01, *E. faecium* LB K04-03, *E. faecium* M17 K09-02, *E. faecium* LB A13-01 ve *Str. salivarius* LB A15-01 bakteriyosin örneklerindeki protein içerikleri sırasıyla 0.99, 1.08, 0.87, 0.73, 1.16, 0.83 ve 1.04 mg/mL olarak tespit edilmiştir.

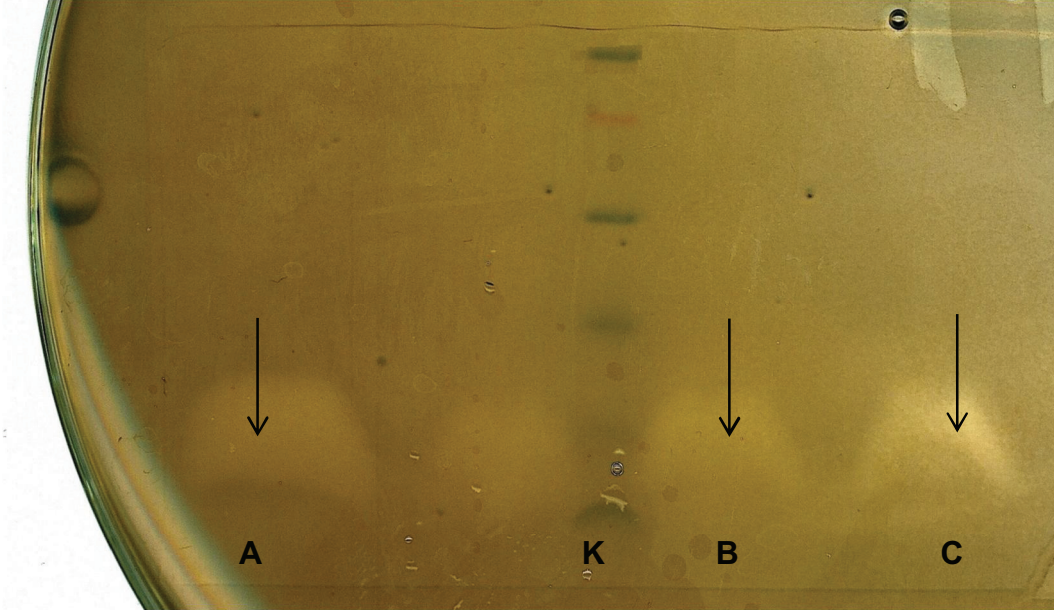
Bakteriyosin örnekleri molekül ağırlığının belirlenmesi için %4, %10 ve %16'lık gradyan jel kullanılarak Trisin-SDS elektroforez işlemine alınmıştır. Elde edilen jellerdeki hangi bantların antimikrobiyel aktiviteden sorumlu olduğunu belirlemek için jeller Bölüm 3.2.22.'de anlatıldığı şekilde *L. monocytogenes* ATCC 7644'e karşı antimikrobiyel etki testine alınmıştır.

P. acidilactici LB A06-02, *Lb. gasseri* LB A14-01 ve *Str. salivarius* LB A15-01 suşlarının ürettiği bakteriyosinlere ait boyanmış ve antimikrobiyel etkisini gösteren jeller Şekil 17 ve 18'de verilmiştir. Bu jellere göre *P. acidilactici* LB A06-02, *Lb. gasseri* LB A14-01, ve *Str. salivarius* LB A15-01 izolatları için bakteriyosin

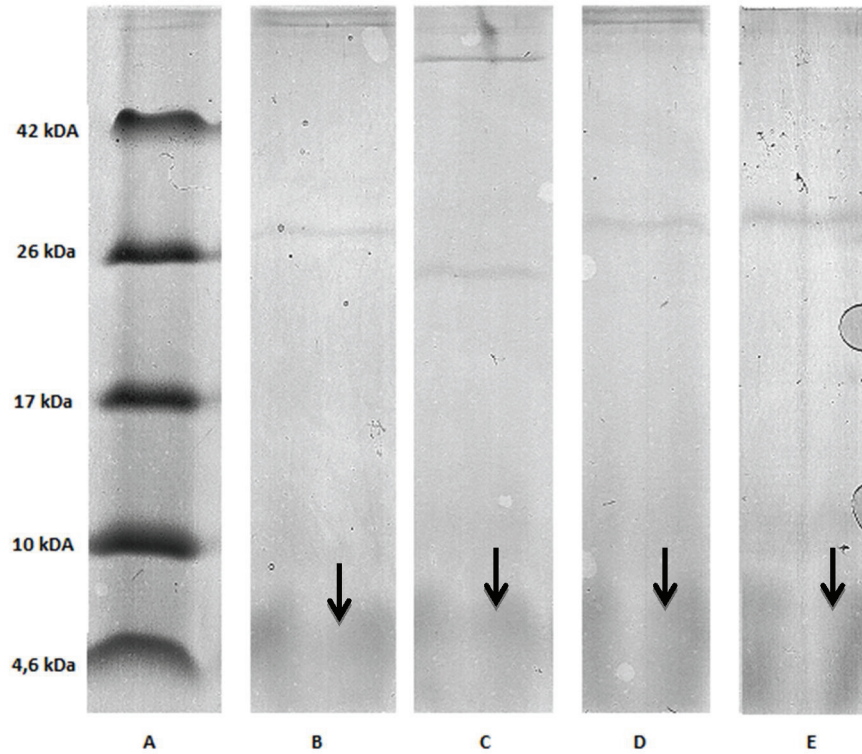
moleküler büyüklükleri Bölüm 3.2.22.'de belirtildiği şekilde hesaplanmış ve yaklaşık olarak sırasıyla 5.23, 5.00 ve 5.25 kDa olarak belirlenmiştir. Şekil 19 ve 20'de *E. faecium* LB A01-01, *E. faecium* LB K04-03, *E. faecium* M17 K09-02, *E. faecium* LB A13-01 suşlarının ürettiği bakteriyosinlere ait boyanmış ve antimikrobiyel etkiyi gösteren jeller verilmiştir. Buna jellere göre *E. faecium* LB A01-01, *E. faecium* LB K04-03, *E. faecium* M17 K09-02, *E. faecium* LB A13-01 suşlarına ait bakteriyosinlerin moleküler büyüklükleri yaklaşık olarak sırasıyla 5.02, 4.93, 4.48 ve 4.96 kDa olarak tespit edilmiştir.



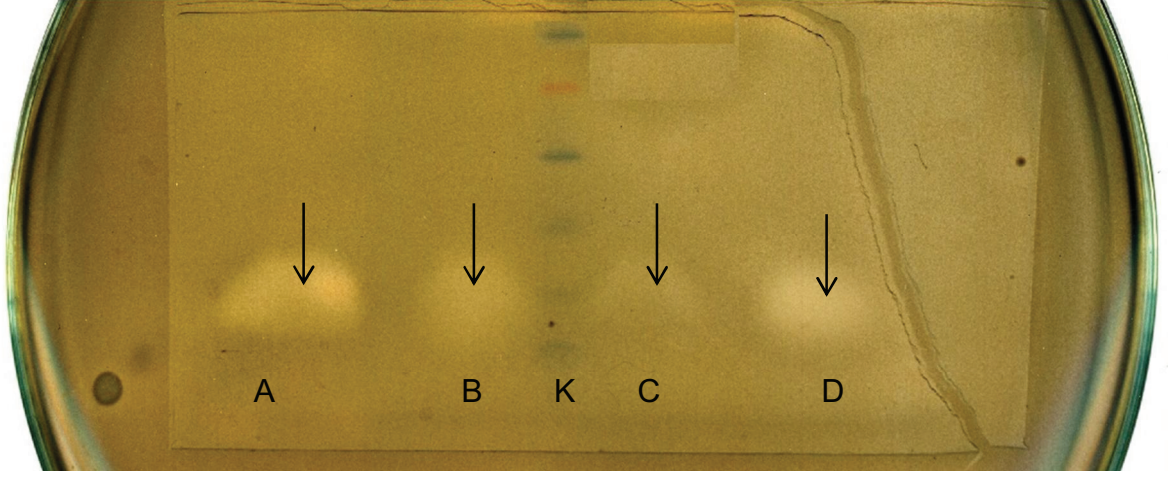
Şekil 17.Moleküler marker (A), *Pediococcus acidilactici* LB A06-02 (B), *Lactobacillus gasseri* LB A14-01 (C), *Streptococcus salivarius* LB A15-01 (D) suşları Tris-Glycine SDS-PAGE jeli.



