

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BOZA KAYNAKLI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN LAKTİK ASİT
MİKTARLARININ VE *Staphylococcus aureus* ÜZERİNE ANTİMİKROBİYAL
ETKİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gözde GÜLSEREN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

OCAK 2012

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BOZA KAYNAKLI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN LAKTİK ASİT
MİKTARLARININ VE *Staphylococcus aureus* ÜZERİNE ANTİMİKROBİYAL
ETKİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Gözde GÜLSEREN
506091524**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Z. Dilek Heperkan

OCAK 2012

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506091524 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Gözde GÜLSEREN** ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**BOZA KAYNAKLI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN LAKTİK ASİT MİKTARLARININ VE *Staphylococcus aureus* ÜZERİNE ANTİMİKROBİYAL ETKİNİN BELİRLENMESİ**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Z. Dilek HEPERKAN**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Gülden OMURTAG**
Marmara Üniversitesi

Yrd.Doç. Dr. Funda Karbancıoğlu GÜLER
İstanbul Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : **19 Aralık 2011**
Savunma Tarihi : **23 Ocak 2012**

ÖNSÖZ

Yapmış olduğum tez çalışmam süresi boyunca bana destek ve yardımlarını esirgemeyen, çalışmama fikirleri ile yön veren değerli hocam sayın Prof. Dr. Z. Dilek Heperkan'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, çalışmam boyunca yardımlarını benden esirgemeyen teknisyen sevgili Levent Dinçer'e ve Sincer Dış Ticaret A.Ş kuruluşundan sayın Zeynep Özdemir Kepenek'e teşekkür ederim.

Benden maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, attığım her adımda ve aldığım her kararda yanımda olan, başta çok sevgili aileme ve sevgili arkadaşım Ahu Üner'e ve Rıdvan Doğru'ya en içten teşekkürlerimi ve sevgilerimi iletirim.

Ocak 2012

Gözde GÜLSEREN
(Gıda Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xvi
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Boza.....	3
2.2 Laktik Asit Bakterileri.....	3
2.2.1 Homolaktik fermantasyon	8
2.2.2 Heterolaktik fermantasyon	9
2.2.3 Laktik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri	10
2.2.4 <i>Lactobacillus</i> grubu bakteriler	12
2.2.4.1 <i>Lactobacillus brevis</i>	14
2.2.4.2 <i>Lactobacillus fermentum</i>	14
2.2.4.3 <i>Lactobacillus plantarum</i>	14
2.2.4.4 <i>Lactobacillus casei</i>	15
2.2.4.5 <i>Lactobacillus casei subsp. paracasei</i>	15
2.2.4.6 <i>Lactobacillus salivarius</i>	16
2.2.5 <i>Lactococcus</i> grubu bakteriler	16
2.2.5.1 <i>Lactococcus lactis</i>	16
2.2.5.2 <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	17
2.2.5.3 <i>Lactococcus raffinolactis</i>	17
2.2.6 <i>Leuconostoc</i> grubu bakteriler	17
2.2.6.1 <i>Leuconostoc lactis</i>	18
2.2.6.2 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	18
2.2.6.3 <i>Leuconostoc citreum</i>	19
2.3 Laktik Asit Bakterilerinin İnhibasyon Mekanizması	19
2.3.1 pH etkisi	19
2.3.2 Su aktivitesi etkisi	20
2.3.3 Diğer etkiler	21
2.4 Laktik Asit Bakterilerinin Üretmiş Olduğu Antimikrobiyal Maddeler.....	21
2.4.1 Organik asitler	22
2.4.1.1 Laktik asit.....	23
2.4.1.2 Laktik asit molekül özellikleri	25
2.4.1.3 Laktik asit üretimini etkileyen faktörler.....	27
2.4.1.4 Laktik asit'in diğer organik asitlerle karşılaştırılması.....	27
2.4.2 Hidrojen peroksit.....	28
2.4.3 Karbondioksit.....	29
2.4.4 Diasetil	30

2.4.5 Düşük molekül ağırlıklı antimikrobiyal maddeler	30
2.4.5.1 Reuterin	31
2.4.5.2 Reuterisiklin	32
2.4.5.3 Piroglutamik asit	32
2.4.5.4 Bakteriyosinler	33
2.5 Laktik Asit Bakterilerinin Gıda Patojenleri Üzerine Etkileri	35
2.5.1 Laktik asit bakterilerinin ürettiği laktik asit süpernatantının <i>Stafilococcus aureus</i> üzerindeki inhibisyon etkisi.....	39
3. MATERİYAL VE METOT	45
3.1 Materyal.....	45
3.1.1 Laktik asitin L(+) ve D(-) cins ve miktarlarının belirlenmesinde kullanılan materyaller	45
3.1.2 Laktik asit bakterilerinden elde edilen laktik asit süpernatantının <i>Stafilococcus aureus</i> üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan materyaller.....	46
3.2 Metot.....	46
3.2.1 Laktik asit bakterilerinden laktik asit süpernatant eldesi	46
3.2.2 Laktik asit L(+) ve D(-) izomerlerinin belirlenmesi.....	47
3.2.3 Laktik asit süpernatant'ının <i>Staphylococcus aureus</i> üzerine olan etkisi...	50
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	53
4.1 <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> ve <i>Leuconostoc</i> Türlerinin Üretmiş Olduğu Laktik Asitin D (-) ve L(-) İzomerlerinin Cins ve Miktarları	53
4.2 <i>Lactobacillus</i> Türünün Ürettiği Laktik Asit Süpernatantının <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> Üzerindeki İnhibisyon Etkisi.....	54
4.3 <i>Lactococcus</i> Türünün Ürettiği Laktik Asit Süpernatantının <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> Üzerindeki İnhibisyon Etkisi.....	65
4.4 <i>Leuconostoc</i> Türünün Ürettiği Laktik Asit Süpernatantının <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> Üzerindeki İnhibisyon Etkisi.....	73
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	81
KAYNAKLAR.....	83
ÖZGEÇMİŞ	87

KISALTMALAR

ATP	: Adenozin Trifosfat
AOAC	: Association of Official Analytical Chemists
aw	: Su Aktivitesi
CO₂	: Karbondioksit
EDTA	: Etilendiamintetraaeterik
GAD	: Gultamat Dekorbiksilaz
GAP	: Gliseraldehit Fosfat
HPLC	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromotografisi
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
MH	: Mueller Hinton
NSLAB	: Starter Olmayan Laktik Asit Bakterileri
PCA	: Piroglutamik Asit
PEP	: Fosfoenolprivat
PTS	: Fosfotransferaz sistem
WHO	: Dünya sağlık rgt

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1 : <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> ve <i>Leuconostoc</i> suşları.....	45
Çizelge 3.2 : <i>Staphylococcus aureus</i> inaktivasyonunda kullanılan <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> ve <i>Leuconostoc</i> suşları.....	46
Çizelge 3.3 : Şişelerdeki solüsyon bileşimleri.....	48
Çizelge 4.1 : <i>Lactobacillus</i> türü LAB'nin üretmiş olduğu laktik asitin cins ve miktarları.....	53
Çizelge 4.2 : <i>Lactococcus</i> türü LAB'nin üretmiş olduğu laktik asitin cins ve miktarları.....	54
Çizelge 4.3 : <i>Leuconostoc</i> türü LAB'nin üretmiş olduğu laktik asitin cins ve miktarları.....	54
Çizelge 4.4 : <i>Lactobacillus</i> türünün ürettiği laktik asit süpernatantının vermiş olduğu absorbands değerleri	55
Çizelge 4.5 : <i>Lactobacillus</i> türünün ürettiği laktik asit süpernatantının <i>Staphylococcus aureus</i> üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri	55
Çizelge 4.6 : <i>Lactococcus</i> türü'nün ürettiği laktik asit süpernatantının vermiş olduğu absorbands değerleri	66
Çizelge 4.7 : <i>Lactococcus</i> türü'nün ürettiği laktik asit süpernatantının <i>Staphylococcus aureus</i> üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri	66
Çizelge 4.8 : <i>Leuconostoc</i> türü'nün ürettiği laktik asit süpernatantının vermiş olduğu absorbands değerleri	73
Çizelge 4.9 : <i>Leuconostoc</i> türünün ürettiği laktik asit süpernatantının <i>Staphylococcus aureus</i> üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri	74

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	: Homolaktik fermentasyon.	8
Şekil 2.2	: Heterolaktik fermentasyon.	10
Şekil 2.3	: Laktik asit asit molekülünün yapısı.....	25
Şekil 2.4	: D-laktik asit molekülünün yapısı	25
Şekil 2.5	: L-laktik asit molekülünün yapısı.....	26
Şekil 2.6	: Hidrojen peroksit molekülünün yapısı.	29
Şekil 2.7	: Karbon dioksit molekülünün yapısı	30
Şekil 2.8	: Diasetil molekülünün yapısı.....	30
Şekil 2.9	: Reuterin molekülünün yapısı	32
Şekil 2.10	: Reuterisiklin molekülünün yapısı	32
Şekil 2.11	: Piroglutamik asit molekülünün yapısı.....	33
Şekil 4.1	: D41 <i>Lactobacillus plantarum</i> suşunun kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri	56
Şekil 4.2	: D41 <i>Lactobacillus plantarum</i> suşunun <i>Stafilococcus aureus</i> üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.....	56
Şekil 4.3	: F30 <i>Lactobacillus plantarum</i> suşunun kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri.	57
Şekil 4.4	: F30 <i>Lactobacillus plantarum</i> suşunun <i>Stafilococcus aureus</i> üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.....	57
Şekil 4.5	: B10 <i>Lactobacillus plantarum</i> suşunun kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri	58
Şekil 4.6	: B10 <i>Lactobacillus plantarum</i> suşunun <i>Stafilococcus aureus</i> üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.....	58
Şekil 4.7	: E32 <i>Lactobacillus brevis</i> suşunun kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri	59
Şekil 4.8	: E32 <i>Lactobacillus brevis</i> suşunun <i>Stafilococcus aureus</i> üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.....	59
Şekil 4.9	: B23 <i>Lactobacillus paracasei</i> suşunun kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri.	60
Şekil 4.10	: B23 <i>Lactobacillus paracasei</i> suşunun <i>Stafilococcus aureus</i> üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.....	60
Şekil 4.11	: E8 <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> suşunun kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri	61
Şekil 4.12	: E8 <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> suşunun <i>Stafilococcus aureus</i> üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.....	62
Şekil 4.13	: C19 <i>Lactobacillus coprophilus</i> suşunun kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri	62
Şekil 4.14	: C19 <i>Lactobacillus coprophilus</i> suşunun suşunun <i>Stafilococcus aureus</i> üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.....	63
Şekil 4.15	: C55 <i>Lactobacillus salivarius</i> suşunun kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri ...	63

