

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ANKARA ÇUBUK YÖRESİ TURŞULARINDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK
ASİT BAKTERİLERİNİN TANIMLANMASI VE TOPLAM HÜCRE PROTEİN
PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ**

Derya DURSUN

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2010**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ANKARA ÇUBUK YÖRESİ TURŞULARINDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN TANIMLANMASI VE TOPLAM HÜCRE PROTEİN PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ

Derya DURSUN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK

Bu çalışma, Ankara ilinin turşu üretimi ile ünlü Çubuk ilçesine ait farklı bölgelerde, ev ölçeği ya da işletme boyutunda doğal yöntemlerle üretilen çeşitli turşulardan, fermantasyondan sorumlu laktik asit bakterilerini izole ederek tanımlamak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Çubuk yöresine ait, doğal fermantasyon ile üretilmiş 15 adet farklı turşu örneğinden 174 adet izolat elde edilmiş; morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal olmak üzere temel tanımlama testlerine tabi tutulmuştur. Fenotipik tanımlama testleri sonucunda, laktik asit bakterisi olma özelliği gösteren 51 adet izolattan 45 tanesinin, API 50 CHL kiti ile karbonhidrat fermantasyon profilleri belirlenerek, tür ve/veya alttür düzeyinde tanımlanmaları gerçekleştirilmiştir.

API 50 CHL test kitleri ile yapılan tanımlama sonucu; laktik asit bakterisi olarak tanımlanan 45 adet bakterinin 38 adedinin *Lactobacillus* cinsine ait olduğu; *L. brevis*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*'un ise, turşu örneklerinde, baskın türler olduğu belirlenmiştir.

API testinin sonucunu doğrulamak amacıyla, izolatların SDS-PAGE yöntemi ile toplam hücre protein profilleri incelenmiş, standart marker proteinler yardımıyla protein ağırlıkları belirlenmiştir.

Temmuz 2010, 100 sayfa

Anahtar Kelimeler: turşu, laktik asit bakterisi, izolasyon, tanımlama, hücre protein profili

ABSTRACT

Master Thesis

IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM PICKLES IN ANKARA ÇUBUK REGION AND DETERMINATION OF THEIR TOTAL CELL PROTEIN PROFILES

Derya DURSUN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK

In this study, it was aimed to isolate lactic acid bacteria that are main microorganisms of the fermentation from various pickles which were produced by traditionally fermented household or manufacturing areas belonging to Çubuk region of Ankara with famous for pickle production.

A total of 174 microorganisms were isolated from 14 different pickle samples concerning Çubuk region which had been produced by spontaneous fermentation; they were tested phenotypically in terms of morphological, physiological and biochemical. In consequence of phenotypic definition, 45 numbers of 51 isolates which were decided as lactic acid bacteria were identified at the level of species or subspecies by characterizing their carbohydrate fermentation profiles using API 50 CHL kits.

As a result of the identification of lactic acid bacteria by API 50 CHL test kits; of the lactic acid bacteria, 38 were determined as belonging to the genus *Lactobacillus* and *L. brevis*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* were predominant species in pickle samples.

To confirm the results of API test, the whole cell protein profiles of the isolates were analyzed with Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) method and the weight of the proteins were determined by means of standart marker proteins.

July 2010, 100 pages

Key Words: pickle, lactic acid bacteria, isolation, identification, cell protein profile

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen, yakın ilgi ve desteğini gördüğüm danışman hocam Sayın Prof. Dr. Filiz Özçelik'e ve Araştırma Görevlisi Mehmet Tokatlı'ya, her zaman destekçim olan değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez alıőması, TÜBİTAK tarafından desteklenen 108O491 nolu "Ankara ubuk yöresi turşularından izole edilen laktik asit bakterilerinin tanımlanmaları, teknolojik ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi ve starter olarak kullanılma olanaklarının değerlendirilmesi" konulu projenin bir bölümüdür.

Derya DURSUN

Ankara, 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1 Laktik Asit Bakterileri.....	14
2.1.1 <i>Lactobacillus</i>	18
2.1.2 <i>Leuconostoc</i>	20
2.1.3 <i>Lactococcus</i>	21
2.1.4 <i>Pediococcus</i>	22
2.2 Turşuda Yer Alan Laktik Asit Bakterileri.....	23
2.2.1 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	25
2.2.2 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	26
2.2.3 <i>Lactobacillus brevis</i>	26
2.2.4 <i>Lactobacillus plantarum</i>	27
2.2.5 <i>Streptococcus faecalis</i>	27
2.3 Laktik Asit Bakterilerinin Önemi	28
2.3.1 Antimikrobiyal bileşikler	29
2.3.2 Probiyotik etki.....	32
2.3.3 Starter kültür kullanımı.....	34
2.3.4 Ekzopolisakkarit (EPS) üretimi.....	35
2.4 Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmalarında Uygulanan Yöntemler.....	36
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	40
3.1 Materyal.....	40
3.1.1 Turşu örnekleri	40
3.1.2 Tampon, besiyeri, kimyasal ve çözeltiler.....	41
3.1.3 Çözelti, besiyeri, kimyasal ve malzemelerin sterilizasyonu.....	42
3.2 Yöntem.....	42
3.2.1 Turşu örneklerinin kimyasal ve mikrobiyolojik analizleri.....	42
3.2.2 Laktik asit bakterilerinin izolasyonu	45
3.2.3 Laktik asit bakterilerinin tanımlanması.....	45
3.2.3.1 Fenotipik özelliklerin incelenmesi	45
3.2.3.1.1 Koloni morfolojisi.....	46
3.2.3.1.2 Gram boyama testi.....	46
3.2.3.1.3 Hücre morfolojisi.....	47
3.2.3.1.4 Katalaz testi.....	47
3.2.3.1.5 Oksidaz testi.....	47

3.2.3.1.6 Glikozdan gaz oluşum testi.....	48
3.2.3.1.7 Farklı sıcaklık derecelerinde gelişme testi	49
3.2.3.1.8 Arjinin hidroliz testi.....	49
3.2.3.1.9 Karbonhidrat fermantasyon profillerinin belirlenmesi.....	50
3.2.3.2 Moleküler düzeyde inceleme	50
3.2.3.2.1 Hücre protein profillerinin belirlenmesi.....	50
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	54
4.1 Bakterilerin İzole Edildiği Turşu Örneklerinin Tanıtımı.....	54
4.2 Turşu Örneklerinin Kimyasal ve Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları.....	54
4.3 Klasik Tanımlama Testlerinin Sonuçları.....	58
4.3.1 Gram boyama sonuçları.....	58
4.3.2 Katalaz testi sonuçları.....	58
4.3.3 Oksidaz testi sonuçları.....	59
4.3.4 Koloni ve hücre morfolojisi.....	59
4.3.5 Glikozdan gaz oluşum testi sonuçları	62
4.3.6 Farklı sıcaklık derecelerinde gelişme testi sonuçları.....	62
4.3.7 Arjinin hidroliz testi sonuçları.....	63
4.4 Karbonhidrat Fermantasyon Profilleri.....	66
4.5 Tanımlama Testleri Sonuçlarının Genel Değerlendirilmesi.....	73
4.6 İzolatların Toplam Hücre Protein Profilleri.....	77
5. SONUÇ	85
KAYNAKLAR.....	87
EKLER.....	94
EK 1 Çalışmada Kullanılan Besiyeri, Tampon, Kimyasal ve Çözeltilerin	
Hazırlanışı.....	94
ÖZGEÇMİŞ.....	100

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Prüvattan önemli metabolik ürünlerin oluşumu.....	16
Şekil 2.2 Laktik asit bakterilerinin glikozu homolaktik ve heterolaktik yollarla parçalaması ..	17
Şekil 4.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i> bakterisinin API 50 CHL kit sonucu	67
Şekil 4.2 <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> bakterisinin API 50 CHL kit sonucu	67
Şekil 4.3 <i>Lactobacillus acidophilus</i> bakterisine ait API test sonucu örneği	68
Şekil 4.4 <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> bakterisine ait API test sonucu örneği	69
Şekil 4.5 API sonuçlarına göre cinslerin dağılımı.....	72
Şekil 4.6 Çeşitli laktik asit bakterilerine ait toplam proteinlerin jel görüntüleri ve molekül ağırlıkları.....	80
Şekil 4.7 <i>L. acidophilus</i> türlerine ait toplam proteinlerin jel görüntüleri ve molekül ağırlıkları.....	81
Şekil 4.8 Çeşitli laktik asit bakterilerine ait toplam proteinlerin jel görüntüleri ve molekül ağırlıkları.....	82
Şekil 4.9 <i>Pediococcus</i> türlerine ait toplam proteinlerin jel görüntüleri ve molekül ağırlıkları.....	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 LAB cinslerinin oksijen gereksinimlerine göre gruplandırılması.....	15
Çizelge 2.2 Bazı sebze fermantasyolarında bulunan temel laktik asit bakterisi türleri ..	24
Çizelge 3.1 Turşu örneklerinin temin edildikleri yerler.....	40
Çizelge 3.2 Turşu örneklerine ilişkin bilgiler.....	41
Çizelge 4.1 Turşu örneklerine ait pH, % titrasyon asitliği ve tuz değerleri.....	55
Çizelge 4.2 Turşu örneklerinin MRS ve M17 besiyerlerinde belirlenen laktik asit bakteri sayımı.....	57
Çizelge 4.3 Farklı besiyerlerinden izole edilen bakterilerin koloni ve hücre morfolojileri.....	60
Çizelge 4.4 Laktik asit bakterilerinin Gram boyama sonuçlarına göre morfolojileri.....	62
Çizelge 4.5 Laktik asit bakterilerinin gaz oluşum, farklı sıcaklıklarda gelişim ve arjinin hidroliz testlerinin sonuçları.....	64
Çizelge 4.6 Laktik asit bakterilerinin arjinin hidroliz yetenekleri.....	65
Çizelge 4.7 İzolatların API Lab Plus Programına göre % tanımlama sonuçları.....	70
Çizelge 4.8 <i>Lactobacillus</i> cinsinin gaz oluşturma yeteneği.....	75

1. GİRİŞ

Fermantasyon teknolojisi bilinen en eski biyoteknoloji uygulaması olmakla birlikte (Borgstorm 1986), gıdaların muhafaza edilmesinde uygulanan oldukça etkin bir yöntemdir. Etanol, asetik asit, laktik asit gibi çeşitli fermantasyon uygulamaları (Beukes *et al.* 2001) ile elde olunan fermente gıdalar, insanlar tarafından 10.000 yıldır tüketilmektedir (Hutkins 2006). 1970'li yıllardan buyana, biyoteknolojik uygulamaların gelişmesine bağlı olarak, fermente gıdaların tüketimi oldukça artış göstermiştir (Board *et al.* 1995). Bunun nedenlerinden biri tüketicilerin, bu tür gıdaların sağlıklı ve doğal olduklarını düşünmeleridir. Fermente ürünlerde olması muhtemel mikroorganizmaların varlığı ve bu mikroorganizmaların metabolitleri tüketicilerde, ürünün güvenliği açısından bir soru işareti yaratmamaktadır. Fermente ürünlerin binlerce yıldır var olması ve tüketilmesi bu ürünlerin, bir bakıma zamanla test edildiği anlamını taşımaktadır (Mavhungu 2005).

Konserve ya da dondurulmuş gıdalar, ekonomik bakımdan ve kolay erişilebilirlik anlamında insanları pek tatmin etmeyen gıdalar olabilmektedir. Gıdaların, özellikle hasat edildikleri anda tüketilmeleri öngörülen meyve ve sebzelerin, daha sonra da tüketilebilmelerine olanak sağlayan muhafaza yöntemlerinden olan fermantasyon; uygulanabilirliği pratik olan, fazla enerji ve işgücü gereksinimi olmayan, ürünlerin organoleptik ve besinsel özelliklerini geliştirebilen, lezzet bakımından farklı tatların oluşmasına imkan sağlayan, insan sağlığına yararlı bileşikler ile faydalı gıdalar sunabilen ve tüketim alanı olarak geniş yelpazeye sahip ürünler ortaya koyabilen bir gıda işleme yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır (Steinkraus 1983).

Her ülke; bir bölge, alan ya da yöresel olarak sahip olduğu ürünleri, fermantasyon uygulamaları ile fermente gıdalara işleyebilmektedir. Böylece bu ürünlerin, zamana bağlı kalmaksızın tüketimi sağlanabilmektedir. Sonuç olarak; ortaya çıkan geleneksel fermente gıdalar, üretim bölgelerindeki doğal floradan kaynaklanan karakteristik özellikler ve yine bu bölgeye ait üretim yöntemlerindeki farklılıklarla önem kazanmaktadır.

Geleneksel olarak üretilen fermente birçok yiyecek ve içecekte laktik asit fermantasyonu kullanılmaktadır. Laktik asit fermantasyonu, meyve ve sebzelerin muhafazasında binlerce yıldır tercih edilen ve uygulanan bir metot olmasının yanı sıra gıdalarda, örneğin tat, aroma ve yapıya dair oluşturduğu önemli değişiklikler ile de insanlar tarafından tüketilebilirliği oldukça yüksek gıdaların üretimine olanak veren bir işlemdir. Bu işlemin uygulandığı gıdalar arasında turşu önemli bir yer tutmaktadır. Turşu yapımı, insanların gıda maddelerini uzun süre saklayabilmek, az ya da hiç bulunmadıkları yer ve dönemlerde bu ürünlerden yararlanabilmek için geliştirdikleri muhafaza yöntemleri içinde en eski olanlardan bir tanesidir. Bu anlamda, turşu ve turşu teknolojisi uzun ve zengin bir tarihe sahiptir (Aktan vd. 1998).

Turşu tüketimi son yıllara kadar ticari boyuttan uzak, evlerde üretilen bir ürün ve küçük çapta bir ekonomik kazanç kaynağı olarak görülmüştür. Ancak artan nüfus, gelişen toplumsal yapı, iç satımın yanında dış satıma yönelik talep ve insanların ilgisiyle birlikte turşuya olan bu bakış açısı değişmiş ve tüketimi artmıştır. Özellikle iç pazardaki tüketicinin bilinçlenmesi ve dışa yönelik talebin artmasıyla birlikte turşunun, gıda sanayisindeki önemi anlaşılmıştır. Ticari anlamdaki yaklaşım da, buna bağlı olarak farklılaşmış ve önem kazanmıştır. ABD’de turşuların artan taleple birlikte, mevcut marketlerdeki piyasa değeri iki milyar doların üzerinde olduğu bildirilmektedir (Breidt *et al.* 2007). Böyle bir ticari öneme sahip turşu üzerinde endüstriyel boyutta bir üretime, standart üretim tekniklerinin oluşturulmasına ve kaliteli ürün elde etmeye yönelik çalışmaların yoğunlaştırılması büyük anlam ve önem taşımaktadır.

Ülkemizdeki turşu üretim ve tüketimi, yöresel olarak üretim yöntemleri ve tüketilme oranları bakımından değişiklik gösterebilmektedir. Ankara ilinin Çubuk ilçesinde geleneksel yöntemlerle üretimi yapılan turşular, ülke çapında bilinmekte ve çok beğenilmektedir. Yöre verimli topraklara sahip olduğundan tarım ürünleri için son derece uygundur. Bu nedenle, başta tahıl ürünleri olmak üzere meyve ve sebze yetiştiriciliği de yaygın bir şekilde yapılmaktadır. Son yıla ait toplam sebze üretiminin 16 bin ton civarında, meyve üretiminin ise yaklaşık 10 bin ton olduğu bildirilmektedir (www.cubuk.bel.tr). Çubuk’ta yetiştirilen meyve ve sebzelerin tat olarak çok hoş ve iyi kalitede olmasıyla birlikte, ürünlerin turşuya işlenmesi ile doğal özellikleri

korunabilmekte, ayrıca turşu ile daha farklı tat, aroma, tekstür ve besinsel öğeler kazandırılabilir.

Yörede yetiştirilen çok farklı ürünlerle turşu üretimi gerçekleştirilmektedir. Son yıllarda yaygınlaşan üretimle beraber ülke çapında ve ülke dışına da Çubuk turşuları pazarlanmaktadır. Önemli bir geçim kaynağı haline gelen turşuculuk ile 2008-2009 yılı içerisinde yaklaşık 10 bin ton üretim yapılmıştır (www.cubuk.bel.tr). Çubuk'ta üretilen turşuların bilimsel olarak araştırılması, turşuların sahip olduğu özelliklerin belirlenmesi ve turşu üretim potansiyelinin geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir.

Çubuk'ta yetiştirilen ürünlerin kendi doğal mikrofloraları ile doğal fermantasyona tabi tutulması sonucu üretilen turşuların tanıtılması ve pazarlanması amacıyla turşu festivalleri düzenlenmektedir. Böylece, yöreye has turşular piyasaya tanıtılmakta, tüketim alanı genişletilmekte, üreticilere ekonomik kazanç temin ederek yeni kazanç kaynaklarının ortaya çıkmasına imkan verilmektedir. Ayrıca, yörenin üretim kapasitesinin oldukça büyük ve ürünlerinin kaliteli olduğu düşünüldüğünde, ekonomik anlamda hem yöresel hem de ülke için ciddi bir potansiyel olması dikkat çekmektedir. Bunların yanı sıra, turşu üretiminin devamlılığı sağlanarak daha kaliteli ürünlerin oluşumu için çalışma alanları yaratılabilir. Bu bağlamda, yörede üretimi yapılan turşularda laktik asit fermantasyonunun seyrinin ve fermantasyondan sorumlu laktik asit bakterilerinin incelenmesi önemli olacaktır.

Laktik asit bakterilerinin tanımlanmalarında biyokimyasal, fizyolojik ve morfolojik testlerden yararlanılmaktadır (Sharpe 1979). Böylece, klasik fenotipik testlerle temel bir taksonomi oluşturulurken familyadan cinse, türden alt türlere kadar bir tanımlama sistemi gerçekleştirilmektedir. Ancak, son yıllarda yapılan çalışmalarla, laktik asit bakterilerinin tanımlanmasına ilişkin farklı yöntemler geliştirilerek yeni taksonomik yaklaşımlar elde edilmiştir. Temel tanımlama yöntemlerinin yanı sıra moleküler seviyede tanımlamayı öngören hücre yağ asit kompozisyonu, hücre protein profilleri, plazmit profilleri gibi hücre DNA'sına yönelik unsurlar ve ribozomal RNA profillerini esas alan filogenetik çalışmalar, taksonomisi hala değişkenlik gösteren laktik asit

bakterilerinin tanımlanmasına ve sınıflandırılmasına ilişkin önemli taksonomik yapılanmaları oluşturmaktadır.

Sınıflandırmaya ilişkin ilk olarak Orla-Jensen'nin (1919), daha sonraki araştırmalara öncü olan çalışmasında bu grup bakteriler; çubuk veya kok morfolojisinde, hareketsiz, spor oluşturmayan, katalaz negatif ve Gram pozitif olarak tanımlanmıştır. Geleneksel olarak *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* şeklinde dört gruba ayrılan laktik asit bakterileri, daha sonraki çalışmalarla *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* ve *Vagococcus* cinslerini de içerecek şekilde düzenlenmiştir (Jay 2005). Pederson ve Albury tarafından 1950'de yapılan bir çalışmada, doğal fermantasyonun gerçekleştiği turşulardan izole edilen laktik asit bakterilerinin, turşuda bulunma oranlarına göre sıralandığında; *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus faecalis*, *Pediococcus cerevisiae*, *Lactobacillus brevis*, ve *Lactobacillus plantarum* oldukları bildirilmiştir (Etchells *et al.* 1975).

API test kiti gibi hızlı tanımlama sistemlerinin kullanımı, daha geniş aralıktaki karbohidratların fermantasyon karakteristiklerini incelemeyi öngörmektedir. Buna bağlı olarak, API 50 CH (Biomérieux) analizi ile şeker fermantasyon profillerinin karşılaştırılması, laktik asit bakterilerinin tür bazında tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Fenotipik testler ile genotipik testlerin birlikte uygulanmasıyla yapılan tanımlama daha güvenli sonuçlar verebilmektedir. Genotipik tanımlamaya ilişkin laktik asit bakterilerinde, SDS-PAGE ile hücre protein profillerinin belirlenmesi, tür ve alt tür düzeyinde tanımlamayı sağlayabilmektedir.

Bu çalışmanın amacı, Ankara ilinin Çubuk ilçesine ait farklı bölgelerde doğal yöntemlerle üretilen ev ölçeği ve/veya işletme boyutundaki çeşitli turşulardan, fermantasyondan sorumlu laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve izole edilen bakterilerin fenotipik ve moleküler (SDS-PAGE) yöntemlerle tanımlanmasıdır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bilim dünyası tarafından fermente yiyecek ve içeceklerin değeri, son 150-200 yıl içerisinde, fermente gıdalardaki mikroorganizmaların ve enzimlerin keşfedilmesiyle birlikte anlaşılmuştur. Başlangıç itibariyle, fermente gıdalar ve dolayısıyla fermantasyonla kimyacılar ilgilenmiş ve bu konuyla ilgili olarak ilk çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Bu bağlamda, ilk gelişmeler şarap ve biradaki mayaların incelenmesiyle başlamıştır (Hutkins 2006).

1857 tarihinde Louis Pasteur, yaptığı çalışmalarda fermantasyonu, ‘yaşamsız (cansız) bir fenomen olmaktan uzak, yaşayan bir proses’ şeklinde ifade etmiştir. Buna bağlı olarak, fermantasyonda yer alan ve fermantasyonu gerçekleştiren mikroorganizmaların önemine dikkat çekmiştir. Pasteur, süt, şarap ve biradaki fermantasyonlarla ilgili olarak laktik ve etanol fermantasyonları üzerine detaylı olarak çeşitli çalışmalar ortaya koymuştur. Ayrıca, şarabın bozulmasından asetik asit fermantasyonunun sorumlu olduğunu bildirmiştir (Hutkins 2006).

Bilimsel gelişmelere bağlı olarak çeşitli fermantasyonların hangi gıdalarda gerçekleştiğine ve fermantasyonda hangi mikroorganizmaların etkili olduğuna ilişkin çalışmalar yapılmış ve fermente ürünler için mikroorganizma kültürleri oluşturulmuştur. 1900’lü yılların başında tereyağı, peynir gibi çeşitli süt ürünleri üzerine bu tarzda çalışmalar yapılmıştır. Buna benzer olarak ekmek, şarap, bira, fermente et ürünleri gibi gıdalarda da fermantasyon çalışmalarına bağlı çeşitli endüstriler oluşturulmuştur. Fermente gıdaların, insanlar tarafından ilk ‘işlenmiş’ gıdalar olarak üretilmesi ve tüketilmesi, fermente gıdalar üzerine birçok araştırma yapılmasını sağlamış ve bu çalışmalar fermantasyonun bir gıda endüstrisi olarak gelişmesine yardımcı olmuştur (Hutkins 2006).

Fermente gıdalarda, hammaddelerin içerisindeki polisakkarit, protein, lipit vb. büyük moleküllü bileşenler, mikroorganizmalar tarafından, özellikle amilaz, proteaz ve lipaz enzimleriyle parçalanarak lezzet, aroma ve yapı açısından tüketiciler için hoş ve cazip ürünler haline gelmektedir (Steinkraus 1997). Bu ürünler arasında; sucuk gibi et

ürünleri, çok çeşitli mikroorganizmaların işlev görmesiyle birbirinden çok farklı özelliklere sahip peynir türleri, yoğurt gibi geleneksel gıdalar, sağlık açısından fonksiyonel gıda olarak nitelendirilen boza, kefir gibi ürünler, meyve ve sebzelerin muhafazasında önemli bir yer tutan turşu, sauerkraut ve temel bir gıda olan ekmek ile binlerce yıldır üretimi yapılagelen bira, şarap ve sirke örnek olarak verilebilmektedir. Bu kadar geniş bir ürün yelpazesi sunan fermantasyon işlemi, ürünlere göre çeşitli kategorilere ayrılmıştır. Fermente gıdalar, tüketiciler tarafından talebi yüksek olan gıdalar arasında yer almaktadır. Avrupa'da beslenmenin % 25 ve gelişmekte olan çoğu ülkede beslenmenin % 60 kadarını fermente gıdaların oluşturduğu tahmin edilmektedir (Stiles 1996).

Campbell- Platt'e (1987) göre gıda fermantasyonları; içkiler, tahıl (hububat) ürünleri, süt ürünleri, balık ürünleri, meyve ve sebze ürünleri, baklagiller ve et ürünleri olmak üzere yedi sınıfa ayrılmaktadır. Sınıflara ayrılmış fermente gıdaların besinsel etkileri insanlara doğrudan ya da dolaylı olarak yansıyabilmektedir. Gıda fermantasyonları ile gıdaların protein içeriği yükseltilmekte ya da esansiyel aminoasitlerin dengesi sağlanmakta ve kullanılabilirliği kolaylaşmaktadır. Yine benzer bir şekilde, gıdaların tiamin, riboflavin, niasin ya da folik asit gibi vitamin içerikleri zenginleşmekte veya kullanılabilirliği artmaktadır (Steinkraus 1997).

Çeşitli bölge ya da yörelerden elde edilen gıda hammaddelerinin fermantasyon prosesiyle işlenmeleri sonucu ortaya çıkan geleneksel fermente gıdalar, o bölge ya da yörelere has doğal mikroflora ve üretim yöntemleri sonucu, çeşitli fonksiyonel özellikler taşıyabilmektedirler. Bunlar;

1. Gıda substratlarında tat, aroma ve dokunun gelişimiyle birlikte diyeti zenginleştirmek,
2. Laktik asit, asetik asit ve alkol fermantasyonları sayesinde önemli oranda gıdaları muhafaza etmek,
3. Proteinler, esansiyel aminoasitleri, esansiyel yağ asitleri ve vitaminler açısından gıda substratlarını zenginleştirmek,
4. Gıda fermantasyonu süresince detoksifikasyonu sağlamak,

5. Pişirme süresinde ve yakıt ihtiyacında azalma gerçekleştirmek olarak tanımlanabilir (Steinkraus 1995).

Bunların yanı sıra, geleneksel gıdaların üretilmesine bağlı olarak ortaya çıkabilecek önemli sosyal öğeler de söz konusudur. Kırsal ve kentsel çevrelerin her ikisinde de iş fırsatları ve gelir elde etme olanakları sağlaması sonucu fakirlikte (yoksullukta) azalma potansiyeli oluşturabilir. Buna bağlı olarak; sürdürülebilir bir geçim kaynağı modeli ve düşük gelirlili kent insanları için elverişli bir üretim şekli olabilmemesinin yanında, gelenekler ve inançlarla ilişkilendirilmesi sonucu ilgili bölgeye kültürel bir kimlik kazandırabileceği de belirtilmektedir (Mavhungu 2005).

Sebzelerin yetiştiği her yerde, bir gıda işleme yöntemi olarak fermantasyon uygulaması söz konusudur. Çünkü fermantasyon, çok eski ve etkin bir muhafaza yöntemi olmasının yanı sıra, sezon dışında ve uzun mesafelerde gıdaların bozulmadan tüketilebilmesini sağlayan bir işlemdir. Ayrıca; sebze fermantasyonu lezzet olarak farklı, beslenme özellikleri açısından da değerli bir son ürün sunmaktadır. Fermente sebzelerin üretimi, çoğunlukla, kuru tuzlama veya salamuraya (tuzlu suya) bırakma yöntemlerinin uygulanmasıyla gerçekleşmektedir. Bu yöntemlerle uygulanan fermente sebze teknolojisinin, 2000 yılı aşkın bir süre önce Avrupa, Orta Doğu ve Asya ile Amerika'nın birkaç ülkesinde başladığı bildirilmektedir. Buna göre, genellikle, tuz veya salamura, işlenmemiş (çiğ) materyale bir koruyucu olarak eklenmekte ve sonra, çeşitli katkılarla ve uygun sıcaklıkta depolamayla fermente ürün elde edilmektedir (Hutkins 2006, Breidt 2007).

Fermente sebze teknolojisinin temeli laktik asit fermantasyonuna dayanmaktadır. Birçok Orta Asya, Orta Doğu ve Afrika ülkelerinde laktik asit fermantasyonu ile elde edilmiş gıdalar yaygın olarak tüketilmektedir. Bu gıdaların, söz konusu ürünlerin fermente edilmemiş halleriyle kıyaslandığında, besinsel değerleri ve sindirilebilirlikleri oldukça yüksektir. Ayrıca; laktik asit fermantasyonu sonunda ürünün organoleptik kalitesinin iyileştiği, fermantasyon sırasında pH'nın ve oksidasyon-redüksiyon potansiyelinin (Eh) düşürülmesi, inhibitör bileşiklerin üretilmesi ve esansiyel besinler

için rekabet edilmesi sonucunda çoğu bozulmanın engellendiği ve birçok patojen mikroorganizmanın inhibe olduğu belirtilmektedir (Karapınar ve Hancıoğlu 1997).