Şekil 18. *Pediococcus acidilactici* LB A06-02 (A), *Lactobacillus gasseri* LB A14-01 (B) ve *Streptococcus salivarius* LB A15-01 (C) suşlarının *Listeria monocytogenes* ATCC 7644'e karşı inhibitör etkisi gösteren Tris-Glycine-SDS-PAGE jeli. Moleküler marker (K).



Şekil 19. Moleküler marker (A); *Enterococcus faecium* LB A01-01 (B), *Enterococcus faecium* LB K04-03 (C), *Enterococcus faecium* M17 K09-02 (D) ve *Enterococcus faecium* LB A13-01 (E) suşları Tris-Glycine-SDS-PAGE jeli.



Şekil 20. *Enterococcus faecium* LB A01-01 (A), *Enterococcus faecium* LB K04-03 (B), *Enterococcus faecium* M17 K09-02 (C) ve *Enterococcus faecium* LB A13-01 (D) suşlarının *Listeria monocytogenes* ATCC 7644'e karşı inhibitör etkisi gösteren Tris-SDS-PAGE jeli. Moleküler markör (K).

Gassericin A'nın *L. monocytogenes*, *B. cereus* ve *S. aureus* gibi gıda patojenlerine karşı antimikrobiyel etkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Itoh et al., 1995; Kawai et al., 2001). Kimyasal yapısı incelendiğinde *E. faecalis* suşlarından elde edilen enterosinlere benzer şekilde gassericin A'nın sınıf 2 bakteriyosinler içinde ve halka yapısında olduğu belirlenmiştir (Joosten et al., 1996; Martínez-Bueno et al., 1996).

Leer et al. (1995) *Lb. acidophilus*'un ürettiği acidocin B'nin molekül ağırlığını SDS-PAGE ile 2.4 kDa olarak bulurken, DNA sekansına göre molekül ağırlığını 5.8 kDa olarak hesaplamışlardır. Buna benzer olarak, başka bir çalışmada *Lb. gasseri*'nin ürettiği gassericin A moleküler ağırlığı SDS-PAGE sonucunda 3.8 kDa olarak bulunurken, kütle spektroskopisi sonucunda molekül ağırlığı 5.652 kDa olarak tespit edilmiştir. Araştırmacılar molekül ağırlığındaki bu farkın bakteriyosinin üçüncül yapısı ve bakteriyosinin saflaştırılmasında kullanılan katkılardan kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir (Kawai et al., 1998). Çalışmamızda *Lb. gasseri* LB A14-01 suşunun ürettiği bakteriyosin molekül ağırlığı ise yaklaşık olarak 5.00 kDa olarak bulunmuş olup, bu sonuç yukarıda belirtilen gassericin molekül ağırlığı ile uyum göstermektedir.

Aslam et al. (2011) *Str. salivarius* spp. *thermophilus* suşunun ürettiği bakteriyosin molekül ağırlığını SDS-PAGE ile 2.7 kDa olarak tespit etmişlerdir.

Osmanağaoğlu et al. (1998) *P. acidilactici* F suşundan elde edilen pediocin F in molekül ağırlığını 4.46 kDa olarak belirlemişlerdir. Yapılan çalışmalarda pediocin ağırlığı 2.7 kDa ile 16.6 kDa arasında değiştiği bildirilmiştir ve molekül ağırlıklarındaki bu değişikliğin nedeninin kullanılan metotlardaki farklılıklardan kaynaklanabileceği belirtilmiştir. (Gonzalez and Kunka, 1985; Anastasiadou et al., 2008). Çalışmamızda *P. acidilactici* LB A06-02 suşundan elde edilen bakteriyosin molekül ağırlığı yaklaşık 5.23 kDa olarak bulunmuştur. Bu molekül ağırlığı yukarıda belirtilen literatür verileri ile uyum göstermektedir.

Parada et al. (2007) *E. faecium* suşunun ürettiği enterosin A molekül büyüklüğünü 4.8 kDa olarak bildirmişlerdir. Cintas et al. (2001) ise enterosin P ve enterosin A molekül büyüklüklerini sırasıyla 4.63 ve 4.83 kDa olarak belirtmişlerdir. Çalışmamızda enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosin molekül ağırlıkları belirtilen çalışmalarla uyum göstermektedir.

Küçük molekül ağırlıklara sahip maddelerin elektroforez yöntemi ile moleküler ağırlıklarının tam olarak belirlenmesi mümkün olmamaktadır. Ayrıca izolasyon yöntemine bağlı olarak ortaya çıkabilen bakteriyosin yan gruplarının kaybı da bakteriyosin moleküler büyüklüğün tam olarak tespit edilmesini engelleyebilmektedir (Bonade et al., 2001; He et al., 2006). Bu sebeple elektroforez ile yaklaşık olarak molekül ağırlığı belirlenen bakteriyosinlerin molekül ağırlıkları kütle spektroskopisi gibi daha ileri tekniklerle doğrulanmalıdır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Laktik asit bakterileri gıdaların aroma gelişiminde rol oynayan proteolitik ve lipolitik enzim aktivitelerinden dolayı peynir ve sucuk gibi fermente gıdalara starter ya da yardımcı kültür olarak eklenebilmekte ya da sahip oldukları kolesterol düşürücü etki ve antimikrobiyel aktivite gibi özellikleri ile probiyotik kültür olarak kullanılabilir.

Anne sütünden izole edilen laktik asit bakterilerinin patojenlere karşı koruma gibi yararlı etkilerinin olabilmesinin yanı sıra bu bakterilerin insan kaynaklı olması, bebekler tarafından uzun süre tüketilmesi durumunda güvenli olması, süt ve bağırsak mukoza yapısına adaptasyon ve mukozaya tutunma gibi insan probiyotikleri için genel olarak önerilen özellikleri taşıması dikkatlerin bu bakteriler üzerine yoğunlaşmasına neden olmuştur. Ancak bu konuda ülkemizde yapılmış çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu bakımdan, Türkiye’deki anne sütlerinin laktik asit bakteri florasının belirlenmesine yönelik olarak gerçekleştirilen araştırmaların literatürdeki önemli bir boşluğun doldurulmasına katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada anne sütünden izole edilen laktik asit bakterileri fizyolojik, biyokimyasal (API 50 CHL ve API 20 Strep test kitleri kullanılarak) testler ve 16S rRNA dizi analiz yöntemleri kullanılarak tanımlanması hedeflenmiştir. Elde edilen tanımlama sonuçları karşılaştırıldığında API test kitleri ile elde edilen sonuçların 16S rRNA tanımlama sonuçları ile tutarlı olmadığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında kullanılan fenotipik yöntemlerin ve ticari test kitlerinin veri tabanlarının laktik asit bakterilerini tanımlamada yeterli olmadığı ve güncellenmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle laktik asit bakterilerinin tanımlamalarında yaygın olarak kullanılan fizyolojik ve biyokimyasal testlerin 16S rRNA dizi analizi gibi ileri moleküler tekniklerle doğrulanması gerektiği düşünülmektedir.

Çalışmamızda 16S rRNA analizleri sonucunda anne sütü izolatlarının 23 adedinin *Enterococcus faecalis*, 6 adedinin *E. faecium*, 8 adedinin *Streptococcus salivarius*, 5 adedinin *Str. mitis*, 1 adedinin *Str. peroris*, 2 adedinin *Lactobacillus gasseri*, 1

adedinin *Str. parasanguinis*, 1 adedinin *E. durans* ve 1 adedinin *Pediococcus acidilactici* suşu oldukları belirlenmiş, 5 adet izolat ise tür düzeyinde tanımlanamamıştır.

Çalışmamızda kullanılan suşlarda belirlenen yüksek asit fosfataz aktivitesinin vücutta kalsiyum ve fosfor absorpsiyonunun arttırılması, β -glukosidaz aktivitesinin ise gıdalarda bulunan şekerleri kullanabilme potansiyelleri yönleriyle önemli olduklarına literatürde detaylı olarak değinilmiştir. Ayrıca, çalışmamızda tanımlanan suşların büyük çoğunluğunun sahip olduğu yüksek esterase (C4 ve C8), yüksek lösin ve sistein arilamidaz ve düşük proteinaz (tripsin ve kimotripsin) aktiviteleri ile fermente gıdaların üretiminde tipik aroma ve yapının oluşumunda rol alabileceği düşünülmektedir.