Şekil 4.16 : C55 <i>Lactobacillus salivarius</i> suşunun <i>Stafilococcus aureus</i> üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.	64
Şekil 4.17 : Tüm <i>Lactobacillus</i> suşlarının kontrol solüsyonuna göre absorban değerleri.	65
Şekil 4.18 : Tüm <i>Lactobacillus</i> bakteri suşlarının <i>Stafilococcus aureus</i> üzerindeki inhibisyon değerleri.	65
Şekil 4.19 : F29 <i>Lactococcus raffinolactis</i> suşunun kontrol solüsyonuna göre absorban değerleri.	66
Şekil 4.20 : F29 <i>Lactococcus raffinolactis</i> suşunun <i>Stafilococcus aureus</i> üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri	67
Şekil 4.21 : B49 <i>Lactococcus raffinolactis</i> suşunun kontrol solüsyonuna göre absorban değerleri	67
Şekil 4.22 : B49 <i>Lactococcus raffinolactis</i> suşunun <i>Stafilococcus aureus</i> üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri	68
Şekil 4.23 : F39 <i>Lactococcus raffinolactis</i> suşunun kontrol solüsyonuna göre absorban değerleri ...	68
Şekil 4.24 : F39 <i>Lactococcus raffinolactis</i> suşunun <i>Stafilococcus aureus</i> üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.	69
Şekil 4.25 : E57 <i>Lactococcus lactis</i> suşunun kontrol solüsyonuna göre absorban değerleri.	69
Şekil 4.26 : E57 <i>Lactococcus lactis</i> suşunun <i>Stafilococcus aureus</i> üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.	70
Şekil 4.27 : F45 <i>Lactococcus lactis</i> suşunun kontrol solüsyonuna göre absorban değerleri	70
Şekil 4.28 : F45 <i>Lactococcus lactis</i> suşunun <i>Stafilococcus aureus</i> üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri	71
Şekil 4.29 : A47 <i>Lactococcus lactis</i> suşunun kontrol solüsyonuna göre absorban değerleri	71
Şekil 4.30 : A47 <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> suşunun <i>Stafilococcus aureus</i> üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri	72
Şekil 4.31 : Tüm <i>Lactococcus</i> bakteri suşlarının kontrol solüsyonuna göre absorban değerleri.	73
Şekil 4.32 : Tüm <i>Lactococcus</i> bakteri suşlarının <i>Stafilococcus aureus</i> üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri	73
Şekil 4.33 : E55 <i>Leuconostoc lactis</i> suşunun kontrol solüsyonuna göre absorban değerleri.	74
Şekil 4.34 : E55 <i>Leuconostoc lactis</i> suşunun <i>Stafilococcus aureus</i> üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.	75
Şekil 4.35 : A40 <i>Leuconostoc lactis</i> suşunun kontrol solüsyonuna göre absorban değerleri	75
Şekil 4.36 : A40 <i>Leuconostoc lactis</i> suşunun <i>Stafilococcus aureus</i> üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri	76
Şekil 4.37 : A31 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> suşunun kontrol solüsyonuna göre absorban değerleri	76
Şekil 4.38 : A31 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> suşunun <i>Stafilococcus aureus</i> üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri ...	77
Şekil 4.39 : B56 <i>Leuconostoc citreum</i> suşunun kontrol solüsyonuna göre absorban değerleri.	77
Şekil 4.40 : B56 <i>Leuconostoc citreum</i> suşunun <i>Stafilococcus aureus</i> üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.	78

Şekil 4.41 : Tüm <i>Leuconostoc</i> bakteri suşlarının kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri.	78
Şekil 4.42 : Tüm <i>Leuconostoc</i> bakteri suşlarının <i>Stafilococcus aureus</i> üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.	79

**BOZA KAYNAKLI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN LAKTİK ASİT
MİKTARLARININ VE *Staphylococcus aureus* ÜZERİNE
ANTİMİKROBİYAL ETKİNİN BELİRLENMESİ**

ÖZET

Laktik asit bakterileri, değişik metabolik aktiviteleri sayesinde özellikle fermente gıda sanayisinde önemli rol oynamaktadır. Bakteriler aynı zamanda starter kültür olarak, gıda katkı maddesi olarak ve diğer üretmiş olduğu metabolitler dolayısı ile de fermentasyon ve diğer işlevler için yardımcı unsur olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, laktik asit bakterileri peynir gibi süt ürünlerinin oluşumunda ve olgunlaşmasının hızlanmasında, gıdaların besinsel, teknolojik ve organoleptik özelliklerin geliştirilmesinde rol oynamaktadır. Laktik asit bakterilerinin, laktik asit, bakteriyosin ve diğer antimikrobiyal özellik gösteren maddeler dolayısı ile gıdaların doğal yollarla korunması ve özellikle patojen mikroorganizmaların ve diğer istenmeyen mikroorganizmaların inhibisyonu sağlanmaktadır.

Staphylococcus aureus gıda sanayisinde en önemli patojen bakterilerinden biri olup, bakterinin inhibe edilmesi için önem arz etmektedir. Patojenin gıda bozulmalarına yol açarak, gıda zehirlenmeleriyle insane sağlığını tehdit etmektedir. Özellikle son günlerde kimyasal maddelerin ve katkı maddelerinin kullanımı hakkında halkın bilinçlenmesi, gıdaları da doğal yollarla korumanın önemini arttırmıştır. Bu yüzde, laktik asit bakterilerinin sentezlemiş olduğu laktik asit'in gıda korumasındaki etkisi daha da incelenmeye değer bulunmuştur.

Yapılan tez çalışmasında boza kaynaklı Laktik Asit Bakterileri gruplarından olan *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* bakterinin üretmiş olduğu laktik asit izomerlerinin cins ve miktarları belirlenmiş ve laktik asit'in gıda sektöründe büyük sorunlara yol açan *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı olan etki mekanizmasının incelenmesi amaçlanmıştır. Laktik asit bakterilerinin bakterinin üretmiş olduğu laktik asit izomerlerinin tayini kitler aracılığı ile yapılmıştır. Ayrıca, bu gruptaki bakterinin üretmiş olduğu laktik asit'in *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon etkisi spektrofotometre kullanılarak incelenmiştir.

Deney sonuçlarına göre, *Lactobacillus* türü bakterileri arasından, B23 *Lactobacillus paracasei* bakterisinin en yüksek oranda laktik asitin D(-) ve L(+) izomerlerini sentezlediği sonucuna ulaşılmıştır. *Lactococcus* türünün çalışılan iki farklı suşunun L(+)-laktik asit izomerini benzer miktarlarda sentezlediği saptanmıştır. *Leuconostoc* bakterilerinden en yüksek oranda D (-)-laktik asit sentezleyen bakteri suşunun ise E55 *Leuconostoc lactis* suşu olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *Lactobacillus* türünün ilgili suşlarından B10 *Lactobacillus fermentum* bakterisinin *Staphylococcus aureus* üzerindeki en yüksek inhibisyon değerine sahip olduğu bulunmuştur. D41 *Lactobacillus plantarum* bakteri suşunun ise *Staphylococcus aureus* üzerindeki en düşük inhibisyon değerine sahip olduğu gözlenmiştir. *Lactococcus* türü bakterilerinden olan F45 *Lactococcus lactis* bakterisinin *Staphylococcus aureus* üzerindeki en yüksek inhibisyon değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca,

Leuconostoc türü suşları arasında, *Staphylococcus aureus* üzerindeki en yüksek inhibisyon değerine A40 *Leuconostoc lactis* bakterisi, en düşük inhibisyon değerine ise A31 *Leuconostoc mesenteroides* bakterisinin ulaştığı gözlenmiştir.

DETERMINATION OF THE AMOUNT OF LACTIC ACID OBTAINED FROM BOZA-BASED LACTIC ACID BACTERIA AND ITS INHIBITION EFFECT AGAINST *Staphylococcus aureus*

SUMMARY

Lactic acid bacteria (LAB) are gram-positive and non-spoerforming bacteria. Their shape can be cocci, coccibacilli or rods. When their DNA was monitored, it is found that their DNA base composition of less than 53mol% G+C. In addition, most of the lactic acid bacteria are non respiratory and lack catalase enzyme that is why they possess superoxide dismutase and have alternative means to detoxify peroxide radicals. Generally, all lactic acid bacteria can grow in the medium where is any oxygen but the bacteria can grow in the presence of oxygen as aerotolerant anaerobes, unlike most anaerobes.

Lactic acid bacteria use the sugar, especially glucose. They convert the sugar primarily to lactic acid and other products named CO₂ and ethanol. Bacteria obtain their all energy from sugar and that is why growing lactic acid bacteria can be restricted to environments in which sugars are present or not.

Lactic acid bacteria refers to a large group of beneficial bacteria that have similar properties and all produce lactic acid as an end product of the fermentation process. Even though many genera of bacteria produce lactic acid ferment sugar and produce lactic acid as a primary or secondary end-product of fermentation, the term “Lactic Acid Bacteria” is conventionally reserved for genera in the order *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Strepreptococcus*, as well as *Carbobacterium*, *Enterecoccus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* and *Weisella*.

Lactic acid bacteria are widespread in nature and are also found in human digestive systems and they take place in the food industry. They are used for pickling of vegetables, baking, winemaking, curing fish, meats and sausages but their main role is that preparation of fermented dairy product. Lactic acid also gives fermented milks their slightly tart taste. Additional characteristic flavours and aromas are often the result of other products of lactic acid bacteria. Likewise, they are also responsible for formation and maturation of cheeses and improvement of nutritional, technological and organoleptic value of food products. In addition, the bacteria can be are used as starter cultures, as additives and as helping metarials that are produced by them for fermentation or other process.

They have an significant role in also and cereal based product process. For example, Especially, the cereal based fermented products are used in all over the world as raw materials. That is why, they take place in big global food production. “Boza” is the one of the most important fermented beverages and it is our one of the traditional fermented beverage which is consumed by Turkish people very much. Boza is produced using boiling cereals that are millet, rice, corn, millet or wheat and then saccharose sugar is added and the fermentation process is began. In this study,

“Boza” based lactic acid bacteria were used to carry out to obtain lactic acid for the assays.

In addition, lactic acid bacteria have long been used to preserve and keep the nutritive qualities of various food products. LAB produce various antimicrobial compounds, which can be fall into two groups. First group can be named as low-molecular-mass compounds which are hydrogen peroxide, carbon dioxide, diacetyl and uncharacterized compounds. Second group can be said as high-molecular-mass compounds such as bacteriocins. However, it is very clear that the primary antimicrobial effect exerted by LAB is the production of lactic acid and reduction of pH. Levels and types of organic acids produced during the fermentation process depend on LAB species or strains, culture composition and growth conditions. The antimicrobial effect of organic acids lies in the reduction of pH, as well as the undissociated form of the molecules. All of these antimicrobial substances can antagonize the growth of some spoilage and pathogenic bacteria in foods. Lactic acid bacteria have also the antagonistic property that is attributed to the lowered pH, the undissociated acids and production of other primary and secondary metabolites produced by LAB. The metabolites which are produced by the fermentation process, except the volatile ones, are kept in the foods and they leads to growth inhibition of food spoilage or poisoning bacteria and detoxification of noxious compounds of plant origin.