Laktik asit fermantasyonunun gerçekleştiği önemli proseslerden biri turşudur. Turşu en yaygın tanımıyla; meyve ve sebzelerin belli konsantrasyonlarda tuz içeren salamura veya kendi öz suları içinde, laktik asit bakterilerince fermente edilmesiyle oluşan laktik asidin ve ortamdaki tuzun koruyucu etkisi sonucu dayanıklılık kazanan bir üründür (Aktan vd. 1998). Bu tanımla beraber turşu üretiminde, laktik asit fermantasyonu ve tuzun önemli iki temel faktörü oluşturduğu görülmektedir. Turşu fermantasyonunda, hammaddeden gelen doğal flora içerisindeki laktik asit bakterilerinin, şekerleri asitlere dönüştürmesi ile laktik asit fermantasyonu gerçekleşmekte ve hammaddeye göre yeni ve farklı karakteristikte ürün elde edilmektedir (Hutkins 2006). Laktik asit fermantasyonu ile ayrıca, mikrobiyal bozulmaya ve toksinlerin gelişmesine karşı gıdalarda direnç sağlanmakta, patojenik mikroorganizmaların gelişimi engellenmekte, ürünün besinsel değeri artırılmaktadır (Steinkraus 1983). Üretimde kullanılan salamura içindeki tuzun, konsantrasyonuna bağlı olarak, turşuda mikrobiyal aktivitenin boyutunu ve tipini belirlemek, hammaddedeki pektinolitik ve proteinolitik hidrolizleri sınırlayarak ürün dokusunda yumuşamayı kontrol etmek ve bozulmanın engellenmesine yardımcı olmak gibi önemli görevleri bulunmaktadır (Steinkraus 1983, Fleming *et al.* 1992).

Meyve ve sebzelerin dayanıklı hale getirilmesi amacıyla geliştirilen bir yöntem olan turşu, çoğunlukla hıyarla ilişkilendirilen bir ürün konumundadır (Aktan vd. 1998). Fakat çok sayıda meyve ve sebzelerin laktik asit fermantasyonuna tabi tutulmasıyla çok çeşitli turşular elde edilebilmektedir. Lahana, biber, taze fasulye, patlıcan, kavun, kiraz ve kapari hıyardan sonra üretimi yaygın olarak gerçekleştirilen turşu çeşitleridir. Bitki kökenli gıda ürünlerinin içerdikleri bileşenler oldukça önemlidir. Meyve ve sebzeler, içerdikleri yüksek miktardaki mineraller, vitaminler, diyet lifleri, fenolik maddeler ve antioksidan fitokimyasallar gibi fonksiyonel gıda bileşenleri açısından oldukça zengin ve sağlıklı gıdalardır (Luckow and Delahunty 2004). Meyve ve sebzelerin, turşuya işlenmeleri sırasında bu özelliklerinin turşuya yansması, turşunun besinsel içeriği bakımından önemlidir. Meyve ve sebzelerin diyetlerde çok miktarda yer alması birçok tüketim şekli oluşturmaktadır. Taze tüketilmesinin yanı sıra pastörize edilmiş,

pişirilmiş, haşlanmış, mikrodalgada pişirilmiş olarak tüketimi söz konusudur. Ancak, uygulanan işlemlerle meyve ve sebzeler çabuk bozulabilmekte, fiziksel ve kimyasal özellikleri istenmeyen doğrultuda değişebilmektedir. Laktik asit fermantasyonunun basit ve önemli bir biyoteknolojik işlem olarak meyve ve sebzelere uygulanması sonucunda, meyve ve sebzelerde gıda güvenliği, raf ömrü, beslenme ve duyuşal özellikler sürdürülebilmekte ve iyileştirilebilmektedir (Muñoz *et al.* 2009).

Turşu üretim yöntemleri temel olarak ikiye ayrılmaktadır (Aktan vd. 1998):

1. Laktik Asit Fermantasyonu

Laktik asit bakterileri (LAB) tarafından gerçekleştirilen fermantasyon sonucu oluşan laktik asit ve ortamdaki tuzun koruyucu etkisiyle turşu elde edilir. Fermantasyonun iki farklı uygulaması söz konusudur. En yaygın yöntem olarak yer alan ‘asitli salamuralı fermantasyon’ uygulamasında, asetik asit ve salamura içindeki hammadde fermantasyona tabi tutulur.

Bir diğerk yöntem olan ‘salamuralı fermantasyon’ uygulamasında ise salamura içindeki hammadde fermantasyona bırakılır. Bu şekilde uygulanan işleme ‘stok işleme’ adı da verilmektedir.

2. Konserve

Fermantasyon işlemi yapılmaksızın, doğrudan kavanoz veya teneke kutulara yerleştirilen hammadde üzerine asit ve tuzdan oluşan salamuranın konularak, pastörizasyon prosesinin uygulandığı yöntemdir. Üretim amacına bağılı olarak bu yöntem de iki farklı şekilde uygulanmaktadır. Kavanoz veya tenekelerdeki asit ve tuz içeren salamura içerisine hammaddenin konularak pastörizasyon işleminin gerçekleştiğı ‘kavanoz veya teneke işleme’ ilk yöntemi oluşturmaktadır. Diğerk bir uygulama ise kampanya dönemini uzatmak ve yıl boyunca işletmeyi çalışır halde tutmak amacıyla, hammaddenin daha sonra kavanoz veya tenekelere işlenmek üzere sirkeli salamura içinde bekletilmesine dayalı ‘stok veya yarı mamul işleme’dir.

Turşulardaki laktik asit fermantasyonu, bir üretim tekniği olarak tüm turşularda uygulanmamaktadır. Laktik asit fermantasyonu gerçekleştirilmeksizin üretilen turşular, Amerika'da tüketilen turşuların yaklaşık yarısını oluşturmaktadır. Bu durumda, salamuraya koruyucu olarak asetik asit katılmakta ve fermantasyon aşaması atlanarak turşu üretilmektedir. Çoğunluk itibariyle, fast-food tarzı yiyeceklerde bu şekilde üretilmiş turşular kullanılmaktadır (Hutkins 2006).

Amerika'da turşular genellikle, üretim proseslerinin farklı olması nedeniyle; taze paketlenmiş, soğutulmuş ve fermente edilmiş turşular olarak üç grupta toplanmaktadır (Hutkins 2006).

Taze paketlenmiş turşular: Sirke ve çeşitli tatlandırıcılarla karıştırılarak ve pastörize edilerek üretilen turşulardır.

Soğutulmuş turşular: Yine sirke ve çeşitli tatlandırıcıların katıldığı, soğutma işleminin uygulandığı, zayıf bir fermantasyon işleminin gerçekleştirildiği turşu grubunu oluşturur.

Fermente edilmiş turşular: Gerçek turşu olarak da nitelendirilen bu turşu çeşidinde, tam olarak bir fermantasyon uygulanmasıyla diğer turşulardan oldukça farklı tat, aroma ve tekstür oluşumu söz konusudur.

Meyve ve sebzelerin doğal florası maya ve küf ile Gram (+) ve Gram (-) bakteriler olmak üzere oldukça fazla miktarda ve çok çeşitli mikroorganizma gruplarını içermektedir. Bahsedilen mikroorganizma gruplarının içerisinde, hammaddenin, kendi doğası gereği doku yüzeyinden ve havadan kaynaklanan yüksek bir Eh'ye sahip olması sonucu, turşuda esas olarak fermantasyonu gerçekleştiren laktik asit bakterilerinin dışında, istenmeyen mikroorganizmalar da bulunabilmektedir. *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus* ve çeşitli küf türleri hammadde üzerinde baskın olarak yer almaktadır. Bununla birlikte *Enterobacter*, *E. coli*, *Klebsiella* gibi fakültatif anaeroblar ile *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia* ve *Rhodotorula* gibi çeşitli mayalar da bulunmaktadır (Hutkins 2006). Laktik asit bakterilerinin miktarı değişken olmakla birlikte UV ışınları, sıcaklık ve kullanılabilir besinler gibi faktörler sayılarının sınırlı

olmasını etkilemektedir (Fleming *et al.* 1987). Turşu fermantasyonunu gerçekleştiren başlıca *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* cinslerine ait laktik asit bakterilerinin sebzelerde düşük seviyelerde yer alması şaşırtıcıdır. *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Echerichia* ve *Bacillus* cinslerinin toplam popülasyonu 10^7 kob/g gibi yüksek bir seviyedeysen, laktik asit bakterileri yaklaşık 10^3 kob/g seviyesindedir (Hutkins 2006).

Turşularda mikrobiyel proses olarak laktik asit fermantasyonunun başarılı olması ürün kalitesi açısından oldukça önemlidir. Ayrıca, fermantasyonun seyrini etkileyen oldukça karmaşık, değişken (kararsız) ve birbirine bağlantılı olan faktörler de söz konusudur. Salamura uygulamaları, çevresel koşullar ve başlangıçtaki mikrobiyal popülasyon öncelikli faktörleri oluşturmaktadır (Etchells *et al.* 1975).

Fermantasyonda mikrobiyel aktivite için, laktik asit bakterilerinin gelişmesini teşvik edecek ve laktik etkisi olmayan floranın baskılanmasını sağlayacak şekilde ortam koşullarının ayarlanması gerekmektedir. Sebzelerdeki laktik asit bakteri seviyesi düşük olsa bile, birkaç faktörün bir arada oluşturulmasıyla birlikte turşunun olgunlaşması için gerekli ortam yaratılabilir. Yeterli tuz miktarı, uygun sıcaklık ve anaerobik ortam temel faktörleri oluşturmaktadır. Ayrıca, kontrollü bir fermantasyon ile koşulları standardize edilmiş bir prosesin uygulanması yararlı olabilmektedir. Starter kültür kullanımına bağlı olarak gerçekleştirilen kontrollü fermantasyon ile istenilen doğrultuda fermantasyonun sağlanabileceği belirtilmektedir (Hutkins 2006).

Hammaddenin salamuraya konulmasıyla birlikte, florasından kaynaklanan mikroorganizmalar ile doğal bir fermantasyon başlar. Doğal fermantasyon, endüstri tarafından uygulanan geleneksel bir üretim yöntemidir (Palop *et al.* 2000). Bu sırada laktik asit bakterilerinin aktivitesini ve ürün kalitesini önemli derecede etkileyebilecek mikrobiyel etkileşimler gerçekleşmektedir (Fleming *et al.* 1987). Floranın doğal fermantasyon süresince değişmesi nedeniyle fermantasyon başlangıç, birincil fermantasyon, ikincil fermantasyon ve fermantasyon sonrası olmak üzere dört aşamayla kategorize edilir. Hammaddenin salamura içerisine yerleştirilmesiyle, hızlı bir şekilde mayalar ile Gram (+) ve Gram (-) bakterilerinin geliştiği gözlenir. Başlangıç pH değeri

5,5 seviyesindedir ve mevcut fermente edilebilir şekerlerden glikoz ve früktoz, laktik asit bakterileri için uygun substrat konumundadır (Fleming *et al.* 1987). *Enterobacteriaceae* üyeleri de aynı substrat için rekabetçi durumundadır. Bu aşamanın sonunda, pH'nın düşmesiyle laktik asit bakterileri üstün konuma gelir ve birincil fermantasyon başlar. Bu aşamada laktik asit üreten beş bakteri türünün aktif olduğu ve gelişimlerine göre muhtemel sıralamasının; *Streptococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus cerevisiae*, *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus plantarum* şeklinde olduğu bildirilmektedir (Fleming *et al.* 1992). Tuzun etkisiyle birlikte, genel bir sıralamayla laktik asit bakterilerinden *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Lactobacillus plantarum* türleri toplam asidin üreticileri olarak baskın konuma geçmektedirler. Bu sıralamayı türlerin başlangıçtaki miktarları, gelişme oranları, tuz ve asit dirençlilikleri etkilemektedir. *L. mesenteroides*'in aside direnci diğer bakteriler kadar yüksek olan bir tür olmasa da, fermantasyonu başlatan mikroorganizma olduğu, bunun nedeninin hammaddede diğer laktik asit bakterilerine oranla daha yüksek miktarda bulunmasından kaynaklandığı belirtilmektedir (Fleming *et al.* 1987). Asit direnci çok yüksek olan *Lactobacillus plantarum* ise fermantasyonu sonlandıran mikroorganizma olarak rol oynamaktadır (Fleming *et al.* 1992).

Laktik asit bakterileri dışında hammadde florasındaki diğer mikroorganizmalardan mayalar da birincil fermantasyon aşamasında aktiftirler. Eğer birincil aşamadan ortamda fermente edilebilir şeker kalırsa ikincil fermantasyon aşamasında da yer alırlar (Fleming *et al.* 1992). Mayaların oksidatif ve fermantatif faaliyetleri bozulma etmeni olarak değerlendirilir ve fermantasyonda yer almaları genellikle istenmez. Fermantatif mayaların oluşturduğu CO₂ kaynaklı bozulmalara neden olurlar. Oksidatif mayalar ise fermantasyonla oluşan laktik asidi kullanarak asitliği azaltırlar ve diğer bozulma etmenlerinin faaliyetlerine olanak verirler. Bunların dışında, artık şekerleri kullanarak fermantasyonu tamamlamaları ile ürüne yönelik olumlu etki de sağlayabilirler. Ayrıca, metabolizmaları sonucu diasetil gibi aroma maddeleri üreterek, az da olsa, ürünün aroma gelişimine yardımcı olurlar. Bir diğer mikroorganizma grubu olan küfler ise selüloolitik ve pektinolitik aktiviteleri ile turşularda yumuşamaya neden olduklarından gelişmeleri istenmez (Aktan vd. 1998).

Son aşamada ise fermantasyonun seyri, gerçekleştirildiği kabın (tankın) açık ya da kapalı olmasına göre değişmektedir. Çünkü tankın açık veya kapalı olması mikroorganizmaların gelişimini etkilemektedir. Eğer kapalı tanklar kullanılıyorsa herhangi bir mikrobiyal aktivite söz konusu değildir. Açık tanklarda ise salamura yüzeyinde tüm mikroorganizmalar gelişebilmektedir (Aktan vd. 1998).

Doğal fermantasyonla, tüketilebilirlik anlamında, genellikle kabul edilebilir ürünler elde edilmektedir. Ancak, son üründe tutarsızlıklar ve bozulmalar meydana gelebilmektedir (Daeschel and Fleming 1987). Bunların dışında, fermantasyonun kontrol ve güvenliğinin sağlanamamasına bağlı olarak ürüne istenen niteliklerin kazandırılmaması, ürün ve üretime yönelik standardizasyonun oluşturulamaması ile ardışık bir üretimin sağlanamarak talebin etkin bir biçimde karşılanamaması doğal fermantasyona ilişkin olumsuzlukları yansıtmaktadır. Kontrollü fermantasyon uygulamasının sonucunda ise oluşabilecek olumsuzluklar giderilebilmekte, fermantasyon istenilen doğrultuda yönlendirilebilmekte ve gelişmesi istenen starter kültür için gerekli çevre koşulları sağlanabilmektedir (Özçelik ve İç 1996).

Doğal fermantasyonun fiziksel ve kimyasal olarak kontrol edilmesi, ancak starter kültürün fermantasyon sisteminde kullanılmasıyla etkili olabilmektedir (Daeschel and Fleming 1987). Pederson ve Albury (1956) tarafından hıyar turşularında bir starter kültür uygulaması olan saf kültür fermantasyonu gerçekleştirilmiş, bu uygulama için homofermantatif *Lactobacillus plantarum* türü kullanılarak bu bakterinin fermantasyonu tek başına sonuçlandırdığı görülmüştür. Ancak diğer türlerin, örneğin *Leuconostoc mesenteroides*'in heterofermantatif iz yolunu izlemesi sonucu oluşturduğu bileşikler ile ürüne yönelik tat ve aroma gibi özellikleri kazandıramadığı bildirilmiştir (Hutkins 2006). *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Lactobacillus brevis* türleriyle de saf kültür çalışmaları yapılmıştır. Ancak, fermantasyonu başlatarak ilk kontrol mekanizmasını gerçekleştiren bu türler, fermantasyonu tamamlamada başarılı olamamışlardır. Hammaddeden gelen mikroorganizmalar dinamik bir ekosistem ile değişen bir fiziksel ve kimyasal çevre sunmaktadır. Bu koşullar çerçevesinde, tek bir tür laktik asit bakterisi içeren starter kültürün, optimal bir gelişme gösterememesi ve iyi derecede rekabetçi olamaması nedeniyle fermantasyonun istenilen düzeyde

gerçekleşmesini sağlayamadığı; ayrıca fermantasyonu, fermantasyon boyunca değil, yalnızca bir aşaması süresince kontrol edebildiği bildirilmiştir (Daeschel and Fleming 1987). Bunların yanı sıra, saf kültür elde etme işlemlerinin, ticari, ekonomik ve teknik anlamda pratik olmadıkları belirtilmektedir (Etchells *et al.* 1964). Saf kültürlerin fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik bakımdan bir entegrasyon sağlayamaması sonucu, çoklu ya da karışık mikroorganizma içeren bir starter kültürün kullanılması öngörülmüş ve böylece fermantasyonda yaşanabilecek tüm bu sorunların giderilebileceği bildirilmiştir (Daeschel and Fleming 1987). Turşu üretiminde, karışık bir kültürden oluşan starter kültür teknolojisinin uygulanmasıyla; fermantasyon kontrol edilebilmekte ve güvenliği sağlanabilmekte; ürün tekstür, tat, aroma yönünden iyileştirilebilmekte ve standart özellikte bir üretim tekniği geliştirilebilmektedir (Hutkins 2006).

2.1 Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılmasına ilişkin yapılan çalışmalarda, morfolojik açıdan çok değişken özellik gösteren bir familya olduğu ve üyelerinin ise fizyolojik açıdan oldukça benzerlik gösterdiği ortaya konulmuştur. Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında geleneksel olarak kullanılan taksonomik sınıflandırmanın temeli; fizyolojik, morfolojik, farklı sıcaklık, farklı pH değerleri ve tuz konsantrasyonlarında gelişme yeteneği, arjinin hidrolizi ve karbohidrat katabolizması gibi biyokimyasal özelliklerin incelenmesini içeren fenotipik özelliklere dayanmaktadır (Gobbetti *et al.* 2005, Botina *et al.* 2006). Tüm LAB üyeleri Gram (+), katalaz (-), *Sporolactobacillus inulinus* hariç spor oluşturmeyen, fakültatif anaerobik, *Pediococcus* cinsi hariç tek düzlemde bölünen ve bazı istisnalar hariç hareketsiz, çubuk ya da kok şekilli, oksidaz ve benzinin negatif, nitratı nitrite indirgeyemeyen, sitokromları olmayan, jelatinaz negatif ve laktat kullanamayan bakteriler olarak tanımlanmaktadır. Mutlak fermantatif olmalarının yanı sıra fermantasyon ürünü olarak laktik asit üretmektedirler. Hem grubu (katalaz, sitokrom) içermeksizin oksijen varlığında gelişebilen nadir mikroorganizma özelliğini taşımaktadırlar. LAB'nin doğal olarak buldukları yaşam alanları süt ve süt ürünleri, işlenmemiş taze veya çürümüş bitkiler, insan ve hayvanların bağırsak mukoza ve içerikleridir (Carr *et al.* 2002, Karasu 2006). Gıdalarla ilişkilendirilen LAB ise

Lactococcus, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Wiessella*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus* ve *Leuconostoc* cinslerinden oluşmaktadır (Vandamme *et al.* 1996).

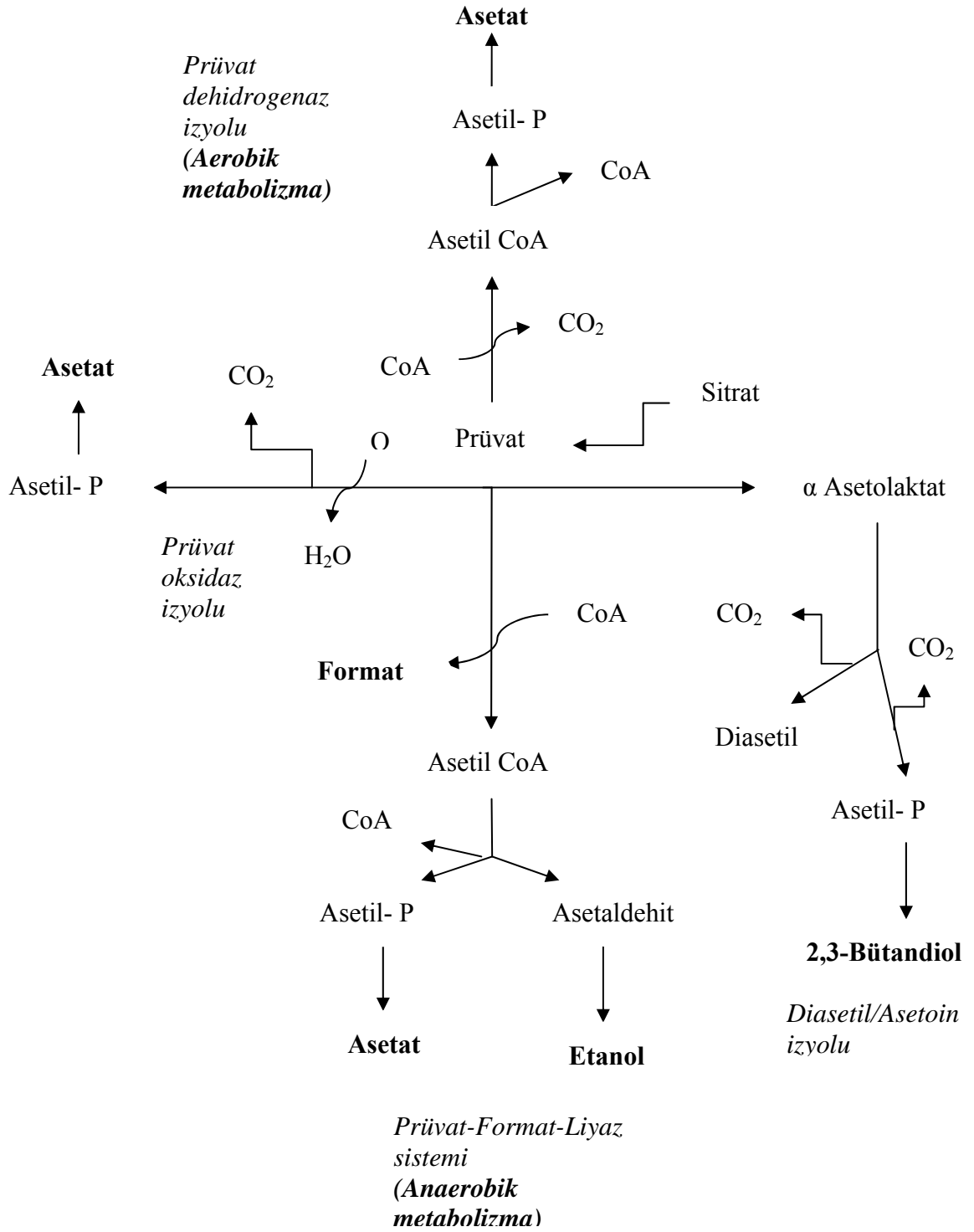
Laktik asit bakterileri *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* temel olmak üzere dört büyük cinsten oluşmaktadır. Söz konusu cinsler, karbon kaynağı glikozu, oksijen ihtiyaçlarına göre farklı yollarla kullanmaktadır (Carr *et al.* 2002).

Çizelge 2.1 LAB cinslerinin oksijen gereksinimlerine göre gruplandırılması (Carr *et al.* 2002)

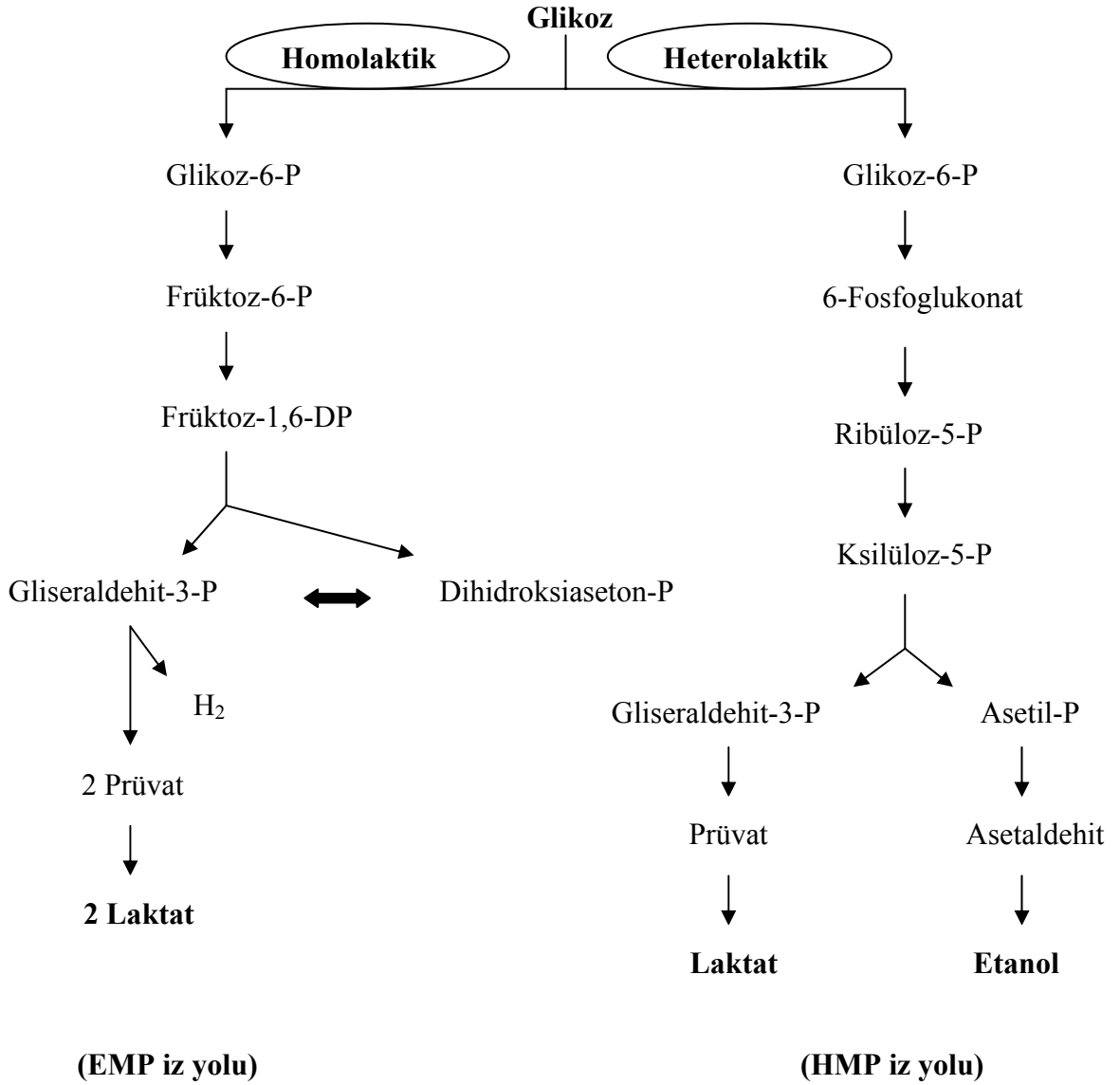
<i>Lactobacillus</i>	Mikroaerofilik/Anaerobik
<i>Leuconostoc</i>	Fakültatif Anaerobik
<i>Pediococcus</i>	Fakültatif Anaerobik
<i>Lactococcus</i>	Fakültatif Anaerobik

LAB'nin fermantasyon sonucu oluşturduğu ürünler, glikozun genetik ve fizyolojik farklılıklara bağlı olarak parçalanması ile değişiklik gösterir ve bu değişiklik bakterileri Homofermantatifler ve Heterofermantatifler olarak gruplandırır (Jay 2005). Homofermantatif laktik asit bakterileri *Streptococcus* ve *Pediococcus* cinslerini içerir. Heterofermantatif laktik asit bakterileri ise *Leuconostoc* cinsi ile *Lactobacillus* cinsinin bir alt grubu olan Betabacteria'dan oluşur (Carr *et al.* 2002).

Homofermantatif iz yolunun takibi sonucu şekerin % 90'dan fazlası laktik aside dönüşürken, heterofermantatif iz yoluyla % 50 kadarı laktik aside, kalan kısmın % 20-25'i CO₂'e ve % 20-25'i de asetik asit ile etanole dönüşür (Titsler *et. al.* 1952, Hutkins 2006).



Şekil 2.1 Prüvattan önemli metabolik ürünlerin oluşumu (Fitzgerald and Caplice 1999)



Şekil 2.2 Laktik asit bakterilerinin glikozu homolaktik ve heterolaktik yollarla parçalaması (Fitzgerald and Caplice 1999)

Homofermantatifler aldolaz ve heksoz izomeraz enzimlerine sahiptir, ancak fosfoketolaz enzimleri yoktur. Dolayısıyla, Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) iz yolunu kullanırlar ve 2 laktat/glikoz oluştururlar. Heterofermantatiflerin ise fosfoketolaz enzimleri vardır, ancak aldolaz ve heksoz izomeraz enzimlerinden yoksundurlar. Bu sebeple, glikozu indirgemek için heksoz monofosfat (HMP) ya da pentoz iz yolunu

kullanırlar ve laktik asidin yanı sıra son ürün olarak CO₂, asetik asit ve etanol oluştururlar (Jay 2005).