Gıda zinciri antibiyotik dirençliliğinin insan ve hayvan popülasyonları arasında aktarılması için ana yol olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle gıdalarda kullanılan laktik asit bakterilerinde antibiyotik direnç özelliklerinin belirlenmesi önem taşımaktadır. Tez kapsamında çalışılan laktik asit bakterisi olarak tanımlanmış suşların büyük bir bölümünün kloramfenikol, ampisilin, penisilin, vankomisin ve gentamisine duyarlı, kanamisin ve eritromisine karşı ise dirençli olduğu tespit edilmiştir. Laktik asit bakterilerinin sahip oldukları antibiyotik direnç özelliklerini aynı ortamda bulundukları bakterilere plazmitler aracılığıyla aktarma potansiyelleri göz önünde bulundurulmalıdır. Bu sebeple, tez kapsamında antibiyotik direnç özellikleri belirlenen suşların ileri araştırmalarda aktarılabilir direnç genleri açısından da incelenmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda, test edilen laktik asit bakteri suşlarının hiçbirisinin histidin'i dekarboksilize edemediği tespit edilmiştir. *Str. salivarius* LB A7-03 suşu hariç olmak üzere, incelenen laktik asit bakteri suşlarının hiç birisinin ornitin ve lizin'i dekarboksilize edemediği, buna karşılık büyük bir çoğunluğunun tirozin dekarboksilasyonu gösterdikleri belirlenmiştir.

Yüksek miktarda biyojen amin içeren gıdaların tüketimi çeşitli sağlık problemlerine yol açabilmektedir. Bu tez çalışması kapsamında bakteriyosin ürettiği belirlenen suşların genel olarak düşük biyojen amin oluşturma potansiyelleri ve test edilen

antibiyotiklere karşı duyarlı olmaları bakımından gıda ürünlerinde starter ve ya probiyotik kültür olarak kullanımının güvenli kabul edilebileceği düşünülmektedir.

Son yıllarda patojenler üzerine antimikrobiyel etki göstermeleri nedeniyle bakteriyosinlerin gıdalarda kullanımı üzerine yapılan araştırmalar artmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen bakteriyosinlerin, yüksek sıcaklıklara dirençli olmaları, geniş bir pH aralığında aktivitelerini sürdürebilmeleri ve gıda patojenlerine karşı antimikrobiyel etki göstermeleri nedeniyle bu bakteriyosinleri üreten suşların starter kültür olarak ya da saf bakteriyosin katkısı şeklinde gıdaların üretiminde koruyucu olarak kullanılma potansiyelleri olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda tanımlanan suşların ürettikleri bakteriyosinler küçük molekül ağırlıklı (4.45 – 52.5 kDa) ve yüksek sıcaklığa (100 °C, 30 dakika) dayanıklı peptidler olarak tanımlanmıştır. *Lb. gasseri* LB 14-01, *E. faecium* LB A01-01, *E. faecium* LB K04-03, *E. faecium* M17 K09-02, *E. faecium* LB A13-01 ve *Str. salivarius* A15-01 suşlarının ürettiği bakteriyosinlerin α -amilaz ve lipaz uygulaması sonucu aktivitelerini yitirdikleri ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar gliko- ve lipid- yapılarının bakteriyosinlerin aktivitelerinde fonksiyon üstlenebileceğinin bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Söz konusu edilen bu laktik asit bakterilerinin bakteriyosinlerindeki yapısal bu özellik pek çok laktik asit bakteriyosinlerinden yapısal yönden farklılık arz etmektedir. Literatürde yapısında gliko- ve lipid- bileşenler içeren bakteriyosinler üzerine yeterli çalışma bulunmamaktadır. Tez kapsamında belirlenen bu bakteriyosinlerin yapısında bulunan bu yan grupların ileri biyokimyasal ve moleküler analizlerle tespiti bu konuda bilgi birikiminin oluşturulması açısından önem taşımaktadır.

Çalışma kapsamında tanımlanan laktik asit bakterilerinin probiyotik bakterilerde bulunan patojenlere karşı antimikrobiyel etki göstermeleri, kolesterol düşürücü etkileri, asit ve safra dirençleri ve insan kaynaklı olmaları gibi özelliklere sahip olmaları dolayısıyla, probiyotik olarak kullanılma potansiyelleri bulunmaktadır. Ancak bakterilerin probiyotik olarak kullanıma uygunluğunun bağırsakta tutunma gibi ilave testlerle desteklenmesi gerekmektedir.

Elde edilen sonuçlar topluca değerlendirildiğinde, anne sütünden izole edilen bakteriyosin üreten laktik asit bakteri suşlarının gıdaların kalitesinin ve güvenliğinin iyileştirilmesinde starter kültür ve sağlık üzerine yararlı etkileri ile probiyotik olarak kullanılma potansiyellerinin bulunduğu düşünülmektedir.

Diğer taraftan, suşların probiyotik potansiyellerinin *in vivo* araştırılmasının yanında gıda endüstrisinde starter ya da yardımcı kültür olarak da değerlendirilebilmeleri amacıyla bu bakterinin gıda ortamındaki davranışlarının yapılacak ürün denemeleriyle belirlenmesi de önem arz etmektedir.

Son yıllarda giderek önem kazanan ve tüketimi yaygınlaşan starter ve probiyotik bakteri suşlarının üretimi ve kullanımı dünya çapında büyük bir pazar payı oluşturmuştur. Ancak bu bakterilerin üretimi ve ticari preparat olarak piyasaya sunumu çok sınırlı sayıdaki bazı firmalar tarafından gerçekleştirilmektedir. Tez kapsamında tanımlanan bu suşların ülkemizde bir kültür koleksiyonu alt yapısı oluşturulmasının yanısıra ve ülkemiz gıda endüstrisinde yerli doğal suşların kullanımına olanak sağlanacağı ve bu sayede de ülke ekonomisinin bu yönde dışa bağımlılığının belli ölçülerde de olsa azaltılmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Martinez-Canamero, M., Galvez, A., 2006, Bacteriocin production, plasmid content and plasmid location of enterocin P structural gene in enterococci isolated from food sources. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 331-337.
- Ahmad, M., Smith, D.G., Mahboob, S., 2003, Determination of heat resistance of exponential phase enterococcal cells. *Online Journal of Biological Sciences, Asian Network for Scientific Information*. 3, 340-346.
- Ahmed, E.F., 2003, Genetically modified probiotics in foods. *Trends in Biotechnology*, 21 (11), 491 - 497.
- Akçelik, O., Tükel, Ç., Özcengiz, G., Akçelik, M., 2006, Characterization of bacteriocins from two *Lactococcus lactis* spp. *lactis* isolates. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50, 306-313.
- Albano, H., Pinho, C., Leite, D., Barbosa, J., Silva, J., Carneiro, L., Magalhães, R., Hogg, T., Teixeira, P., 2009a, Evaluation of a bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for “Alheira”, a fermented meat sausage, *Food Control*, 20 (8), 764-770.
- Albano, H., Reenen, C. A., Todorov, S.D., Cruz, D., Fraga, L., Hogg, T., Dicks, L.M. Teixeira, P., 2009, Phenotypic and genetic heterogeneity of lactic acid bacteria isolated from "Alheira, a traditional fermented sausage produced in Portugal. *Meat Science*, DOI: 10.1016/j.meatsci.2009.02.009.
- Albano, H., Todorov, S.D., Van Reenen, C.A., Hogg, T., Dicks, L.M.T., Teixeira, P., 2007, Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from “Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. *International Journal of Food Microbiology*, 116, 239-247.

- Albesharat, R., Ehrmann, M.A., Korakli, M., Yazaji, S., Vogel, R.F., 2011, Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Systematic and Applied Microbiology*, 34, 148-155.
- Al-Saleh, A., Metwalli, A.M.M., Abu-Tarboush, H.M., 2006, Bile salts and acid tolerance and cholesterol removal from media by some lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Saudi Society Food and Nutrition*, 1(1), 1-24.
- Altuntaş, G., E., Ayhan, K., Okcu, G., Erkanlı, K., Balcı, M.H., Sonakın, Ş.S., 2010, Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel aktiviteleri. *Gıda*, 35(3), 197-203.
- Ammor, M.S., Florez, A.B., Mayo, B., 2007b, Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24, 559-570.
- Ammor, M.S., Mayo, B., 2007a, Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update, *Meat Science*, 76, 138-146.
- Ananou, S., Garriga, M., Hugas, M., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., Galves, A., Valdivia, E., 2005, Control of *Listeria monocytogenes* in model sausages by enterocin AS-48. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 179-190.
- Anastasiadou, S., Papagianni, M., Filiouis, G., Ambrosiadis, I., Koidis, P., 2008, Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: Production conditions, purification and characterization. *Biosource Technology*, 99, 5384, 5390.
- Arici, M., Bilgin, B., Sagdic, O., Ozdemir, C., 2004, Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. *Food Microbiology*, 21, 19-24.