Staphylococcus aureus is one of most important pathogen bacteria for food industry and it causes food poisoning or food spoilage in some cases. of this bacteria is important. that is why it is a threat on human health. *Staphylococcus aureus* is one of most important pathogen bacteria for food industry and inhibition of this bacteria is important. *Staphylococcus aureus* is gram-positive, non-motile, catalase and coagulase positive bacteria. It's shape is cocci and cells can be spherical single or paired cocci or form grape-like clusters. It does not have any spore forming. *Staphylococcus aureus* is able to grow in a wide range of temperatures at at 7°C to 48.5°C with an optimum of 30°C to 37°C and pH at 4.2 to 9.3, with an optimum of 7 to 7.5 as well as and sodium chloride concentrations that is up to 15% NaCl. These characteristics of *S. aureus* preapare to grow this bacteria on variety of foods. In addition, some *S. aureus* strains are able to produce staphylococcal enterotoxins (SEs) and it cause to staphylococcal food poisonings. It is known that food poisonings based on enterotoxins are big threats on human health. That is why *S. aureus* contaminations can be readily avoided by heat treatment of food. However, they remain a major cause of food-borne diseases because they can contaminate food products during preparation and processing. In these cases, owing to the public awareness about using chemical substances and additives food protection, the interest of food production with natural ways increases. It is observed that people want to protect your foodstuffs in natural ways and they also want to consume foods which are protected naturally. Thus, the effect of lactic acid which are produced by lactic acid bacteria on food preservation is focused more.

In this study, the assays carried out two aims. First, the amounts and kind of lactic acid which are produced by *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* lactic acid bacteria group were determinated. Secondly, the inhibition mechanism of lactic acid which is also taken from *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Leuconostoc* lactic acid bacteria group against *Staphylococcus aureus* that leads to big problems for food industry were studied.

Lactic acid have two isomers which are named D(-)-lactic acid and L (+)-lactic acid. Isomers are the molecules that have the same molecular formula but they have a different arrangement of the atoms in space. Because of whole molecule rotating or particular bonds of molecule rotating, more different arrangements occur. This phenomena is known as structural isomerism. Lactic acid isomers which are produced by lactic acid bacteria were measured using kits. In the assays, number of lactic acid bacteria were studied to obtain lactic acid taken from lactic acid bacteria which are *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Leuconostoc* bacteria species. First, *Lactobacillus* bacteria groups which are B2 *Lactobacillus fermentum*, C3 *Lactobacillus fermentum*, B23 *Lactobacillus paracasei*, D29 *Lactobacillus para.sub.paracasei*, E8 *Lactobacillus para.sub.paracasei*, F30 *Lactobacillus plantarum*, E32 *Lactobacillus brevis*, C19 *Lactobacillus carpophilus*, A15 *Lactobacillus delb.sub.delb*, C55 *Lactobacillus salivarius* were studied to obtain lactic acid. In addition, *Lactococcus* groups that are F39 *Lactococcus raffinolactis* and B49 *Lactococcus raffinolactis* were researched to take lactic acid, secondly. Finally, *Leuconostoc* bacteria were also investigated to obtain lactic acid which include E55 *Leuconostoc lactis*, B56 *Leuconostoc citreum* and A31 *Leuconostoc mesenteroides*. To determinate concentration and kind of lactic acid that are of L (+)-lactic acid and D(-)-lactic acid, D/L lactic acid kits were used. Kits had seven different solutions. In addition, the principal of kits depends on the UV measurement and measuring the absorbance of substances. Measuring absorbances of lactic acid were carried out by means of spectrophotometer at 340 nm. Measurements in the assays were carried out duplicate.

To determinate inhibition effect of lactic acid against *Staphylococcus aureus*, number of lactic acid bacteria which are *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Leuconostoc* species were studied. Firstly, lactic acid which is obtained from *Lactobacillus* bacteria groups including D41 *Lactobacillus plantarum*, F30 *Lactobacillus plantarum*, B10 *Lactobacillus fermentum*, E32 *Lactobacillus brevis*, B23 *Lactobacillus paracasei*, E8 *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei*, C19 *Lactobacillus carpophilus* and C55 *Lactobacillus salivarius* were studied. Secondly, lactic acid that is taken from *Lactococcus* groups which are F29 *Lactococcus raffinolactis*, B49 *Lactococcus raffinolactis*, F39 *Lactococcus raffinolactis*, E57 *Lactococcus lactis*, F45 *Lactococcus lactis* and A47 *Lactococcus lactis* spp. *lactis* were investigated. Finally, inhibition effect of lactic acid that are gained from *Leuconostoc* species E55 *Leuconostoc lactis*, A40 *Leuconostoc lactis*, A31 *Leuconostoc mesenteroides* and B56 *Leuconostoc citreum* were studied. In addition, the inhibition effect of lactic acid against *Staphylococcus aureus* is measured via spectrophotometer. After obtained lactic acid from different lactic acid bacteria species, lactic acid, *Staphylococcus aureus* that is determined its concentration and Mueller Hinton Broth were added into ELISA microplates at they were measured at OD₆₆₀ and the measurements were taken three hours intervals until 24th hour.

According to the assays, it is obvious that B23 *Lactobacillus paracasei* bacteria produces the highest value of lactic acid isomers which are D(-) and L(+)-lactic acid among all tested *Lactobacillus* species. For studied only two different *Lactococcus* strain, it is observed that they produce the same amount of L(+)-lactic acid isomers. It is clear that E55 *Leuconostoc lactis* strain produces the highest value of D(-)-lactic acid isomers among all tested *Leuconostoc* species.

In addition, It is obvious that B10 *Lactobacillus fermentum* produced the highest value of lactic acid against *Staphylococcus aureus* pathogen bacteria whereas D41

Lactobacillus plantarum produced the lowest value of lactic acid against *Staphylococcus aureus* pathogen bacteria among tested all *Lactobacillus* species. It is observed that F45 *Lactococcus lactis* produced the highest value of lactic acid against *Staphylococcus aureus* pathogen bacteria among tested all *Lactococcus* species. Furthermore, it is clear that A40 *Leuconostoc lactis* produced the highest value of lactic acid against *Staphylococcus aureus* pathogen bacteria whereas A31 *Leuconostoc mesenteroides* produced the lowest value of lactic acid against *Staphylococcus aureus* pathogen bacteria among tested all *Lactobacillus* species.

According to the this study facts, It can be said that lactic acid obtained from lactic acid bacteria which are studied in the assays have inhibition effect against *Staphylococcus aureus*. Thus, lactic acid can be used to inhibit *Staphylococcus aureus* bacteria.

1. GİRİŞ

Laktik asit bakterileri ve bakterilerin gerçekleştirmiş olduğu çeşitli özellikteki metabolik aktiviteler dolayısı ile bu grup bakteriler gıda endüstrisinde oldukça önemli bir yere sahip olmaktadır. Laktik asit bakterileri, fermentasyon işlevi için starter kültür olarak kullanılmasının yanında, başta laktik asit olmak üzere üretmiş olduğu diğer metabolitler ile de hem gıda katkı maddesi olarak, hem de fermentasyon ve diğer işlevlerde yardımcı unsur olarak kullanılmaktadırlar. Buna ek olarak, bu grup bakteriler güçlü fermente özelliğine sahip olduklarından, gıdaların yapısını değiştirerek, özellikle peynirin ve diğer süt ürünlerinin oluşumunda etkin rol oynamaktadırlar. Bakteriler bu tip ürünlerde, dokunun oluşmasının sağlanması ve ürüne farklı tat, koku ve aroma kazandırılmasının yanında gıdaların besinsel ve organoleptik özelliklerini geliştirilmesine de yardımcı olmaktadır.

Laktik Asit Bakterilerinin en önemli görevlerinden birisi de, başta laktik asit olmak üzere antimikrobiyal özellik gösteren maddeler sentezleyerek, gıdalarda istenmeyen mikroorganizmaların ve patojenlerin gelişimini önlemektir. Özellikle *Staphylococcus aureus* bakterisi gıdalarını enfekte ederek, gıdalarda bozulmasına yol açarak, gıda zehirlenmelerine neden olmaktadır. Bu çalışma ile boza kaynaklı Laktik Asit Bakterileri gruplarından olan *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* bakterinin üretmiş olduğu laktik asit izomerlerinin cins ve miktarları belirlenmiş ve laktik asit'in gıda sektöründe büyük sorunlara yol açan *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı olan etki mekanizması incelenmiştir. Diğer bir deyişle, laktik asit kullanımının *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyonun oranının belirlenmesi amaçlanmıştır. *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* bakterinin üretmiş olduğu laktik asit izomerlerinin tayini kitler aracılığı ile yapılmış olup, bu gruptaki bakterinin üretmiş olduğu laktik asit'in *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon etkisi ise spektrofotometre kullanılarak incelenmiştir. Yapılan çalışmanın, gıda ürünlerinin kalitesine, insan sağlığına ve ülke ekonomisine katkı sağlanacağına düşünülmesinin yanında, gıdaların patojen bakterilerden doğal yollar kullanarak korumasının mümkün olduğu da belirlenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Boza

Boza hububat kaynaklı, diğer bir hububat kaynaklı bir içecek olan biradan yapımı oldukça farklı, fermente bir içecek olması sebebi ile de en eski zamanlardan bile tüketilen bir içecektir. Boza'nın yapımında, yabancı maddelerden temizlenmiş bir şekilde kullanılan darı, pirinç, buğday, mısır gibi hububatların kırmalarına veya unlarından birine veya birkaçına içme suyu katılarak pişirilmesiyle birlikte beyaz şeker eklenerek, laktik asit ve alkol fermentasyonuna maruz bırakılmasıyla hazırlanan unlu bir mamüldür. Boza, özellikle kış aylarında yoğun olarak tüketilen bir içecektir. Ayrıca, süt arttırıcı özelliği dolayısı ile hamile bayanlara, vitamin içeriği bakımından da sporculara tavsiye edilmektedir. Boza üretimi sırasında meydana gelen prosesler, hammaddelerin hazırlanması, kaynatma, soğutma, seyreltme, süzme ve şeker ilavesi ile fermentasyon işlemlerini kapsamaktadır (Bayram, 2005).

2.2. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB) gram pozitif, sporsuz kok, kokbasil veya çubuk şekli olan, DNA baz bileşimi %53 mol guanin ve sitozin' den az olmayan bakterilerdir. Genelde, oksidaz negatif olmakla beraber, asite karşı toleranslı bakterilerdir. Yapılan çalışmalar, LAB'lerin katalaz negatif olduğunu göstermiş olup, katalaz enzimine sahip olmadıkları takdirde ise süperoksidaz dismutaz enzimi içerdiklerini göstermiştir. Ayrıca, peroksit radikallerini, peroksidaz enzimleri yardımı ile detoksifiye ettiği gözlemlenmiştir. Bunun yanında LAB, oksijeni kullanmalarına göre anaerobik, aerotolerant veya mikroaerofiliklerdir. Genel olarak tüm LAB anaerobik olarak gelişmek gösterirler fakat birçok anaerob bakterilerden farklı olarak oksijen varlığında aerotolerant anaerob bakteriler olarak adlandırılırlar (Todar, t.y).