2.1.1 *Lactobacillus*

Lactobacillus cinsinin oldukça geniş bir bakteri grubundan oluşmasıyla birlikte, yeni çalışmalar sonucunda bu cinse yedi yeni tür ve alt tür eklenmiştir. Bu cinse ait tüm üyeler spor oluşturmayan çubuklar olmakla birlikte bu tanımlama morfoloji açısından yeterli değildir. Çünkü farklı boyutlardaki çubuk uzunluklarının yanı sıra kıvrılmış, eğri veya oldukça ince formda olmak üzere çok değişik şekillerde bulunabilmektedirler. Ayrıca, koloni morfolojisi agar plaklarında değişken olabilmekte; bazı koloniler geniş yuvarlak formlar oluştururken, bazıları küçük ya da düzensiz koloniler oluşturabilmektedir. *Lactobacillus* cinsi, diğer LAB cinsleri içinde ekolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve genetik yapı olarak en çok çeşitlilik gösteren grup olarak yer almaktadır. *Lactobacillus* türleri ekolojik olarak geniş bir yaşam alanında yer almaları nedeniyle doğada her yerde bulunabilen (ubikuitöz) organizma olarak tanımlanırlar. Meyve ve sebzelerde, süt ve et ürünlerinde, meyve suları ve fermente içeceklerde, tahıl ürünlerinde, hayvan ve insan bağırsak sistemlerinde bulunurlar. (Hutkins 2006).

Sahip oldukları farklı fizyolojik özellikleri sonucunda mezofilik, psikrotrofik, termodurik ve termofilik türler içermektedir. Optimum gelişme sıcaklık aralığı geniş olmakla birlikte, 30-45 °C derecelerinde gelişim gösterebilirler. Bazı türleri düşük su aktivitesine, yüksek tuz konsantrasyonuna ve ozmotik basınca dirençlilik gösterir. Bazı türleri ise etanol-tolerant ve safra-tolerant olarak nitelendirilir. Ayrıca, birçok tür de aerotolerant özelliktedir (Hutkins 2006). Gıdalarda pH 4 seviyesinde asit üretebildikleri ve bu asit seviyesine dayanabildikleri için asidurik veya asidofilik özelliktedirler (Holzaphel and Stiles 1997).

Farklı iz yolları kullanarak şekerleri metabolize ederler (Holzaphel and Stiles 1997). Früktoz-1,6-bisfosfat aldolaz enziminin varlığına bağlı olarak fizyolojik açıdan zorunlu homofermantatif, fakültatif heterofermantatif ve früktoz-1,6-bisfosfat aldolaz enzimini

içermeyen zorunlu heterofermantatif şeklinde üç gruba ayrılırlar (Fitzgerald and Caplice 1999). *Lactobacillus* cinsinin yaklaşık üçte birlik bir kısmını heterofermantatif türler oluşturur (Holzaphel and Stiles 1997). Zorunlu homofermantatifler heksozları EMP yolu ile laktik aside indirgerken, pentozları ve glukonatu parçalayamazlar. Fakültatif heterofermantatif grup, heksozlardan EMP yoluyla laktik asit oluşturmasının yanı sıra asetik asit, formik asit ve etanol da oluşturabilmektedir. Pentoz fosfoketolaz içermeleri nedeniyle pentoz şekerleri laktik asit ve asetik aside fermente edebilmektedir. Son grup olan zorunlu heterofermantatifler ise fosfoglukonat iz yoluyla heksozları laktik asit, asetik asit, etanol ve CO₂'e parçalar. Pentozları ise laktik asit ve asetik aside fermente ederler (Fitzgerald and Caplice 1999). Metabolik çeşitliliklerine bağlı olarak birçok tür zengin besin ortamına ihtiyaç duyar. Proteolitik ve lipolitik olmadıklarından hızlı gelişme için aminoasitlere, peptitlere ve yağ asitlerine gereksinim duyarlar. Bazı suşların gelişebilmesi için özellikle çeşitli vitamin, nükleotit ve diğer besinlere gerek vardır. Fermente edilebilir karbohidratlar temel besini oluşturmakla beraber glikoz, früktoz, laktoz gibi şekerlerin yanı sıra mannitol, sellobiyoz gibi şekerleri fermente edebilen türler de mevcuttur (Hutkins 2006).

Genel olarak laktik asit bakterilerinin % 35-40 gibi düşük bir G+C oranına sahip olmalarına rağmen, genetik yapı olarak çok çeşitlilik gösteren *Lactobacillus* türleri, % 32'den % 55 gibi bir aralıkta G+C oranı gösterirler (Hutkins 2006).

Orla ve Jensen (1919) tarafından *Lactobacillus* cinsi, glikoz fermantasyonu süresince oluşturdukları laktik asidin miktarına göre homofermantatif ve heterofermantatif olarak sınıflandırılmaktadır. Ayrıca, değişik aralıktaki sıcaklık gelişimlerine ve biyokimyasal reaksiyonlarına göre Betabacterium, Streptobacterium ve Termobacterium olmak üzere üç gruba ayrılmıştır (Mavhangu 2005).

Betabacterium: Glikozdan CO₂ oluşturan heterofermantatif laktobasil türlerini içeren bir gruptur. Beslenmeleri sırasında tiamine gereksinimleri vardır. Optimal gelişme sıcaklıkları 15 °C'dir. *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus fermentum* fermente gıdaların üretiminde önemli türleri oluşturmaktadır. Schillinger'e göre Betabacterium iki temel gruba ayrılmıştır: Riboz ve arginin negatif olan *L. fructosus*, *L. sanfrancisco*,

L. viridescens; ribozu fermente edebilen ve arginini hidrolize eden *L. buchneri*, *L. carnis*, *L. collinoides*, *L. confusus*, *L. divergens*, *L. fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. halotolerans*, *L. kandleri*, *L. kefir* ve *L. minor* (Carr *et al.* 2002).

Streptobacterium: Çoğu gıda ürünlerinde ve endüstriyel fermantasyonlarda kullanılan oldukça geniş bakteri türü içeren homofermantatif bir gruptur. Habitat olarak lahana gibi çeşitli bitkiler, mısır, süt ve peynirlerde bulunurlar. Ayrıca kırmızı et ve vakumla paketlenmiş etlerde de yer alırlar (Carr *et al.* 2002). Riboz ve pentoz şekerlerini fermente edebilirler, glikoz yerine glikonattan CO₂ oluştururlar, en uygun gelişimi 30 °C'de gösterirler ve % 1,5 üzerinde laktik asit üretebilirler (Carr *et al.* 2002, Jay 2005). Streptobacterium grubu mannitolu fermente edebilme yeteneklerine göre iki ana gruba ayrılmıştır. Mannitol pozitif grup; *L. agilis*, *L. casei* spp. *casei*, *L. casei* spp. *rhamnusus*, *L. casei* spp. *pseudopantarum*, *L. coryniformis*, *L. maltaromicus*, *L. piscicola*, *L. plantarum*. Mannitolu kullanmayan grup ise; *L. alimentarius*, *L. amylophlus*, *L. bavaricus*, *L. casei* spp. *tolerans*, *L. curvatus*, *L. farciminis*, *L. sake*, *L. sharpeae*, *L. yamanashiensis* (Carr *et al.* 2002).

Thermobacterium: Termofilik ve homofermantatif olan bu grup ne glikoz ne de glikonattan CO₂ oluşturabilir. Optimal gelişme sıcaklıkları 40-45 °C'dir, 15 °C'de gelişemezler ve % 30 üzerinde laktik asit üretebilirler. Ribozu fermente ve arginini hidolize edemezler. *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* spp. *lactis*, *L. helviticus*, *L. lactis*, *L. leichmanii*, *L. salivarius* bu grubu oluşturan türlerdir (Carr *et al.* 2002).

2.1.2 *Leuconostoc*

İlk olarak Van Tieghem (1878) tarafından keşfedilen bu bakteri cinsi (Mavhungu 2005), Gram pozitif, heterofermantatif, kok şeklinde olup, çiftler ya da zincirler halinde bulunur ve hareketsizdir (Carr *et al.* 2002). Spor oluşturmeyen fakültatif anaerobik bu bakteri cinsi agarlı besi yerinde küçük, gri (boz) ve flat (yassı) koloniler oluşturur (Hucker *et al.* 1957). Katalaz ve arjinin negatif olup sitokromları yoktur. Ayrıca;

proteolitik aktivite göstermez, indol oluşturmaz ve nitratları indirgeyemez (Sneath *et al.* 1986). Glikozdan D (-) formda laktat oluşturur. *Lactobacillus* ve *Pediococcus* cinslerine göre gelişebilmek için 4,5 ve üzerinde pH değerlerindeki ortama gereksinim duyar (Carr *et al.* 2002). LAB arasında bitkilerde baskın tür olarak yer alan *Leuconostoc* cinsi meyve ve sebzelerin yüzeyi ve içi, süt ürünleri gibi farklı doğal yaşam alanlarında bulunur (Mavhungu 2005). Birçok süt ürününün fermentasyonunda, sauerkraut, turşu ve çeşitli et ürünlerinin üretiminde önemli roller üstlenir (Kitchell and Shaw 1975). Gıdalarda *Leuconostoc* türlerini önemli kılan birkaç özellik söz konusudur (Mavhungu 2005):

1. Diasetil ve diğer aroma bileşikleri üretebilirler ve böylece çeşitli gıdalara karakteristik olabilecek nitelikte aroma sağlarlar.
2. Tuza direnç göstererek, sauerkraut ve dereotu turşu fermentasyonlarında, *Leu. mesenteroides* türü ile laktik asit fermentasyonun ilk aşamasını gerçekleştirirler.
3. Sebze ürünlerinde fermentasyonu diğer laktiklere göre daha hızlı bir şekilde başlatabilirler.
4. Yüksek şekere dirençlilikleri (özellikle % 55-60'lara kadar direnç gösterebilen *Leu. mesenteroides*) ile şuruplarda, sıvı keklerde ve dondurma karışımlarında gelişebilirler.

2.1.3 *Lactococcus*

Lactococcus cinsi filogenetik yapısına göre beş farklı türden oluşmaktadır: *Lactococcus garviae*, *Lc. lactis*, *Lc. piscium*, *Lc. plantarum*, *Lc. raffinolactis* (Hutkins 2006). Laktik asit fermentasyonlarına ilişkin, laktokoklar üzerinde yapılan genetik çalışmaların merkezini kazein parçalanması, sitrattan diasetil üretimi ve faj saldırılarına dirençlilikleri oluşturmaktadır. Ayrıca, bakteriyosin gibi inhibitör maddelerini üretme yetenekleri de çalışılan konular arasında yer almaktadır. *Lactococcus* cinsi, endüstriyel

starter kültür teknolojisinde uzun bir geçmişe ve geniş bir kullanım alanına sahiptir (Holzaphel and Stiles 1997).

Türlerin hepsi hareketsiz, zorunlu homofermantatif, fakültatif anaerob ve optimum gelişme sıcaklığı 30 °C'dir. 10 °C'de gelişme gösterebilmeleri ile *Streptococcus* cinsinden, 45°C sıcaklığında gelişmemeleri ile de *Enterococcus* cinsinden ayrılırlar (Carr *et al.* 2002, Kıran 2006). Mikroskopik morfolojisinde değişkenlik göstermesiyle birlikte, genellikle çift ya da zincir koklar halinde yer alırlar. (Hutkins 2006). Yaygın olarak çiğ süt ve süt ürünlerinde bulunurlar (Carr *et al.* 2002).

Lc. lactis'in, ekonomik olarak oldukça değerli olan *Lc. lactis* spp. *lactis* ve *Lc. lactis* spp. *cremoris* olmak üzere iki alt türü bulunmaktadır. Bu nedenle, gıdalar üzerindeki etkilerinin araştırılmasına yönelik biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri çalışılmıştır. LAB arasında ticari olarak en önemli türleri oluşturmakla birlikte, fermente süt ürünlerinde önemli görevler üstlenmişlerdir (Holzaphel and Stiles 1997). Sert peynirlerin çoğunun ve birkaç kültürlü süt ürünlerinin üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadırlar (Teuber 1995). *Cl. botulinum* gibi çeşitli Gram pozitif bakterilere ve sporlarına karşı etki gösteren lantibiyotik ve nisin gibi önemli bakteriyosinleri üretme yeteneğindedirler (Holzaphel and Stiles 1997).

2.1.4 *Pediococcus*

1884 yılında Wochnschre F. Balcke tarafından tanımlanan zorunlu homofermantatif *Pediococcus* cinsi, hücre organizasyonu gereği 'Sarcinae' olarak bilinmekteydi. Mikroskopik morfolojisi incelendiğinde iki düzlemde bölünerek tetrat yapı gösterdiği anlaşılmıştır. Bu özelliği ile LAB arasında tek cins konumundadır (Sakamoto and Konings 2003, Mavhungu 2005). Biraların bozulmasıyla ilişkilendirilmesi sonucu Louis Pasteur tarafından çalışılan ilk bakteriler arasında yer almıştır (Holzaphel and Stiles 1997). Amonyak tuzlarını nitrojen kaynağı olarak kullanamadığından ve nitratları nitritlere indirgeyemediğinden karmaşık (kompleks) azot bileşiklerine gereksinim duyar. Fakültatif anaerobik olan bu LAB cinsi, EMP iz yoluyla glikozu fermente eder

ve CO₂ üretmeksizin L(-) veya DL(-) formda laktat oluşturur. Bitki ve hayvanlara apatojenik olan tüm *Pediococcus* türleri bitki materyalleri, süt, tuzlu sular, hayvan idrarı ve bira gibi doğal yaşam alanlarında bulunmaktadır (Mavhungu 2005, Hutkins 2006).

16S rRNA sekans analizlerine göre Pediokoklar 6 tür içermektedir; *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus*. Yeniden sınıflandırılması sonucunda *P. halophilus* türü *Tetragenococcus* cinsine dahil edilmiştir. Optimum gelişme sıcaklıkları 25 °C ile 50 °C arasındadır. 4,2 pH değerindeki asidik ortamda ve % 6,5 oranındaki tuz konsantrasyonunda yaşabilmeleri ile diğer laktik asit bakterilerinden ayrılmaktadırlar (Hutkins 2006).

P. acidilactici ve *P. pentosaceus* türleri doğal olarak çiğ sebzelerde bulunurlar ve uygun koşullar altında fermente sebzelerin üretiminde anahtar rol üstlenirler (Hutkins 2006). Ayrıca, özellikle farklı tip sosislerde starter kültür olarak ve peynirlerin olgunlaştırılma aşamasında kullanılmaları söz konusudur (Carr *et al.* 2002, Hutkins 2006). *P. acidilactici* ve *P. pentosaceus* bakteriyosin üretme yeteneğinde olan türlerdir (Holzapfel and Stiles 1997). *P. pentosaceus*, pediosin A üretmesi sonucu fermente sebzelerde koruyucu özellik gösterir (Mavhungu 2005). Bunların yanı sıra, *P. damnosus* türü biralarda diasetil üretmesi nedeniyle ciddi sorunlar oluşturmaktadır (Sakamoto and Konings 2003).

2.2 Turşuda Yer Alan Laktik Asit Bakterileri

Lactobacillus, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* ve *Tetragenococcus* cinsleri doğrudan gıda fermantasyonlarıyla ilişkili LAB'dir. Ayrıca, *Enterococcus* cinsi de gıda fermantasyonlarında yaygın olarak yer almaktadır (Hutkins 2006). Karbonhidratlardan laktik asit ve diğer asitleri üretebilmesi LAB'nin gıda fermantasyonlarına ilişkin önemli ve temel özelliğini oluşturmaktadır (Radler 1975).

Çizelge 2.2 Bazı sebze fermantasyonlarında bulunan temel LAB türleri (Muñoz *et al.* 2009)

Sebze	Laktik asit bakterileri
Zeytin	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus pentosus</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>
Lahana	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Leuconostoc citreum</i> <i>Lactobacillus paraplantarum</i>
Hıyar	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus pentosus</i> <i>Leuconostoc sp.</i> <i>Pediococcus sp.</i>
Patlıcan	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus pentosus</i> <i>Lactobacillus brevis</i>
Kapari	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus paraplantarum</i> <i>Lactobacillus pentosus</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus fermentum</i>
Üzüm Şırası	<i>Oenococcus oeni</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>

Streptococcus, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* tanımlamaya ilişkin LAB'nin karakterini taşıyan başlıca cinsler olup, bitkilerle ilişkilendirilen cinsleri de kapsamaktadır. Söz konusu cinslere ait türler arasında; *L. arabinosus*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. fermentum*, *L. leichmannii*, *L. plantarum*, *Leu. dextranicum*, *Leu. mesenteroides*, *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. pentosaceus*, *Stp. faecalis*, *Stp. faecalis* var. *liquefaciens*, *Stp. faecium*, *Stp. lactis* yer almaktadır (Fleming *et al.* 1987, Nout and Rombouts 1992). Genel olarak meyve ve sebze fermantasyonlarıyla ilişkilendirilen LAB türleri Çizelge 2.2'de verilmiştir (Muñoz *et al.* 2009).

Turşu yapımı, gerek dünya çapında gerek Çubuk turşularında çoğunluk olarak hıyar materyali üzerinden gerçekleştiğinden, turşunun hammadde kaynaklı mikroorganizma içeriği de hıyar üzerinden incelenmiştir. LAB'nin sayıları hıyarlarda oldukça düşük olmasına karşın salamuralı ortama hemen adapte olup, hızla gelişmeye başlarlar. Hammadde kaynaklı diğer mikroorganizmalardan koliform grubu bakteriler, fermantasyon sırasında asit gelişimine bağlı olarak kısa sürede inhibe olurken, diğer bir istenmeyen mikroorganizma grubu olan mayalar ise ortamdaki fermente edilebilir şekerler için LAB ile rekabet ederler. Doğal fermantasyonlardan izole edilen LAB, turşu ortamına hakim olma durumlarına (sıralarına) göre *Leu. mesenteroides*, *Stp. faecalis* (güncel sınıflandırması *Enterococcus faecalis*) *P. pentosaceus* (önceki sınıflandırması *Pediococcus cerevisiae*), *L. brevis*, *L. plantarum* şeklinde sıralanır. Bu türler arasında, genellikle ticari fermantasyonlarda *P. pentosaceus*, *L. brevis*, *L. plantarum* kullanılmaktadır (Pederson and Albury 1950).

2.2.1 *Leuconostoc mesenteroides*

Küre şeklinde, uzun ya da kısa çiftler halinde bulunan mikroaerofilik bu tür Gram pozitif reaksiyon verir. Fakültatif anaerobik olup, indol reaksiyonu göstermez ve nitratları indirgeyemez. Glikoz, früktoz, galaktoz, mannoz, ksiloz, arabinoz ve sakkarozdan asit oluşturur. Laktoz, rafinoz, salisin ve mannitolden, genellikle dekstrin, nişasta, inulin, sorbitol, ramnoz ve gliserolden de nadiren asit oluşturabilir. Gelişimleri

için optimum sıcaklık aralığı 21-25 °C'dir. Yaşam alanı olarak, *Leuconostoc* cinsinin en aktif türüdür. Fermente sebzelerde, bitki materyallerinde ve hazır et ürünlerinde bulunur (Hucker and Pederson 1930).

2.2.2 *Pediococcus pentosaceus*

Küre şekilli bu tür tek hücre halinde, çiftler halinde ya da tetrad formda olabilmektedir. Asitli ortamda ise tetrad yapısı üstün gelmektedir. Hareketsiz Gram (+)'dir. Alkali ortamda gelişemezken, patates ortamında sınırlı bir gelişme gösterir. Glikoz, früktoz, galaktoz, mannoz ve maltozdan asit üretebilir. Laktoz, rafinoz, salisin, sakkaroz, arabinoz ve amiglادينden genellikle asit oluşturabilirken, ksiloz ve ramnozdan bazen oluşturmaktadır. Mannitol, alfametil glikozit, inulin, dekstrin ve nişastadan asit üretememektedir. Optik olarak inaktif laktik asit üretmesinin yanı sıra iz miktarda asetik asit ve karbon dioksit, asetilmetilkarbinolü okside ederek diasetil üretebilmektedir. Pürin, pirimidin, niasin, pantotenik asit, riboflavin gibi besinlere gelişimleri sırasında gereksinim duymaktadır. Mikroaerofilik olup, 25-32 °C'de optimum gelişme gösterir. Sıcaklık gelişim aralığı ise 7-45 °C'dir. Doğal yaşam alanları bira, sauerkraut ve turşu gibi fermente ürünlerdir (Pederson 1949).

2.2.3 *Lactobacillus brevis*

Çubuk şekilli, kısa zincirler halinde tek tek bulunmaktadır. Gram pozitif, hareketsiz ve jelatini sıvılaştıramaz özelliktedir. Kalsiyum laktatı karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir. Arabinoz, ksiloz, glikoz, früktoz, galaktoz ve maltozdan asit oluşturmaktadır. Laktoz, sakkaroz, mannoz ve rafinoz fermantasyonları türlerine göre değişmekle beraber; salisin, mannitol, gliserol, ramnoz, dekstrin, inulin ve nişastayı nadiren fermente edebilmektedir. Früktozu glikozdan daha kolay fermente etmektedir. Aldoheksozları fermente ederek laktik asit, asetik asit, etil alkol ve CO₂ üretirken, pentozlardan laktik asit ve asetik asit üretmektedir. Optimum gelişim sıcaklığı 30 °C olup, 15 °C altında ve 37 °C üzerinde zayıf bir gelişme göstermektedir. Doğada geniş

bir alanda yer almaktadır. Özellikle bitkilerde ve hayvansal ürünlerde bulunmaktadır (Orla-Jensen 1919).

2.2.4 *Lactobacillus plantarum*

Çubuk şeklinde, tek hücre halinde ya da kısa zincirler halinde bulunur. Uygun koşullar söz konusu olduğunda kısa çubuklar halindedir. Olumsuz koşullarda, örneğin fermente sebzelerde asitlik arttıkça, daha uzun yapı oluşturur. Gelişimi sırasında sıvı ortamda birkaç gün sonra berraklaşan bir bulanıklık görülür. Bazı suşlar ise bulanıklaşmayla birlikte küçük parçalar oluşturur (flokulasyon). Harrison ve Hansen tarafından keşfedilen bir suş dışında hareketsiz olan bu tür diğer LAB türleri gibi Gram (+)'dir. Suşlarının büyük çoğunluğu glikoz, früktoz, mannoz, galaktoz, arabinoz, sakkaroz, maltoz, laktoz, rafinoz ve salisin kaynaklarından asit meydana getirir. Bir kısmı sorbitol, mannitol, dekstrin, gliserol ve ksilozu fermente edip asit oluştururken; ramnoz, nişasta ve inulini genelde fermente etmez. Fermantasyon sırasında heksoz şekerlerden esas olarak laktik asit, çok küçük miktarlarda ise asetik asit ve karbondioksit oluşturur. Pentozlardan ise asetik ve laktik asit oluşturur. Sıvı ortamda yaklaşık % 1,2 kadar bir asitlik meydana getirir.

Tuza dirençliliği % 5,5 seviyesine ulaşabilmektedir. Mikroaerofilik olan *L. plantarum* 10-40 °C sıcaklık aralığında gelişebilmektedir. En uygun sıcaklık gelişimi ise 30 °C'dir. Ancak özel besi ortamında nitratları indirgeyebilmektedir. Doğada oldukça geniş bir alana yayılmıştır, ancak özellikle fermente sebzelerde ve hayvansal ürünlerde yer alır (Orla-Jensen 1919).

2.2.5 *Streptococcus faecalis*

Yumurtaya benzer biçimde çiftler ya da kısa zincirler halinde bulunmaktadır. Fermente edilebilir karbohidratları içeren sıvı besi ortamlarında bulanıklık ve yoğun bir çökelti (tortu) oluşturarak gelişim göstermektedir. Farklı renklerde koloni oluşturabilmektedir.

Birkaç suşu hareketlidir. 60 °C'de yarım saat kadar canlı kalabilirken, sıcaklık gelişim aralığı 10-45 °C'dir. % 40 ve üzerinde oranlardaki safrada, pH 9,6 değerinde ve % 6,5 tuz içeren ortamda gelişebilmektedir. Glikoz, maltoz, laktoz, teraloz ve salisinden asit üretir. Sadece birkaç tür tarafından, aerobik koşullarda parçalanabilen gliserolü, ayrıca eskulini fermente edebilir. Mannitol ve sorbitolü yalnızca çok özel durumlarda kullanırken, inulin ve rafinozu nadiren fermente eder. Nişasta ve jelatini hidrolize edemez. İnsanların ve sıcakkanlı hayvanların bağırsaklarında doğal olarak yaşam alanı bulur (Andrewes and Horder 1906).

2.3 Laktik Asit Bakterilerinin Önemi

Fermente süt ürünlerinin, sebze ve et ürünlerinin yapımında, şarap gibi ürünlerin işlenmesinde laktik asit bakterileri çok önemli roller üstlenmektedirler. LAB'nin bu fermantasyonlarda oynadıkları rolü anlayabilmek ve özellikle yönlendirebilmek için, üzerlerinde oldukça yoğun araştırmalar yapılmış ve sonuç olarak LAB genetik, fizyolojik ve uygulamalar yönünden en iyi karakterize edilmiş (tanımlanmış) mikroorganizmalar arasında olduğu ifade edilmiştir. Bahsedilen gıdalarla ilişkilendirildiğinde LAB'nin geniş bir mikroorganizma grubundan oluştuğu görülmektedir. 'Laktikler' olarak da adlandırılan bu mikroorganizma grubu, gıda endüstrisinde büyük bir ekonomik öneme sahiptir. Ayrıca, ziraat ve tıp gibi alanlarda yapılan çalışmalarla birlikte LAB önemli araştırmaların konusu haline gelmiştir.

Son on yılda, tüketicilerin taze, sağlıklı ve hazırlanması kolay olan gıdalara ilgisinin artması üzerine taze meyve ve sebzelerden elde edilen ürünlere olan talep hızla artış göstermiştir. Bu ürünlerden biri olan turşunun, taze meyve ve sebzelerin mevsim dışı ve her an kullanılabilmesine olanak tanıyan bir ürün olmasının yanı sıra, üretim yöntemi olarak da laktik asit fermantasyonun kullanılması tüketicilerde güven uyandırmıştır. Bu güvenin oluşmasında etken faktörler olarak; insanlık tarihinin ilk keşfettiği üretim yöntemlerinden biri olması ve buna bağlı olarak çok uzun zamandır kullanılması, doğal hammaddeler üzerinden yine doğal bir üretim gerçekleştirilebilmesi ve gelişen teknolojiye adaptasyonunun sağlanabilmesi gösterilmektedir. Bununla birlikte LAB,

FDA tarafından GRAS (Generally Recognized as Safe) olarak kabul edilmektedir (Stiles 1996).

LAB'nin fermente gıdaların üretiminde yaygınca kullanılması ve gıda endüstrisinde önemli derecede ekonomik değere sahip olması, üzerinde çok çalışılan bir organizma grubu olmasına neden olmuştur. Yapılan çalışmalar çerçevesinde gıda endüstrisinde, bazı fizyolojik özelliklerinden dolayı yeni uygulamalara açık bulunan bu mikroorganizmaların, insan sağlığına yararları olduğu da belirtilmektedir. Bakteriyosin gibi önemli antimikrobiyal bileşiklerin üretimi, probiyotik etkisi, starter kültür olarak kullanımı LAB'nin yaygın olarak bilinen önemli özellikleri arasındadır. Bunların dışında; multidrug rezistansı (çoklu ilaç dirençliliği), ozmoregülasyon (su basıncı düzenlemesi), proteoliziz (protein parçalanması), otolizin (eritrosinleri parçalayan hemolizin) ve bakteriofajlar LAB ile ilişkilendirilen yeni çalışma alanlarını oluşturmaktadır. Ayrıca, LAB'nin genetik özelliklerinin araştırılması ve tanımlanması 'gıdada kullanılabilir/gıda saflığında' (food-grade) niteliğinin oluşturulmasına ilişkin önemli genetik işlemleri (modifikasyon, seleksiyon ve ekspresyon) ortaya çıkarmaktadır (Konings *et al.* 2000).

2.3.1 Antimikrobiyel bileşikler

Organik asit, hidrojen peroksit, karbondioksit, diasetil, asetaldehit, etanol, ruterin ve bakteriyosin gibi geniş spektrumlu antimikrobiyeller üretmesi LAB'den biyolojik koruyucular olarak yararlanılmasını sağlamaktadır (Fitzgerald and Caplice 1999). Gıdalarda, farklı amaçlarla kullanılan katkı maddeleri bulunmaktadır. Bu maddeler arasında yer alan koruyucu maddelerin çoğu kimyasal yapıdadır. Tüketici sağlığı üzerinde olumsuz etkilerde bulunabileceği belirlenen koruyucu madde katkılı gıdalara alternatif olarak, doğal koruyucu içeren gıdaların tüketilmesi, bu anlamda önem taşımaktadır.

LAB'nin ürettiği bileşiklerin gösterdiği aktivite sonucu, bağışıklık gücünü arttırıcı, kanseri önleyici, serum kolestrol seviyesini düşürücü gibi yararlı fizyolojik etkilerinin

olduğu belirtilmektedir (Kullisaar *et al.* 2002). Ayrıca, bağırsak sistemine yerleşmeleri ile ürettikleri organik asitler sayesinde bağırsak ortam pH'sını kontrol ettikleri, kabızlığı, laktöz intoleransını ve patojen bakterilerin neden olduğu ishali etkin biçimde engelleyebildikleri ifade edilmektedir (Kim *et al.* 2000). Bunlara ek olarak, fermantasyonun antimikrobiyal etkisi, gıda hijyen uygulamalarına bir yardımcı olarak görülebilmektedir (Adams and Nicolaides 1997).