- Arihara, K., Ogihara, S., Sakata, J., Itoh, M., Kondo, Y., 1991, Antimicrobial activity of *Enterococcus faecalis* against *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology, 13, 190-192.
- Aslam, M., Shahid, M., Rehman, F.U., Naveed, N.H., Batool, A.I., Sharif, S., Asia, A., 2011, Purification and characterization of bacteriocin isolated from *Streptococcus thermophilus*. African Journal of Microbiology Research, 5(18), 2642-2648.
- Aslım, B., Beyatlı, Y., 2004, Antibiotic resistance and plasmid DNA contents of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Turkish yogurts, Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 28, 257-263.
- Aslim, B., Kilic, E., 2006, Some probiotic properties of vaginal lactobacilli isolated from healthy women. Japanese Journal of Infectious Diseases, 59, 249-253.
- Aslim, B., Yuksekdağ, Z.N., Sarıkaya, E., Beyatlı, Y., 2005, Determination of the bacteriocin-Like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. LWT - Food Science and Technology, 38, 691-694.
- Axelsson, L., 2004, Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. Lactic acid bacteria. Salminen S., von Wright, A., Ouwehand, A. (eds.), Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Ayhan, K. ve Durlu-Özkaya, F., 2007, Biogenic amines in foods. Metabolism and Applications of Lactic acid Bacteria. Barbaros Özer (eds.). Research Signpost, 37/661 (2), Kerala, India. pp. 27.
- Bakari, D., Tatsadjieu, N.L., Mbawala, A., Mbofung, C.M., 2011, Assessment of physiological properties of some lactic acid bacteria isolated from the intestine of chickens use as probiotics and antimicrobial agents against enteropathogenic bacteria. Innovative Romanian Food Biotechnology, 8, 33-40.

- Barry, A.L., Kolstad, J., 1983, Proteolytic systems in lactic acid bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49, 225-245.
- Begley, M., Hill, C., Gahan, C.G.M., 2006, Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1729-1738.
- Belgacem, Z.B., Abriouel, H., Omar, N.B., Lucas, R., Martinez-Canamero, M., Galvez, A., Manai, M., 2010, Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from Artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control*, 21, 462–470.
- Bonade, A., Murelli, F., Vescovo, M., Scolari, G. 2001, Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*. *Letters in Applied Microbiology*, 33 (2), 153-158.
- Bouksaim, M., Lacroix, C., Audet, P., Simard, R.E., 2000, Effects of mixed starter composition on nisin Z production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis UL719 during production and ripening of Gouda cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 59, 141-156.
- Bover-Cid, S., Holzapfel, W. H., 1999, Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 53 (1), 33-41.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C., 2001, Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 185-189.
- Boyd, M.A., Antonio, M.A., Hillier, S.L., 2005, Comparison of API 50 CH strips to whole chromosomal DNA probes for identification of *Lactobacillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5309-5311.
- Bradford, M., 1976, A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

- Brolazo, E.M., Leite, D.S., Tiba, M.R., Villarroel, M., Marconi, C., Simoes, J.A., 2011, Correlation between API 50 CH and multiplex polymerase chain reaction for the identification of vaginal lactobacilli in isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 225-232.
- Brown, K.H., Black, R.E., Lopez, R.G, Creed, K.H., 1989, Infant feeding practices and their relationship with diarrheal and other diseases in Huascar (Lima), Peru. *Pediatrics* 83, 31-40.
- Canzek-Majhenic, A., Rogelj, I., Perko, B., 2005, Enterococci from Tolminc cheese: Population structure, antibiotic susceptibility and incidence of virulence determinants. Short communication. *International Journal of Food Microbiology*, 102:239-244.
- Cariolato, D., Andrighetto, C., Lombardi, A., 2008, Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. *Food Control*, 19(9), 886-892.
- Carr, F.J., Chill D., Maida, N., 2002, The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4):281–370.
- Cebrian, R., Banos, A., Valdivia, E., Perez-Pulido, R., Martines-Bueno, M., Maqueda, M., 2012, Characterization of functional, safety and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48 producer strain. *Food Microbiology*, 30, 59-67.
- Chagnaud, P., Machinis, K., Coutte, L.A., Marecat, A., Mercenier, A., 2001, Rapid PCR based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. *Journal of Microbiological Methods*, 44, 139-148.
- Cheigh, C. I., Choi, H. J., Park, H., Kim, S.B., Kook, M.C., Kim, T.S., Hwang, J.K., Pyun, Y.R., 2002, Influence of growth conditions on the production

of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. Journal of Biotechnology, 95(3), 225-235.

Chen, H., Hoover, D.G. 2003. Bacteriocins and their food applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2, 82-100.

Cingi, M.İ., Erol, K., 1996, Farmakoloji, Erdoğan, M. (editor), T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları No:494.

Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F., Hernandez, P.E., 2001, Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. Food Science and Technology International, 7(4), 281-305.

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I. F., Chikindas, M.L., 2001, Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology, 71, 1-20.

Coşansu, S., Kuleasan, H., Ayhan, K., Materon, L., 2007, Antimicrobial activity and protein profiles of *Pediococcus* spp. isolated from Turkish “Sucuk”. Journal of Food Processing and Preservation, 31, 190–200.

Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2005, Bacteriocins: developing innate immunity for food, Nature Reviews Microbiology, 3(10), 777-788.

Çakır, İ., Çakmakçı, M.L., 2004, Probiyotikler: tanımı, etki mekanizması, seçim ve güvenilirlik kriterleri. Gıda, 29 (6), 427-434.

Çataloluk, O., Göğebakan, B., 2004, Presence of drug resistance in intestinal lactobacilli of dairy and human origin in Turkey, FEMS Microbiology Letters, 236, 7-12.

Çıtak, S., Yucel, N., Mendi, A., 2005, Antibiotic resistance of enterococcal isolates in raw milk. Journal of Food Processing and Preservation, 29, 183–195.

Çıtak, S., Yücel, N., Orhan, S., 2004, Antibiotic resistance and incidence of Enterococcus Species in Turkish white cheese. International Journal of Dairy Technology, 57, 27-31.

- Çolak, H., Aksu, H., 2002, Gıdalarda biyojen aminlerin varlığı ve amin oluşumunu etkileyen faktörler. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 13, 35-40.
- Çon, A.H., Gökalp, H.Y., 2000, Production of bacteriocin-like metabolites by lactic acid cultures isolated from sucuk samples, Meat Science, 55, 89-96.
- Daeschel, M.A., Jung, D.S., Watson, B.t., 1991, Controlling wine malolactic fermentation with nisin and nisin-resistant strains of *Leuconostoc oenos*. Applied and Environmental Microbiology, 57, 601-603.
- Danielsen, M., Simpson, P.J., O'Connor, E.B., Ross, R.P., Stanton, C., 2007, Susceptibility of *Pediococcus* spp. to antimicrobial agents. Journal of Applied Microbiology, 102(2), 384-389.
- De Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., Schrezenmeir, J., 2001, Probiotics compensation for lactase insufficiency. American Journal of Clinical Nutrition 73 (2), 421-429.
- De Vuyst, L., Leroy, F., 2007, Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 13, 194-199.
- De Vuyst, L., Vandamme, E.J., 1994, Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications. L. De Vuyst, E.J. Vandamme (eds.), Blackie, London. pp. 91-142.
- Delgado, S., O'Sullivan, E., Fitzgerald, G., Mayo, B., 2007, Subtractive screening for probiotic properties of lactobacillus species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics. Journal of Food Science, 72, 310-314.
- Dellaglio, F., Dicks, L.M.T., Torrani, S., 1995, The genus *Leuconostoc*. The lactic acid bacteria, the genera of lactic acid bacteria Volume 2. Woods,

- B.J.B., Holzapfel, W.H. (eds), Blackie Academix & Professional, Glasgow. pp. 19-55.
- Denkova, R., Ilieva, S., Nikolova, D., Denkova, Z., Yanakieva, V., 2012, Identification and examination of some probiotic properties of the strain *Lactobacillus* Lbrz12. Food and Environment Safety, 9(1), 60-65.
- Dewan, S., Tamang, J.P., 2006, Microbial and analytical characterization of Chhu – a traditional fermented milk product of the Sikkim Himalayas. Journal of Scientific & Industrial Research, 65, 747-752.
- Dewan, S., Tamang, J.P., 2007, Dominant lactic acid bacteria and their technological properties isolated from the himalayan ethnic fermented milk products. Antonie van Leeuwenhoek, 92, 343-352.
- Dilmi-Bouras, A., 2006, Assimilation (in vitro) of cholesterol by yogurt bacteria. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 13, 49-53.
- Dimitonova, S.P., Bakalov, B.V., Aleksandrova-Georgieva, R.N., Danova, S.T., 2008, Phenotypic and molecular identification of lactobacilli isolated from vaginal secretions. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 41, 469-477.
- Domig, K. J., Mayer, H.K., Kneifel, W., 2003, Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp. 1. Media for isolation and enumeration, Review article. International Journal of Food Microbiology, 88, 147– 164.
- Du Toit, M., Franz, C.M.A.P., Dicks, L.M.T., Holzapfel, W.H., 2000, Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. Journal of Applied Microbiology, 88, 482-494.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., C O'Sullivan, G., Shanahan, F., and Collins J.K., 2001, *In-vitro* selection criteria for

probiotic bacteria of human origin: Correlation with in vivo findings. The American Journal of Clinical Nutrition, 73, 386-392.

Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunali, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., 2001, Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from beyaz cheese made from raw ewes' milk. Journal of Applied Microbiology, 91, 861-870.

Eaton, T.J., Gasson, M.J., 2001, Molecular screening of *Enterococcus* Virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Applied and Environmental Microbiology, 67 (4), 1628-1635.

EFSA (European Food Safety Authority), 2011, Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods, EFSA Journal, 9(10), 1-93.

Esperanza, F.R., M.D., Ricarchito, B.M., 1989, Antimicrobial activity of breastmilk against common pediatric pathogens. Philippine Journal of Microbiology and Infectious Diseases, 18(2), 67-74.

Fernandez, M.F., Boris, S., Barbes, C., 2003, Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology, 94, 449-455.

Foulquie-Moreno, M.R., Rea, M. C., Cogan, T. M. De Vuyst, L., 2003, Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. International Journal of Food Microbiology, 81(1), 73-84.

Foulquie-Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., 2006, The role and application of enterococci in food and health. Review. International Journal of Food Microbiology, 106, 1 – 24.

- Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E., 1999, Enterococci at the crossroads of food safety? Review. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 1–24.
- Franz, C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancanneyt, M., Swings, J., Holzapfel, W.H., 2001, Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4385–4389.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H., 2003, Enterococci in foods - a conundrum for food safety. Review article. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 105– 122.
- Frece, J., Kos, B., Beganovic, J., Vukovic, S., Suskovic, J., 2005, *In vivo* testing of functional properties of three selected probiotic strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 1401-1408.
- Fuller, R., 1989, Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Microbiology*, 66(5), 365-378.
- 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.
- Garai, G., Duenas, M.T., Irastorza, A., Moreno-Arribas, M.V., 2007, Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 473-478.
- Garcia-Ruiz, A., Gonzales-Rompinelli, E.M., Bartolome, B., Moreno-Arribas, M.V., 2011, Potential of wine associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines. *International Journal of Food Microbiology*, 148, 115-120.
- Gardini, F., Bover-Cid, S., Tofalo, R., Belletti, N., Gatto, V., Suzzi, G., Torriani, S., 2008, Modeling the aminogenic potential of *Enterococcus faecalis* EF37 in dry fermented sausages through chemical and molecular

approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (9), 2740–2750.

Ghraiiri, T., Frere, J., Berieaud, L.M., Manai, M., 2008, Purification and characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. *Food Control*, 19, 162-169.

Giraffa, G., 2002, Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 163-171.

Goff, J.H., Bhunia, A.K., Johnson, M.G., 1996, Complete Inhibition of Low Levels of *Listeria monocytogenes* on Refrigerated Chicken Meat with Pediocin AcH Bound to Heat-Killed *Pediococcus acidilactici* Cells. *Journal of Food Protection*, 59 (11), 1187-1992.

Gomes, B.C., Esteves, C.T., Palazzo, I.C.V., Darini, A.L.C., Felis, G.E., Sechi, L.A., Franco, B.D.G.M., De Martinis, E.C.P., 2008, Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Journal of Food Microbiology*, 59, 141-156.

Gonzalez, C. F., Kunka, B. S., 1985, Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 532-534.

Grande, M.J., Lucas, R., Abriouel, H., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Martínez-Cañamero, M., Valvidia, E., Gálvez, A., 2005, Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 289–297.

Grande, M.J., Lucas, R., Abriouel, H., Valvidia, E., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A., 2006, Inhibition of *Bacillus licheniformis* LMG 19409 from rosy cider by enterocin AS-48. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 422–428.

Guantam, N., Sharma, N., 2009, Bacteriocin: Safest approach to preserve food products. *Indian Journal of Microbiology*, 49, 204-211.

- Hagen, M. and Narvhus, J.A., 1999, Production of ice cream containing probiotic bacteria. *Milchwissenschaft*, 54 (5), 265-268.
- Hajikhani, R., Beyatli, Y., Aslim, B., 2007, Antimicrobial activity of enterococci strains isolated from white cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 60 (2), 105-108.
- Hammes, W.P., Vogel, R.F., 1995, The Genus *Lactobacillus*. The lactic acid bacteria, The Genera of Lactic Acid Bacteria Volume 2, Woods, B.J.B., Holzapfel, W.H. (eds.), Blackie Academic & Professional, Glasgow. pp. 19-55.
- Hardie, J.M., Whiley, R.A., 1997, Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 83, 1-11.
- Harris, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.E., Klaenhammer, T.R., 1989, Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 52: 384-387.
- Harwood, V.J., Delahoya, N.C., Ulrich, R.M., Kramer, M.F., Whitlock, J.E., Garey, J.R., Lim, D.V., 2004, Molecular confirmation of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* from clinical, faecal and environmental sources. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 476-482.
- He, L., Chen, W., Liu, Y. 2006, Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis*. *ZJU12. Microbiological Research*, 161 (4), 321-326.
- Heikkila, M.P., Saris, P.E.J., 2003, Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk, *Journal of Applied Microbiology*, 95, 471-478.
- Heng, N.C.K., P.A., Wescombe, J.A., Burton, J.P. Jack, R.W., Tagg, J.R., 2007, The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. *Bacteriocins*

Ecology and Evolution. Riley, M.A., Chavan, M.A (eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 45-83.

Herreros, M.A., Sandoval, H., Gonzales, L., Castro, J.M., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., 2005, Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada Cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiology*, 22, 455-459.

Hlivak, P., Odraska, J., Ferencik, M., Ebringer, L., Jahnova, E., Mikes, Z., et al., 2005, One-year application of probiotic strain *Enterococcus faecium* M74 decreases serum cholesterol levels, Clinical study. *Bratislava Medical Journal*, 106, 67-72.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T., 1994, *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins, USA. 9th edition.

Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Veld, J.H.J., 1998, Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 85-101.

Houben, J.H., 2003, The potential of vancomycin-resistant enterococci to persist in fermented and pasteurized meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 11-18.

Huang, Y., Zheng, Y., 2009, The probiotic *Lactobacillus acidophilus* reduces cholesterol absorption through the down-regulation of Niemann-Pick C1-like 1 in Caco-2 cells. *British Journal of Nutrition* 9, 1-6.

Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T., 2003, Functionality of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology* 88, 223-233.

Itoh, T., Fujimoto, Y., Kawai, Y., Toba, T., Saito, T., 1995, Inhibition of food-borne pathogenic bacteria by bacteriocins from *Lactobacillus gasseri*. *Letters in Applied Microbiology*, 21, 137-141.

- Ivanova, I., Kabadjova, P., Pantev, A., Danova, S., Dousset, X., 2000, Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B14 isolated from boza Bulgarian traditional cereal beverage. *Biocatalysis: Fundamentals & Applications*, 41(6), 47-53.
- Janice, M., Vickerstaff, J., 1992, Breast Milk A vital defense against infection. *Canadian Family Physician*, 38, 1849–1855.
- Jeevaratnam, K., Jamuna, M., Bawa, A.S., 2005, Biological preservation of foods- Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Indian Journal of Biotechnology*, Vol. 4, 446-454.
- Jiménez-Díaz, R., Ríos-Sánchez, R.M., Desmazeaud, M., Ruiz-Barba, J.L., Piard, J.-C., 1993, Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1416–1424.
- Joosten, H.M., Nunez, M., Devreese, B., Van Beeumen, J., Marugg, J.D., 1996, Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA 4. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4220-4223.
- Jurkovic, D., Krizkova, L., Dusinsky, R., Belicova, A., Sojka, M., Krajcovic, J., Ebringer L., 2006, Identification and characterization of enterococci from bryndza cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 553–559.
- Kabore, D., Sawadogo-Lingani, H., Dicko, M.H., Diawara, B., Jakobsen, M., 2012, Acid resistance, bile tolerance and antimicrobial properties of dominant lactic acid bacteria isolated from traditional “maari” baobab seeds fermented condiment. *African Journal of Biotechnology*, 11(5), 1197-1206.
- Kanmani, P., Kumar, R.S., Yuvaraj, N., Paari, K.A., Pattukumar, V., Arul, V., 2010, Comparison of antimicrobial activity of probiotic bacterium

Streptococcus phocae PI80, *Enterococcus faecium* MC13 and *Carnobacterium divergens* against fish pathogen. World Journal of Dairy & Food Sciences, 5(2), 145-151.