Laktik asit bakterilerin sınıflandırılmasında, bakterilerin morfolojik özellikleri, glikoz şekerini fermente etme şekilleri, farklı sıcaklıklarda ve tuz

konsantrasyonlarında gelişmeleri, çeşitli asitlere ve alkalilere olan toleransları ve üretmiş oldukları laktik asitin konfigürasyonu temel alınmaktadır. Bunun yanında, bakteri hücre duvarı bileşenleri veya hücre duvarı yağ asidi kompozisyonu da LAB'nin sınıflandırılmasında kullanılan diğer bir kemotaksonomik özelliklerdir. LAB'nin günümüzde yapılan çalışmalar sonucunda, taksonomik olarak fligenetik sınıflandırılma yaparken rRNA dizisi baz alınmaktadır. Gelişen teknoloji ile beraber özellikle nükleik asit problama teknikleriyle beraber PCR teknikleri de LAB sınıflandırılması ve tanımlanmasında önemli rol oynamaktadır (Bayram, 2005).

Birçok bakteri türü fermentasyon sonucunda birincil ve ikincil ürün olarak laktik asiti sentezlemelerine rağmen, genel olarak Laktik Asit Bakteri'leri olarak adlandırılan gruba giren *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Carbobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weisella* türleri olmaktadır (Todar, t.y).

Laktik asit bakterileri gıda endüstrisinde birçok alanda kullanılmaktadırlar. Özellikle, yapımında *Streptococcus spp.* ve *Lactobacillus spp.* bakterilerinin birlikte kullanıldığı yoğurt, *Lactococcus spp.*'nin kullanıldığı değişik tat ve aromadaki peynirler, *Leuconostoc spp.*'nin kullanıldığı sauerkraut ile sosis, zeytin ve bazı LAB üretiminde rol oynadığı bira, şarap ve işlenmiş et başı çeken gıda maddeleridir (Dugas, 2011).

Laktik asit bakterileri, inorganik nitrojen kaynaklarını kullanarak amino asit sentezleyebilme özelliği son derece kısıtlı olan mikroorganizma türüdür. Bu gruptaki bakteriler, enerjilerini sadece şekeri fermente ederek sağladıkları için, sadece şeker içeren ortamlarda gelişimleri sınırlandırılmaktadırlar. Aynı sebeple, bakteriler gelişimleri için amino asite bağımlı olup, mutlaka gelişme gösterdikleri ortamda nitrojen kaynağına ihtiyaçları vardır. Diğer bir deyişle, LAB'nin sınırlandırılmış biyosentez yetenekleri olmasından dolayı, temel besinsel gereksinimlerini yerine getirebilmeleri için aminoasit, vitamin, purin veya purimidin gibi temel besin maddelerini içeren ortamlara ihtiyaçları vardır. Bu sebeple, LAB bakterileri bu gereksinimlerin sağlandığı ortamlar olan hayvan bağırsakları, bitki yaprakları gibi yerlerde daha bol sayıda bulunmaktadırlar (Dugas, 2011).

LAB türleri arasında, bakterilerin gelişmeleri için istenilen özellikler değişkenlik göstermekle beraber, bakterileri kültürlerine göre değişmektedir. Bazı bakteriler bazı

aminoasit türüne göre fototrof olup, yalnızca 13-15 amino asite ihtiyaç duymaktadırlar. Buna ek olarak, çevrede bulunan serbest aminoasitlerin bakteri hücrelerinin yoğunluğunu yeterince desteklememesi yüzünden, bakteriler kendi temel aminoasit gruplarını sentezlemek için peptitleri yada proteinleri hidrolize etmektedirler. LAB'nin bu şekilde peptitleri veya proteinleri hidrolize etmeleri onların proteolitik aktiviteye sahip olduklarını göstermektedir. Ayrıca, tüm süt ürünlerinin yapımında kullanılan *Lactococci* türünün proteolitik sistemlerini kullanmaları dolayısı ile sütün asitlenmesine yol açmaktadırlar. Özellikle Lactococcal proteolitik sistemleri, hücre içi peptitlerini, taşıyıcı sistemleri ve sitoplazmik hücrenin dışında kalan enzimleri içermektedir. LAB'nin proteolitik aktiviteleri fermente olmuş gıdalarda dokunun, tadın ve aromanın gelişmesini sağlamakla beraber, özellikle isveç veya cheddar gibi değişik peynirlerde istenilen tat ve aromanın oluşmasını sağlamaktadır (Todar, t.y).

LAB'nin başlıca görevi gıdaların yapısında bulunan karbonhidratları fermente ederek, gıdaların karbonhidrat içeriklerini ve laktik asit üretmeleri sonucunda da ortamın pH'nı düşürmeleridir. LAB'nin gelişmesinin en istenen sebebi belirtildiği gibi ortamı asitlendirme özellikleridir. Ortamın pH'ı LAB sayesinde 4'e kadar düşürülmekte ve bu düşen pH dolayısı ile başta insan ve gıda patojenleri olmak üzere diğer mikroorganizmaların da gelişimi önlenmektedir. LAB, ortamın pH değerini düşürerek, diğer mikroorganizmaların gelişimlerini kısıtlayıcı özellikte olması, gıdaların raf ömrünü arttırıcı en önemli özelliklerin başına gelmektedir. Ayrıca, asitliğin artması, özellikle gıda proteinlerin çökmesine ve tat arttırıcı biyokimyasal değişikliklere sebep olmakta ve dolayısı ile gıdaların doku özellikleri de değişmektedir. Buna ek olarak, fermentasyon prosesi yani diğer bir deyişle LAB'nin gelişme süreci, kendi kendini limitleyen bir proses türü olup, LAB ortamın asidik pH'ına karşı da hassasiyet göstermektedirler (Dugas, 2011).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, çok az LAB'nin ve *Streptococcus* cinsi bakterilerin hayvanlar için patojenik olma özelliğine sahip olduğu bulunmuştur. İnsanlarda ise özellikle *Streptococcus pyogenes* laktik asit bakterisinin streptokokal boğaz ağrısına, zaatüreye, diğer piyanojenik infeksiyonlara, kızıl hastalığına ve diğer zehirlenmelere yol açtığı belirlenmiştir. Bunun yanında, *Streptococcus pneumoniae* ise insanlarda labor pönomani, orta kulak iltihabı ve menenjitte sebep olmakla

beraber bazı viral özellikteki mikroorganizmalar ve hemolitik olmayan streptokokiler ise diş ve diş eti hastalıklarının oluşmasına önemli rol oynamaktadır (Todar, t.y).

Lactobacillus türüne giren bakterileri çubuk şeklinde olup, bakterilerden bazılarının glikoz şekerini metabolize etmeleri sonucunda CO₂ gazını oluşturdıkları, bazılarının ise oluşturmamaları gözlenmiştir. Ayrıca, bu gruptaki bakterilerin bir kısmı 10°C ve 45°C'deki ortamlarda gelişme gösterebilirken, aynı şekilde bu gruba giren bazı bakterilerin ise bu sıcaklık derecelerine sahip ortamlarda gelişemedikleri belirtilmiştir. Buna ek olarak, bakterilerde bazı suşlarının %6.5 NaCl içeren ortamlarda gelişebildikleri, bazılarının ise gelişemedikleri belirlenmiştir. Ortam pH'nın 4.4 olduğu durumlarda bakterilerin bazı suşlarının gelişme gösterirken bazılarının gelişme gösteremediği, ortam pH'nın 9.6 olduğu durumlarda ise bakterilerin tamamının gelişemediği gözlenmiştir. Bu gruba giren bakterilerin ise laktik asitin D(-), L(+) veya bu iki izomerin ikisini birden sentezleme kabiliyetleri olduğu anlaşılmıştır.

Diğer bir grup olan *Enterococcus* türü bakteri kok şeklinde olup, bakterilerin glikoz şekerini metabolize etmeleri sonucunda CO₂ gazını oluşturmamaları gözlenmiştir. Ayrıca, bu gruptaki bakterilerin 10°C ve 45°C'deki ortamlarda gelişme gösterebildikleri, belirtilmiştir. Buna ek olarak, bu gruptaki bakterilerin % 6.5 NaCl içeren ortamlarda gelişebildikleri belirlenmiştir. Ortam pH'nın 4.4 ve 9.6 olduğu durumlarda da *Enterococcus* bakterilerinin gelişebildikleri gözlenmiştir. Bu gruba giren bakterilerin ise laktik asitin L(+) formunu sentezleme kabiliyetleri olduğu anlaşılmıştır.

Lactococcus türü bakterileri de kok şeklinde olup, bakterilerin glikoz şekerini metabolize etmeleri sonucunda CO₂ gazını oluşturmamaları gözlenmiştir. Ayrıca, bu gruptaki bakteriler 10°C'deki ortamlarda gelişme gösterebilirken, 45°C'deki ortamda gelişme gösteremedikleri belirtilmiştir. Buna ek olarak, bu gruptaki bakterilerin % 6.5 NaCl içeren ortamlarda gelişemedikleri belirlenmiştir. Ortam pH'nın 4.4 olduğu durumlarda bakterilerin bazı suşları gelişme gösterirken bazı suşlarının gelişme gösteremediği, ortam pH'nın 9.6 olduğu durumlarda ise bakterilerin tamamının gelişemediği gözlenmiştir. Bu gruba giren bakterilerin ise laktik asitin L(+) formunu sentezleme kabiliyetleri olduğu anlaşılmıştır.

Leuconostoc türü bakterileri LAB grubuna girmekte olup, bakteriler kok şeklinde olmaktadır. Bakterilerin glikoz şekerini metabolize etmeleri sonucunda CO₂ gazını oluşturmamaları gözlenmiştir. Ayrıca, bu gruptaki bakteriler 10°C'deki ortamlarda gelişme gösterebilirken, 45°C'deki ortamda ise gelişme gösteremedikleri belirtilmiştir. Buna ek olarak, bakterilerin bazı suşlarının %6.5 NaCl içeren ortamlarda gelişebildikleri, bazılarının ise gelişemedikleri belirlenmiştir. Ortam pH'nın 4.4 olduğu durumlarda aynı şekilde bakterilerin bazı suşlarının gelişme gösterebildiği, bazı suşlarının gelişme gösteremediği, fakat ortam pH'nın 9.6 olduğu durumlarda ise bakterilerin tamamının gelişemediği gözlenmiştir. Bu gruba giren bakterilerin ise laktik asitin D(-) formunu sentezleme kabiliyetleri olduğu anlaşılmıştır.

Diğer bir grup olan *Pediococcus* türü bakteri kok şeklinde olup, bakterilerin glikoz şekerini metabolize etmeleri sonucunda CO₂ gazını oluşturmamaları gözlenmiştir. Ayrıca, bu gruptaki bakterilerin bir kısmı 10°C ve 45°C'deki ortamlarda gelişme gösterebilirken, aynı şekilde bu gruba giren bazı bakterilerin ise bu sıcaklık derecelerine sahip ortamlarda gelişemedikleri belirtilmiştir. Buna ek olarak, bakterilerin bazı suşlarının %6.5 NaCl içeren ortamlarda gelişebildikleri, bazı suşların ise gelişemedikleri belirlenmiştir. Ortam pH'nın 4.4 olduğu durumlarda bakterilerin gelişme gösterebildiği fakat ortam pH'nın 9.6 olduğu durumlarda ise bakterilerin gelişemediği gözlenmiştir. Bu gruba giren bakterilerin ise laktik asitin L(+) veya D(-) ve L(+) iki izomerin ikisini birden sentezleme kabiliyetleri olduğu anlaşılmıştır.