LAB tarafından fermente edilen gıdalardaki laktik, asetik ve propiyonik asitlerinin direk olarak antimikrobiyel etkileri olduğu belirtilmektedir (Fitzgerald and Caplice 1999). Ayrıca, asitliğin diğer antimikrobiyal bileşikler arasında en önemli inhibitör ajan olduğu bildirilmektedir (Adams and Nicolaides 1997). Her asidin etkinliği eşit seviyede olmamakla birlikte asetik asit daha güçlü bir etki göstermektedir. Maya, küf ve bakterilere karşı inhibisyonu söz konusudur. Propiyonik asit ise küf ve bakterilere karşı etkindir (Fitzgerald and Caplice 1999).

Asetaldehit ve etil alkolün biyolojik korumaya karşı katkısı çok yüksek seviyelerde olmamasına rağmen antimikrobiyel etki gösterebilmektedirler (Fitzgerald and Caplice 1999). Etil alkol heterofermantatif LAB tarafından üretilmektedir. Heterofermantatif grubu bakterilerin en aktif olduğu doğal fermantasyonun ilk aşamalarında, etil alkolün belirgin bir etkisi söz konusu olmaktadır (Adams and Nicolaides 1997).

Oksijen varlığında LAB, flavoprotein oksidaz enzimlerinin aktivitesi sonucunda hidrojen peroksit üretir. LAB katalaz negatif olduğundan, H₂O₂ ortamda çoğalır ve inhibitör etkisini *S. aureus* ve *Pseudomonas* spp. gibi mikroorganizmalar üzerinde gösterir. Söz konusu inhibisyon, hidrojen peroksitin membran lipitleri ve hücre proteinleri üzerine güçlü oksidasyonu ile ortaya çıkar. LAB diğer bakterilere oranla hidrojen peroksite daha dirençlidir (Adams and Nicolaides 1997). H₂O₂ ayrıca, hipotiyosiyanat gibi antimikrobiyal bileşiklerin oluşumuyla birlikte taze sütlerde laktoperoksidaz sistemini aktive eder (Fitzgerald and Caplice 1999).

Heterolaktik fermantasyon sonucu oluşın karbondioksit, anaerobik bir çevre oluşturarak antimikrobiyel etkisini gösterir. İç ve dış pH seviyesini düşürmesi ve hücre membranını

etkilemesi sonucu gıda kökenli bazı aerobik mikroorganizmalara toksik özelliktedir. Sitrat metabolizmasının bir ürünü olan diasetil, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* suşlarını da içeren birçok LAB tarafından üretilmektedir. Arjinin kullanımına müdahale etmesinden dolayı Gram negatif bakteriler, mayalar ve küfler diasetile hassasiyet göstermektedirler (Fitzgerald and Caplice 1999). *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus* spp., *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *S. aureus* ve *Y. enterocolitica* diasetile hassasiyeti olan mikroorganizmalar arasında yer almaktadır (Adams and Nicolaides 1997).

Lactobacillus reuteri tarafından üretilen antibiyotik niteliğindeki ruterin maddesinin küfler ve bakteriler gibi protoza grubu mikroorganizmalara karşı geniş bir antimikrobiyel etkisi bulunmaktadır. Ruterinin, ribonükleotit redüktazı inhibe ederek aktivitesini gösterdiği düşünülmektedir (Fitzgerald and Caplice 1999).

Diğer mikroorganizmaların gıdalarda oluşturduğu mikrobiyel ortamın aksine LAB tarafından meydana getirilen ortamın etkisi daha fazladır. Çünkü kısa sürede etkin bir biçimde popülasyonunu arttırarak hacimsel olarak yayılabileceği fiziksel alanı kaplaması ve sindirilebilir besinlere ulaşımı ortadan kaldırması diğer mikroorganizmaların gelişimini sınırlandırır (Adams and Nicolaides 1997).

Bakteriyosinler Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen biyolojik anlamda aktif proteinler olarak tanımlanmaktadır. Laktik asit bakterilerince üretilen gerçek bakteriyosinler *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* ve *Listeria* sp. gibi gıda kaynaklı patojenleri inhibe edebilme niteliğindedir. Bu bakımdan, LAB'nin ürettiği bakteriyosinler doğal koruyucular olarak kullanılma potansiyeline sahiptir (Montville *et al.* 1991). LAB tarafından üretilen bakteriyosinler, posttranslasyonel olarak modifiye peptitler ve lineer antimikrobiyal peptitler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Söz konusu peptitler, çeşitli biyomakromoleküller ile reaksiyonlara girerek etki mekanizmalarını gösterebilmektedirler (Konings *et al.* 2000). Gıda bozulmalarının ve/veya patojenik mikroorganizmaların inhibisyonu ile bakteriyosin üreten suşa rekabet edebilme olanağı vermesi anlamında gıda

fermantasyonlarında bakteriyosinlerden yararlanılmaktadır (Fitzgerald and Caplice 1999).

Schillinger ve Lucke tarafından 1989'da, taze ve fermente gıdalardan izole edilmiş bakteriyosinjenik suşların varlığı kanıtlanmıştır (Fitzgerald and Caplice 1999). Fermente bir gıda olan turşuda yer alan LAB'den *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* cinslerine ait türler antimikrobiyel protein olan bakteriyosinleri salgılayabilme özelliğindedir. Antimikrobiyel aktivite, konakçının hücre duvarına spesifik olarak adsorbsiyonu ile başlar. İyonların hücreye sızması ve liziz olayı ile bakterisidal etki kendini gösterir ve hassas hücrelerin hemen ölmesine neden olur. Bakteriyosinler ancak pronaz, fisin ve tripsin gibi proteolitik enzimlerle aktivitesini kaybetmektedir. Pişirmeye ve düşük pH değerlerine dirençlidir. LAB'nin ürettiği bakteriyosinler, starter kültürlerin rekabetçi niteliklerini arttırabilmektedir. Ayrıca, bakteriyosin üretebilme yeteneklerine göre, fermentasyon için seçilecek starter suşlar belirlenebilmektedir (Nout and Rombouts 1992). Böylece, fermente gıdaların güvenliği ve kalitesi iyileştirilmiş olmaktadır (Fitzgerald and Caplice 1999).

Lactococcus lactis ssp. *lactis* tarafından üretilen nisin, yaklaşık altmış yıldır bilinen ve GRAS olarak kabul gören bir lantibiyotik olmakla birlikte peynir, konserve sebzeler, süt ürünleri, bira ve şarap fermentasyonlarında ticari olarak kullanılan bir bakteriyosindir (Nout and Rombouts 1992).

2.3.2 Probiyotik etki

Laktik asit bakterileri genel olarak iki grupta sınıflandırılmaktadır. Yoğurt, peynir gibi ürünlerin yapımında kullanılan çiğ süt ve bağırsak kaynaklı LAB ilk grubu oluşturmaktadır. İkinci grup salamura meyve ve sebzeler, kimichi, soya sosu, miso gibi geleneksel Asya gıdalarının üretiminde kullanılan yeşillik/çimen ile meyve ve sebzeleri içeren bitkisel LAB'den meydana gelmektedir. Bahsedilen türde gıdaların tüketilmesiyle vücuda alınan LAB, diğer mikroorganizmaların aksine, midedeki gastrik asit ve pankreatik salgılara karşı dirençlilik gösterir. Özellikle bitkisel ürünlerle vücuda

giren LAB, mide ve bağırsaktaki sert/zor koşullara hayvansal LAB'den daha dirençlidir (Muñoz *et al.* 2009).

Sindirim sistemine geçerek canlı kalmayı başarabilen LAB'nin probiyotik olma özelliği söz konusudur. Probiyotik terimi genellikle, organizmaların sağlığını olumlu yönde etkileyen mikroorganizmaları ifade etmektedir (Anonim 2001). Patojen organizmaları canlı ve cansız ortamda inhibe edebilme özelliğine sahip probiyotiklerin antibiyotik kullanımına alternatif olması, kolonik kanserojenlerin sentezlenmesini sağlayan intestinal (bağırsak) bakteriyel enzimleri inhibe etmesi, sınırlı besinler için rekabetçi olması, sindirime enzimatik katkı sağlaması, epitel ve mukoz adheransı (yapışıklığı) inhibe etmesi, çözülmüş organik materyallerin doğrudan alınmasına yardımcı olması, vücut direncini arttırması insan ve hayvan beslenmesine ilişkin probiyotiklerin çeşitli yararlı etkilerini ortaya koymaktadır. Bunlara ek olarak, patojen mikroorganizmalara karşı bağışıklık sistemini güçlendirici ve antiviral etkileri olduğu düşünülmektedir (Rolfe 2000, Balcázar *et al.* 2006). Tümörler ve bağışıklık sistemi üzerine yapılan araştırmalar sonucunda, LAB'nin bağışıklık sistemini uyardığı ve gözle görülür biçimde etkilediği fark edilmiştir (Mavhungu 2005). Bir başka araştırma, bağırsak mikroflorasının, peptit hormonların ve nöropeptitlerin düzenleyicisi appetitlere karşı otoantibadilerin sentezlenmesine etkisinin bulunabileceğini göstermiştir. Ayrıca, bağırsak mikroflorasının, kabızlığa sebep olan bağırsaktaki dengesizlikleri ve bağırsakların peristaltik hareketini düzenleyici etkisi olduğu bildirilmiştir (Higashikawa *et al.* 2009).

Probiyotik laktik asit bakterilerinin güncel sınıflandırmasına göre; *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Enterococcus* probiyotik cinsleri oluşturmaktadır. *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *B. longum*, *B. animalis* genel olarak probiyotik etki gösteren türlere örnek olarak karşımıza çıkmaktadır (Klein *et al.* 1998). Mide ve safra tuzuna dirençli olan probiyotik mikroorganizmalarla fermente olmuş ürünlerin tüketimi ile sindirim sistemine yerleşen bakteriler bağırsaklara yerleşip hızlı bir şekilde çoğalarak baskın konuma geçerler ve etkilerini gösterirler (Nahaisi 1986).

2.3.3 Starter kültür kullanımı

İşlenmemiş gıda materyallerinin, yapılarında bulunan mikroorganizmalarla fermantasyona bırakılması sonucu doğal fermantasyon gerçekleşir ve tüketim anlamında kabul edilebilir özelliklerde ürün elde edilebilir. Bu şekilde uygulanan bir yöntem küçük ölçekteki üretimlerde, gelişmemiş ya da az gelişmiş ülkelerde ve ev tipi üretimlerde gerçekleştirilebilir. Ancak, endüstriyel boyutta bir üretim söz konusu olduğunda doğal fermantasyon, ürüne yönelik istenen sonuçları her zaman sağlayamayabilir. Bu anlamda fermente gıda ve içeceklerin standart bir kalitede olması oldukça önem taşımaktadır. Ürünün istenen duyu özelliklerinde ve standartlara uygun tüketim güvenliğinde olması, uygulanan üretim yönteminin teknolojik, hijyenik ve standart koşullarda gerçekleştirilmesi doğal (geleneksel) ve modern (teknolojik) fermantasyonlar arasındaki farkı ortaya çıkaran önemli unsurları meydana getirmektedir. Ayrıca; ürünün besleyici, sağlık ve ekonomik değerinin iyileştirilmesi ile gıda güvenlik risklerinin azaltılması da son ürün kalitesine yönelik katkı sağlayacak özellikleri oluşturmaktadır. İşlenmemiş materyallere katılan starter kültürler, fermente bir ürüne ilişkin istenen ve olması gereken tüm özellikleri sağlayabilmektedir. Bu nedenle; ticari boyuttaki fermantasyonlarda starter kültür kullanımı temel bir zorunluluk olarak görülmektedir.

Gıda fermantasyonlarında bakteri ve mayaların rolleri keşfedildiğinden beri fermantasyonları kontrol etmek, istenilen doğrultuda yönlendirebilmek ve koşullarını iyileştirebilmek için çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların odak noktasını oluşturan starter kültür teknolojisi, 1900'li yıllardan bu yana gelişim göstermiş olup çeşitli fermantasyon alanlarında kullanılmaktadır. Başta süt endüstrisi olmak üzere et, ekmek, bira, şarap ve sirke fermantasyonlarında starter kültür teknolojisi uygulanmaktadır. Doğal fermantasyon tekniklerinin uygulandığı sauerkraut ve turşu fermantasyonlarında da artık starter kültür kullanımına bağlı kontrollü bir fermantasyon gerçekleştirilmektedir (Hutkins 2006).

Meyve-sebze fermantasyonlarında, tek bir suştan oluşan saf kültürün ve/veya çoklu mikroorganizma içeren bir kültürün starter olarak kullanılmasına yaklaşık elli yıl önce başlanmış (Daeschel and Fleming 1987), günümüzde de çeşitli adaptasyonların

uygulanmasıyla birlikte devam edilmektedir. Genel olarak, sebze fermantasyonlarından izole edilen türler starter kültür olarak kullanılmaktadır. İzole edilen türler arasında *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus plantarum* yer almaktadır. Sebze fermantasyonu spesifik bir uygulamayı gerektirdiği için suş seçimi, ürüne istenen özelliklerin verilebilmesi açısından oldukça önem taşımaktadır (Hutkins 2006). Ayrıca, bazı türlerin yüksek seviyede biyojen amin üretebildiği göz önünde bulundurulduğunda starter olacak suş/suşların önemi artmaktadır (Halasz *et al.* 1999).

Standart bir ürün ve üretim tekniğinin oluşturulması ile istenilen duyuşsal özelliklerin sağlanmasının yanı sıra, istenilen boyutta üretim kolaylığı, üretim hızı ve veriminde artış, spesifik özelliklerin adaptasyonu, biyojen amin oluşumunda baskılama/azaltma, depolama sürecinde stabilizasyon gibi nitelikler de fermente sebze teknolojisinde starter kültür kullanımına bağılı olarak elde edilebilecek faydalardır (Halasz *et al.* 1999, Hutkins 2006).

2.3.4 Ekzopolisakkarit (EPS) üretimi

Gıdalarda emülsifiye edici, viskozite arttırıcı, stabilize edici, jelleştirici ajan olarak yer alan mikrobiyel ekzopolisakkaritler, biyolojik kıvam arttırıcılar olarak ifade edilmektedirler. Bakteriler, mikroalgler ile az sayıdaki maya ve küfler tarafından üretilebilen EPS, ekstraselüler polisakkarit olarak tanımlanır. Kapsüllerin oluşumunda hücre yüzeyi ile ilişkilendirilen veya yapışkanlık oluşumunda ekstraselüler ortamın içinde gizli olarak bulunan EPS, mikrobiyel hücreleri birçok olumsuzluğa karşı korumaktadır. Kurumaya, fagositoza ve faj saldırılarına, antibiyotiklere, toksik metal iyonları ve sülfür dioksit gibi toksik bileşiklere, osmotik strese, protozoa predasyonuna karşı korumada önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bunların dışında, hücrelerin katı yüzeylere adhezyonunda ve biyofilm oluşumunda etkili olduğu belirtilmektedir (Vuysta and Degeest 1999).

Dekstranlar, ksantanlar, jellan, pullulan, maya glukanları ve bakteriyel aljinatlar endüstriyel olarak önemli mikrobiyal EPS'lerdir. Mikrobiyal olarak üretimini gerçekleştiren çoğu mikroorganizma fitopatojen ya da üretim maliyeti pahalı olduğundan, endüstriyel EPS üretiminde, GRAS suşlar içeren, food-grade olarak belirlenen, oldukça büyük miktarlarda üretim olanağı sağlayabilen laktik asit bakterileri öncelikli kullanılmaktadır. Mezofilik ve termofilik LAB tarafından farklı kompozisyonda, boyutta ve yapıda EPS sentezlenebilmektedir. Bilim dünyasının bu konuya gün geçtikçe artan ilgisiyle birlikte sentez yapan LAB suşları üzerine detaylı çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (Vuysta and Degeest 1999). LAB tarafından üretilen EPS moleküllerinin fizyolojik, fermantasyon, kimyasal ve yapısal karakterleri; biyosentez, genetik ve metabolik mühendisliği ve fonksiyonel özellikleri araştırma konularını oluşturmaktadır (Ruas-Madiedo and Reyes-Gavilán 2005). Özellikle çeşitli yoğurt, peynir, kefir taneleri ve İskandinavya fermente sütleri gibi süt ürünlerinden izole suşlar başta olmak üzere, fermente et ve sebzelerden izole edilen suşlar da EPS üreticileri olarak incelenmektedir (Vuysta and Degeest 1999).

LAB'nin ürettiği EPS moleküllerinin insan sağlığına kolesterolü düşürme, immunomodülatör etkisiyle immun reaksiyonlarını düzenleme, antitümoral aktiviteler ve prebiyotik etkiler gibi yararları olduğu düşünülmektedir. EPS üreticisi çoğu LAB'nin *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinslerine ait olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, *Bifidobacterium* cinsine ait bazı suşların da bu biyopolimerleri üretebildiği bilinmektedir (Ruas-Madiedo and Reyes-Gavilán 2005).

2.4 Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmalarında Uygulanan Yöntemler

Orla-Jensen'nin morfolojik, fizyolojik ve ekolojik açıdan laktik asit bakterilerinin tanımlanmasına ilişkin yaptığı ilk sınıflandırma, LAB'nin endüstriyel, ekonomik ve bilimsel açıdan gittikçe değer kazanmasıyla birlikte, fonksiyonlarının belirlenmesine yönelik çalışmalarla gelişme göstermiştir. Diğer bir ifadeyle, bakteriyel taksonomiye klasik bir sınıflandırma yaklaşımıyla birlikte bakterilerin moleküler karakterlerinin belirlenmesinin de önemi ortaya çıkmıştır. LAB'nin hangi enerji kaynaklarını

kullanabildiklerine yönelik karbohidrat fermantasyon karakterleri, kullandıkları fermantasyon yolları, laktik asit üretim düzeyleri, peptidoglukan tabakalarının analizi, yağ asidi kompozisyonları, DNA'nın % G+C düzeyleri, gen ürünlerinin elektroforetik özellikleri, DNA-DNA hibridizasyonu yeni çalışmalarda yer alan konular olarak araştırılmaya başlanmıştır (Holzapfel and Stiles 1997). Bunların yanı sıra, türlerin tam olarak birbirinden ayrılabilmesini ve kesin bir taksonominin oluşturulabilmesini sağlayan yöntemler ile de sınıflandırmaya dair yeni yaklaşımlar elde edilmiştir. Bu yaklaşımlar DNA yapılarının detaylı olarak incelenmesine dayanmaktadır. Sonuç olarak LAB'ne uygulanan modern taksonomik metotlar fenotipik ve genotipik analizleri birlikte içermektedir.

Süt teknolojisinde büyük roller üstlenmesi nedeniyle LAB'nin tanımlanmasına yönelik ilk kapsamlı çalışmalar süt ve süt ürünleri üzerinden gerçekleştirilmiştir. En iyi karakterize edilmiş laktik asit bakterileri, süt fermantasyonları ile ilişkilendirilen LAB olmuştur. Değişik açılardan birbirinden farklı niteliklere sahip süt ürünlerinde bulunan çeşitli LAB'nin tür seviyesindeki tanımlanmalarına ilişkin fiziksel ve biyokimyasal kriterlerin belirlenmesinin yanı sıra, hücre duvarı ya da toplam protein profillerini belirleyen Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) uygulamasının kullanımı da yaygınlaşmıştır.

Hébert ve arkadaşları (2000), Arjantin ve İtalyan yöresel sert peynirlerinden izole edilen 6 termofilik suşa temel sınıflandırma ve API 50 CH analizlerini uygulamışlardır. *Lactobacillus helveticus* ve *L. delbrueckii* ssp. *lactis* türleri arasındaki kesin farklılığı, SDS-PAGE yöntemiyle hücre duvarı protein profillerini belirleyerek ortaya koymuşlardır. Sonuç olarak, SDS-PAGE uygulamasıyla daha güvenilir ve hızlı sonuçlar alınabileceği bildirilmiştir.

Laktik asit fermantasyon işleminin uygulandığı farklı gıdalarda da LAB'ni tanımlamaya ilişkin değişik yöntemler kullanılmaktadır. Pot ve arkadaşları (1993), endüstriyel anlamda büyük önem taşıyan, bağırsak florasına etkilerinden dolayı insan beslenmesine ve sağlığına yararlı etkileri bulunan, ancak heterojen *Lactobacillus acidophilus* suşlarının tanımlanmasını ve sınıflandırılmasını düzenlemek/geliştirmek için iki

görüntüleme metodu kullanmışlardır. SDS-PAGE, rRNA sekans analizi ve oligonükleotit prob hibridizasyonu ile *Lactobacillus acidophilus* suşları birbirinden kesin bir şekilde ayrılmaya çalışılmıştır. Toplam hücre proteinlerinin belirlenmesinde SDS-PAGE yönteminin fazla sayıdaki suşların hızlı bir şekilde görüntülenmesine olanak verdiği belirtilmiştir. Protein modellerinin SDS-PAGE ile yapılan numerik (sayısal) analiz sonucu, *L. acidophilus* suşlarındaki heterojenitenin doğru olduğunu göstermiştir. Bu yöntemin diğer çalışmalarla birlikte kullanılması ile kesin bir tanımlama ortaya konulmuştur.

Güney İtalya'ya özgü bir ekmek çeşidi olan *Cornetto*'nun ekşi hamurundan izole edilen 41 laktik asit bakteri suşunun tanımlaması yapılmış ve teknolojik karakterizasyonu incelenmiştir. Toplam hücre proteinleri SDS-PAGE ile tanımlanmış, asit üretme yetenekleri, antimikrobiyel aktiviteleri ve EPS üretimleri görüntülenmiştir. İzolatların % 49'u *Lactobacillus plantarum*, % 17'si *Leuconostoc mesenteroides*, % 15'i *Lactobacillus curvatus*, %12'si *Lactobacillus paraplantarum*, % 5'i *Weissella cibaria*, % 2'si *Lactobacillus pentosus* olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, araştırılan özelliklerine göre ekmek üretimi için kullanılacak starter kültür belirlenmiştir (Zotta *et al.* 2008).

Çeşitli süt ürünleri ve sucuktan izole edilen toplam 36 adet laktik asit bakterisi çeşitli biyokimyasal analizlerle ve API 50 CH test kiti ile tanımlanmış, SDS-PAGE metodu ile toplam protein profilleri belirlenmiştir. Ayrıca, tüm LAB'nin plazmit DNA'ları incelenmiştir. Türlerin sınıflandırılmasına ilişkin olarak temel tanımlama testlerine, API 50 CH ve SDS-PAGE analizlerinin destekleyici sonuçlar verdiği tespit edilmiştir (Yüksekdağ ve Beyatlı 2009).

Çeşitli çalışmalarda, temel izolasyon ve tanımlama testleri kullanılarak turşularda tür bazında tanımlamalar yapılmıştır. Costilow ve arkadaşları 1956 yılında yaptıkları çalışmada, 84 farklı hıyar turşusunu incelemiş ve 848 adet bakteri izolasyonunu yaparak tür bazında belirlemişlerdir. İzolatların 333 adeti *L. plantarum*, 188'i *L. brevis*, 284 adet de *P. cerevisiae* türleri içerisinde sınıflandırılmış, 43 adet izolatın ise diğer türlerden olduğu bildirilmiştir (İç 2000).

Ogabi ve Pamir 1973 yılında Türk turşuları üzerine yaptıkları bir araştırmada 51 turşu örneği ile çalışmışlardır. Bu turşulardan toplam 502 adet bakteri izole etmişler ve tüm izolatların Lactobacillaceae familyasından olduğunu görmüşlerdir. Bu familyaya ait bakteriler *Lactobacillus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinslerinden 102 *L. plantarum*, 33 *L. casei*, 207 *L. brevis*, 72 *L. buchneri*, 13 *P. damnosus*, 17 *Leu. mesenteroides* olarak tür bazında belirleyebilmişlerdir. 59 izolatın ise tür olarak ayrımı yapılamamıştır (Demirtaşoğlu 1998).

Diğer bir araştırmada ise Samsun yöresine ait değişik türde 39 turşunun LAB içeriği ve starter kültür olarak kullanılabilme özellikleri incelenmiş, 100 adet LAB izole edilmiştir. Bakterilerin 40 adedi *L. plantarum* var. *plantarum*, 26'sı *L. plantarum* var. *pentosus*, 14 tanesi *L. plantarum* var. *arabinosus*, 20'si *L. casei* olarak belirlenmiştir. Starter kültür denemelerinde, starter kültür kullanılarak üretilen turşuların duyu ve içerik yönünden daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür (Evren ve Şahin 1993).

Turgut (2006), hıyarları doğal ve *L. plantarum* suşuyla starter kültürü fermentasyona tabi tutarak biyojen amin oluşumunu incelemiş ve biyojen amin miktarını HPLC ile belirlemiştir. Starter kültür kullanılarak üretilen turşularda, biyojen amin oluşumunun baskılandığı, dolayısıyla turşularda starter kültür kullanımının yararlı olabileceği vurgulanmıştır.

Palop ve arkadaşları (2000), İspanya'nın geleneksel bir fermente ürünü olan *Almagro*'nun doğal fermentasyonu sonucu toplam 149 laktik asit bakterisi izole etmişlerdir. Suşlardan 148'nin, fiziksel ve morfolojik karakterlerinin incelenmesiyle *Lactobacillus* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Daha ileri bir karakterizasyon analizi olan API 50 CH sistemi uygulanmıştır. APILAB Plus bilgisayar programına göre suşların tanımlanması gerçekleştirilmiş, ancak kesin olmayan sonuçlar elde edilmiştir. Palop ve arkadaşları (2003) daha sonra yaptıkları çalışmalarında, SDS-PAGE metoduyla laktik asit bakterilerinin toplam hücre protein profillerini belirleyerek, önceki araştırma bulgularını destekleyici sonuçlar elde etmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Turşu örnekleri

Ankara ilinin Çubuk ilçesinde bulunan 7 farklı işletmeden, 2008-2009 yılında üretilen çeşitli turşulardan 15 adet örnek temin edilmiştir. Örneklerin temin edildikleri işletmeler numara ve kodlarıyla birlikte Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Turşu örneklerinin temin edildikleri yerler

İşletme No	İşletme Kodu
1	HB
2	KY
3	GT
4	TT
5	ZT
6	ET
7	MT

Turşu örneklerinin fermantasyon süreleri, örnek çeşidi ve miktarları ile örneğin alındığı tarihlere ilişkin bilgiler Çizelge 3.2’de verilmiştir. Buna göre, 10 günlük turşudan 1 adet, 15-20 günlük turşudan 3 adet, 20 günlük turşudan 3 adet, 20-25 günlük turşudan 3 adet ve 30 günlük turşudan 5 adet olmak üzere turşu fermantasyonunun farklı evrelerinden örnekler alınmıştır.

Çizelge 3.2 Turşu örneklerine ilişkin bilgiler

Örnek No	İşletme Kodu	Örnek Alım Tarihi	Örnek Fermantasyon Süresi (gün)	Örnek Tipi	Örnek Miktarı (mL)
1	HB-1	16.09.2008	15-20	hıyar	100
2	HB-2	16.09.2008	15-20	hıyar	1000
3	HB-3	16.09.2008	15-20	hıyar	100
4	KY-1	16.09.2008	20-25	hıyar	100
5	KY-2	16.09.2008	20-25	hıyar	1000
6	KY-3	16.09.2008	10	hıyar	100
7	KY-4	16.09.2008	30	hıyar	100
8	GT	16.09.2008	20	karişik	30
9	TT	16.09.2008	20	hıyar	30
10	ZT	16.09.2008	20	hıyar	30
11	ET	16.09.2008	20-25	hıyar	1000
12	MT-1	01.12.2008	30	erik	200
13	MT-2	01.12.2008	30	biber	200
14	MT-3	01.12.2008	30	hıyar	200
15	MT-4	01.12.2008	30	hıyar	200

3.1.2 Tampon, besiyeri, kimyasal ve çözeltiler

Çalışma süresince kullanılan tampon, besiyeri, kimyasal ve çözeltiler ile hazırlanış şekilleri **EK 1**'de verilmiştir.

3.1.3 Çözelti, besiyeri, kimyasal ve malzemelerin sterilizasyonu

Çalışma boyunca steril olarak kullanılması gereken tüm malzemeler, besiyerleri, çözeltiler, kimyasallar otoklavda (CL-40M Alp, Japan) 121⁰C'de 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir (Halkman 2005).

3.2 Yöntem

Küçük ambalajlarda kurulmuş turşu örnekleri orijinal ambalajında, büyük kaplarda kurulmuş turşulardan ise steril kaplara salamura örnekleri alınarak laboratuvara getirilmiştir. Örnekler, uygulanacak kimyasal ve mikrobiyolojik analizlere kadar +4⁰C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.1 Turşu örneklerinin kimyasal ve mikrobiyolojik analizleri

Turşu salamuralarından alınan tüm örneklerin paralelli olarak pH değerlerine bakılmış, titrasyon asitliği (% laktik asit) ve tuz (%) analizleri yapılmıştır. Ayrıca, Petri plaklarına ekim yapılarak mikroorganizma sayımı gerçekleştirilmiştir.

pH: Örneklerin pH değerleri, pH 4,0 ve pH 7,0 tamponlarıyla (Hamilton Duracal Buffer, Switzerland) kalibre edilmiş pH metre (Mettler Toledo Seven Easy pH, China) ile belirlenmiştir.