Karaoğlu, Ş.A., Aydın, F., Kılıç, S.S., Kılıç, A.O., 2003, Antimicrobial activity and characteristics of bacteriocins produced by vaginal lactobacilli. Turkish Journal of Medical Sciences, 33, 7-13.

Kawai, Y., Ishii, Y., Uemura, K., Kitazawa, H., Saito, T., Itoh, T., 2001, *Lactobacillus reuteri* LA6 and *Lactobacillus gasseri* LA39 isolated from faeces of the same human infant produce identical cyclic bacteriocin. Food Microbiology, 18, 407-415.

Kawai, Y., T. Saito, M. Suzuki, Itoh, T., 1998, Sequence analysis by cloning of the structural gene of gasserin A, a hydrophobic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39. Bioscience Biotechnology & Biochemistry. 62, 887–892.

Khalid, K., 2011, An Overview of Lactic Acid Bacteria. International Journal of Biosciences, 1(3), 1-13.

Khedid, K., M. Faid, Mokhtari, A., Soulaymani, A., Zinedine, A., 2009, Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. Microbiological Research, 164(1), 81-91.

Kılıç, S., 2001, Süt endüstrisinde laktik asit bakterileri, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:542, İzmir, 451s.

Kıran, F., Osmanağaoğlu, Ö., 2011, Laktik asit bakterilerinin identifikasyonunda/tiplendirilmesinde kullanılan moleküler yöntemler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 27, 62-74.

Kingcha, Y., Tosukhowong, A., Zendo, T., Roytrakul, S., Luxananil, P., Chareonpornsook, K., Valyasevi, R., Sonomoto, K., Visessanguan, W., 2012, Anti-Listeria activity of *Pediococcus pentosaceus* BCC 3772 and

application as starter culture for Nham, A traditional fermented pork sausage. Food Control, 25, 190-196.

Klaenhammer, T.R., Kulen, M.J., 1999, Selection and design of probiotics. International Journal of Food Microbiology, 50, 45-57.

Klaenhammer, T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 12, 39-86.

Klein, G., 2003, Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and gastro-intestinal tract. Review. International Journal of Food Microbiology, 88, 123-131.

Klingberg, T.D., Axelsson, L., Naterstad, K., Elsser, D., Buddle, B.B., 2005, Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-Type fermented sausages. International Journal of Food Microbiology, 105, 419-431.

Korkeala, H., Alanko, T., Tiusanen, T., 1992, Effect of sodium nitrite and sodium chloride on growth of lactic acid bacteria. Acta Veterinaria Scandinavica, 33, 27-32.

Krier, F., A. M. Revol-Junelles, Germain, P., 1998, Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, 50(3), 359-363.

Kuley, E., Özogul, F., Özogul, Y., Akyol, İ., 2011, The Function of lactic acid bacteria and brine solutions on biogenic amine formation by foodborne pathogens in trout fillets. Food Chemistry, 129, 1211-1216.

Lavanya, B., Sowmiya, S., Balaji, S., Muthuvelam, B., 2011, Screening and characterization of lactic acid bacteria from fermented milk. British Journal of Dairy Sciences, 2(1), 5-10.

- Lee, Y., Salminen, S., 1995, The coming of age of probiotics. Trends in Food Science and Technology, 6 (7), 241-245.
- Leer R. J., J.M.B.M. van der Vossen, M. van Giezen, J. M. Van Noort, Pouwel, P.H., 1995, Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Microbiology, 141, 1629–1635.
- Leroy, F., De Vuyst, L., 2005, Simulation of the effect of sausage ingredients and technology on the functionality of the bacteriocin producing *Lactobacillus sakei* CTC 494 strain. International Journal of Food Microbiology, 100, 141-152.
- Leuschner, R.G.K., Kurihara, R., Hammes, W.P., 1999, Formation of biogenic amines by proteolytic enterococci during cheese ripening. Journal of the Science Food and Agriculture, 79, 1141-1144.
- Lewus, C.B., Sun, S., Montville, T. J. 1992, Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. Applied Environmental Microbiology, 5, 143-149.
- Lian W., Hsiao, H., Chou, C., 2003, Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. Short communication. International Journal of Food Microbiology, 86, 293– 301.
- Lim, H., Kim , S., Lee, W., 2004, Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use. Journal of Veterinary Science, 5 (4), 391-395.
- Ling, W.H., Saxelin, M., Hanninen, O., Salminen, S., 1994, Enzyme profile of *Lactobacillus* strain GG by a rapid API ZYM system: A comparison of intestinal bacterial strains. Microbial Ecology in Health and Disease, 7, 99-104.
- Liong, M.T., Shah, N.P., 2005, Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. Journal of Dairy Science, 88, 55-66.

- Longo, M.A., Sanromán, M.A., 2006, Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies, *Food Technology and Biotechnology*, 44(3), 335-353.
- Lopez-Alarcon, M., Villalpando, S., Fajardo, A., 1997, Breast-feeding lowers the frequency and duration of acute respiratory infection and diarrhea in infants under six months of age. *The Journal of Nutrition*, 127(3), 436-443.
- Lönnerdal, B., 2000, Breast milk: a truly functional food. *Nutrition*, 16 (7/8), 39-86.
- Maisnier-Patin, S., Deschamps, S.N., Tatini, S.R., Richard, J., 1992, Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camambert cheese made with a nisin producing starter. *Letters in Applied Microbiology*, 72, 249-263.
- Malini, N, Sabitha, K., Viswanathan, P., Menon, V.P., 1998, Influence of spices on the bacterial (enzyme) activity in experimental colon cancer *Journal of Ethnopharmacology*, 62(1), 15-24.
- Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Comunian, R., Zanetti, S., Dupre, I., Sechib, L. A., 2003, Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 291– 304.
- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miari, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., Tsakalidou, E. 2005, Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16, 189-199.
- Martin, B., Garriga, M., Hugas, M., Aymerich, T., 2005a, Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1177–1190.
- Martin, R., Olivares, M., Marin, M.L., Fernandez, L., Xaus, J., Rodriguez, J.M., 2005b, Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. *Journal of Human Lactation*, 21, 8-17.

- Martin, R., Langa, S., Reviriego, C., Jimenez, E., Marin, M.L., Olivares, M., Boza, J., Jimenez, J., Fernandez, L., Xaus, J., Rodriguez, J.M., 2004, The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 121-127.
- Martin, R., Langa, S., Reviriego, C., Jimenez, E., Marin, M.L., Xaus, J., Fernandez, Rodriguez, J.M., 2003, Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *Journal of Pediatrics*, 143, 754-758.
- Martin, R., Olivares, M., Perez, M., Xaus, J., Torre, C., Fernandez, L., Rodriguez, J.M., 2010, Identification and evaluation of the probiotic potential of lactobacilli isolated from canine milk. *The Veterinary Journal*, 185, 193-198.
- Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Gálvez, A., Samyn, B., Van Beeumen, J., Coyette, J., Valdivia, E., 1994, Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *Journal of Bacteriology*, 176(20), 6334–6339.
- Mathara J.M., Schillinger, U., Kutima, P.M., Mbugua, S.K., Holzapfel W.H., 2004, Isolation, identification and characterization of the dominant microorganisms of kule naoto: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. *International Journal Food Microbiology*, 94, 269–278.
- Mathur, S., Singh, R., 2005, Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria- A Review. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 281-295.
- Matijasic, B.B., Rajsp, M.K., Perko, B., Rogelj, I., 2007, Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. *International Dairy Journal*, 17, 157-166.
- Menozzi, M.G., Eigner U., Covan, S., Rossi, S., Somenzi, P., Dettori, G., Chezzi, C., Fahr, A.M., 2006, Two-center collaborative evaluation of performance of the BD phoenix automated microbiology system for

- identification and antimicrobial susceptibility testing of Gram-negative bacteria." *Journal of Clinical Microbiology*, 44(11), 4085-4094.
- Menteş, Ö., Ercan, R., Akçelik, M., 2007, Inhibitor activities of two *Lactobacillus* strains, isolated from sourdough, against rope-forming *Bacillus* strains. *Food Control*, 18, 359–363
- Metchnikoff, E., 1908, *The prolongation of life.: Optimistic studies.* G.P. Putnam's sons, New York.
- Moll, G.N., Konings, W.N., Driessen, A.J.M., 1999, Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76, 185-198.
- Morelli, L., Vescovo, M. and Bottazzi, V., 1983, Identification of chloramphenicol resistance plasmids in *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus acidophilus*. *International Journal of Microbiology*, 1, 1–5.
- Mourad, K., Nour-Eddine, K., 2006, *In-vitro* preselection criteria for probiotic *Lactobacillus plantarum* strains of fermented olives origin. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 1(1), 27-32.
- Mudryk, Z. J., Podgórska, B., 2006, Enzymatic activity bacterial strains isolated from marine beach. *Polish Journal of Ecology*, 15, 441- 448.
- Munoz-Atienza, E., Landeta, G., de las Rivas, B., Gomez-Sala, B., Munoz, R., Hernandez, P.E., Cintas, L.M., Herranz, C., 2011, Phenotypic and genetic evaluations of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 146, 212-216.
- NCCLS, 2006, Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. National Committee for Clinical Laboratory Standards. M2-A9.