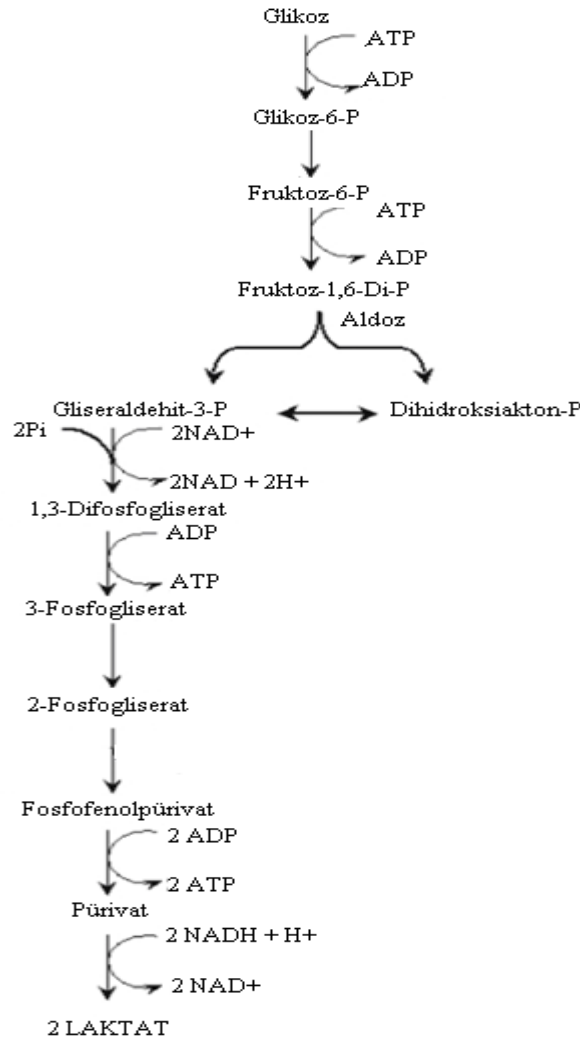
Streptococcus türü bakteriler ise kok şeklinde olup, bu gruptaki bakterilerin glikoz şekerini metabolize etmeleri sonucunda CO₂ gazını oluşturmamaları gözlenmiştir. Ayrıca, bu gruptaki bakteriler 10°C gelişme gösterebilirken, 45°C'deki ortamlarda bu gruptaki bakterilerin bazı suşları gelişme gösterebilirken, bazılarının ise gelişme gösteremedikleri belirtilmiştir. Buna ek olarak, bu gruptaki bakterilerin % 6.5 NaCl içeren ve ortam pH'nın 4.4 ve 9.6 olduğu durumlarda gelişemedikleri belirtilmiştir. Bu gruba giren bakterilerin ise laktik asitin L(+) formunu sentezleme kabiliyetleri olduğu anlaşılmıştır.

LAB, glikoz şekerini fermente ederek, ilk önce sadece laktik asite veya laktik asit ve beraberinde oluşan karbondioksit'e (CO₂) ve etanol'e dönüştürmektedir. LAB, belirtildiği gibi karbonhidratları fermente ederken kullandıkları yola iki ikiye

ayrılmaktadır. Homofermentatif özellik gösteren LAB, glikoliz ya da diğer bir adı ile Embden-Meyerhof yoluyla ilgili şekeri fermente ederek, son ürün olarak sadece laktik asit'i meydana getirmektedirler. Heterofermentatif özellik gösteren LAB ise 6-fosfoglukonat ve fosfoketolaz yolu ile şekerin fermentasyonu sonucunda, son ürün olarak laktik asit'in yanında etanol, CO₂, asetik asit ve formik asit de oluşturmaktadırlar (Todar, t.y).

2.2.1. Homolatik fermentasyon

Şekil 2.1'de laktik asit üretiminin homolatik fermentasyon yoluyla oluşumunu göstermektedir.



Şekil 2.1 : Homolatik fermentasyon.

LAB, fazla miktarda glikozun ve az miktarda O₂'nin bulunduğu ortamda, glikoz şekerini Embden- Meyerhof yolu ile fermente ederek, 1 mol glikozdan 2 mol pürivat oluşumuna neden olmaktadır. Bu grup fermentasyon türüne homolatik fermentasyon

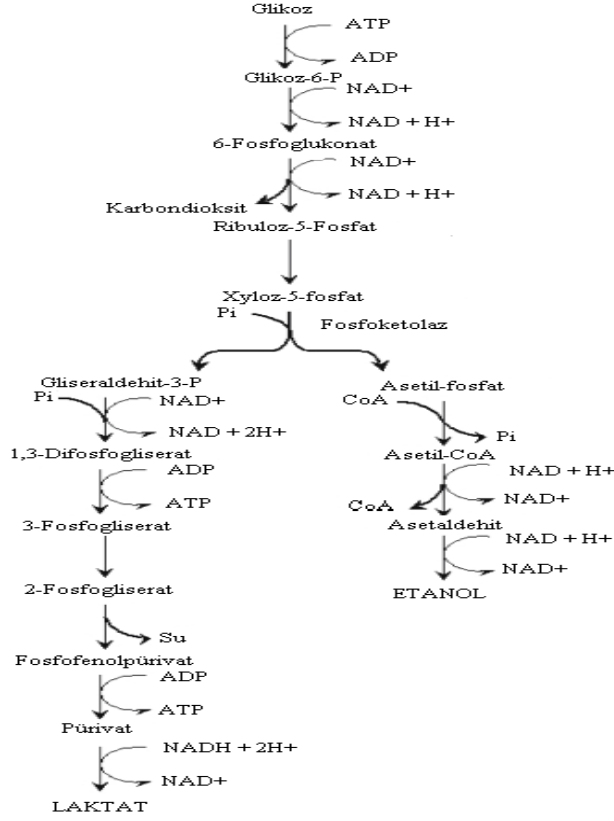
denilmekte olup, hücre içi redoks dengesi NADH oksidasyonu ile sağlanmakta ve beraberinde ise pürivat laktik asite indirgenmektedir. Bu proses için, 2 mol ATP kullanılmaktadır. Bu yol ile ilgili şekeri fermente eden bakterilerin genel olarak, bazı *Lactobacilli* üyeleri ile birlikte, *Enterococci*, *Lactococci*, *Pediococci*, *Streptococci*, *Tetragenococci* ve *Vagococci* bakterilerin birçok türü olarak sayılabilmektedir (Todar, t.y).

Şekerin fosforilasyonu ve taşınması iki yol ile mevcut olmaktadır. Bu yollardan ilki, serbest glikozun taşınması ve ATP'ye bağlı hekzokinaz enziminin kullanılması ile başlatılan fotofosforilasyon işlemidir. Ayrıca, izomerizasyon veya fosforilasyon ya da her iki işlem sonrasında, mannoz ve fruktoz gibi şekerler, bu döngüye glukoz-6-fosfat veya fruktoz-6-fosfat oluşumu seviyesinde girmektedirler. Şekerin fosforilasyonu ve taşınmasındaki ikinci yolun ise, fosfoenolpürivat (PEP)'in alınan şeker için fosforil donör'ü olarak kullanılan şeker fosfotransferaz sistem (PTS)'i olduğu saptanmıştır. Bazı LAB türleri, PTS sistemini sadece galaktoz şekerinin taşınmasında kullanırken, diğer LAB türleri ise tüm şekerler için PTS sistemini kullanmaktadırlar (Todar, t.y).

2.2.2. Heterolaktik fermentation

Heterofermentatif LAB, fosfoketolaz yani diğer adı ile pentoz fosfat yolu ile şekerin indirgenmesini sağlamaktadır. 1 mol glikoz-6-fosfat'ın başlangıçta dehidrohenasyonu sonucunda 6-fosfoglukanat ve sonrasında ise dekarboksilasyonu sonucunda 1 mol CO₂ ürünü oluşmaktadır. Son ürün olarak açığa çıkan pentoz-5 fosfat, 1 mol gliseraldehit fosfat (GAP)'a ve 1 mol asetil fosfat'a dönüşmektedir. Heterofermentatif LAB, GAP molekülünü daha sonraki aşamalarda homofermentatif LAB yaptığı gibi laktata dönüştürürken, asetil-CoA ve asetaldehit ara ürünlerinin yardımıyla asetil fosfat da etanole dönüşmektedir. Teorik olarak, ürün olarak oluşan CO₂, laktat ve etanol gibi maddeler, 1 mol glikozdan eşit miktarda üretilmektedirler ve bu yolu kullanarak şekeri fermente eden obligat LAB'in ise *Leuconostoc*, bazı *Lactobacilli*, *Oenococci* ve *Weissella* türleri'nin olduğu belirtilmiştir (Todar, t.y).

Şekil 2.2'de laktik asit üretiminin heterolaktik fermentasyon yoluyla oluşumunu göstermektedir.



Şekil 2.2 : Heterolaktik Fermentasyon.

2.2.3. Laktik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri

Probiyotik kelimesinin kökeni Yunan dilinden gelmekte olup, Türkçeye çevirildiğinde “hayat için” anlamına gelmektedir. Dünya sağlık örgütü (WHO), probiyotik bakterileri, yeteri sayıda olduklarında, bulunmuş oldukları konakçı hücreye yarar sağlayan mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır. Günümüzde, özellikle Avrupa ve Japonya gıda marketlerinde, probiyotik özellik gösteren gıda maddeleri oldukça popüler olup, bu ülkelerin gıda pazarları dünya pazarları arasında başı çekmektedir (Saarela, M., 2007).

Probiyotikler, mide-bağırsak mikrobiyal dengesini sağlayarak veya bakterilerin bu şekilde gelişmesi sonucunda insan sağlığına yarar sağlayan ek canlı gıda gruplarıdır. Probiyotik bakterilerin insan sağlığı üzerindeki güçlü etkilerinin olmasının fark edilmesiyle birlikte bu yönde artan çalışmaların olması sadece yoğurt ve diğer fermente olmuş gıda maddeleri üzerine değil, aynı zamanda meyve ve sebze suları gibi süt ve süt ürünleri haricindeki gıda maddeleri üzerindeki ilgiyi de arttırmıştır. Günümüzde yapılan çalışmalar, Laktik Asit Bakterilerinin insan mide-bağırsak düzenindeki faydalı mikroorganizmaların gelişmesine katkıda bulunduğu, bu

mikroorganizmaların aktivitelerini arttırıcı özelliklerinin olduğu belirlenmiştir. Dolayısı ile LAB'lerinin probiyotik özellikte olduğu anlaşılmıştır (Saarela et al., 2005).

İlk olarak probiyotik özellik gösteren Laktik Asit Bakterileri fermente süt bazlı ürünler için formüle edilmişlerdir. Formülasyonların öncelikle olarak süt bazlı ürünler için hazırlanmış olmasının en önemli sebepleri olarak, birçok probiyotik Laktik Asit Bakterisi'nin süt bazlı ürün matrikslerinde daha etkili biçimde gelişme göstermeleriyle birlikte, düşük sıcaklık derecelerinde de saklanabilme özelliklerine sahip olmaları gösterilmiştir. Fakat, günümüzde bireylerin artık süt bazlı probiyotik ürünleri tüketmek yerine, süt ürünleri haricindeki probiyotik ürünleri satın alma eğilimlerinin bulunduğu anlaşılmıştır. Tüketicilerin bu tercihinin en önemli sebebi olarak birçok insanın laktoza ve belirli süt proteinlerine karşı alerjilerinin olması ve bu konuda bilinçlenmeleri olarak gösterilmiştir (Saarela et al., 2005). Diğer yandan, süt ürünlerinin içerdiği yüksek miktardaki kolesterol, tüketicilerin süt ve süt ürünlerini tercih etmemesinin diğer bir sebebi olarak belirtilmiştir (Shah, 2001).