Toplam Asitlik: 100 g numunede bulunan serbest asitleri nötrleştirmek için harcanan ayarlı baz çözeltisinin hacminin bulunması esasına dayanarak, örneklerde toplam asitlik belirlenmiştir. Salamura örneklerinden 1 mL alınarak üzerine yaklaşık olarak 40 mL damıtık su ilave edilmiş ve 2-3 damla % 1'lik fenolftalein (Merck, Germany) indikatörü eşliğinde, ayarlı 0,0098 N NaOH (Merck, Germany) çözeltisiyle hafif pembe renk oluşuncaya kadar titre edilmiş ve harcanan baz miktarı (V₁) kaydedilmiştir. Aynı şartlar altında, örnek içermeyen şahit (kör) titre edilerek harcanan baz miktarı (V₂)

kaydedilmiştir. Sonuçlar aşağıda verilen formüle göre hesaplanarak iki paralelin ortalaması alınmış ve toplam asitlik % laktik asit cinsinden ifade edilmiştir (Anonim 1993, Aktan ve Kalkan 2000).

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

V=(V₁-V₂): Harcanan 0,0098 N NaOH miktarı (mL)

F: Titrasyonda kullanılan bazın normalitesi: 0,0098 N

E: 1 mL NaOH'ın eşdeğeri asit miktarı (g)

Laktik asit için E: 0,09g

m: Örnek miktarı (mL): 1 mL

Tuz: Örneklerde tuz tayini Mohr yöntemi esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Salamura örneklerinden 1 mL alınarak üzerine yaklaşık 40 mL damıtık su ilave edilmiş ve üzerine 1 mL % 5'lik potasyum dikromat (K₂CrO₄) (Merck, Germany) çözeltisinden eklenerek 0,08825 N AgNO₃ (Merck, Germany) çözeltisiyle kiremit kırmızısı renk oluşuncaya kadar titre edilmiştir. Harcanan AgNO₃ miktarı V₁ olarak kaydedilmiştir. Salamura örneği içermeyen şahit için de aynı koşullar altında harcanan AgNO₃ miktarı kaydedilmiştir (V₂). Sonuçların hesaplanması aşağıda verilen formüle göre yapılarak iki paralelin ortalaması alınmış ve tuz miktarı % olarak ifade edilmiştir (Anonim 1993, Aktan ve Kalkan 2000).

1 mL 0,1 N AgNO₃ = 0,00585 g NaCl miktarına denk geldiğinden hesaplama, aşağıda belirtilen formül ile yapılmıştır.

$$\% \text{ Tuz} = \frac{V.F.(0.0585)}{m} \cdot 100$$

$V=(V_1-V_2)$: Harcanan 0,08825 N AgNO₃ miktarı (mL)

F: Titrasyonda kullanılan AgNO₃ normalitesi: 0,08825 N

m: Örnek miktarı (mL): 1 mL

Mikrobiyolojik sayım: Turşu örneklerinin mikrobiyolojik sayımları Halkman (2005)'in belirttiği yöntem ve formüle göre yapılmıştır. Laktik asit bakterilerinin izolasyonu için, steril koşullarda, turşu salamuralarından 1 mL örnek alınmış ve 9 mL % 0,85 tuz içeren steril fizyolojik tuzlu su (FTS) içeren tüplere aktarılarak salamuralar seyreltilmiştir. Oluşan her seyreltiden 1 mL alınıp, 9 mL FTS içeren diğer bir tüpe aktarma suretiyle 10⁻⁷ düzeyine kadar seyreltileri hazırlanmıştır. Her bir seyrelti tüpünden 0,1 mL alınarak yayma plak yöntemine göre MRS agar (Merck, Germany) ve M17 agar (Merck, Germany) içeren Petri plaklarına ekim yapılmıştır. Ekim yapılan Petri plakları 30 °C'deki inkübatörde (Binder, USA) 2-3 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Man *et al.* 1960). İnkübasyon sonunda her iki besiyerinde de muhtemel toplam laktik asit bakterisi sayımı yapılarak, örneklerin laktik asit bakteri yükleri belirlenmiştir. MRS besiyerinde *Lactobacillus* türlerinin, laktokokların gelişmesini baskılayabilme olasılığına karşın iki farklı besiyerine ayrı ayrı ekimler yapılarak sayım gerçekleştirilmiştir.

$$N = \frac{C}{[V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d]}$$

N: Örneğin 1 g ya da 1 mL'sindeki mikroorganizma sayısı

C: Sayımı yapılan tüm petrilereki toplam koloni sayısı

V: Sayımı yapılan petrilere aktarılan hacim (mL)

n₁: İlk seyreltiden ekim yapılan petri adedi

n₂: İkinci seyreltiden ekim yapılan petri adedi

d: Sayımı yapılan ardışık iki seyreltiden konsantre olanının seyreltme oranı

3.2.2 Laktik asit bakterilerinin izolasyonu

MRS ve M17 besiyerleri üzerinde gelişen kolonilerin morfolojik görünümleri gözle muayene sonucu belirlenerek, birbirinden farklı koloni morfolojisi gösteren tüm mikroorganizmalar öze yardımıyla alınmıştır. 10 mL'lik MRS veya M17 sıvı (Merck, Germany) besiyerlerine alınan koloniler, 30 °C'de 2-3 gün süren bir inkübasyonla geliştirilmiş ve yeniden uygun katı besiyeri üzerinde, sürme plak yöntemi kullanarak, saf koloni oluşturmaları sağlanmıştır. Petrilere tek düşerek oluşan saf kolonilerden alınarak 10 mL'lik MRS veya M17 sıvı besiyerlerinde, uygun koşullarda geliştirilmiştir (Narvhus *et al.* 2003). Gelişen izolatlar, izolasyonun gerçekleştirilmesinden sonraki ilk bir hafta içerisinde her iki günde bir, daha sonraki dönemde ise haftada bir olmak üzere aktifleştirilmiştir. Aktifleştirme işlemi (pasaj), 10 mL olarak hazırlanmış steril taze sıvı besiyerlerine, bir önceki pasajdan 100 µL örnek aktararak gerçekleştirilmiştir. İzolatlar, tanımlama testlerinin uygulanma süresi boyunca +4 °C'deki soğuk odada bekletilmiştir.

3.2.3 Laktik asit bakterilerinin tanımlanması

3.2.3.1 Fenotipik özelliklerin incelenmesi

Laktik asit bakterilerinin taksonomik sınıflandırmasının temeli olan fenotipik özellikler, tanımlamaya ilişkin ilk aşamayı oluşturmaktadır. Bakterilerin metabolizma ve biyokimyasal yapılarını araştırmaya yönelik fenotipik testler uygulanarak taksonomik cetveldeki yeri tespit edilmektedir. Fenotipik profile bakılarak identifikasyonun yapılması güncel, hızlı sonuç veren, temel bir değerlendirmedir.

3.2.3.1.1 Koloni morfolojisi

MRS ve M17 katı besiyerlerinde izolatların, sürme plak yöntemine göre ekimleri gerçekleştirilerek 30 °C'de 2-3 gün süreyle inkübasyonu sonucu oluşturdukları tek koloniler incelenmiştir. Koloniler opaklık, boyut, şekil, profil ve renk açısından değerlendirilerek koloni morfolojileri tayin edilmiştir.

3.2.3.1.2 Gram boyama testi

Bakterilerde hücre dış duvarındaki lipit miktarına göre hücrenin boyar madde ile boyanması esasına dayalı Gram boyama testinde (Aydın 2004), izolatların 10 mL'lik MRS ve M17 sıvı besiyerlerinde 30 °C'de geliştirilmiş 18-24 saatlik taze kültürleri kullanılmıştır. Steril koşullarda, izolatlardan bir öze dolusu örnek alınmış, temiz bir lam üzerine homojen şekilde yayılmış ve kendi halinde kurumaya bırakılmıştır. Alev üzerinde lamlar üç kez fikse edildikten sonra Gram boyama setinin (Merck, Germany) üzerinde belirtilen talimatlar doğrultusunda boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Buna göre, kristal violet çözeltisi ile lam üzerindeki örnek 1 dakika süresince muamele edilmiş, süre sonunda lamdaki kristal violet lugol çözeltisi ile yıkanmış ve lugol çözeltisi damlatılarak 1 dakika beklenmiştir. Damıtık su ile lugol çözeltisi 5 saniye süreyle yıkanmıştır. Dekolorizasyon çözeltisi ile lamdaki renk, grimsi maviye dönüşene kadar 10-15 saniye muamele edilmiştir. Damıtık su ile lam 5 saniye yıkanmış ve üzerine safranin çözeltisi damlatılarak 1 dakika süreyle bekletilmiştir. Damıtık su ile tekrar 5 saniye kadar bir süre yıkanan lam, hava akımı yardımı ile kurutmuştur. Kuruyan lamdaki örnek üzerine immersiyon yağı (Merck, Germany) damlatılarak X100 büyütme güçlü ışık mikroskobunda (CME Leica, USA) incelenmiştir (Halkman 2005). Boyama işlemi sonucunda hücreler, pembe-kırmızı renge boyanmışsa Gram (-), mavi-mor renkte ise Gram (+) olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3.1.3 Hücree morfolojisi

Gram boyama aşamasında mikroorganizmaların morfolojik durumu da incelenmiştir. İzole edilen bakterilerin şekilleri (kok ya da basil) belirlenmiş, bakteri dışındaki mikroorganizmalar ise farklı morfolojileri ile ayırt edilerek çalışma kapsamından çıkartılmıştır.

3.2.3.1.4 Katalaz testi

Bakterilerin ürettiği katalaz, bakteri hücresi içerisinde açığa çıkan toksik özellikli hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalayan hemoprotein yapıda bir enzimdir (Aydın 2004). Gram (+) olarak belirlenen bakterilerin katalaz üretilip üretilmediğini tespit etmek amacıyla % 30'luk H₂O₂ (Merck, Germany) çözeltisi kullanılmıştır. 10 mL'lik MRS ve M17 sıvı besiyerlerinde 30 °C'de 18-24 saat süresince geliştirilmiş taze izolatların üzerine 3-4 damla H₂O₂ çözeltisi damlatılmış ve gaz çıkışına göre sonuçlar değerlendirilmiştir. H₂O₂ çözeltisi ile girdiği reaksiyon sonucu gaz çıkışı göstermeyen izolatlar katalaz (-), gaz çıkışı gösteren izolatlar ise katalaz (+) olarak belirlenmiştir (Saginur *et al.* 1982).

3.2.3.1.5 Oksidaz testi

Oksidaz testi ile demir içeren bir hemoprotein olan sitokrom C oksidaz enzim varlığı araştırılmaktadır (Aydın 2004). Gram (+) ve katalaz (-) olan izolatlar MRS ve M17 katı besiyerlerinde 30 °C'de 2-3 gün süreyle geliştirilmiş ve oksidaz test kiti (Merck, Germany) ile bu teste tabi tutulmuşlardır. Katı besiyerindeki koloniler, steril koşullarda, oksidaz test stripleri üzerine alınarak renk değişimi gözlemlenmiştir. Mavi renk oluşumu pozitif oksidaz olarak değerlendirilmiştir (López-Diaz *et al.* 2000).

Bakteri kültürlerinin muhafazası

Gram boyama, katalaz ve oksidaz testlerinin sonucunda laktik asit bakterisi olarak belirlenen kültürler, katı besiyerine sürme yapılarak saflık kontrolünden geçirilmiş ve 5 mL'lik sıvı besiyerine alınıp geliştirilmiştir. 18-24 saatlik taze kültürlerle, toplam hacmin % 30'u gliserol olacak şekilde, steril koşullarda, steril gliserol (Merck, Germany) ilave edilerek vorteksle (Heidolph MR Hei-Standard, Germany) iyice karıştırılmıştır. 1 mL'lik karyotüplere gliserollü kültür alınmış ve -65 °C'de muhafaza edilmiştir (Lages *et al.* 1999). Bu aşamadan sonra, izolatlara fenotipik tanımlama testleri uygulanmıştır. Testlerin uygulama aşaması öncesinde kültürler aktifleştirilerek kullanılmıştır. Aktifleştirme işlemi steril koşullarda, gliserollü kültürlerden öze yardımıyla alınmış ve sıvı besiyerinde geliştirilmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlanarak kültürler uygulanacak testler için hazır hale getirilmiştir (Anonim 2005).

3.2.3.1.6 Glikozdan gaz oluşum testi

Durham tüpleri içerisinde oluşmuş gaz kabarcıkları, fermantasyon sonucunda oluşan katabolik gaz ürünlerinin bulunduğunu kalitatif olarak gösteren bir testtir (Aydın 2004). Glikozun fermente edilmesiyle ortamda gaz oluşup oluşmadığını anlamak amacı ile 10 mL steril MRS ve M17 sıvı besiyerleri içeren tüplere ters konumda havası alınmış olarak Durham tüpleri yerleştirilmiş ve tüpler sterilize edilmiştir. Kültürlerden 0,1 mL örnek alınarak tüplere ekim yapılmış ve örnekler 30 °C'de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda Durham tüplerinin tabanında gaz oluşumunun varlığı kontrol edilmiştir. Sonuçlar, gaz oluşumu tespit edilmişse heterofermantatif, gaz oluşumu görülmemişse homofermantatif olarak değerlendirilmiştir (Randazzo *et al.* 2004).

3.2.3.1.7 Farklı sıcaklık derecelerinde gelişme testi

Bakteri hücrelerinin farklı sıcaklık derecelerinde metabolik faaliyetlerinin devam edip etmeyeceğinin tespiti için uygulanan bir testtir. Bazı bakterilerin konak doku dışında yüksek veya düşük ısıda gelişme göstermesi, bakterinin kimliği hakkında bilgi verici bir özelliktir (Aydın 2004). 10 mL steril MRS ve M17 sıvı besiyerlerine 0,1 mL olarak aşılınmış kültürler 10 °C, 15 °C ve 45 °C sıcaklık derecelerinde inkübasyona bırakılmıştır. Kültürlerin 3 günlük inkübasyonu sonunda gelişip gelişmedikleri gözlemlenmiştir (Randazzo *et al.* 2004).

3.2.3.1.8 Arjinin hidroliz testi

Aminoasitlerin bir bakteri tarafından kullanılması, cins bazında o bakteriye özgü tanımlamaya ilişkin bir özelliktir. Bakterilerin besiyerinde bulunan aminoasidi kullanmaları sonucunda alkali aminler ortaya çıkar ve ortam pH'sı yükselir (Aydın 2004). Laktik asit bakterilerinin arjinini dekarboksile ederek amonyak oluşturmaları sonucu ortamın pH'sını yükseltmeleri ilkesinden yararlanılarak arjinin testi yapılmaktadır. Bu amaçla Ornitin dekarboksilaz sıvı besiyerine (Sigma, USA), arjinin monohidroklorid (Merck, Germany) (5 g L-arjinin monohidroklorid/1000 mL) ilave edilerek hazırlanan besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri, 18-24 saatlik MRS ve M17 sıvı besiyerlerinde geliştirilmiş kültürlerle aşılınmış ve 30 °C'de 1 hafta süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda renk değişimine bağlı arjinin hidrolizasyonu değerlendirilmiştir. L-arjinin monohidroklorid içeren tüplerde eflatundan sarıya dönen rengin tekrar eflatuna dönmesi ve aynı izolatın aşılandığı kontrol tüplerinde (L-arjinin monohidroklorid içermeyen tüplerde) ise oluşan sarı rengin değişmeksizin kalması pozitif olarak kabul edilmiştir. Kontrol tüpleri ile birlikte L-arjinin monohidroklorid içeren tüplerde rengin sarı olarak kalması da negatif olarak kabul edilmiştir. Negatif sonuç, gelişen örneğin besiyeri rengini değiştirebilecek kadar amonyak oluşturmadığını göstermektedir (Anonim 2005).

3.2.3.1.9 Karbohidrat fermantasyon profillerinin belirlenmesi

Bakterilerin karbohidrat fermantasyon karakterizasyonu hakkında bilgi sağlayarak tanımlamayı kolaylaştıran API (Analytical Profile Index) sistemi, laktik asit bakterilerinin tür düzeyinde belirlenebilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. API 50 CH test kitinden alınan sonuçlar, sisteme uygun bilgisayar programının veri tabanında yer alan bakteri türleri ile karşılaştırılarak tanımlama işlemi gerçekleştirilmektedir. Test sonuçları ilgili programda “% tanımlama” şeklinde ifade edilmektedir.

Kültürlerin tür düzeyinde belirlenebilmesi amacıyla API 50 CH test kitinden (BioMérieux, Marcy l’Etoile France) yararlanılmıştır. Test kitleri, 1 tanesi kontrol olmak üzere toplam 50 kuyucuktan oluşmaktadır. Analiz aşamasında kit içerisindeki bromkresol moru indikatörü içeren steril ‘API 50 CHL Medium’ besiyerine 18-24 saatlik taze bakteri kültürlerinden, bulanıklıkları standart konsantrasyonda (2 McFarland) olacak şekilde ayarlanarak aşılama yapılmıştır. Kuyucukların içerisine hazırlanan bu içerikten ilave edilerek üzerleri mineral yağ ile kapatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan kitler 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 24. ve 48. saat sonundaki renk değişimleri, kit besiyerinde bulunan indikatör renkteki (bromokresol moru) değişimlere göre belirlenmiş ve kitlerin örnek kartları üzerine kaydedilmiştir. Renk değişimlerine bağlı olarak ortaya çıkan sonuçlar, ‘API Identification Software’ (API Lab Plus Program, BioMérieux) programında değerlendirilerek, izolatlar cins, tür veya alt tür düzeyinde yüzdesel olarak belirlenmiştir.

3.2.3.2 Moleküler düzeyde inceleme

3.2.3.2.1 Hücre protein profillerinin belirlenmesi

Proteinlerin DNA molekülünün doğrudan bir ürünü olması, birbirine yakın özellik gösteren mikroorganizma gruplarının birbirinden homojen olarak ayrılmasında,

mikrobiyel hücrelerdeki proteinlerin tanımlanmasını dikkate değer kılmaktadır (Vandamme *et al.* 1996, Mavhungu 2005).

Birçok gıda ürününden izole edilen LAB için başarılı bir şekilde SDS-PAGE uygulaması gerçekleştirilmektedir. Tanımlama testlerine destek sağlamasının yanı sıra, DNA/DNA hibridizasyon veya 16S rRNA analizleri ile iyi bir korelasyon göstermesi SDS-PAGE uygulamasının önemini ortaya çıkarmaktadır (Palop *et al.* 2003).

API test kitleri ile tür düzeyinde gerçekleşen tanımlamayı destekleyen ve moleküler düzeyde bir fenotipik tanımlamayı sağlayan Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE), laktik asit bakterilerinin toplam hücre protein profillerini belirlemek için kullanılmış ve bu amaçla Laemmli (1970) yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır. SDS-PAGE analizinde öncelikle, bakteri hücrelerindeki tüm proteinler, Zotta ve arkadaşları (2008) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek izole edilmiştir. Elde edilen proteinler, jelde yürütülmüş ve jel görüntüleme sisteminde (Gel Logic 200 Imaning System Kodak, USA) bantlar halinde görüntülenerek moleküler büyüklükleri hesaplanmıştır.

Hücre proteinlerinin izolasyonu: Protein izolasyonu için 18-24 saatlik taze kültürler kullanılmıştır. Kültürlerin spektrofotometrede (UV-1208 Shimadzu, Japan) 600 nm dalga boyunda absorbans değerleri, damıtık suya karşı ölçülmüş ve kaydedilmiştir. 10 mL'lik besiyerinde absorbans değerleri 2-2,5 aralığında olacak şekilde ayarlama yapılarak standart oranda protein içermesi sağlanan kültürler 6.000 rpm devirde (4.020 rcf) 10 dakika süreyle santrifüj (Mikro 22R Hettich Zentrifugen, Germany) edilmiştir. Peletler bir kez yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Yıkama 10 mL damıtık suyla yapılarak iyice karıştırılmış ve örnekler tekrar 6.000 rpm devirde (4.020 rcf) 10 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme sonrası, tüpte üstte kalan sıvı kısım uzaklaştırılmış ve tüp dibinde kalan pelet üzerine spesifik aktivitesi 20.000 mg (pH 6,24) olan 100 µL lizozim enzim çözeltisi (Biochemica Applichem GmbH, Germany) EK 1'de belirtildiği üzere hazırlanarak ilave edilmiştir. Pelet ile enzim karışımı vorteksle iyice karıştırılmış ve yaklaşık 1 saat 37 °C'lik su banyosunda enzim aktivitesini göstermesi için bekletilmiştir. Enzimle inkübasyon işlemi sonrasında yine iyice karıştırılan örnekler

yaklaşık 10-15 dakika -20°C 'de dondurulmuştur. Süre sonunda 1.000 amplitude'da yaklaşık 1 dakika süreyle örnekler sonikasyon cihazında (VC 130 Sonics Vibra Cell, USA) kademeli olarak sonike edilmiştir. Sonikasyon sonrası iyice karıştırılan örneklere 500 μL örnek tamponu (**EK 1**) konularak 5 dakika boyunca 95°C sıcaklıktaki su içerisinde bekletilmiştir. Isıl işlem sonrasında örnekler, 5 dakika boyunca iyice karıştırılmış ve Eppendorf tüplerine alınarak 12.000 rpm devirdeki (12.718 rcf) santrifüjde (Biofuge 15 Heraeus Sepatech, Germany) 10 dakika santrifüjlenmiş ve sıvı faz toplanmıştır. Bu şekilde hazırlanan örnekler elektroforez işlemi yapılıncaya kadar -20°C 'de bekletilmiştir.

Elektroforez işlemi: Dikey elektroforez sistemi Mini Protean (Bio-Rad Laboratories, USA) malzemeleri kullanılarak uygulanmıştır. Elektroforez sisteminin cam plakaları % 76'lık etanol çözeltisiyle temizlenmiş ve gerekli diğer malzemeler uygun biçimde yerleştirilerek elektroforez düzeneği kurulmuştur. Cam plakalar arasına öncelikle, plaka boyutunun ortalama % 80 kadarını kaplayacak miktarda ayırma jeli (% 12) (**EK 1**) dökülmüş ve üzerine saf etanol (Merck, Germany) ilave edilmiştir. Jelin donması için 45 dakika beklenilmiş ve üzerindeki alkol uzaklaştırılmıştır. Cam plakaların boş kalan kısmı yığma jeli (% 4) (**EK 1**) ile tamamlanmış ve tarak aparatı yerleştirilmiştir. Yığma jelinin donması için de 45 dakika beklenmiştir. Hazırlanan jel plakaları elektroforez tankına yerleştirilerek elektrot tampon (**EK 1**), plakalar etrafında köpük olmayacak şekilde dökülmüştür. Moleküler ağırlıkları 10-200 kDa aralığında olan 14 protein içeren standarttan 10 μL ve örnek proteinlerinden 20'şer μL jellere yüklenmiştir. Elektroforez için EV231 Consort (Belgium) güç kaynağı kullanılmış ve yığma jeli için; 70V, ayırma jeli için; 100V elektrik akımında çalıştırılmıştır. Standart ve örnek proteinlerin yürütme işlemi tamamlandığında jeller dikkatle cam plakalardan ayrılmış ve boyama çözeltisi (**EK 1**) içerisine konulmuştur. Boyama çözeltisinde bir gece boyunca çalkalamalı bir düzenekte bekletilen jeller, boyama çözeltisinin uzaklaşması için yıkama çözeltisinde de (**EK 1**) yine bir gece çalkalamalı bir düzenekte bekletilmiştir. Daha sonra net bir şekilde mavi-mor renkte beliren protein bantları jel görüntüleme sisteminde (Gel Logic 200 Imaning System Kodak, USA) görüntülenerek proteinlerin, bilgisayar programında moleküler büyüklükleri hesaplanmıştır. Hesaplama ilgili programda, standart (SM0661 Fermentas, EU) olarak kullanılan marker proteinlerinin bağıl hareketlilik (Rf) değerleri

ve moleküler büyüklüklerinin logaritmalarından yararlanılarak çizilen standart eğrilerin kullanılması ile gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Bakterilerin İzole Edildiği Turşu Örneklerinin Tanıtımı

Bakteri kültürleri, ağırlıklı olarak hıyar materyali üzerinden üretimi gerçekleştirilen, farklı fermantasyon sürelerine sahip turşulardan elde edilmiştir. Turşu materyallerinin salamura örneklerinden MRS ve M17 besiyerlerine yapılan ekimlerden laktik asit bakterisi olduğu düşünülen mikroorganizmalar izole edilmiş ve tanımlama testlerine tabi tutulmuştur.

4.2 Turşu Örneklerinin Kimyasal ve Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

Turşu örneklerinden bakteri izolasyonu için aseptik koşullarda örnekler alındıktan sonra turşuların genel durumları hakkında bilgi sahibi olabilmek amacıyla, turşuların salamuralarında kimyasal ve mikrobiyolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Turşu örneklerine ait pH, toplam asitlik ve tuz değerleri Çizelge 4.1’de görülmektedir.

Özellikle homofermantatif LAB tarafından gerçekleştirilen asit üretimi, salamuranın laktik asit cinsinden toplam asitliğini arttırmakta ve turşuda koruyucu görevi üstlenmesini sağlamaktadır. pH değerindeki azalma, asitlik oluşumunun ortaya çıkardığı bir sonuç olarak kendini göstermektedir (Daeschel and Fleming 1984).

Doğu Himalaya bölgesinde ev ölçeğinde üretilen geleneksel fermente sebze ürünleri üzerinde çalışan Schillinger ve arkadaşları (2005) araştırmaları sonucunda, ürünlerin pH değerlerini 3,5-5,0 arasında bulmuşlardır.

Çizelge 4.1 Örneklere ait pH, % titrasyon asitliği ve tuz değerleri

Örnek No	Örnek Tipi	pH	Toplam Asitlik (g laktik asit/100mL)	Tuz (g/100mL)
1	hıyar	3,39	0,37	3,74
2	hıyar	4,38	0,15	3,48
3	hıyar	3,53	0,39	3,46
4	hıyar	3,79	0,22	3,48
5	hıyar	4,74	0,04	3,85
6	hıyar	3,43	0,60	3,72
7	hıyar	3,17	0,54	4,62
8	karışık	3,31	0,17	5,89
9	hıyar	3,46	0,48	3,61
10	hıyar	3,28	0,67	3,82
11	hıyar	3,48	0,39	3,82
12	erik	3,26	0,54	3,54
13	biber	3,16	1,31	5,58
14	hıyar	3,20	0,61	4,03
15	hıyar	3,35	0,64	4,72

Salamura örneklerinin toplam asitlik değerlerinin 0,04 g/100 mL ile 1,31 g/100 mL arasında değiştiği, pH değerlerinin de asitlik değerlerine uygun olarak 3,16-4,74 arasında olduğu belirlenmiştir. Yüksek asit içeriğine bağlı olarak, 13 nolu turşu örneğinin pH değerinin 3,16 ile en düşük değere sahip olduğu görülmektedir. 5 nolu örneğin, tüketime hazır bir hıyar turşusu olarak çok düşük asitlik değerine sahip olması ilginç bir sonuç olarak değerlendirilmiştir. Bununla birlikte, örneklerin pH ve titrasyon asitliği değerleri arasında ciddi bir korelasyon gözlenmemesi, muhtemelen, turşuların hazırlandığı sebzelerin ve salamuralarının tamponlama yeteneklerinin farklılığından kaynaklanmaktadır.

Sebze fermantasyonlarında fiziksel ve kimyasal ortama bağlı olarak sıcaklık derecesi, tuz konsantrasyonu, asitlik düzeyi, pH gibi çeşitli parametreler ortama hakim

mikroorganizma grubunu belirlemektedir. Buna bağlı olarak fermantasyon s¼recinde, laktik asit bakterilerinin ortama hakim mikroorganizma konumunda olması asitliğin zamanla geliştiğine ve pH değişimlerine neden olduğuna kanıt olarak g¼sterilebilir (Daeschel and Fleming 1984).

Sebze fermantasyonlarındaki tuz, laktik olmayan (non-laktik) fermantasyonları engelleyebilme etkisiyle mikrobiyal gelişimi ve tipini belirlemekle birlikte, konsantrasyonunun iyi ayarlanması doğal fermantasyonun seyri açısından önem taşımaktadır. Yeterli tuz oranı ile LAB gelişimini desteklemek ve aşırı tuz oranı ile gelişimi inhibe etmemek amacıyla, sebze fermantasyonlarındaki tuz oranının % 1-8 arasında olması gerektiği, fermantasyon için uygun tuz oranının ise % 5 civarında olduğu ifade edilmektedir (Daeschel and Fleming 1984, Nout and Rombouts 1992).

rnek salamuralarındaki tuz konsantrasyonları 3,46-5,89 g/100mL arasında değişmektedir. En y¼ksek tuz konsantrasyonuna sahip karışık turşu, en d¼ř¼k konsantrasyona sahip olarak ise bir hıyar turşusu g¼r¼lmektedir. İlgili turşu örneklerine ait tuz konsantrasyonlarının uygun değerlere sahip olduğu yorumu yapılabilir.