- O'Sullivan, L.O., Ross, R.P., Hill, C., 2002, Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84, 593-604.
- Ogden, K., Waites, M.J., Hammond, J.R.M., 1988, Nisin and brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 94, 233-238.
- Oh, S., Kim, S.H., Worobo, R.W., 2000, Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *Journal of Dairy Science*, 83, 2747, 2752.
- Olivares, M., Diaz-Ropero, M.P., Martin, R., Rodriguez, J.M., Xaus, J., 2006, Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 72-79.
- Orla-Jensen, S. 1919, The lactic acid bacteria. E. Munksgaard, Copenhagen.
- Ortu, S., Felis, G.E., Marzotto, M., Deriu, A., Mollicotti, P., Sechi, L.A., Dellagio, F., Zanetti, S., 2007, Identification and functional characterization of *Lactobacillus* strains isolated from milk and gioddu, a traditional sardinian fermented milk., *International Dairy Journal*, 17, 1312-1320.
- Osmanağaoğlu, Ö., Gündüz, U., Beyatlı, Y., Çökmüş, C., 1998, Purification and characterization of pediocin F, A bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* F. *Turkish Journal of Biology*, 22, 217-228.
- Önür, N.D., Beyler, A.R., 2000, Safra Asitleri Metabolizması. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, 54(1), 65-76.
- Pan, L., Hu, X., Wang, X., 2011, Assesment of antibiotic resistance of lactic acid bacteria in Chinese fermented foods. *Food Control*, 22, 1316-1321.
- Panagea, S. and Chadwick, P.R., 1996, Heat tolerance of vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Pathology*, 49, 687-689.
- Papamanoli, E. Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. ve Kotzekidou, P., 2003, Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-

fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. Meat Science, 65, 859-867.

Parada, J.L., Caron, C.R., Medeiros, A.B.P., Soccol, C.R., 2007, Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification properties and use as biopreservatives. Brazilian Archives of Biology and Technology, 50(3), 521-542.

Park, S.C., Hwang, M.H., Kim, Y.H., Kim, J.C. Song, J.C., Lee, K.W., Jeong, K.S., Rhee, M.H., Kim, K.S., Kim, T.W., 2006, Comparison of pH and bile resistance of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from rat, pig, chicken, and human sources. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 22, 35-37.

Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S., Kim, H.Y., 2006, Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. Journal of Applied Microbiology, 100, 1171-1185.

Pelinescu, D., Chifiriuc, M.C., Ditu, L.M., Sarbu, I., Bleotu, C., Vassu, T., Stoica, I., Lazar, V., Corcionivoschi, N., Sasarman, E., 2011, Selection and characterization of the probiotic potential of some lactic acid bacteria isolated from infant feces. Romanian Biotechnological Letters, 16(3), 6178-6189.

Pereira, D.I.A., Gibson, G.R., 2002, Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. Applied and Environmental Microbiology, 68 (9), 4698-4693.

Pereira, D.I.A., McCartney, A.L., Gibson, G.R., 2003, An *in-Vitro* study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. Applied and Environmental Microbiology, 69, 4743–4752.

Peters, J., Mac, K., Wichmann-Schauer, H., Klein, G., Ellerbroek, L., 2003, Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci

isolated from food of animal origin in Germany. International Journal of Food Microbiology, 88, 311-314.

Pingitore, E.V., Salvucci, E., Sesma, F., Nader-Macias, M.E., 2007, Different strategies for purification of antimicrobial peptides from lactic acid bacteria (LAB). Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, 1, 557-568.

Prasad, J., Harsharanjit, G., Smart, J., Gopal, P.K., 1998, Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. International Dairy Journal, 993-1002.

Prentice, A., 1996, Constituents of human milk. Food and Nutrition Bulletin, 17, No.4.

Raghavan, C.M., Nanda, A., Yuvaraj, R., Mukesh-Kumar, D.J., Murugan, A.S., Raja, R.B., 2011, Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus* species as probiotics. World Applied Sciences Journal, 14(4), 552-560.

Ramasamy, K., Abdullah, N., Wong, M.C.V.L., Karuthan, C., Ho, Y.W., 2010, Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus* strains used as probiotics in chickens. Journal of the Science of Food and Agriculture, 90, 65-69.

Rattanachaikunsopon, P., Phumlhachorn, P., 2010, Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. Annals of Biological Research, 1(4), 218-228.

Rehaïem, A., B. Martinez, Manai, M., Rodriguez, A., 2010, Production of enterocin A by *Enterococcus faecium* MMRA isolated from 'Rayeb', a traditional Tunisian dairy beverage. Journal of Applied Microbiology, 108(5), 1685-1693.

Reviriego, C., Eaton, T., Martín, R., Jiménez, E., Fernández, L., Gasson, M.J. Rodríguez, J.M., 2005, Screening of virulence determinants in

- Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. Journal of Human Lactation 21(2), 131-138.
- Rilla, N., Martinez, B., Delgado, T., Rodriguez, A., 2003, Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 729, a nisin Z producer. International Journal of Food Microbiology, 85, 23-33.
- Rince, A., Flahaut S., Auffray, Y., 2000, Identification of general stress genes in *Enterococcus faecalis*, Mini-review. International Journal of Food Microbiology, 55, 87–91.
- Rinne, M., Kalliomaki, M., Arvillommi, H., Salminen, S., Isolauri, E., 2005, Effects of probiotics and breastfeeding on the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus/ Enterococcus* microbiota and humoral immune responses. Journal of Pediatrics, 147, 186-191.
- Robin, F., J. Delmas, Archambaud, M., Schweitzer, C., Chanal, C., Bonnet, R., 2006, CMT-type beta-lactamase TEM-125, an emerging problem for extended-spectrum beta-lactamase detection. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 50(7), 2403-2408.
- Rodriguez, E., Calzada, J., Arques, J.L., Rodriguez, J.M., Nunez, M., Medina, M., 2005, Antimicrobial activity of pediocin producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. International Dairy Journal, 15, 51-57.
- Saarela, M., Mongensen, G., Fonden, R., Mattö, J., Matilla-Sandholm, T., 2000, Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Review article. Journal of Biotechnology, 84, 197-215.
- Saavedra, J.M., 2001, Clinical applications of probiotic agents. The American Journal of Clinical Nutrition, 73, 1147–1151.

- Saavedra, L., Taranto, M.P., Sesma, F., de Valdez, G.F., 2003, Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 241-245.
- Salminen, S., Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M., Fonden, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E., Sandholm, T.M., 1998, Demonstration of safety of probiotics- a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 93-106.
- Sánchez-Valenzuela, A., Ben Omar, N., Abriouel, H., López, R. L., Veljovic, K., Cañamero, M.M., Milan, Topisirovic, K.L., Gálvez, A., 2009, Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control*, 20, 381–385.
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, 2001, Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal* 11, 621-647.
- Savadogo, A., Ouattara, C.A.T., Bassole, I. H.N., Traore S.A., 2006, Bacteriocins and lactic acid bacteria – a minireview. *African Journal of Biotechnology*, 5(9), 678-683.
- Sawitzki, M.C., Fiorentini, A.M., Bertol, T.M., Sant’Anna, S., 2009, *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented sausages and their technological properties for application as starter cultures. *Ciencia e Technologica de Alimentos*, 29(2), 340-345.
- Schillinger, U., F.K., Lucke, 1987, Identification of lactobacilli from meat and meat product. *Food Microbiology*, 4, 199-208.
- Schillinger, U., Lücke, F.K., 1989, Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1901-1906.