Bazı gıda maddeleri kendi bünyelerinde doğal olarak insanlara sağlık açısından birçok yararlı etki sağlayan mikroorganizmalar barındırmaktadır. Bu mikroorganizmaların başında Laktik Asit Bakterileri gelmekte olup, Laktik Asit Bakterileri ile birlikte birçok bakteri türünün ve mayaların da probiyotik özellik gösterdiği bilinmektedir. Özellikle *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* ve *Enterococcus* türlerinin probiyotik özellik gösteren bakterilerden olduğu, bu bakteri türleri içinde ise *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium spp.*, ve *Lactobacillus casei* bakterilerinin diğerler bakterilere göre probiyotik özellik gösterme bakımından daha üstün özellikte olduğu yapılan çalışmalar tarafından bulunmuştur (Pereir ve diğ., 2011).

Lactobacillus ve *Bifidobacterium* üyeleri, süt ve süt ürünlerinin yanında, diğer fermente gıda maddelerinin de üretimlerinde eski yıllardan beri kullanılmaktadır. Bu bakterilerin, insan mide-bağırsak sisteminde doğal olarak bulundukları saptanmıştır. Diğer yandan, özellikle *L. acidophilus* ve *Bifidobacterium spp.* bakteri türleri temel probiyotik bakteriler olarak gıda üretiminde kullanılmakla beraber, özellikle yoğurt, süt yağı ve süt tozlarında ve dondurulmuş tatlı ürünlerinde kullanılmaktadırlar. Ayrıca, probiyotik organizmalar, toz, kapsül veya tablet halinde de piyasaya sürülmektedir (Shah, N., P., 2010).

Probiyotikler, farklı mekanizmalar kullanarak, insan sağlığına olumlu yönde katkıda bulunmaktadırlar. Bu mekanizmalar,

- Daha iyi sindirimin sağlanması, mineral ve vitaminlerin absorpsiyonun artması gibi besinsel geri dönüş değerinin artırılması,
- Bağırsaktaki laktoz sindiriminin teşvik edilmesi,
- Antibiyotik veya kolitin başlamasına sebep olan radyasyon üzerine bağırsağa karşı pozitif etki etme,
- Gıda patojenlerine karşı, bağırsak içi enfeksiyonları nleme,
- Rotavirüs ve kolite sebep olan *Clostridium* bakterisinin kontrol altında tutulması,
- *Helicobacter pylori* esaslı ülserlerin nlenmesi,
- Kabızlık ve hassas bağırsak sendromu gibi rahatsızlıklara karşı bağırsak hareketliliğin sağlanması,
- Bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi,
- Kolon kanserinin nlenmesi,
- Serum kolestrollerinin düşürülmesi,
- Böbrek ve karaciğer tarafından elimine edilen katabolik ürünlerin miktarının azaltılması,
- Osteoporoz'un nlenmesi,
- Allerjik reaksiyonların azaltılması,
- rogentital enfeksiyonların nlenmesi,
- Kan basıncını düşüren etkiye sahip olması olarak adlandırılabilir (Grkan ve diğ., 2010).

2.2.4. *Lactobacillus* grubu bakteriler

Lactobacillus türü, laktik asit bakteri grubu içinde yer alan ve sayıca en çok yer kaplayan türdür. Bakteriler gram pozitif, sporsuz çubuk vea kok-basil şeklinde olmakta, katalaz negatif özelliğine sahip olmakla beraber, güçlü şekilde fermente etme yeteneğine sahiptir. Fermentasyon metabolizmaları sonucunda ana bileşik olarak laktik asiti sentezlemektedirler. Aerotolerant veya anaerobik, asidurik ve asidofilik olmaları ile birlikte, gelişmeleri için kompleks besin maddelerine ihtiyaç duymaktadırlar. DNA yapıları %50 mol oranından daha düşük oranda sitozin+guanin içermektedir (Sanchez ve Sanz, t.y). Bu gruptaki bakteriler fakültatif anaerob

olmalarının yanında bazen de mikroaerofilik özellik göstermekte, havanın bulunduğu ortamlarda gelişmeleri oldukça düşük olmaktadır. Koloniler, 2-5 mm arasında olmakta, konveks, opak ve renksiz özellik göstermektedir. Bakterilerin optimum gelişme sıcaklığı da 30-40°C arasında olmaktadır (Holt ve diğ., 1998).

Lactobacillus grubu bakteriler, fenotip karakterine göre gruplara ayrılmakta ve ilk sınıflama bakterilerin optimal gelişme derecelerine ve heksoz şekerini fermente etme yoluna göre belirlenmiş ve 16S rRNA tekniği ile şu ana kadar başarılı bir şekilde sınıflandırılması sağlanmıştır. Sınıflanmaya göre, *Lactobacillus delbrueckii* grubu, *Lactobacillus casei-Pediococcus* grubu ve bazı *Lactobacilli* bakterilerini de içeren *Leuconostoc* grupları ortaya çıkmıştır (Sanchez ve Sanz, t.y). İlk gruba giren *Lactobacillus* türü bakterilerin %85'ine yakını glukoz şekerinden son ürün olarak laktik asit üretmektedirler. Bu gruba giren bakteriler obligat homofermentatif özellikte olup, genel olarak 45°C'de gelişme gösterirler. Bu gruptaki çoğu bakteri 15°C'de gelişme göstermezler. *L. delbrueckii* and *L. acidophilus* bakteriler bu gruba giren bakterilerdendir. Diğer bir gruba giren bakteriler ise aynı şekilde homofermentatif özellikte olup, 15°C'de gelişme gösterip, 45°C'deki gelişmeleri ise sınırlı olmaktadır. Ortamda eğer O₂ varsa, *L. casei* ve *L. plantarum* gibi bu gruba giren bakteriler asetat gibi daha okside olmuş ürünleri üretmektedirler. Diğer bir gruba giren bakteriler ise heterofermentatif özellikte olup, son ürün olarak laktik asit'in yanında CO₂ ve etanol de üretmektedirler. Bu gruba giren bakterilere örnek olarak *L. fermentum*, *L. brevis* ve *L. keferi* verilebilir (Todar, t.y).

Lactobacillus bakterilerinin peynirde starter kültürlerle birlikte veya süt fermentasyonunda sadece starter kültür olarak kullanılması mevcut olmakla birlikte, türün fakültatif ve obligat özellik gösteren bakterilerinin probiotik aktivite sağlanması veya üründe istenilen tat oluşumu gibi istenilen etkileri gösterebilirken diğer yandan gaz üretiminden oluşabilen ve istenilmeyen koku ve tat oluşumunun görüldüğü durumlar da olabilmektedir (Calasso ve Gobbetti, 2011).

Bakteriler genel olarak fermente olmuş süttten ve insanların mide-bağırsak sistemlerinden izole edilmekte ve bu gruptaki bakterilerin *Lb. gasseri*, *Lb. crispatus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. salivarius*, *Lb. reuteri*, *Lb. casei*, *Lb. ruminis*, *Lb. itulinus*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* ve *Lb. acidophilus* olarak adlandırıldığı belirtilmiştir (Matsuzaki, 2003).

2.2.4.1. *Lactobacillus brevis*

Lactobacillus brevis, microaerofilik, obligat heterofermantatif bir Laktik Asit Bakterisidir. Bakteri, heksoz şekerini fosfoketolaz yolu ile fermente ederek laktik asit, asetik asit, etanol ve CO₂ maddelerinin karışımını sentezlemektedir. *L. brevis* bakterilerinin %90'ından fazlasının arabinoz, fruktoz, glukoz, maltoz, glukonat, riboz şekerlerini ve, bakterilerin %11-89 oranının ise inüsilini, galaktozu, laktozu, rafinozu, sükrozu ve xylozu fermente edebildiği belirtilmiştir. Bakteri şekli tek ve kısa çubuk zincirleri şeklinde olabilmekte ve boyutları 0.7-1x2-4 mm arasında değişmektedir (Teixeira, 2004).

Lactobacillus brevis, *Lactobacillus* grubunun ikinci grubuna dahil olarak, *L.casei-Pediococcus* grubuna dahil olmaktadır. Bakteri, genel olarak süt, peynir, çeşitli tahıl grupları, fermente olmuş sebze ve etlerden ve insan ve hayvan sindirim sisteminden izole edilmiştir (Teixeira, 2004).

2.2.4.2. *Lactobacillus fermentum*

Lactobacillus fermentum, laktik asit bakteri grubuna giren gram pozitif, sporsuz, hareketsiz ve katalaz negatif özellikte olan bakteridir. Daha çok fermente olmuş gıdalarda ve hayvan sindirim sisteminde bulunabilmekte ve özellikle insanlar için heterofermantatif özellik gösteren bakterilerin başında gelmektedir. Bu grup bakterileri ayrıca endüstriyel fermentasyonda da kullanılmakta, özellikle süt ürünlerinin yapımında starter kültür olarak da tercih edilmektedir (Dickson,2005).

2.2.4.3. *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum, gram pozitif, sporsuz, hareket edebilen, mezofilik, mikraerobik bir bakteri türüdür. 10-15°C'de gelişmeleri mümkün olurken, 45°C'de gibi sıcaklıklarda gelişme gösterememektedir. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* ve *Lactobacillus paraplantarum* bakterileri '*Lactobacillus plantarum*' grubu bakterileri olarak anılmaktadırlar. Bu bakterilerin aynı gruba girmeleri'nin sebebi 16S rRNA tekniği ile ilgili bakteri genlerinin birbirlerine % 99.7–99.9 oranında benzer olmasıdır. Aynı zamanda, bu gruba giren bakteriler aynı fermentasyon yolunu kullanmaktadırlar (Corsetti ve Valmorri, 2011).

L.plantarum bakteri hücresinin büyüklüğü 0.9-1.2 x 3-8 mm civarında olup, hücre şekli ise genelde tek, kısa ve ikili zincirler şeklinde olmaktadır. Düşük pH'a karşı dirençli bir bakteri türü olup, en iyi şekilde gelişebildiği sıcaklık ise 30°C olmaktadır (Hui Y.H. ve diğ., 2004).

L.plantarum, fakültatif heterofermentatif bakteri grubuna girmekte olup, Embden–Meyerhof–Parnas yolunu kullanarak, heksoz şekerinin tamamı laktik asite ve diğer maddelere de dönüşmektedir. Bakteri, L(+) ve D(-) laktik asit cinsinin ikisini de sentezlemekte ve karbon kaynağı olarak arabinoz, sellibioz, fruktoz, galaktoz, glukoz, glukonat, maltoz, laktoz, mannitol, mannoz, melibioz, raffinoz, riboz, salisin, sorbitol, sukroz şekerlerini kullanmaktadır (Corsetti ve Valmorri, 2011).