Kimyasal analiz sonuçlarının birbiri ile korelasyonlu bir ilişki g¼stermedięi tespit edilmiştir. Bunun nedeni olarak, turşu hammaddelerinin çoğunluk olarak hıyar olması ile birlikte farklı materyaller içermesi ve farklı fermantasyon evrelerindeki turşulardan örneklerin alınması d¼ř¼n¼lebilir.

Turşu örneklerinde yapılan toplam laktik asit bakterisi sayım sonuçları izelge 4.2'de g¼r¼lmektedir.

Çizelge 4.2 Turşu örneklerin MRS ve M17 besiyerlerinde belirlenen toplam laktik asit bakteri sayısı

Örnek No	Örnek Tipi	Toplam Laktik Asit Bakterisi (log kob/mL)		Toplam Laktik Asit Bakterisi (kob/mL)	
		MRS	M17	MRS	M17
1	hıyar	6,98	6,34	$9,6 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$
2	hıyar	5,65	7,04	$4,5 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^7$
3	hıyar	5,86	6,37	$7,3 \cdot 10^5$	$2,37 \cdot 10^6$
4	hıyar	5,99	6,90	$9,7 \cdot 10^5$	$7,8 \cdot 10^6$
5	hıyar	5,30	6,70	$2,0 \cdot 10^5$	$4,7 \cdot 10^6$
6	hıyar	7,30	3,40	$2,0 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^3$
7	hıyar	3,39	4,72	$2,47 \cdot 10^3$	$5,2 \cdot 10^4$
8	karişik	6,90	6,40	$7,6 \cdot 10^6$	$2,37 \cdot 10^6$
9	hıyar	4,14	2,52	$1,37 \cdot 10^4$	$3,3 \cdot 10^2$
10	hıyar	5,40	5,36	$2,37 \cdot 10^5$	$2,28 \cdot 10^5$
11	hıyar	6,98	5,87	$9,5 \cdot 10^6$	$7,4 \cdot 10^5$
12	erik	7,56	5,65	$3,64 \cdot 10^7$	$4,5 \cdot 10^5$
13	biber	6,50	4,40	$3,14 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^4$
14	hıyar	6,54	5,13	$3,5 \cdot 10^6$	$1,36 \cdot 10^5$
15	hıyar	7,52	5,86	$3,32 \cdot 10^7$	$7,2 \cdot 10^5$

MRS ve M17 besiyerlerinde ayrı ayrı sayım yapılmasının gerekçesi, laktokokların MRS besiyerinde baskılanabilme olasılığıdır. Toplam laktik asit bakterisi sayıları; MRS agar besiyerinde yapılan sayımlarda $3,39-7,56$ log kob/mL ($2,47 \cdot 10^3-3,64 \cdot 10^7$ kob/mL), M17 agar besiyerinde yapılan sayımlarda ise $2,52-7,04$ log kob/mL ($3,3 \cdot 10^2-1,1 \cdot 10^7$ kob/mL) arasında olduğu belirlenmiştir.

Sebze fermantasyonlarındaki tuz ve asitlik değerleri LAB gelişimini etkileyen önemli parametreler olarak belirtirmektedir. Doğal fermantasyona tabi tutulmuş geleneksel Doğu Himalaya sebze ürünlerinde pH 3,5-5 aralığında, LAB sayısı ise $5,7 \cdot 10^8-8,2 \cdot 10^8$ kob/mL olarak tespit edilmiştir (Schillinger *et al.* 2005). Palop ve arkadaşları (1999)

patlıcanları % 4; 6; 10 olmak üzere çeşitli tuz oranları ile doğal fermantasyona tabi tutmuşlar ve düşük tuz seviyesinde yüksek sayıda LAB elde ederken (10^8 - 10^9 kob/mL), yüksek tuz oranında nispeten düşük LAB sayısı elde etmişlerdir.

Örneklere ilişkin asitlik ve tuz değerleri ile toplam laktik asit bakteri sayıları arasında bir korelasyon görülmemektedir.

4.3 Klasik Tanımlama Testlerinin Sonuçları

4.3.1 Gram boyama sonuçları

Gram boyama test sonuçlarına göre, 75 adet bakteri Gram (+) olarak tanımlanmıştır. Mikroskopik inceleme sonucunda, laktik asit bakterilerinin Gram (+) özellikte olması nedeniyle, Gram (-) bakteriler elenmiştir. Mikroskopik inceleme sırasında, morfolojik yapılarından dolayı, mayalar da izolatlardan ayırt edilmiştir.

4.3.2 Katalaz testi sonuçları

Katalaz testi sırasında gerçekleşen kimyasal reaksiyon; $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ şeklindedir. Katalaz enzimi varlığında kabarcık ve köpük halinde görülen O_2 gazı ile bakteriler katalaz (+) olarak, herhangi bir reaksiyon oluşmadığında ise katalaz (-) değerlendirilir (Aydın 2004). Laktik asit bakterileri katalaz (-) olarak bilindiğinden katalaz reaksiyonu pozitif olan örnekler ayırt edilmiştir. Gram (+) bakterilerde test edilen katalaz enziminin varlığı sonucunda 60 bakteri katalaz (-) olarak tanımlanmıştır.

4.3.3 Oksidaz testi sonuçları

Okdisaz test kiti üzerinde belirtilmiş renk diagramlarına göre eflatun-mor renk oluşturan örnekler oksidaz (-) olarak değerlendirilmiştir. Oksidaz enzimi nonfermantatif (aerobik) solunuma katılan bir enzim olduğundan (Aydın 2004), Gram (+) ve katalaz (-) olan bakterilerde tespit edilmemiş ve 51 bakteri oksidaz (-) olarak tanımlanmıştır.

4.3.4 Koloni ve hücre morfolojisi

İzolaların oluşturduğu kolonilerin boyut, şekil, renk, opaklık ve profil görünüşleri, MRS ve M17 katı besiyelerinde ayrı ayrı yapılan gözlemlerle belirlenmiştir. Mayalar, Gram boyama esnasında, boyutları ve şekilleri itibariyle bakterilerden ayrılmış ve incelenecek mikroorganizma grubundan elenmiştir. Gram boyama, katalaz ve oksidaz testlerinin sonuçlarına göre laktik asit bakterisi olduğu belirlenen örneklerin koloni ve hücre morfolojileri Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Gram boyama, katalaz ve oksidaz testlerinin ortak sonucuna göre, 12 ve 13 numaralı turşu örneklerinden MRS besiyerine yapılan ekimler ile 2, 5, 8, 10, 13 ve 15 numaralı turşu örneklerinden M17 besiyerine yapılan ekimlerden LAB olduğu düşünülecek bir koloni elde edilememiştir.

Gram boyama ile boyanmış bakterilerde hücrelerin kok ya da basil şekilleri daha net ayırt edilebilmiştir. Turşu fermantasyonlarında, genel olarak yer alan LAB’nin Gram boyama sonuçlarına göre morfolojileri Çizelge 4.4’deki gibi ifade edilmiştir.

Çizelge 4.3 Farklı besiyerlerinden izole edilen bakterilerin koloni ve hücre morfolojileri

Örnek No	Koloni No	Besiyeri	Opaklık	Boyut	Şekil	Renk	Profil	Hücre Morfolojisi
1	1	MRS	mat	küçük	düzensiz	beyaz	konveks	basil
1	2	MRS	mat	küçük	dairesel	beyaz	konveks	basil
1	3	MRS	mat	küçük	dairesel	beyaz	konveks	basil
1	4	MRS	mat	büyük	dairesel	sarı	konveks	basil
2	5	MRS	mat	küçük	düzensiz	beyaz	buruşuk	basil
2	6	MRS	mat	küçük	düzensiz	beyaz	konveks	kok
2	7	MRS	mat	küçük	düzensiz	beyaz	konveks	kok
2	8	MRS	mat	küçük	dairesel	beyaz	konveks	kok
2	9	MRS	mat	küçük	dairesel	beyaz	konveks	kok
3	10	MRS	mat	büyük	düzensiz	beyaz	buruşuk	kok
3	11	MRS	mat	küçük	dairesel	beyaz	konveks	kok
3	12	MRS	mat	küçük	dairesel	beyaz	konveks	basil
4	13	MRS	mat	küçük	düzensiz	beyaz	konveks	basil
4	14	MRS	şeffaf	küçük	dairesel	beyaz	konveks	kok
4	15	MRS	şeffaf	küçük	düzensiz	beyaz	konveks	basil
4	16	MRS	mat	küçük	dairesel	sarı	konveks	kok
5	17	MRS	şeffaf	küçük	dairesel	beyaz	konveks	kok
8	18	MRS	mat	küçük	düzensiz	beyaz	konveks	basil
9	19	MRS	mat	büyük	düzensiz	beyaz	konveks	basil
9	20	MRS	mat	küçük	dairesel	beyaz	konveks	kok
9	21	MRS	mat	büyük	düzensiz	beyaz	konveks	basil
10	22	MRS	mat	küçük	dairesel	beyaz	konveks	kok
11	23	MRS	mat	büyük	düzensiz	beyaz	konveks	basil
11	24	MRS	mat	küçük	dairesel	beyaz	konveks	kok
11	25	MRS	mat	büyük	dairesel	sarı	konveks	kok

Çizelge 4.3 Farklı besiyerlerinden izole edilen bakterilerin koloni ve hücre morfolojileri

(Devam)

Örnek No	Koloni No	Besiyeri	Opaklık	Boyut	Şekil	Renk	Profil	Hücre Morfolojisi
11	26	MRS	mat	büyük	dairesel	beyaz	konveks	kok
11	27	MRS	mat	küçük	dairesel	beyaz	konveks	basil
11	28	MRS	mat	büyük	düzensiz	beyaz	konveks	basil
12	29	MRS	mat	büyük	düzensiz	beyaz	konveks	basil
12	30	MRS	mat	küçük	dairesel	beyaz	konveks	kok
12	31	MRS	mat	küçük	dairesel	beyaz	konveks	basil
12	32	MRS	mat	küçük	dairesel	beyaz	konveks	basil
12	33	MRS	mat	küçük	düzensiz	beyaz	konveks	basil
13	34	MRS	mat	büyük	düzensiz	beyaz	buruşuk	basil
14	35	MRS	mat	küçük	düzensiz	beyaz	konveks	basil
14	36	MRS	mat	büyük	dairesel	beyaz	konveks	basil
14	37	MRS	mat	küçük	düzensiz	beyaz	konveks	basil
15	38	MRS	mat	büyük	düzensiz	beyaz	konveks	basil
15	39	MRS	mat	büyük	dairesel	sarı	konveks	kok
15	40	MRS	mat	küçük	dairesel	beyaz	konveks	kok
15	41	MRS	şeffaf	küçük	dairesel	beyaz	konveks	kok
15	42	MRS	mat	küçük	dairesel	beyaz	konveks	basil
1	43	M17	mat	küçük	dairesel	beyaz	konveks	basil
3	44	M17	mat	küçük	dairesel	beyaz	konveks	kok
4	45	M17	mat	büyük	dairesel	beyaz	buruşuk	basil
6	46	M17	mat	küçük	dairesel	beyaz	konveks	basil
7	47	M17	mat	büyük	dairesel	beyaz	konveks	basil
9	48	M17	mat	küçük	dairesel	kırmızı	konveks	kok
11	49	M17	mat	büyük	dairesel	beyaz	konveks	basil
12	50	M17	mat	küçük	dairesel	beyaz	konveks	basil
14	51	M17	mat	büyük	düzensiz	beyaz	buruşuk	kok

Çizelge 4.4 LAB'nin Gram boyama sonuçlarına göre morfolojileri (Carr *et al.* 2002)

Cins	Morfoloji
<i>Lactobacillus</i>	Basil
<i>Lactococcus</i>	Kok
<i>Leuconostoc</i>	Kok
<i>Pediococcus</i>	Kok
<i>Streptococcus</i>	Kok

4.3.5 Glikozdan gaz oluşum testi sonuçları

Glikoz kullanımına bağlı olarak yapılan testte, 7 günlük inkübasyon süresince Durham tüplerindeki gaz oluşumu kontrol edilmiş ve gaz oluşumunun varlığı tespit edilen kültürler pozitif olarak nitelendirilmiştir. LAB'nin fermantasyonu homofermantatif ve heterofermantatif yollarla gerçekleştirmeleri bilgisiyle gaz oluşturma testinin sonucu, izolatların homofermantatif ve heterofermantatif türler olarak ayrılmasına yardımcı olmuştur (Çizelge 4.5). 19 adet heterofermantatif izolat tespit edilmiştir. Hıyar fermantasyonlarında, şişme sorununa yol açtığından, mümkün olduğunca az seviyede CO₂ oluşumu istenmektedir. Bu nedenle, homofermantatif LAB'nin gelişimi, heterofermantatif olanlara göre daha çok istenmektedir (Daeschel and Fleming 1984).

4.3.6 Farklı sıcaklık derecelerinde gelişme testi sonuçları

10 °C, 15 °C ve 45 °C imak üzere farklı sıcaklık derecelerinde inkübasyona bırakılan kültürlerin, inkübasyon süresi (3 gün) sonunda tüplerdeki tortu veya bulanıklık oluşumu şeklinde görülen gelişimi pozitif test sonucu olarak yorumlanmıştır (Çizelge 4.5).

Laktik asit bakterilerinin, özellikle hıyar fermantasyonlarında, 16-32 °C gibi oldukça geniş bir sıcaklık aralığında optimum olarak gelişebildiği belirtilmektedir. Bazı *Pediococci* türlerinde ise daha yüksek sıcaklıklarda gelişme saptanmıştır (Daeschel and Fleming 1984).

Çalışma süresince yapılan pasajlarda izolatların gelişme sıcaklıkları 30 °C olup, tüm izolatların bu sıcaklık derecesinde gelişebildiği gözlemlenmiştir. 10 °C'de gelişebilen bir izolata rastlanılmamıştır. 15 °C'de 34 adet ve 45 °C'de 8 adet izolatın geliştiği gözlemlenmiş, 45 °C'de gelişen her izolatın, aynı zamanda, 15 °C'de de geliştiği belirlenmiştir.

4.3.7 Arjinin hidroliz testi sonuçları

Ornitin dekarboksilaz sıvı besiyeri eflatun renkli olmakla birlikte söz konusu renk, örneğin gelişmesine bağlı olarak sarı renge dönüşmektedir. Böylece Ornitin dekarboksilaz sıvı besiyeri kontrol amaçlı kullanılmıştır. Bu besiyerine eklenen L-arjinin monohidroklorid besiyeri ise LAB'nin arjinini hidrolize edebilme yeteneklerini araştırmak için kullanılmıştır. Arjinin hidrolizasyonunu gerçekleştiren laktik asit bakterilerinin, kontrol tüpleri ile karşılaştırmalı renk değişimleri sonuçlarına bağlı olarak 14 adet pozitif sonuç elde edilmiştir (Çizelge 4.5).

Schillinger ve arkadaşları (2005) dört farklı sebze fermantasyonundan izole ettikleri toplam 269 adet laktik asit bakterisinden 96 adetinin arjinini hidrolize edebildiğini görmüştür.

Çizelge 4.5 LAB'nin gaz oluşumu, farklı sıcaklıklarda gelişme ve arjinin hidroliz testlerinin sonuçları

Örnek No	Koloni No	Gaz Oluşumu	Farklı Sıcaklıklarda Gelişme			Arjinin Hidrolizi
			10 °C	15 °C	45 °C	
1	1	+	-	-	-	+
1	2	-	-	-	-	-
1	3	+	-	+	-	+
1	4	-	-	+	+	-
2	5	+	-	-	-	+
2	6	-	-	-	-	-
2	7	-	-	+	-	-
2	8	-	-	+	-	-
2	9	-	-	+	-	-
3	10	-	-	-	-	-
3	11	-	-	+	-	-
3	12	+	-	-	-	+
4	13	+	-	+	+	+
4	14	-	-	+	-	-
4	15	+	-	+	+	+
4	16	-	-	+	-	-
5	17	-	-	+	-	-
8	18	-	-	+	+	-
9	19	+	-	+	-	+
9	20	-	-	+	-	-
9	21	+	-	+	-	+
10	22	-	-	+	-	-
11	23	+	-	+	-	+
11	24	-	-	+	-	-
11	25	-	-	+	-	-
11	26	-	-	-	-	-
11	27	+	-	-	-	-
11	28	+	-	-	-	-
12	29	+	-	+	-	+
12	30	-	-	+	-	-
12	31	+	-	+	-	-
12	32	-	-	+	-	-
12	33	+	-	+	-	-

Çizelge 4.5 LAB'nin gaz oluşumu, farklı sıcaklıklarda gelişme ve arjinin hidroliz testlerinin sonuçları (devam)

Örnek No	Koloni No	Gaz Oluşumu	Farklı Sıcaklıklarda Gelişme			Arjinin Hidrolizi
			10 °C	15 °C	45 °C	
13	34	-	-	+	-	-
14	35	+	-	+	-	+
14	36	+	-	+	-	+
14	37	+	-	-	-	-
15	38	+	-	+	+	+
15	39	-	-	+	-	-
15	40	-	-	+	-	-
15	41	-	-	+	-	-
15	42	+	-	+	+	-
1	43	-	-	-	-	-
3	44	-	-	-	-	-
4	45	-	-	-	-	-
6	46	-	-	-	-	-
7	47	-	-	+	+	-
9	48	-	-	-	-	-
11	49	-	-	-	-	-
12	50	-	-	-	-	+
14	51	-	-	+	+	-

Çizelge 4.6 LAB'nin arjinin hidroliz yetenekleri (Carr *et al.* 2002)

Cins	Arjinin Hidrolizasyonu
<i>Lactobacillus</i> (Homofermantatif)	-
<i>Lactobacillus</i> (Heterofermantatif)	+
<i>Lactococcus</i>	değişken
<i>Leuconostoc</i>	-
<i>Pediococcus</i>	değişken
<i>Streptococcus</i>	değişken

Carr ve arkadaşları (2002), laktik asit bakterilerinin arjinin hidrolizasyon yeteneğini cinslere göre Çizelge 4.6'deki gibi ifade etmiştir.

4.4 Karbohidrat Fermantasyon Profili

Örneklerin gerekli inkübasyon süreleri sonunda, besiyerinde bulunan karbohidratları kullanabilmesine bağlı olarak ortamda oluşturduğu asit, kit besiyerindeki indikatörde renk değişimi meydana getirerek fermantasyon karakterlerinin belirlenmesini sağlamıştır. Renk değişimi, kit besiyerindeki indikatör rengin (bromkresol moru) mordan sarıya dönmesi pozitif (+), mor rengin değişmemesi negatif (-), ara renkler ise şüpheli (?) olarak kaydedilmiştir.

Kit üzerindeki 25. kuyucukta bulunan eskulin, bakteri tarafından kullanılma yeteneğine göre test edilmiş ve sonuç olarak kuyucuktaki renk, siyaha dönüştüğünde pozitif (+) şeklinde değerlendirilmiştir.

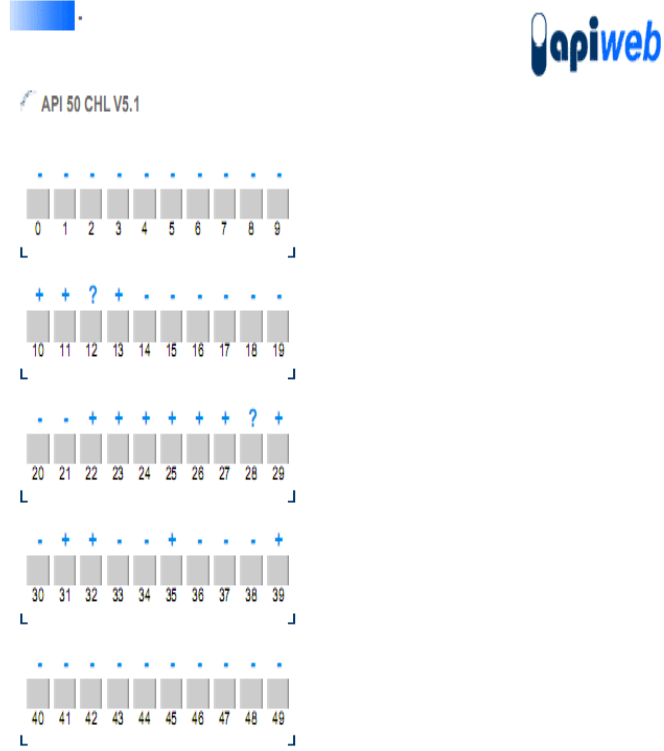
API test kiti ile elde edilen sonuçlar API Identification Software (API Lab Plus Program, BioMérieux) programına aktarılmış ve önceki testlerle laktik asit bakterisi olduğu düşünülen örnekler programa göre tür veya alttür düzeyinde tanımlanmıştır.



Şekil 4.1 *Lactobacillus acidophilus* bakterisinin API 50 CHL kit sonucu



Şekil 4.2 *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* bakterisinin API 50 CHL kit sonucu



REFERENCE DATE
14 7/7/09

COMMENT

GOOD IDENTIFICATION

Strip API 50 CHL V5.1
Profile + + ? ++ + + + + ? ++ + +
Note

Significant taxa	% ID	T	Tests against
Lactobacillus acidophilus 1	97.7	0.76	RAF 25%

Next taxon	% ID	T	Tests against
Lactobacillus crispatus	0.8	0.57	AMD 100%

[Close](#)

[Print](#)

Şekil 4.3 *Lactobacillus acidophilus* bakterisine ait API test sonucu örneği



API 50 CHL V5.1

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
L J

10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
L J

20 21 22 23 24 25 26 27 28 29
L J

30 31 32 33 34 35 36 37 38 39
L J

40 41 42 43 44 45 46 47 48 49
L J

REFERENCE DATE
133 7/2/09

COMMENT

GOOD IDENTIFICATION TO THE GENUS

Strip API 50 CHL V5.1
Profile ?.....++++.....+..+?+.....+..+.....?..+.....?..
Note

Significant taxa	% ID	T	Tests against
Lactobacillus paracasei ssp paracasei 3	83.4	0.43	SOR 20% LAC 80% MLZ 20%
Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1	14.6	0.38	LAC 99% TUR 80%

Next taxon	% ID	T	Tests against
Lactobacillus paracasei ssp paracasei 2	1.8	0.33	MDG 83% TUR 100%

[Close](#) [Print](#)

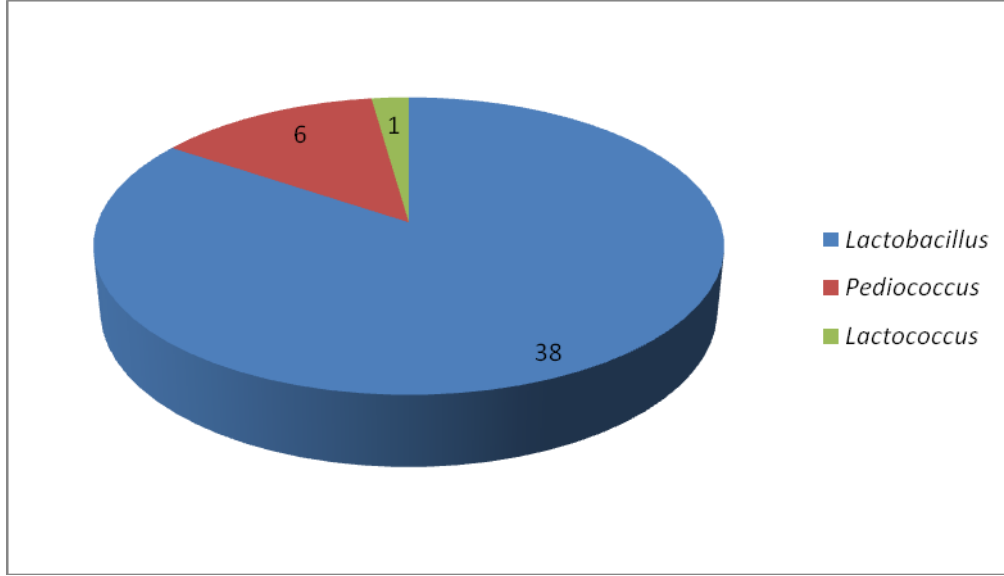
Şekil 4.4 *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* bakterisine ait API test sonucu örneği

Çizelge 4.7 İzolatların API Lab Plus Programına göre % tanımlama sonuçları

Koloni No	Tür/Alttür	%
1	<i>L. salivarius</i>	99,9
2	<i>P. damnosus</i> 2	99,7
3	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1	88,5
	<i>Leu. mesenteroides</i> ssp.	6,8
4	<i>L. plantarum</i> 1	65,5
	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1	17,4
	<i>L. brevis</i> 1	10,4
5		
6	<i>L. acidophilus</i> 1	90,4
7	<i>L. acidophilus</i> 3	96,3
8	<i>L. acidophilus</i> 1	99,7
9	<i>L. acidophilus</i> 1	93
10		
11	<i>P. spp.</i>	58,2
	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 2	18,3
	<i>P. damnosus</i> 2	12,6
12	<i>L. brevis</i> 3	99,7
13	<i>L. buchneri</i>	99,9
14	<i>P. damnosus</i> 2	99,1
15	<i>L. buchneri</i>	96,1
16	<i>L. acidophilus</i> 1	97,7
17	<i>P. spp.</i>	84
	<i>L. acidophilus</i> 1	13,4
18	<i>L. plantarum</i> 1	99,9
19	<i>L. buchneri</i>	96,9
20	<i>L. plantarum</i> 1	81
	<i>L. pentosaceus</i>	18,9
21	<i>L. buchneri</i>	95,5
22	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 3	83,4
	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	14,6
23		
24	<i>L. del.</i> ssp. <i>lactis</i> 2	63,9
	<i>L. acidophilus</i> 1	31,2
25	<i>P. damnosus</i> 2	99,9
26	<i>L. acidophilus</i> 1	91,3
27	<i>L. brevis</i> 3	99,7
28	<i>L. brevis</i> 3	92,9

Çizelge 4.7 İzolatların API Lab Plus Programına göre % tanımlama sonuçları (devam)

Koloni No	Tür/Alttür	%
29	<i>L. brevis</i> 3	90,6
	<i>P. spp.</i>	48,4
30	<i>L. acidophilus</i> 1	48
31	<i>L. brevis</i> 3	99,3
32	<i>L. plantarum</i> 1	99,9
	<i>L. collinoides</i>	89,7
33	<i>L. brevis</i> 3	9,2
34	<i>L. plantarum</i> 1	99,9
35	<i>L. brevis</i> 2	98,9
36	<i>L. brevis</i> 2	99,7
37	<i>L. brevis</i> 3	99,2
38	<i>L. brevis</i> 3	99,5
39	<i>L. acidophilus</i> 1	93,2
	<i>L. acidophilus</i> 1	83,4
40	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i> 3	9,7
	<i>L. acidophilus</i> 1	83,4
41	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i> 3	9,7
42	<i>L. brevis</i> 3	99,9
43		
44		
45	<i>L. pentosaceus</i>	99,9
46	<i>L. plantarum</i> 1	99,6
	<i>L. pentosaceus</i>	63,9
47	<i>L. plantarum</i> 1	35,2
48		
	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i> 1	51,7
49	<i>L. plantarum</i> 1	43,6
50	<i>L. brevis</i> 3	99,3
	<i>L. pentosaceus</i>	56,4
51	<i>L. plantarum</i> 1	43,5



Şekil 4.5 API sonuçlarına göre laktik asit bakteri cinslerinin dağılımı

Lactobacillus, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* sebze fermantasyonlarından çoğunlukla izole edilen cinsleri oluşturmaktadır (Daeschel *et al.* 1987). Bu çalışmada, API tanımlama testine göre; *Lactobacillus* (38) ve *Pediococcus* (6) turşu örneklerinden en çok izole edilen bakteri cinslerini oluşturmakta olup, *Lactococcus* cinsine ait 1 adet bakteri tanımlanabilmiştir. Söz konusu *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 biyotipi olup, MRS besiyerinden izole edilmiş, M17 besiyerinden herhangi bir laktokok cinsine ait bakteri izole edilememiştir.

Hıyar fermantasyonlarında, *L. plantarum* baskın mikroorganizma olmakla birlikte, genellikle, *P. pentosaceus* ve *Leu. mesenteroides* türleri de yer almaktadır (Mäki 2004).

L. brevis (11), *L. acidophilus* (9) ve *L. plantarum* (6) türlerinin, tanımlanabilen izolatların çoğunluğunu oluşturduğu belirlenmiştir. *L. salivarius*, *L. del.* ssp. *lactis* 2 ve *L. collinoides* türlerinin turşulardan elde edilmesi ilginç bir sonuç olarak karşımıza çıkmıştır. *Leu. mesenteroides* ssp. ile *L. casei*, genellikle, turşulardan yoğun olarak izole

edilen bakteriler arasında yer alırken, API sonuçlarına göre izole edilememeleri, ilgili turşu örneklerine yönelik yine ilginç bir sonuç olarak yorumlanmıştır.

API 50 CHL test kiti ile izolatların tanımlamaları aşamasında 6 izolat, testin yapılabilmesi için 18-24 saat inkübasyon sonucunda gerekli düzeyde gelişme gösteremedikleri için API testleri yapılamamıştır. Bu nedenle; 5, 10, 23, 43, 44, 48 koloni nolu izolatların API sonuçları bulunmamaktadır. Sonuç olarak, 51 adet izolattan 45 adetinin tanımlaması yapılabilmektedir.

API Lab Plus System ile ortaya çıkan sonuçların güvenilir olabilmesi için, % olarak bildirilen tanımlama sonuçlarının daha yüksek değerlere sahip olması gerektiği vurgulanmaktadır (Palop *et al.* 2000).