- Schneider, R., Fernandez, F.J., Aguilar, M.B., Guerrero-Legarreta, I., Alpuche-Solis, A., Ponce-Alquicira, E., 2006, Partial characterization of a class IIa pediocin produced by *Pediococcus parvulus* 133 strain isolated from meat (Mexican “chorizo”). Food Control, 17, 909-915.
- Schrezenmeir, J., De Verse, M., 2001, Probiotics, prebiotics, and synbiotics approaching a definition. The American Journal of Clinical Nutrition, 73, 361-364.
- Schved, F., Lalazar, A., Henis, Y., Juven, B.J., 1993, Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. Journal of Applied Bacteriology, 74(1), 67-77
- Semedo, T., Santos, M.A., Lopes, M.F.S., Figueiredo Marques, J.J., Barreto Crespo, M.T., Tenreiro, R., 2003 Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus?. Systematic and Applied Microbiology, 26, 13–22.
- Settanni, L., Corsetti, A., 2008, Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. International Journal of Food Microbiology, 121, 123-138.
- Shortt, C., 1999, The probiotic century: historical and current perspectives. Trends in Food Science and Technology, 10, 411-417.
- Sinton, L. W., Donnison, A. M., Hastie C. M., 1993, Faecal streptococci as faecal pollution indicators: a review. Part I: Taxonomy and enumeration. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, Vol. 27: 101-115.
- Sirilun, S., Chaiyasut, C., Kantachote, D., Luxananil, P., 2010, Characterisation of non human origin probiotic *Lactobacillus plantarum* with cholesterollowering property. African Journal of Microbiology Research, 4(10), 994-1000.

- Skytta, E., Hereijgers, W., Mattilda-Sandholm, T., 1991, Broad spectrum antibacterial activity of *Pediococcus damnosus* and *Pediococcus pentosaceus* in minced meat. *Food Microbiology*, 8, 231-237.
- Spelhaug, S., Harlander, S.K., 1989, Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. *Journal of Food Protection*, 52(12), 856-862.
- Stiles, M.E., Holzapfel, W.H., 1997, Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1-29.
- Straub, B.W., Kicherer, M., Schilcher, S.M., Hammes, W.P., 1995, The formation of biogenic amines by fermentation organisms. *European Food Research and Technology*, 201, 79–82.
- Strompfova, V., Laukova, A., 2007, In vitro study on bacteriocin production of enterococci associated with chickens. *Anaerobe*, 13, 228-237.
- Sustackova, A., Napravnikova, E., Schlegelova, J., 2004, Antimicrobial resistance of *enterococcus* spp. isolates from raw beef and meat products. *Folia Microbiologica*, 49, (4), 411–417.
- Suzzi, G., Gardini, F., 2003, Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 41-54.
- Şahingil, D., İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., Akçelik, M., Yıldırım, M., 2011, Characterization of lactococcin BZ produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BZ isolated from boza. *Turkish Journal of Biology*, 35, 21-33.
- Şener, A. ve Temiz, A., 2008, The effects of certain prebiotics on the resistance to acid, bile and cold storage of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. First European Food Congress, 04-09 November 2008, Ljubljana, Slovenia, Delegate Manual, number P043 (poster).

- Şener, A., 2009, Serbest ve mikroenkapsüle probiyotik bakterilerin ticari dondurma üretiminde kullanılabilirliği üzerine bir araştırma, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 139s.
- Tannock, G.W., Luchansky, J.B., Miller, L., Connell, H., Thode-Andersen, S., Mercer, A.A., 1994, Molecular Characterization of a plasmid-borne (pGT633) erythromycin resistance determinant (emrGT) from *Lactobacillus reuteri*. Plasmid, 31, 60-71.
- Temiz, A., 1989, Et ve et ürünlerindeki laktobasillerin hızlı ve basit olarak tanımlanmaları için geliştirilen tanımlama tabloları. Gıda, 14 (6), 385-391.
- Temiz, A., 2010, Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, Hatiboğlu yayınları, Ankara, 291s.
- Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J., 2003, Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. International Journal of Food Microbiology, 81, 1-10.
- Thapa, N., Pal, J., Tamang, J.P., 2006, Phenotypic Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the eastern Himalayas. International Journal of Food Microbiology, 107, 33-38.
- Todorov, S. D., L. M. Dicks, 2005, Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. Journal of Basic Microbiology, 45(4), 312-322.
- Todorov, S.D., Dicks, L.M.T., 2006, Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. Microbiological Research 161(2), 102-108.
- Toğay, A., 2010, Doğal fermente gıdalar ve anne sütünden enterokokların izolasyonu, karakterizasyonu ve bunların probiyotik kültür olarak

kullanılabilme potansiyelinin araştırılması, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 145s.

- Tok, E., Aslim, B., 2007, Probiyotik olarak kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyonu ve safra tuzları dekonjugasyonundaki rolleri. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 37(1), 62-68.
- Toomula, N., Sathish, K.D., Arun, K.R., Hima, B.K., Raviteja, Y., 2011, Bacteriocin producing probiotic lactic acid bacteria. Microbial & Biochemical Technology, 3(5), 121-124.
- Trojanova, I. Rada, V., 2005, Enzymatic Activity in fermented milk products containing bifidobacteria. Czech Journal of Food Sciences, 23, 224-229.
- Tükel, Ç., Avşaroğlu, M.D., Şimşek, Ö., Akçelik, M., 2007, Isolation and partial characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* spp. *lactis* MC38. Journal of Food Safety, 27, 17-29
- Upreti, G. C. and Hinsdill, R. D. 1975, Production and mode of action of lactocin 27: bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 7, 139-145.
- Upreti, G. C., Hinsdill, R. D. 1973, Isolation and characterization of a bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 4, 487-494.
- Urso, R., Rantsiou, K., Cantoni, C., Comi, G., Cocolin, L., 2006, Technological characterization of a bacteriocin producing *Lactobacillus sakei* and its use in fermented sausages production. International Journal of Food Microbiology, 110, 232-239.
- Usman, A.H. 1999, Bile Tolerance, Taurocholate deconjugation and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. Journal of Dairy Science, 82, 243-248.

- 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.
- Vassos, D., Bezirtoglou, E., Voidarou, C., Alexopoulos, A., Maipa, V., 2009, Biochemical and antimicrobial profile of *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* isolated from traditional dairy products and infant intestinal microbiota. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 21, 241-250.
- Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A. 2003, Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative 'in vitro' study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36, 895-904.
- Visser, S., 1993, Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: An Overview. *Journal of Dairy Science*, 76 (1), 329-350.
- Wollowski, I., Rechkemmer, G., Pool-Zobel, B.L., 2001, Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 451-455.
- Xiraphi, N., M. Georgalaki, Rantsiou, K., Cocolin, L., Tsakalidou, E., Drosinos, E.H., 2008, Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131. *Meat Science*, 80(2), 194-203.
- Yang, R., Johnson, M.C., Ray, B., 1992, Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3355-3359.
- Yaygın, H., Kılıç, S., 1993, Süt endüstrisinde saf kültür. Altındağ Matbaacılık, İzmir, 105s.
- Yıldırım, Z., Johnson, M.G., 1998, Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R isolated from radish. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 297-304.

- Yıldız, F., Yetişmeyen, A., 2005, Peynirlerde biyojen amin riski. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, 2(2), 127-134.
- Yılmaz, R., Temiz, A., 2003, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'un klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanması ve karakterizasyonu. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 1(3), 19-42.
- Zhou, J.S., Pillidge, C.J., Gopal, P.K., Gill, H.S., 2005, Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. International Journal of Food Microbiology, 98, 211-217.
- Ziarno, M. 2008, *In vitro* cholesterol uptake by *Lactobacillus acidophilus* isolates. ACTA Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria, 7 (3), 65-74.
- Ziarno, M., Sekul, E., Lafraya, A.A., 2007, Cholesterol assimilation by commercial yoghurt starter cultures. ACTA Scientiarum Polonorum - Technologia Alimentaria, 6 (1), 83-94.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Ufuk BAĞCI

Doğum Yeri : Konya

Doğum Yılı : 06.10.1977

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise :1988-1994 Yenimahalle Mustafa Kemal Lisesi, Ankara

Lisans :1994-2000 Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi,
Gıda Mühendisliği Bölümü, Beytepe Ankara

Yüksek Lisans :2003-2005 Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi,
Gıda Mühendisliği Bölümü, Beytepe Ankara

Doktora :2006- Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi,
Gıda Mühendisliği Bölümü, Beytepe Ankara

Yabancı Dil: İngilizce

İş Tecrübesi:

2002-2003 Hacettepe Üniversitesi, Kaman MYO, Araştırma Görevlisi

2003-2012 Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi,
Gıda Mühendisliği Bölümü, Araştırma Görevlisi

2012- Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Avrupa Birliği ve
Dış İlişkiler Genel Müdürlüğü, Mühendis.