2.2.4.4. *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei grubu genel olarak süt ve süt ürünlerinden izole edilmiş olup bu gruba giren bakterilerin özellikle *Lb. paracasei* veya diğer bir adı ile *Lb.paracasei subsp. paracasei* ve *Lb.rhmnosus* bakterileri olduğu belirtilmiştir. Bu bakteriler, genel olarak peynirin olgunlaşması sırasında starter olmayan Laktik Asit Bakterileri olarak işlev görmek ve peynirdeki tadın oluşumuna katkıda bulunmaktadır. *Lb. casei* grubundan seçilen bazı bakterilerin, peynire eklenerek, istenmeyen mikroorganizmaların gelişmesinin önüne geçilmek ve peynir kalitesini standart hale getirmek istenildiği de belirtilmiştir. Aynı zamanda, bu gruptaki bazı bakterilerin ise probiotik özellik göstermekte ve bu özelliklerinden dolayı fonksiyonel peynir veya süt içecekleri üretiminde kullanılmaktadır (Minervini, 2011).

Lb. casei grubuna giren bakteriler fenotip ve genotip olarak heterojen özellikteki bakterilerden oluşmakta ve çeşitli gıda maddelerinde bu gruptaki çeşitli bakteri türleri görülmektedir. *Lb. casei* gram pozitif, hareketsiz, sporsuz ve katalaz negatif özelliklerinde olan bir bakteridir. Hücreleri çubuk şeklinde olup 0.7-1.1 x 2-4 µm dolaylarında olmaktadır (Gobbetti, 2004).

2.2.4.5. *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*

Lactobacillus casei grubu, 1989 yılında yapılan bir çalışma neticesinde yeniden sınıflandırılıp, bu türün büyük bir çoğunluğu *Lb. paracasei subsp. paracasei* olarak sınıflandırılmıştır. Bakteri, *L. casei* ve *L.casei spp.* tolerans bakterileri gibi 0°C'de gelişme gösterirken, 45°C'de gelişme gösterememekte ve *L. rhamnosus*

bakterisinden de farklı olarak, ramnoz şekerini fermente edememektedir. Bakterinin bazı suşları ise laktik asit'in hem L(+) hem de D(-)formunu sentezlemektedir (Minervini, 2011)

2.2.4.6. *Lactobacillus salivarius*

Lactobacillus salivarius, üzerinde çok çalışılmayan bakteri türlerinden biridir. *L. salivarius*'un sentezlediği L-laktat, asetat, hidrojen peroksit gibi maddeler dolayısı ile antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Martín ve diğ., 2006).

2.2.5. *Lactococcus* grubu bakteriler

Lactococcus türüne ait bakteriler, gram pozitif, sporsuz, hareketsiz ve fakültatif anaerob ve homofermentatif bakterilerdir. Sulu ortamlarda, ikili veya salkım halinde görülebilmektedirler. Hücre şekilleri, oval veya küre şeklinde olup, hücre boyutları 0.5-1.2 x 0.5-1.5 µm olmaktadır. Bakteriler, 10°C gibi düşük sıcaklıklarda gelişme gösterebilirlerken, 45°C gibi yüksek sıcaklıklarda ve % 0.5 NaCl içeren ortamlarda gelişme gösterememektedirler. Bakterinin optimum olarak belirlenen gelişme sıcaklığı 30°C dolaylarında olmakta ve bakteriler katalaz ve oksidaz testlerine karşı negatif sonuçlar vermektedir. Bakteriler, birçok şekeri fermente ederek laktik asitin L(+) formunu üretmektedirler. Fermantasyon sırasında herhangi bir gaz çıkışı görülmemektedir (Holt ve diğ., 1998).

Lactococcus bakterileri geniş ölçüde süt ürünlerinin eldesinde kullanılan bir bakteri grubudur. Özellikle, kesilmiş süt ve krema, laktik yağlar, çökelek ve lor peyniri gibi yumuşak peynirler ve cacambert, roquerfort gibi sert peynirler bu bakteri türünü yoğun olarak içermektedir (Ward ve diğ., 2002).

Lactobacillus lactis bakterisinin *lactis* ve *cremoris* olmak üzere iki adet alt grup suşu da mevcuttur. *Lactococcus* bakteri grubu diğer Laktik Asit Bakterilerinden pH'a, tuz konsantrasyonuna ve sıcaklığa toleransları bakımından ayrılmaktadırlar (Todar, t.y.).

2.2.5.1. *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis, mezofilik *Lactococcus* bakteri grubunun bir üyesi olup, endüstride ve starter kültür kullanımının gerektiği yerlerde en çok tercih edilen bakterilerden biridir. Süt ve süt ürünlerinin fermentasyonu sırasında, bakterinin

görevi, laktozdan laktik asit oluşumunun sağlanmak ve süt proteinlerinin tat veren bileşenlere dönüşümünü sağlamaktır (Mills ve diğ., 2011).

Lactococcus lactis, küre veya oval şeklinde, gram pozitif, katalaz negatif, fakültatif anaerob, hareketsiz ve sporsuz bir bakteri türü olup, bakterilerin fermentasyonda kullanılıp kullanılamayacağını belirleyen özellikler, bakterilerin plazmidlerinde kodlanmıştır (Mills ve diğ., 2011). Ayrıca, *Lactococcus lactis* bakterisi üç alt türe sahip olup, bu türler *Lactococcus subsp. cremoris*, *Lactococcus subsp. hordniae* ve *Lactococcus subsp. lactis* olarak adlandırılmışlardır (Holt ve diğ., 1998).

2.2.5.2. *Lactococcus lactis subsp. lactis*

Lactococcus lactis türüne ait özelliklerin birçoğu, *Lactococcus lactis subsp. lactis* bakterisi için de geçerli olmaktadır. *Lactococcus lactis subsp. lactis* bakterisi arginini hidrolize edebilen, 40°C gibi yüksek sıcaklıklarda ve %4 tuz içeren ortamlarda canlılığını koruyabilen bir bakteridir. Buna ek olarak, bakteri laktozu kullanarak asit üretmekte fakat mannitol ve rafinoz şekerini kullanamamakta ve dolayısı ile asit üretememektedir (Holt ve diğ., 1998).

2.2.5.3. *Lactococcus raffinolactis*

Lactococcus raffinolactis, *Streptococcus raffinolactis* olarak da bilinmektedir. Bakteri, genel olarak süt ve süt ürünlerinde doğal olarak mevcut olmakla beraber, kazeinolitik aktivitelerinin az olması nedeni ile ise süt ürünlerinin yapımında kullanılamamaktadır. Bakteri şekilleri oval olup, ikili veya kısa zincir halinde bulunurlar. Bakteri hücreleri 40°C’de ve pH 9.2 veya %4’lük NaCl gibi ortam koşullarında ise gelişme gösteremekte ve arginin’i hidrolize edemektedir. Bunun yanında, meliboz ve rafinoz gibi galaktoz şekerini fermente etmektedir (Boucher ve diğ., 2003).

2.2.6. *Leuconostoc* Grubu Bakteriler

Leuconostoc bakterileri fakültatif anaerob, gram pozitif olup, kok şeklinde ikili veya zincir şeklinde bulunabilmektedirler. Bu gruba giren bakteri türleri heterofermentif olup, son ürün olarak laktik asit’in D(-) formunu, etanol, asetat ve CO₂ oluşturmaktadır. Ayrıca, bakteri sitrat metabolizmasına sahip olduğu için, metabolizma reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan doğal C₄ bileşikler olan diasetil, asetoin gibi maddeler özellikle süt ürünlerinin üretimi sırasında, gıda maddesine özel

aroma ve tat kazandırmaktadır. Diğer yandan, bu gruptaki bakteriler asetaldehit üretimine de sahip olduğu görülmüştür. Asetaldehit üretimi dolayısı ile *Leuconostoc* bakterileri starter kültür olarak da kullanılmaktadır (Tomas ve Bou, t.y.).

Leuconostoc bakterileri doğal olarak süt, üzüm, yeşillik, et ve et ürünleri gibi besin maddeleri ile beraber bazı sebzelerde ve şekerde bulunduğu saptanmıştır. Ayrıca, bu bakteri grubuna giren Laktik Asit Bakterileri, süt ve süt ürünlerinin fermente olmasında, aromatik bileşikler oluşturma yönünden önemli bir yere sahiptir (Tomas ve Bou, t.y.)

2.2.6.1. *Leuconostoc lactis*

Leuconostoc lactis bakterisi *Leuconostoc* bakteri grubuna giren bakterilerin başında olmaktadır. Bakteri sarı pigmentlere sahip olmamakla beraber, asit üretmek için sukroz, maltoz ve fruktoz şekerini kullanabilmekte buna karşın L-arabinoz şekerini kullanamamaktadır. Bakteri 4.8 pH değerine sahip olan ve % 10 etanol içeren ortamlarda gelişme gösterememekte, buna karşın ortam sıcaklığının 37°C olduğu ortamlarda gelişme gösterebilmektedir (Holt ve diğ., 1998).

2.2.6.2. *Leuconostoc mesenteroides*

Leuconostoc mesenteroides bakterisi de *Leuconostoc* bakteri grubuna girmekte olup, *Leuconostoc subsp. cremoris*, *Leuconostoc subsp. dextranicum* ve *Leuconostoc subsp. mesentreroides* bakterilerinin içine girdiği bir grubun da ismi olmaktadır. Bu gruptaki *Leuconostoc subsp. cremoris* bakterisi sarı pigmentlere sahip değildir. Asit üretmek için, L-arabinoz, fruktoz, sükroz gibi şekerleri kullanamamakta ve maltoz ve meliboz şekerinin kullanımı hakkında ise kesin bir veri bulunmamaktadır. Bakteri 4.8 pH değerine sahip olan, % 10 etanol içeren ve ortam sıcaklığının 37°C'de olduğu durumlarda iken gelişme gösterememektedir. *Leuconostoc subsp. dextranicum* bakterisi ise aynı şekilde sarı pigmentlere sahip değildir. Asit üretmek için, L-arabinoz şekerini kullanamamakta fakat fruktoz, maltoz, meliboz, sükroz gibi şekerleri kullanabilmektedir. Bakteri 4.8 pH değerine sahip olan, % 10 etanol içeren ve ortam sıcaklığının 37°C'de olduğu durumlarda iken gelişme gösterememektedir. Ayrıca, Bakteri 4.8 pH değerine sahip olan ve % 10 etanol içeren ortamlarda gelişme gösterememekte, buna karşın ortam sıcaklığının 37°C olduğu ortamlarda gelişme gösterebilmektedir. Grubun en son üyesi olan *Leuconostoc subsp. mesentreroides* bakterisi de aynı şekilde sarı pigmentlere sahip değildir. Asit üretmek için, L-

arabinoz, fruktoz, süktroz, maltoz gibi şekerleri kullanabilmektedir. Ayrıca, bakteri 4.8 pH değerine sahip olan ve % 10 etanol içeren ortamlarda gelişme gösteremezken, ortam sıcaklığının 37°C’de olduğu durumlarda ise gelişmeleri belirlenememiştir (Holt ve diğ., 1998).

2.2.6.3. *Leuconostoc citreum*

Leuconostoc citreum bakterisi sarı pigmentlere sahip bir *Leuconostoc* grubuna giren bir bakteri olup, asit üretmek için, L-arabinoz, fruktoz, süktroz, maltoz gibi şekerleri kullanabilmekte fakat melioz şekerini kullanamamaktadır. Ayrıca, bakteri 4.8 pH değerine sahip olan ve % 10 etanol içeren ortamlarda gelişme göstermeleri ise belirlenememiştir (Holt ve diğ., 1998).