4.5 Tanımlama Testleri Sonuçlarının Genel Değerlendirilmesi

İzolatların klasik tanımlama testlerinin sonuçları ile API testi sonuçları karşılaştırılarak, birbirleri ile uyumları incelenmiştir.

On gün ile otuz gün arasında farklı fermantasyon süreçlerine sahip Çubuk turşularından alınan örneklerden izole edilen bakteri türleri incelendiğinde: *L. plantarum* 1 fermantasyonun hemen her aşamasından izole edilmiştir; *Pediococcus* türleri, *L. acidophilus* 1 ve 3 ile *L. brevis* 1 ve 3 biyotipleri fermantasyonun ilk 15 günü hariç diğer aşamalardan izole edilmiştir; *L. pentosaceus* ile *L. buchneri* türleri ise fermantasyonun 20. gününden sonra izole edilmiştir.

Fleming ve arkadaşları (1992), fermantasyonun birincil aşamasında *Streptococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus cerevisiae*, *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus plantarum* türlerinin en aktif bakteriler olduğunu bildirmişlerdir.

Palop ve arkadaşları (2000) patlıcan fermantasyonunun ilk aşaması hariç, fermantasyon süresince baskın tür olarak *L. plantarum* 1 biyotipini belirlemişlerdir. *L. brevis* türüne ait 2 ve 3 biyotiplerini fermantasyonun başlangıç aşamasında yoğun olarak izole etmişlerdir.

Karışık turşu olan 8 nolu örnekten yalnızca bir adet LAB (*L. plantarum* 1) tanımlanabilmiştir. 12 nolu erik turşusundan *L. plantarum* 1, *L. acidophilus* 1, *L. brevis* 3 ve *L. collinoides* olmak üzere 4 farklı türde LAB tanımlanmıştır. 13 nolu biber turşusundan yalnızca bir bakteri izole edilmiş ve *L. plantarum* 1 olarak tanımlanmıştır. Hıyar turşu örneklerinden *Lactobacillus* ve *Pediococcus* cinslerine ait çeşitli türler ile *Lactococcus* cinsine ait bir tür (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1) izole edilmiş ve tanımlanmıştır.

API test sonuçlarına göre belirlenen türlerin cins özelliklerine ait hücre morfolojileri ile Çizelge 4.3'e göre belirlenmiş hücre morfolojileri arasında bazı uyumsuzluklar olduğu görülmektedir. 3 nolu koloni Çizelge 4.3'de basil olarak belirlenmesine karşın, API sonucuna göre, bu koloni % 88,5 oranla kok şekilli *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 olarak tanımlanmıştır. 24 nolu koloni yine Çizelge 4.3'de kok olarak görünmekte, fakat API sonucu % 63,9 oranla *Lactobacillus del.* ssp. *lactis* 2 olduğunu göstermektedir. 49 nolu koloni API sonucuna göre, % 51,7 oranla *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 1 olarak tanımlanmıştır ve Çizelge 4.3'deki basil sonucuyla uyumluluk göstermektedir. API sonucuna göre, % 83,4 oranla *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 3 olarak tanımlanan 22 nolu koloninin, Çizelge 4.3'e göre, hücre morfolojisi kok olarak belirlenmiştir. İki biyotip arasındaki farklılık olarak ortaya çıkan bir sonuç elde edilmiştir. Bununla birlikte, API sonuçlarına göre tüm *Lactobacillus acidophilus* türüne ait 1 ve 3 biyotipleri Çizelge 4.3'de kok olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.8 *Lactobacillus* cinsinin gaz oluşturma yeteneği (Axelsson 2004)

Zorunlu Homofermantatif	Fakültatif Heterofermantatif	Zorunlu Heterofermantatif
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>

Gaz oluşturmalarına göre homofermantatif ve heterofermantatif olarak belirlenen izolatların, API test sonuçları ile arasında farklılıklar saptanmıştır. API sonuçlarına göre *L. brevis* 3 olarak tanımlanan laktik asit bakterisinin tüm üyeleri, gaz oluşum testinde heterofermantatif olarak belirlenmiş ancak, 50 koloni nolu *L. brevis* 3 homofermantatif olarak sonuç vermiştir. 1 koloni nolu *L. salivarius* ile 3 koloni nolu *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 zorunlu homofermantatif olması gerekirken (Carr *et al.* 2002), testte gaz oluşturdıkları gözlemlenmiş ve heterofermantatif olarak belirlenmiştir.

API sonuçlarına göre türleri belirlenen izolatların farklı sıcaklık derecelerinde gelişmelerine bağlı olarak da uyumlu olmayan bazı sonuçlar elde edilmiştir. 35 °C’de gelişebilen tek tür olan *P. damnosus* (Carr *et al.* 2002), söz konusu sıcaklık derecesine yakın olan 30 °C’de gelişme göstermiştir. *P. damnosus* 2 türü olduğu belirlenen 14 ve 25 koloni nolu bakteriler yalnızca 15 °C’de gelişmiş, 2 koloni nolu *P. damnosus* 2 ise deneysel sıcaklık derecelerinin hiçbirinde gelişmemiştir.

Orla-Jensen (1919), Laktobasillerden Streptobacterium grubunda yer alan *L. plantarum* türünün 10-40 °C sıcaklık aralığında gelişebildiğini bildirmiştir. Kandler ve Weiss (1986), çoğu *L. plantarum* bakterisinin 45 °C’de gelişebildiğini ifade etmişlerdir. *L. plantarum* 1 olduğu belirlenen 4, 18, 32 ve 46 koloni nolu izolatlardan, 4 ve 18 nolu koloniler 15 °C ve 45 °C sıcaklık derecelerinde gelişme göstermiş, 32 koloni nolu *L. plantarum* 1 türü yalnızca 15 °C’de gelişmiştir. 46 koloni nolu *L. plantarum* 1 ise söz konusu hiçbir sıcaklık derecesinde gelişmemiştir.

Thermobacterium grubundan *L. acidophilus* 15 °C'de gelişemeyen, 45 °C'de gelişme gösteren bir türdür (Carr *et al.* 2002). *L. acidophilus* 1 olarak tanımlanan 6, 8, 9, 16, 26, 39, 40 ve 41 nolu kolonilerden 8, 9, 16, 39, 40 ve 41 ile *L. acidophilus* 3 olarak tanımlanan 7 nolu koloni 15 °C'de gelişme göstermiş, 6 ve 26 koloni nolu koloniler ise söz konusu herhangi bir sıcaklık derecesinde gelişmemiştir.

Thermobacterium grubundan *L. del. ssp. lactis* 2 biyotipi 15 °C'de gelişip, 45 °C'de gelişemeyerek uyumlu olmayan bir sonuç göstermiştir. *L. salivarius* da bir Thermobacterium grubu üyesidir ancak, 45 °C'de gelişmediği tespit edilmiştir.

Optimal gelişme sıcaklığı 15 °C olan Betabacterium grubunun *L. brevis* üyesi, grubun bu özelliğinden farklı olarak 15 °C'de gelişemeyen bir tür olarak karşımıza çıkmaktadır (Carr *et al.* 2002). 29 ve 31 koloni nolu *L. brevis* 3 türleri ile *L. brevis* 2 olarak tanımlanan 35 ve 36 nolu koloniler, literatürden farklı olarak, yalnızca 15 °C'de gelişmişlerdir. *L. brevis* türünün 45 °C'de gelişmediği bilinmektedir (Kandler and Weiss 1986). 38 ve 42 koloni nolu *L. brevis* 3 biyotipleri 15 °C ve 45 °C'de gelişme göstermişlerdir. Palop ve arkadaşları (2000) fermente bir sebze ürünü olan Almogro'dan izole ettikleri *L. brevis* 2 ve 3 biyotiplerinin 45 °C'de gelişebildiğini tespit etmişlerdir. *L. brevis* 3 olarak tanımlanan 12, 27, 28, 37 ve 50 nolu koloniler ise, bahsi geçen deneme sıcaklık derecelerinin hiçbirinde gelişmemişlerdir.

L. brevis türü gibi *L. buchneri* türü de 15 °C'de gelişemeyen bir Betabacterium grubu üyesidir (Carr *et al.* 2002). Çubuk turşu örneklerinden izole edilen ve tanımlanan *L. buchneri* türlerinden 13 ve 15 nolu koloniler 15 °C ve 45 °C'de gelişmiş, 19 ve 21 nolu koloniler ise yalnızca 15 °C'de gelişebilmişlerdir.

10 °C ve 40 °C sıcaklık derecelerinde gelişebilen *L. paracasei ssp. paracasei* (Carr *et al.* 2002) türünün 49 koloni nolu *L. paracasei ssp. paracasei* 1 biyotipi, deneme sıcaklık derecelerinin hiçbirinde gelişme göstermezken, 22 nolu koloni olan *L. paracasei ssp. paracasei* 3, 15 °C'de gelişme göstermiştir.

Palop ve arkadaşları (2000), 148 adet *Lactobacillus* cinsine ait izolattan 96 adedinin amonyak oluşturamayı arjinin (-) sonuç verdiğini bildirmişlerdir. API testine göre % 99.9 oranında *L. salivarius* olarak tanımlanan 1 nolu koloni, literatürden farklı olarak, arjinin hidroliz testinde pozitif sonuç vermiştir. *L. collinoides*, arjinini hidrolize edebilen bir bakteri iken, yapılan arjinin hidroliz testinde negatif sonuç vermiştir. *Lactobacillus del. ssp. lactis* türü geç oluşan bir reaksiyon gösterse de arjinini hidrolize edebilmektedir (Carr et al. 2002). *Lactobacillus del. ssp. lactis* 2 biyotipi ise arjinin (-) sonucunu vermiştir. *L. brevis* arjininden amonyak oluşturabilen bir bakteri türü iken (Carr et al. 2002), *L. brevis* 3 olarak tanımlanan 27, 28, 31, 37 ve 42 nolu koloniler arjinin hidroliz testinde negatif sonuç vermiştir.

Tüm bu ifadelerle ilişkin olarak, tür ve alt tür düzeyinde tanımlama yapan API testinin sonuçları ile, API testi öncesinde uygulanan klasik tanımlama testlerinin sonuçları arasında uyumsuzluklar olduğu görülmektedir. Bu durum, API testinin % orana bağlı olarak gerçekleştirdiği tanımlamanın doğruluğuna yönelik şüpheli bir yaklaşımı ortaya koymaktadır. Tanımlama amacıyla temel olarak gerçekleştirilen fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal analizlerin, laktik asit bakterilerinin sınıflandırma çalışmalarında yeterli sonuç sağlayamadığı anlaşılmaktadır. İleri derecede tanımlama ile taksonomik sınıflandırma gerçekleştirebilen ve kesin sonuçlar sağlayabilen analizlere ihtiyaç duyulmaktadır.

4.6 İzolatların Toplam Hücre Protein Profilleri

API testinin sonuçlarını destekleyen ve moleküler düzeyde bir fenotipik tanımlamayı sağlayan SDS-PAGE metodu, mikroorganizmaların protein profillerine göre bir sınıflandırma yaparak daha ileri düzeyde karakterize edilmesi açısından önem taşımaktadır. SDS-PAGE yönteminin, genel olarak, ürüne yönelik baskın mikroorganizma grubunun tanımlanmasına ilişkin yararlı bir yöntem olduğu belirtilmektedir.

Poliakrilamid jel elektroforez uygulamasını gerçekleştirme sürecinde 17, 20, 34, 45, 47 ve 51 koloni nolu izolatların yeterli gelişme gösteremeyerek proteinleri izole edilememiş ve görüntülenememiştir. 45, 47 ve 51 koloni nolu izolatlar, API test sonuçlarına göre *L. pentosaceus* olarak tanımlanmıştır. Bu süreçte izole edilen tüm *L. pentosaceus* üyeleri kaybedilmiştir. Sonuç olarak, 39 adet laktik asit bakterisinin fenotipik tanımlaması, karbohidrat fermantasyon ve makro protein profilleri belirlenmiştir.

Çalışmada gerçekleştirilen poliakrilamid jel elektroforez uygulaması ile laktik asit bakterilerinin protein yapıları ve bu proteinlere ait molekül ağırlıkları Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9'da görüntülenmiştir. Tanımlamaya tabi tutulan laktik asit bakterilerinde farklı ağırlıklara sahip 1-27 adet protein içeriği saptanmıştır. 5,40 kDa ile en düşük ağırlıkta proteine sahip *P. spp* ve 454,20 kDa ile en yüksek ağırlıkta proteine sahip *L. plantarum* 1 bakterileri belirlenmiştir. *L. paracasei* ssp. *paracasei* bakteri türleri çok düşük ağırlıklı protein aralıklarına sahip türler olarak belirlenmiştir. *L. collinoides* türü, SM0661 standart proteinine ağırlık olarak en yakın sonucu vermiştir.

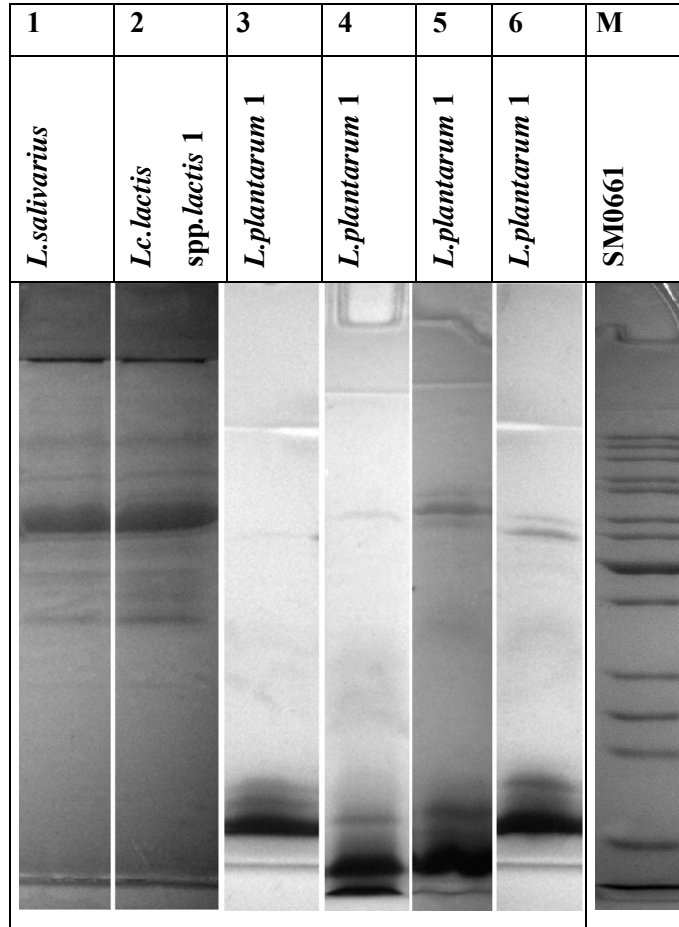
Şekil 4.6'da *L. salivarius* ve *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 türlerine ait bant görüntülerinin birbirlerinin aynı, 35,31 kDa ve 48,97 kDa ağırlığındaki proteinler dışında, protein ağırlıklarının farklı olduğu görülmektedir. Şekil 4.6'da tüm *L. plantarum* 1 türlerinin çok değişken aralıkta protein ağırlıklarına, yine aynı şekilde 4 ve 5 olarak numaralandırılan *L. plantarum* 1 bakterilerinin standart proteine göre oldukça düşük protein ağırlıklarına sahip olduğu görülmektedir.

L. acidophilus 1 türlerinden Şekil 4.7'de 5 olarak numaralandırılan bant, diğerlerine kıyasla düşük protein ağırlığı ve görüntüsündeki belirsizlik ile dikkat çekmektedir. 2, 6 ve 8 nolu bantların sahibi *L. acidophilus* 1 ile 9 nolu bantın sahibi *L. acidophilus* 3 biyotipleri arasında bazı protein ağırlıklarının aynı olduğu belirlenmiştir. 8 nolu bantın 60 ile 150 kDa ve 9 nolu bantın 15 ile 60 kDa ağırlığındaki proteinleri standart protein ile aynı ağırlıktaki bantlar olarak tespit edilmiştir. *L. acidophilus* 1 biyotipinden 1 ile 4 nolu bantlarda 3 adet aynı ağırlığa sahip proteinlerin (45,49 kDa; 35,96 kDa; 20,71 kDa) bulunduğu görülmektedir.

L. brevis 3 biyotipinden 5 nolu bant 10 ve 100 kDa, 6 nolu bant 40 kDa, 8 nolu bant 10 kDa ağırlığındaki proteinlerin standart protein ile aynı ağırlıkta olduğu belirlenmiştir. *L. brevis* 3 biyotipine ait 1 nolu bant ile *L. brevis* 2 biyotipine ait 11 nolu bant arasında 59,25 kDa ağırlığındaki proteinin benzer olduğu görülmektedir.

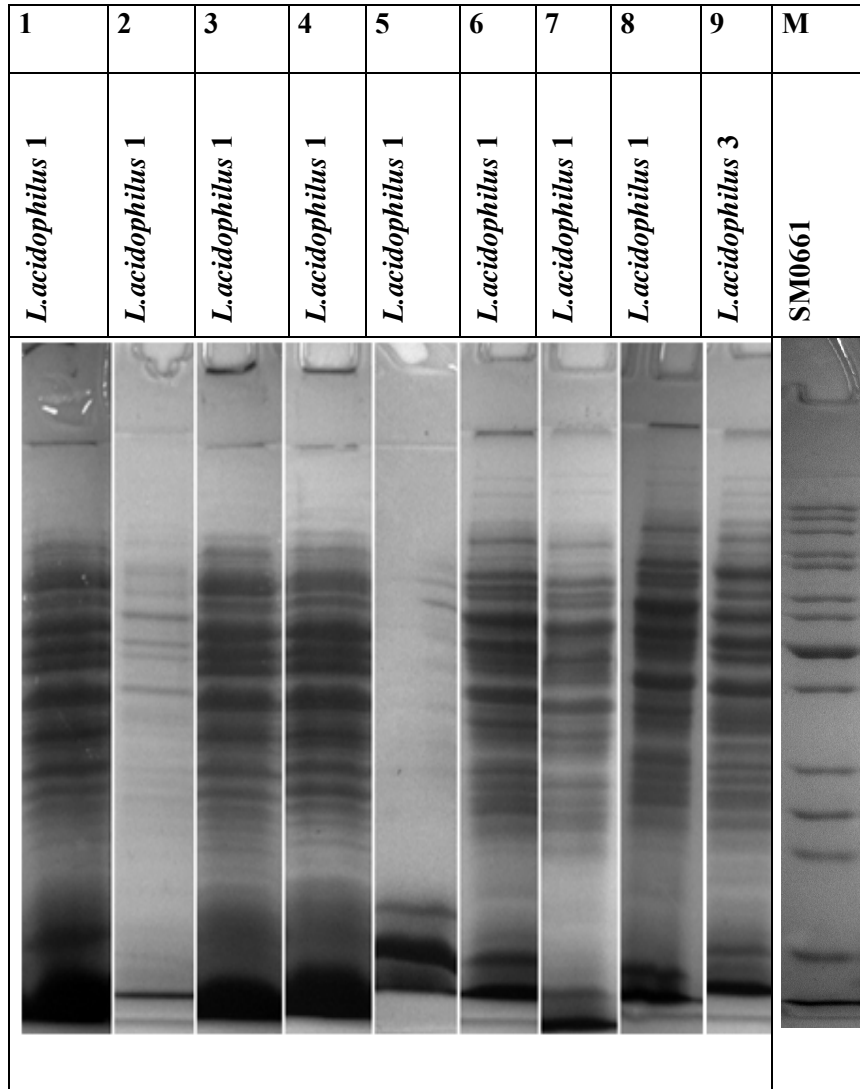
L. buchneri olduğu bilinen 14 nolu bantın 10 ile 85 kDa ve 15 nolu bantın 150 kDa ağırlığındaki proteinleri, standart protein ile ortak ağırlıkta olduğu saptanmıştır.

Pediococcus damnosus 2 biyotipinin 2 nolu bantındaki 70 kDa ağırlığındaki protein standart protein ile aynı ağırlıkta çıkmıştır. *Pediococcus* alttürüne ait 4 ve 5 nolu bantlardan 28,23 ve 32,38 kDa ağırlığındaki proteinler ortak çıkmıştır. 3 nolu bantın sahibi *P. damnosus* 2 biyotipi ile 4 nolu bantın sahibi *Pediococcus* spp. arasında ortak ağırlığa (24,91 kDa) sahip protein olduğu saptanmıştır.



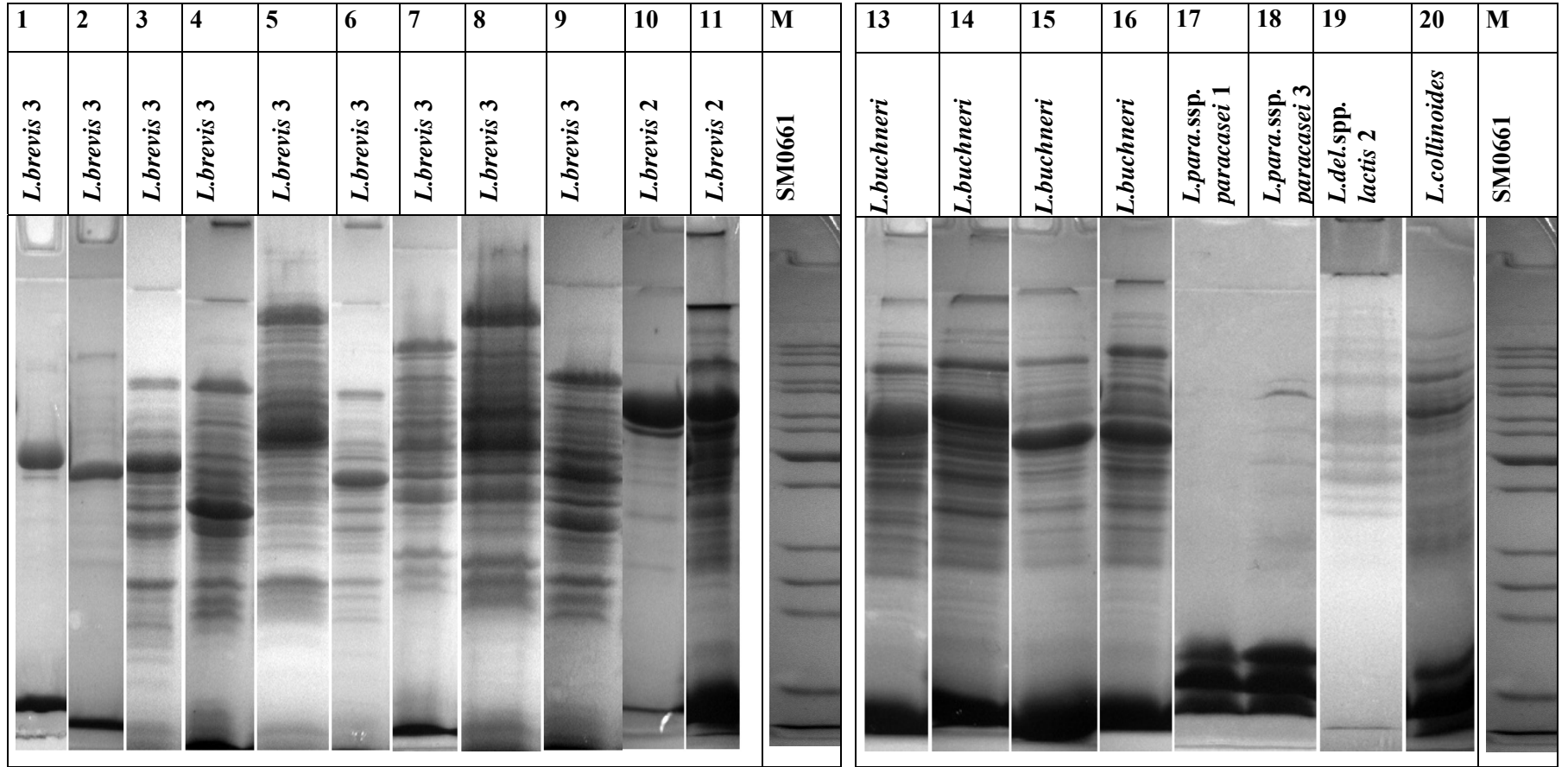
1	2	3	4	5	6	M
181,3	251,80	395,80	62,80	75,45	454,20	200
117,4	143,00	64,29	23,83	65,22	266,70	150
90,04	114,80	14,71	16,33	15,85	74,46	100
72,93	92,11	10,29	10,59	14,26	65,71	85
67,15	69,55		5,44	10,11	56,43	70
57,56	57,33				50,71	60
48,97	53,56				43,90	50
44,27	48,97				35,60	40
40,68	41,00				33,96	30
39,43	38,53				32,31	25
38,30	36,78				15,81	15
37,06	35,31				14,31	10
36,45	32,23				11,18	
35,31	30,38					
33,75	9,71					
32,61						
30,57						
10,15						

Şekil 4.6 Çeşitli laktik asit bakterilerine ait proteinlerin jel görüntüleri ve molekül ağırlıkları



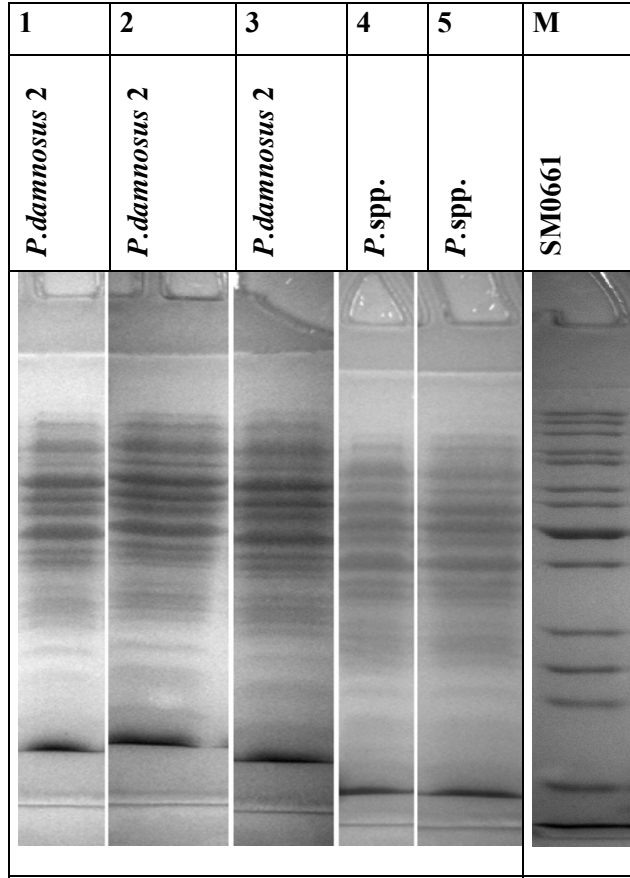
1	2	3	4	5	6	7	8	9	M
98,33	102,20	118,10	118,10	72,63	173,70	157,10	150,00	163,20	200
82,95	87,50	95,00	111,60	66,00	133,80	128,90	125,00	130,00	150
66,09	72,87	80,23	97,50	55,43	115,70	85,00	83,64	115,10	100
58,08	62,22	65,22	82,27	46,46	103,20	77,06	76,82	102,70	85
50,96	55,00	57,31	66,96	38,60	86,67	68,28	67,78	86,67	70
45,49	47,45	50,58	58,27	34,30	82,13	64,14	60,00	78,94	60
40,59	43,92	44,71	50,58	29,32	77,66	59,29	53,21	70,64	50
35,96	39,22	40,00	45,49	26,44	70,64	53,75	46,92	60,00	40
31,21	37,84	35,66	40,39	15,96	64,81	45,69	43,65	54,40	30
27,27	34,66	30,81	35,96	13,03	61,48	37,80	41,15	47,25	25
25,23	32,67	27,20	31,52	10,13	53,60	36,42	37,75	42,55	15
23,57	30,17	24,94	29,85		46,47	34,63	36,08	37,84	10
22,21	28,70	23,57	27,50		42,75	33,01	34,33	35,00	
20,71	27,61	22,14	25,08		40,20	29,61	32,83	33,28	
14,23	25,94	20,26	23,83		37,41	27,96	29,51	31,03	
8,69	24,27	19,01	22,47		35,52	26,58	27,99	29,06	
	21,64	14,62	20,71		33,79	25,39	26,11	27,68	
	18,09	8,77	19,37		32,93	23,17	23,59	26,30	
	14,49		14,92		28,84	14,44	21,09	25,29	
	11,28		9,00		27,10	8,61	18,54	22,82	
	7,43				24,91		17,18	20,27	
					22,00		14,14	18,56	
					19,89		10,43	15,00	
					17,91			11,67	
					15,86			8,59	
					13,21				
					7,82				

Şekil 4.7 *L. acidophilus* türlerine ait proteinlerin jel görüntüleri ve molekül ağırlıkları



Şekil 4.8 Çeşitli laktik asit bakterilerine ait proteinlerin jel görüntüleri ve molekül ağırlıkları

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	M	13	14	15	16	17	18	19	20	M
91,18	94,37	86,50	154,80	162,50	147,90	89,09	166,10	163,60	102,20	169,20	200	144,50	148,60	150,00	209,40	15,11	71,07	142,50	196,20	200
44,81	74,79	78,73	109,80	141,70	132,40	81,84	118,30	117,30	59,80	123,30	150	122,70	128,20	126,20	187,50	12,35	62,92	119,40	143,00	150
39,25	66,67	74,36	94,47	110,20	84,43	77,11	93,12	92,50	53,20	97,35	120	91,67	93,33	92,50	146,30	9,76	47,45	111,40	97,09	120
32,36	56,04	69,33	81,60	100,00	80,47	72,11	79,00	83,664	48,04	62,69	100	81,59	85,00	83,64	105,00		38,35	95,59	81,71	100
9,47	52,64	59,52	75,38	90,00	76,79	68,39	73,23	79,55	44,90	54,90	85	79,55	81,25	79,20	92,50		33,12	76,00	71,08	85
	49,07	57,26	70,57	82,69	69,66	59,85	67,69	73,27	41,18	48,16	70	75,80	77,84	75,80	84,66		25,76	59,05	57,11	70
	39,11	51,13	61,03	78,31	59,15	57,08	62,05	70,55	38,10	39,25	60	55,96	59,62	69,58	80,57		21,96	54,64	50,45	60
	33,50	48,03	55,42	75,08	56,78	53,54	56,19	61,67	32,93	36,33	50	48,82	53,65	62,50	73,07		14,94	50,36	47,33	50
	31,79	46,07	50,68	68,21	55,08	47,81	52,06	57,26	25,87	33,08	40	45,49	48,82	57,78	64,58		12,29	44,91	40,43	40
	29,37	43,93	45,57	63,59	48,03	45,00	45,18	54,35	9,23	30,42	30	42,55	45,10	49,88	57,78		9,65	39,85	38,82	30
	26,48	41,64	39,75	57,62	45,25	42,66	39,67	48,20		26,42	25	39,80	41,57	45,28	50,56			38,00	37,44	25
	8,78	39,52	36,61	53,97	43,93	39,85	36,82	44,43		21,88	20	37,37	38,89	42,26	45,85			37,11	36,45	20
		36,35	35,34	45,76	40,00	37,71	34,70	40,49		19,07	15	32,83	37,88	39,80	42,83			34,59	32,89	15
		34,01	34,07	42,59	37,03	36,64	33,25	38,17		16,50	10	31,21	34,75	38,37	39,59			32,74	16,90	10
		32,38	32,88	41,06	36,02	32,75	28,96	37,06		11,61		29,02	32,53	36,84	36,84			8,30	10,00	
		30,79	29,36	39,54	35,08	29,39	27,50	35,00				27,20	30,61	34,69	35,00					
		29,16	27,56	37,15	33,98	27,56	25,75	31,59				24,55	27,95	32,96	33,27					
		27,70	26,28	36,09	31,95	26,17	15,70	29,66				22,34	26,89	29,65	29,79					
		26,69	24,06	34,37	29,48	11,67	15,12	27,64				20,32	25,15	28,19	28,06					
		25,51	17,12	33,58	27,97		10,00	26,18				19,41	23,57	25,49	25,56					
		21,76	16,46	32,32	26,45			15,56				17,07	21,36	21,04	23,68					
		19,58	11,36	30,66	25,64			13,75				9,00	19,82	19,03	22,36					
		17,87		27,69	20,19								19,10	17,08	21,18					
		13,75		26,89	16,90								17,16	10,30	19,91					
		8,75		25,71	15,91								10,00		19,07					
				13,22											17,17					
				10,00											11,01					



1	2	3	4	5	M
98,00	103,40	106,20	97,35	97,35	200
89,00	87,00	86,00	83,60	82,56	150
71,62	74,86	75,68	70,35	68,40	120
60,80	70,00	73,24	59,80	58,16	100
53,17	60,80	68,80	53,06	52,04	85
46,73	55,12	58,54	46,67	46,27	70
42,86	48,16	51,71	42,16	41,37	60
37,88	44,49	45,31	37,62	37,24	50
34,65	38,59	40,82	34,29	34,19	40
32,63	35,45	36,46	32,38	32,38	30
28,13	33,94	33,84	31,05	31,14	25
26,88	32,32	31,92	28,23	28,23	20
24,83	29,27	30,40	26,46	23,16	15
19,50	26,88	26,77	24,91	19,44	10
16,97	25,21	24,91	23,16	14,61	
8,08	23,79	23,28	19,55	8,95	
	19,68	21,72	17,87		
	17,61	18,76	15,78		
	14,36	16,42	9,47		
	9,36	11,38	5,40		
		6,28			

Şekil 4.9 *Pediococcus* türlerine ait proteinlerin jel görüntüleri ve molekül ağırlıkları

5. SONUÇ

Çalışma sonuçları maddeler halinde aşağıdaki gibi ifade edilmiştir:

1. Ankara Çubuk yöresinde bulunan 7 farklı işletmeden alınan 15 adet turşu örneğinin salamuralarında pH, laktik asit cinsinden toplam asitlik ve tuz tayinleri gerçekleştirilmiş; pH değerleri 3,16-4,74; toplam asitlik değerleri 0,04-1,31 g/100mL; tuz değerleri ise 3,46-5,89 g/100mL arasında belirlenmiştir.
2. Turşu salamuralarından MRS ve M17 besiyerlerinde ayrı ayrı gerçekleştirilen izolasyon işlemi sonucu başlangıçta 174 adet izolat elde edilmiştir.
3. İzolatların koloni morfolojileri boyut, şekil, renk, opaklık ve profil görünümleri yönünden incelenmiş, çoğunluğunun dairesel şekilli, küçük boyutlu, beyaz renkli, konveks görünümlü ve mat olduğuna ilişkin değerlendirme yapılmıştır. İzolatların hücre morfolojileri ise kok ve basil olmalarına göre incelenerek 30 adedinin çubuk, 21 adedinin kok şekilli olduğu tespit edilmiştir.
4. İzolatlar Gram boyama, katalaz ve oksidaz testlerine tabi tutulmuştur. Testler sonucunda Gram (+), katalaz (-) ve oksidaz (-) özellik gösteren 51 adet laktik asit bakterisi tanımlanmıştır.
5. Laktik asit bakterilerinin glikozdan gaz oluşturma, arjinin hidroliz ve farklı sıcaklık derecelerinde gelişebilme yetenekleri incelenmiştir. Glikozdan gaz oluşturabilmesine göre 19 adet heterofermantatif ve 32 adet homofermantatif izolat belirlenmiştir. İzolatların amonyak oluşturabilmesine bağlı olarak arjinin hidroliz testinden 14 adet pozitif sonuç elde edilmiştir. Deneme sıcaklıklarından 10 °C'de hiçbir izolat gelişmezken, 15 °C'de 34 adet, 45 °C'de 8 adet gelişebilen izolat tespit edilmiştir.
6. Turşu örneklerinden izole edilen toplam 51 adet laktik asit bakterisinden 45 adedine API testi uygulanabilmiştir. Bunlardan 38 adedinin *Lactobacillus* cinsine ait olduğu, 45

bakteri arasında baskın cinsi oluşturduğu görülmüştür. *L. brevis*, *L. acidophilus* ve *L. plantarum* ise turşu örneklerinde baskın türler olarak belirlenmiştir. API testinin % tanımlama sonuçları ile izolatların *L. buchneri*, *L. salivarius*, *L. collinoides* ve *Pediococcus* spp. türleri; *L. plantarum* 1, *L. acidophilus* 1 ve 3, *L. brevis* 2 ve 3, *L. paracasei* spp. *paracasei* 1 ve 3, *L. del. spp. lactis* 2, *Lc. lactis* spp. *lactis* 1 ve *Pediococcus damnosus* 2 biyotipleri şeklinde tür ve alttür ayrımları gerçekleştirilmiştir.

7. SDS-PAGE ile 39 adet bakterinin toplam protein profilleri incelenerek protein ağırlıkları hesaplanmıştır. Toplamda 1-27 adet protein içeriği saptanmış, 5,40 kDa ile 454,20 kDa arasında protein ağırlıklarına sahip oldukları belirlenmiştir.

8. Bu bakteriler üzerinde devam eden çalışmalarda diğer moleküler tanımlama yöntemleri sürdürülecek, bakterilerin teknolojik özellikleri de belirlenerek, starter olabilme potansiyeli değerlendirilecektir.

KAYNAKLAR

- Adams, M. R. and Nicolaides, L. 1997. Review of the sensitivity of different food-borne pathogens to fermentation. *Food Control*, 8, 227-239.
- Aktan, N., Yücel, U. ve Kalkan, H. 1998. *Turşu Teknolojisi*. Ege Üni. Ege Meslek Yüksek Okulu Yayınları, 23, 138 s., İzmir.
- Aktan, N. ve Kalkan, H. 2000. *Şarap Teknolojisi, Kavaklıdere*. Eğitim Yayınları, 4, 614 s., Ankara.
- Albury, M. N. and Pederson, C. S. 1956. Variation in bacterial flora of low salt cucumber brines. *Applied Microbiology*, 4, 259-263.
- Andrews, F. W. and Horder, T. J. 1906. A study of the streptococci for man. *Lancet*, 2, 708.
- Anonim. 1993. *Hıyar Turşusu*. TS 11112, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- Anonim. 2001. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina.
- Anonim. 2005. *Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*. Ed: A. K. Halkman, Başak Matbaacılık Ltd. Şti., 358 s., Ankara.
- Axelsson, L. 2004. *Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology, Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*. Salminen, S., Wrigth, A. and Ouwehand, A., 3th Ed., Marcel Dekker Inc., USA., pp. 1-66.
- Aydın, M. 2004. Bakteri identifikasyonunda kullanılan standart biyokimyasal ve fizyolojik testler. Ed: Cengiz, Mısırlıgil, Aydın., *Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji*, 11, 91-110. Güneş Yayınevi, Ankara.
- Balcázar, J. L., Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Cunningham, D., Vendrell, D. and Múzquiz, J. L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114, 173-186.
- Beukes, E. M., Bester, B. H. and Mostert, F. 2001. The microbiology of South African traditional fermented milks. *International Journal of Food Microbiology*, 63, pp. 189-197.
- Board, R. G., Jones, D. and Jarvis, B. 1995. *Microbial Fermentation: Beverages, Foods and Feeds*. *Journal of Applied Bacteriology*, 79, pp. 505.
- Borgstorm, G. 1986. *Principals of food science, Vol 2. Food Microbiology and Biochemistry*. New York, Macmillian, pp. 625.

- Botina, S.G., Tsygankov, Yu. D. and Sukhodolets, V. V. 2006. Identification of industrial strains of lactic acid bacteria by methods of molecular genetic typing, *Russian Journal of Genetics R.*, 1367-1379.
- Breidt, F. Jr., McFeeters, R. F. and Diaz-Muñiz, I. 2007. *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, 783-793, 3rd Ed. ASM Press, Washington D.C.
- Campbell-Platt, G. 1987. *Fermented Foods of the World: a Dictionary and Guide*. Butterworths, London, pp. 290.
- Carr, F.J., Chill, D. and Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28, 281-370.
- Daeschel, M. A. and Fleming, H.P. 1984. Selection of lactic acid bacteria for use in vegetable fermentations. Academic Press Inc. Limited, London, pp. 303-313.
- Daeschel, M. A. and Fleming, H.P. 1987. Achieving pure culture cucumber fermentations. Review, A. *Development in Industrial Microbiology* Pierce. G.E. Society for Industrial Microbiology Arlington, V.A., 28, 141-148.
- Daeschel, M. A., Anderson, R. E. and Fleming, H.P. 1987. Microbial ecology of fermenting plant materials. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46, 357-367.
- Demirtaşoğlu, Z. 1998. Kontrollü koşullarda turşu üretimi ve Türkiye gerçeği. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Etchells, J. L., Costilow, R. N., Anderson, T. E. and Bell, T. A. 1964. Pure culture fermentation of brined cucumbers. *Applied Microbiology*, 12 (6); 523-535.
- Etchells, J. L., Bell, T. A., Fleming, H. P., Kelling, R. E. and Thompson, R. L. 1973. Suggested procedure of the controlled fermentation of commercially brined pickling cucumbers-The use of starter cultures and reduction of carbon dioxide accumulation. *Pickle Pak Science*, 3, 4-14.
- Etchells, J. L., Fleming, H. P. and Bell, T. A. 1975. Factor influencing the growth of lactic acid bacteria during brine fermentation of cucumbers. In: J.G. Carr, C.V. Cutting and G.C. Whiting Ed., *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*, Academic Press, 281-305, New York.
- Evren, İ. ve Şahin, İ. 1993. Turşudan laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve bunlardan starter kültür üretiminin araştırılması. *Doğa*, 17, 881-890.
- Fitzgerald, G. F. and Caplice, E. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 131-149.
- Fleming, H. P., Andersson, R. E. and Daeschel, M. A. 1987. Microbial ecology of fermenting plant materials. *FEMS Microbiology Reviews*, 46, 357-367.

- Fleming, H. P., McFeeters, R. F. and Daeschel, M. A. 1992. Fermented and Acidified Vegetables. In: C. Vanderzant and D. F. Splittstoesser. Ed. Compendium of methods for the microbiological examination of foods (3rd Ed.), American Public Health Association, 929-952, Washington D. C.
- Gobbetti, M., Angelis, M., Corsetti, A. and Cagno, R. 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. Trends in Food Science and Technology, 16, 57-69.
- Halasz, A., Barath, A. and Holzapfel, W. H. 1999. The influence of starter culture selection on sauerkraut fermentation. Z. Lebensm Unter Frosch. A., 208, 434-438.
- Hébert, E. M., Raya, R. R. and Giori, G. S. 2000. Use of SDS-Page of cell wall proteins for rapid differentiation of *L. delbrueckii* subsp. *lactis* and *L. helveticus*. Biotechnology Letters, 22, 1003-1006.
- Higashikawa, F., Noda, M., Awaya, T., Nomura, K., Oku, H. and Sugiyama, M. 2009. Improvement of constipation and liver function by plant-derived lactic acid bacteria: A double-blind, randomized trial. Nutrition, 1-8.
- Holzapfel, W. H. and Stiles, M. E. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology, 36, 1-29.
- Hucker, G. J. and Pederson, C. S. 1930. Studies on the coccaceae. The genus *Leuconostoc*. N. Y. State Agr. Expt. Sta., Tech. Bull., 167; 1-80 pp.
- Hucker, G. J. and Pederson, C. S. 1957. Genus IV *Leuconostoc*, in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Breed, R. S., Murray, E. G. D. and Smith, N. R., 7th Ed., Williams and Wilkins Co. Baltimore, Maryland, pp. 531-533.
- Hutkins, R. W. 2006. Microbiology and Technology of Fermented Foods. Blackwell Publishing, 473, Oxford, UK.
- İç, E. 2000. Hıyar turşusu salamurasında kalsiyum klorür kullanarak tuz konsantrasyonunun azaltılma olanağı üzerine araştırma. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi 117s., Ankara.
- Jay, M. J. 2005. Modern Food Microbiology, 7th Ed. Springer Science+Business Media, Inc. Publisher, 715, N. Y. USA.
- Kandler, O. and Weiss, N. 1986. Regular, nonsporing Gram positive rods. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. C. (Eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, pp. 1208-1234.
- Karapınar, M. ve Hancıoğlu, Ö. 1997. Microflora of Boza, a traditional fermented Turkish beverage. International Journal of Microbiology, 35, 271-274.

- Karasu, N. 2006. Turşu ve zeytinden antagonistik ve probiyotik özellikte laktik starter kültür eldesi. Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 88s., Denizli.
- Kıran, F. 2006. Hücre duvarı protein profilleri ve plazmid içeriklerine göre laktik asit bakterilerinin moleküler tanısı. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 130s., Ankara.
- Kim, J., Chun, J. and Han, H. U. 2000. *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from kimchii. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, 1915-1919.
- Kitchell, A. G. and Shaw, B. G. 1975. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their protein patterns. Journal of General Microbiology, 87, 333-342.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. and Reuter, G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. Internatinol Journal of Food Microbiology, 41, 103-125.
- Konings, W. N., Kok, J., Kuipers, O. P. and Poolman, B. 2000. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millenium. Current Opinion in Microbiology, 3, 276-282.
- Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C. and Kilk, A. 2002. Two antioxidative Lactobacilli strains as promising probiotics. International Journal of Food Microbiology, 72, 215-224.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, pp. 680-685.
- Lages, F., Silva-Graça, M. and Lucas, C. 1999. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. Society of General Microbiology 145, pp. 2577-2585.
- López-Díaz, T. M., Alonso, C., Román, C., Garcia-López, M. L. and Moreno, B. 2000. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. Food Microbiology 17, pp. 23-32.
- Luckow, T. and Delahunty, C. 2004. Consumer acceptance of orange juice containing functional ingredients. Food Research International, 37, 805-814.
- Mäki, M. 2004. Lactic Acid Bacteria in Vegetable Fermentation, Lactic Acid Bacteria Microbiological and Fuctional Aspects. Salminen, S., Wrihth, A. and Ouwehand, A., 3th Ed., Marcel Dekker Inc., USA., pp. 419-430.
- Man, J. D., Rogasa, M. and Sharpe, M. E. 1960. A medium for the cultivation of Lactobacilli. Journal of Applied Bacteriology 23, pp. 130-135.
- Mavhungu, J. 2005. Isolation and identification of lactic acid bacteria from 'Ting' in the Nothern Province of South Africa. Department of Microbiology and Plant Pathology. University of Pretoria, 74 p., South Africa.

- Montville, T. J., Lewus, C. B. and Kaiser, A. 1991. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 6, 1683- 1688.
- Muñoz, R., Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., Rivas, B., Felipe, F. L., Gómez-Cordovés, C. and Mancheño, J. M. 2009. Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 132, 79-90.
- Narvhus, J. A., Muyanja, C. M. B. K., Treimo, J. and Langsrud, T. 2003. Isolation characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. *International Journal of Food Microbiology* 80, pp. 201-210.
- Nout, M. J. R. and Rombouts, F. M. 1992. Fermentative preservation of plant foods. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 73, 13-147.
- Nahaisi, D. M. H. 1986. *L. acidophilus*: Therapeutic properties product and enumeration; in developments in food microbiology, Ed. R. K. Robinson. Elsevier App. Sc. Pub., 153-178, London.
- Orla-Jensen, S. 1919. The Lactic Acid Bacteria. Dairy Bacteriology, Host and Son, Copenhagen, 118 pp.
- Özçelik, F. ve İç, E. 1996. Hıyar turşusu üretiminde kontrollü fermantasyon. *Gıda*, 21 (1); 49-53.
- Palop, L., Sánchez, I. and Ballestenos, C. 1999. Influence of sodium chloride concentration on the controlled lactic acid fermentation of 'Almagro' eggplants. *International Journal of Food Microbiology*, 53, 13-20.
- Palop, L., Sánchez, I. and Ballestenos, C. 2000. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of 'Almagro' eggplants. *International Journal of Food Microbiology*, 59, 9-17.
- Palop, L., Sánchez, I. and Seseña, S. 2003. Identification of lactic acid bacteria from spontaneous fermentation of 'Almagro' eggplants by SDS-Page whole cell protein fingerprinting. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 181-189.
- Pederson, C. S. 1949. The Genus *Pediococcus*. *Bacteriology Reviews*, 13, 225-232.
- Pederson, C. S. and Albury, M. N. 1950. Effect of temperature upon bacteriological and chemical changes in fermenting cucumbers. *N. Y. Agr. Expt. Sta. Bull.*, 744.
- Pot, B., Hertel, C., Ludwig, Descheemaeker, P., Kersters, K. and Schleifer, K. H. 1993. Identification and classification of *L. acidophilus*, *L. gasseri* and *L. johnsoni*: strains by SDS-Page and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. *Journal of General Microbiology*, 139, 513-517.

- Radler, F. 1975. The metabolism of organic acids by lactic acid bacteria. In: J.G. Carr, C.V. Cutting and G.C. Whiting Ed., *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*, Academic Press, 17-27. London.
- Randazzo, L. R., Restuccia, C., Romaro, D. A. and Caggia, C. 2004. *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 9-14.
- Rolfe, R. D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The Journal of Nutrition*, 130, 396-402.
- Ruas-Madiedo, P. and Reyes-Gavilán, C. G. 2005. Invited Review: Methods for the screening, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *American Dairy Science Association*, 88, 843-856.
- Saginur, R., Clecner, B., Portnoy, J. and Mendelson, J. 1982. Superoxol (Catalase) test for identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology* Mar., pp. 475-477.
- Sakamoto, K. and Konings, W. N. 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*, 89, 105-124.
- Schillinger, U., Tamang, J. P., Tamang, B., Franz, C. M. A. P., Gores, M. and Holzaphel, W. H. 2005. Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 347-356.
- Sharpe, M. E. 1979. Lactic acid bacteria in the dairy industry. *Journal Society of Dairy Technology*, 32, pp. 9-17.
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. 1986. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams and Wilkins Co. Baltimore, pp. 1075-1079.
- Steinkraus, K. H. 1983. Lactic acid fermentation in the production of foods from vegetables, cereals and legumes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49, 337-348.
- Steinkraus, K. H. 1995. *Handbook of Indigenous Fermented Foods*, Ed. Marcel Dekker, 76, New York.
- Steinkraus, K. H. 1997. Classification of fermented foods: World-wide review of household fermentation techniques. *Food Control*, 8, 311-317.
- Stiles, M. E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70, 331-345.
- Teuber, M. 1995. The genus *Lactococcus* in the lactic acid bacteria, the genera of lactic acid bacteria. *Blackie Academics and Professionals*, 2, 173-235.

- Titsler, R. P. Pederson, C. S., Snell, E. E., Hendlin, D. and Niven, C. F. 1952. Symposium on the lactic acid bacteria. *Bacteriological Reviews*, 16 (4); 227-259.
- Turgut, Z. 2006. Starter kültür kullanarak üretilen hıyar turşularında biyojen amin oluşumu üzerine araştırma. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Vuysta, L. and Degeest, B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 153-177.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., Vos, P., Kersters, K. and Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 6, 407-438.
- Yüksekdağ, Z. N. ve Beyatlı, Y. 2009. Bazı laktik asit bakterilerinin fizyolojik, biyokimyasal, plazmit DNA ve protein profil özelliklerinin incelenmesi. *GIDA* 34 (2); 91-98.
- Zotta, T., Piraino, P., Parente, E., Salzano, G. and Ricciardi, A. 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from sourdough for Corretto, a traditional bread produced in Basilicata (Southern Italy). *World Journal Microbiology Biotechnology*, 24, 1785-1795.

EKLER

EK 1 ÇALIŞMADA KULLANILAN BESİYERİ, TAMPON, KİMYASAL VE ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANIŞI

EK 1,1 BAKTERİLERİN İZOLASYONUNDA VE GELİŞİMİNDE KULLANILAN BESİYERLERİ

MRS agar besiyeri

68,2 g MRS agar besiyeri tartılır ve damıtık suda çözündürülerek 1 L'ye tamamlanır.

MRS broth besiyeri

52,2 g MRS broth besiyeri tartılır ve damıtık suda çözündürülerek 1 L'ye tamamlanır.

M17 agar

55 g M17 agar besiyeri tartılır ve damıtık suda çözündürülerek 1 L'ye tamamlanır.

M17 broth besiyeri

42,5 g M17 broth besiyeri tartılır ve damıtık suda çözündürülerek 1 L'ye tamamlanır.

ORNİTİN DEKARBOKSİLİZ broth besiyeri

9 g Ornitin/Dekarboksilaz broth besiyeri tartılır ve damıtık suda çözündürülerek 1 L'ye tamamlanır.

L- ARJİNİN MONOHİDROKLORİD broth besiyeri

50 g L- arjinin monohidroklorid broth besiyeri tartılır ve damıtık suda çözümlenerek 1 L'ye tamamlanır.

EK 1.2 ÇALIŞMADA KULLANILAN TAMPON, ÇÖZELTİ VE KİMYASALLAR

% 1'lik Fenolftalein Çözeltisi

1 g fenolftalein % 95'lik etil alkol ile çözümlenerek 100 mL'ye tamamlanır.

0,1 N NaOH Çözeltisi

4 g sodyum hidroksit damıtık su ile çözümlenerek 1 L'ye tamamlanır.

% 5'lik Potasyum dikromat (K_2CrO_4) Çözeltisi

5 g potasyum dikromat damıtık su ile çözümlenerek 100 mL'ye tamamlanır.

0,1 N $AgNO_3$ Çözeltisi

16,9 g gümüş nitrat damıtık su ile çözümlenerek 1 L'ye tamamlanır.

% 0.085'lik (w/v) FTS

8,5 g sodyum klorür (NaCl) damıtık su ile çözümlenerek 1 L'ye tamamlanır.

Lizozim Enzim Çözeltisi

Lizozim enzimi	100 mg
0,5 M EDTA	200 µL
0,5 M Tris HCL (pH 6,8)	200 µL
Damıtık su	5 mL

Tüm bileşenler karıştırılır ve çözelti +4 °C'de muhafaza edilir.

Örnek Tamponu 10X

0,5 M Tris HCL (pH 6,8)	1 mL
Gliserol	0,8 mL
% 10'lük (w/v) SDS	0,8 mL
2-β-merkaptoetanol	0,8 mL
% 0.05'lik (w/v) Bromfenol Blue	0,4 mL
Damıtık su	3,8 mL

Tüm bileşenler karıştırılır ve çözelti +4 °C'de muhafaza edilir.

% 0.05'lik (w/v) Bromfenol Blue Çözeltisi:

0,05 g bromfenol blue damıtık su ile çözündürülerek 100 mL'ye tamamlanır.

Jel Kimyasalları

0,5 M Tris HCL (pH 6,8):

6 g tris base öncelikle 50 mL damıtık su ile çözündürülür. 3 N HCl ile pH 6,8 değerine ayarlanır. Çözelti damıtık su ile 100 mL'ye tamamlanır ve +4 °C'de muhafaza edilir.

1.5 M Tris HCL (pH 8,8):

18,15 g tris base öncelikle 50 mL damıtık su ile çözündürülür. 3 N HCl ile pH 8,8 değerine ayarlanır. Çözelti damıtık su ile 100 mL'ye tamamlanır ve +4 °C'de muhafaza edilir.

Akrilamid/Bis (% 30 T, 2.67 C):

Akrilamid	29,2 g
N-N-Bis-met-akrilamid	0,8 g
Damıtık su	100 mL

Tüm bileşenler karıştırılarak filtre edilir. Çözelti şişesinin etrafı folyo ile kaplanır ve şişe +4 °C'de muhafaza edilir.

%10'luk (w/v) SDS:

10 g SDS damıtık su ile çözündürülerek 100 mL'ye tamamlanır.

%10'luk (w/v) Amonyun Per Sülfat (APS):

100 mg APS damıtık su ile çözündürülerek 1 mL'ye tamamlanır. Çözelti kullanılacağı an hazırlanır ve 1 kez kullanılır.

Ayrırma Jeli (% 12)

35 ml için:

1.5 M Tris HCL (pH 8,8)	8,75 mL
% 10'luk (w/v) SDS	0,35 mL
% 30'luk Akrilamid/Bis	4 mL
% 10'luk APS	175 µL
Temed	17,5 µL
Damıtık su	11,73 mL

APS ve temed jel kullanılacağı an eklenir. Tüm bileşenler karıştırılır ve donma riskine karşı hızla cam plakalara dökülür.

Yığıma Jeli (% 4)

10 mL için:

1.5 M Tris HCL (pH 6,8)	2,5 mL
% 10'luk (w/v) SDS	100 mL
% 30'luk Akrilamid/Bis	1,3 mL
% 10'luk APS	50 µL
Temed	10 µL
Damıtık su	6,1 mL

APS ve temed jel kullanılacağı an eklenir. Tüm bileşenler karıştırılır ve donma riskine karşı hızla cam plakalara dökülür.

Elektrot Tamponu 5X (pH 8,3)

Tris	37,5 g
Glisin	180 g
SDS	12,5 g
Damıtık su	2,5 L

Tampon kullanım anına kadar +4 °C'de muhafaza edilir. Kullanılmadan önce 1:4 oranında seyreltilir.

Boyama Cözeltisi

Asetik asit	100 mL
% 95'lik Etil alkol	400 mL
Commasie Brilliant Blue G 250	1 g
Damıtık su	500 mL

Boya Uzaklaştırma Cözeltisi

Asetik asit	100 mL
% 95'lik Etil alkol	400 mL
Damıtık su	500 mL

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Derya DURSUN

Doğum Yeri : Turhal

Doğum Tarihi : 1984

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu:

Lise : Çarşamba Süper Lisesi (1997-2001)

Lisans : Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği
Bölümü (2002-2006)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği
Anabilim Dalı (Eylül 2007-Temmuz 2010)

Yayınları:

- ✓ **Dursun D.**, Yakar N, Çakır İ, Çakmakçı ML. Mikrobiyel selüloz üretimi ve gıda sanayinde kullanımı (poster sunumu). Türkiye 9. Gıda Kongresi, s. 981-984, 24-26 Mayıs 2006, Bolu.
- ✓ Tokatlı M, **Dursun D.**, Bağder S, Şanlıbaba P, Özçelik F, Identification of lactic acid bacteria isolated from pickles in Ankara Çubuk region (poster sunumu). Biotech METU 2009 International Symposium on Biotechnology: Developments and Trends, s. 141, 27-30 Eylül 2009, Ankara.