2.3. Laktik Asit Bakterilerinin İnhibasyon Mekanizması

LAB, çok sayıda antimikrobiyal maddeler sentezlemektedir. Birçok antimikrobiyal ajanların amacı, mikrobiyal aktivitenin düşürülmesi veya durdurulmasıdır. Gıda endüstrisinde, laktik asit veya laktat’ın antimikrobiyal uygulamaları genel olarak iki basamakta gerçekleşmektedir. İlk olarak, kesim tesislerindeki sığır kaskaları gibi ürünlerde kontaminasyonu önlemek için kullanılmakla beraber, taze veya yarı işlenmiş gıdaların raf ömrünün uzatılmasında da kullanılmaktadır. (Bogaert ve Naidu, 2000). Birçok inhibisyon mekanizması olmasına rağmen, iki ana mekanizma LAB’nin diğer mikroorganizma inhibisyonunu sağlaması için temel oluşturmaktadır. Bunlardan ilki, ortamın pH’ın düşürülmesini sağlayan laktik asit kapasitesi ve mikroorganizmanın hücre duvarından içeriye girişi sağlayamaya yardımcı olan laktik asitin protonize olmuş lipofilik karakteri olmaktadır. İkinci mekanizma ise, gıdaların su aktivite dengesinin özellikle sodyum laktat tarafından bozulmasıdır (Bogaert ve Naidu, 2000).

2.3.1. pH etkisi:

Birçok mikroorganizmanın, inorganik asitlere göre organik asitlerin antimikrobiyal özelliklerine karşı daha hassas oldukları ortaya çıkmıştır. Ortamın pH’nın düşmesi, birçok mikroorganizmanın inhibe olmasını sağlamaktadır. Mikroorganizmaların inhibisyonu, organik asitlerin hidrofobik karakteristik özelliği ile ilgili olmakta ve bu özelliğin uçucu yağ asitleri sebebiyle ortaya çıktığı belirlenmiştir. Difüzyon prosesi

hücresinin içindeki ve dışındaki pH değeri ile özmolarite dolayısı ile kendiliğinden gerçekleşmektedir. Genel olarak, hücresinin içindeki pH değeri, hücre dışındaki pH değerinden daha fazla olmaktadır. Asit hücreye girer girmez çözünmeye başlamakta ve protonların serbest kalması dolayısı ile hücre içinde pH düşmektedir. Genellikle, mikroorganizmalar için optimum bir hücre içi pH değeri bulunmamakla beraber, asite dayanıklı mikroorganizmaların hücre içi pH değeri 6.5-7, nötr pH'larda gelişme gösteren bakterilerin hücre içi pH değeri 7.5-8 ve alkali ortama dayanıklı bakterilerin ise hücre içi pH değeri 8.4-9 değerleri arasında olduğu bulunmuştur. Mikroorganizmalar, iç pH değerini sabit tutmaya eğilimli olmakta ve bu kabiliyet her bakteriye göre değişkenlik göstermektedir. Fermentatif özellik gösteren bakteriler, diğer bakterilere göre hücre içinde daha geniş bir aralıkta gelişme özellikleri bakımından stabil durumda olmakta ve bu özellikleri transmembran taşıma olgusu ile açıklanmaktadır. Ayrıca, yapılan çalışmalar neticesinde bakteri gelişiminin proton varlığından olduğu gibi anyon varlığından da etkilendiği gözlemlenmiştir. Örneğin, laktat anyonu, fermentasyon prosesi sonucunda üretilen propiyonat, sorbat ve asetat gibi diğer anyonlara göre daha farklı bir davranış karakteri göstermektedir. Fermente olmayan gıdalarda ise pH değeri nötr değerine yakındır (Bogaert ve Naidu, 2000).

2.3.2. Su aktivitesi etkisi

Gıda ürününün su aktivitesinin düşmesi veya değişmesi mikroorganizmaların gelişmesini sınırlayıcı bir etkidir. Özellikle sodyum laktatın su aktivitesini (a_w) düşürme etkisi, eşit konsantrasyondaki diğer organik asitlere veya sodyum klorite göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada sodyum laktatın, su aktivitesini düşürme özelliği bakımından sodyum klorit'e göre daha az etkiye sahip olmasına rağmen, etkisinin eşit konsantrasyondaki sodyum sitrata göre daha fazla olduğu belirtilmiştir. Bunun yanında, diğer bir çalışma grubu yaptıkları deneylerle sodyum laktatın ve sodyum klorit'in su aktivitesi üzerinde aynı etkiye sahip olduğunu ve su aktivitesi değerinin ise 0.089 ile 0.89 mol/L arasında değiştiğini göstermişlerdir (Bogaert ve Naidu, 2000).

Buna ek olarak, bu iki tuzun gösterdiği etki bakterilerin türüne göre değiştiği belirlenmiştir. Örneğin, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogens*, *Staphylococcus aureus* ve *Brochotrix thermosphacta* bakterilerinin laktata karşı klorit'ten daha hassas oldukları saptanmıştır. Ayrıca, gram pozitif bakterilerin, gram

negatiflere göre sodyum laktat uygulamalarında daha dirençli olduğu ortaya çıkmıştır. Diğer ortam koşulları aynı zamanda önemli olup, antimikrobiyal maddenin etkinliğini artırmakta veya azaltabilmektedir. Organoleptik özellikler olarak da, sodyum laktat'ın, sodyum klorat'a göre beş kere daha az tuzlu olduğu anlaşılmıştır (Bogaert ve Naidu, 2000).

2.3.3. Diğer etkiler

Laktik asit gıda uygulamalarında, şelatlama amacı ile de kullanılmakta olup, polifosfat, sitrat ve etilendiamintetraeterik (EDTA) asit maddeleri bu kullanımda önemli olmaktadır. Aynı şekilde hidroksikarboksilik asit de şelatlama amacı ile kullanılmaktadır. Ayrıca, demir şelatlama özelliği olan bu maddelerin, laktat'ın antilisterial etkisinin gelişimine katkı sağladığı ve gıda yağlarının stabilizasyonunu sağladığı belirtilmiştir (Bogaert ve Naidu, 2000).

Laktik Asit Bakterilerinin ürettiği antimikrobiyal maddeler tarihin en eski zamanlarından bu yana öncelikle gıdaların korunması amacı ile kullanılmaktadır. Önce süt'ün korunmasında kullanılan bu maddeler, fermate olmuş sebzelerin korunmasında da zaman içinde kullanılmıştır (Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

Fermentasyon prosesi sonucunda, ilgili şekeri parçalanarak, geniş bir aralıkta antimikrobiyal özellik gösteren düşük molekül ağırlığında olan maddelerin sentezi gerçekleşir. Bu moleküllerin en yaygın olarak bilinenleri laktik, asetik ve propiyonik asittir. Bu asitlerin haricindeki diğer antimikrobiyal özellik gösteren maddeler, farklı LAB'leri tarafından üretilmektedirler. Buna ek olarak, insan mide-bağırsak sisteminde bazı bakteriler diğer bakteriler ile yarışarak, ortamın asitlenmesi veya diğer mikroorganizmaya karşı üretilen toksin gibi değişen çevre koşulları dolayısı ile diğer mikroorganizmaları ile girdikleri yarışı kazanmaktadırlar (Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

2.4. Laktik Asit Bakterilerinin Üretmiş Olduğu Antimikrobiyal Maddeler

Laktik Asit Bakterilerin üretmiş olduğu antimikrobiyal özellik gösteren maddelerin başında organik asitler gelmektedir. Organik asitleri, hidrojen peroksit, karbondioksit (CO₂), dieasetil ve diğer düşük molekül ağırlıklı maddeler izlemektedir.

2.4.1. Organik asitler

Heksoz şekerinin fermentasyonu sonucunda, heterofermentatif LAB'leri eşit mol sayıda laktik asit, asetik asit ve CO₂ üretirler. Yapılan deneyler sonucunda zayıf asitlerin antimikrobiyal etkilerinin doğal pH değerine göre daha düşük pH değerinde daha etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Asetik asit en güçlü inhibitör olup, maya, bakteri ve küf olmak üzere geniş bir alanda mikrobiyal inhibisyon özelliğine sahiptir. Bunun yanında propiyonik asit ise özellikle maya ve bakteriler üzerinde güçlü inhibisyon özelliğine sahiptir. Asetik ve propiyonik asitin antimikrobiyal aktiviteleri incelendiğinde, laktik asit'in antimikrobiyal aktivitesine göre daha yüksek bir pKa özelliğine sahip oldukları ve bu değerlerin asetik asit için 4.87, propiyonik asit için 4.75 ve laktik asit için ise 3.08 değerine karşılıktır. Örneğin, pH değerinin 4 olduğu bir ortamda, laktik asitins sadece %11'i ayrışmamışken asetik asit'in %85'inin ve propiyonik asitin ise %92'sinin ayrışmadığı saptanmıştır. Diğer bir deyişle, düşük pH değerinde en yüksek çözünmeyi laktik asit sağlamakta, bu sonucu sırasıyla asetik asit ve daha sonra da propiyonik asit izlemektedir. Buna ek olarak, bir asit karışımına bakıldığında, asetik asit ve propiyonik asit güçlü bir şekilde çözünmez iken, pH'ın düşmesine en başta laktik asitin sebep olduğu ve asıl antimikrobiyal ajanın laktik asit olduğu anlaşılmıştır.

Ayrıca, yapılan bir çalışmada, asetik ve laktik asit'in birlikte kullanıldığı taktirde *Salmonella enterica ser. var. typhimurium* patojeninin daha etkili bir şekilde yok edildiği gözlenmiştir. Bu çalışmada, asitlerin birlikte kullanımının sinerjik etki yarattığı ve ayrıca ortamın pH'ının daha da düşürüldüğü taktirde laktik asitin mikroorganizma hücresinin geçirgenliğini artırarak, diğer antimikrobiyal maddelerin etkinliğini de desteklediği ortaya çıkmıştır (Bogaert ve Naidu, 2000).

Ortamdaki çözünmeyen asitler mikrobiyal inhibisyonu sağlamakta ve çözünmeyen asit moleküllerinin zayıf asitlerin toksik formları olmaktadır. Organik asitlerin çözünmeyen yani doğal olan bu formları yağda çözünür olduğu için hücre zarına kolayca diffüze olmaktadır. Ayrıca, hücre sitoplazma pH'ının nötr seviyesinde olmasından dolayı asitler hücre içine girdikten sonra buarada çözünmeye başlamaktadırlar. Bazı çalışmalar hücre içinin asitlenmesiyle beraber hücre içindeki pH değerinin değişmesini , protonların hücre içine girmesini sebep olarak gösterirken, diğer çalışmalar yalnızca protonların hücre içine girmesi değil, aynı zamanda anyonların hücre içinde birikmesinin de sebeplerden biri olduğunu

belirtmiştir. Anyonlar makromoleküllerin sentez oranını düşürerek, tüm hücre içindeki transport işlevlerini etkilemektedirler. LAB ve diğer bakteriler anyon birikmesini kendi sitoplazma içi pH'ın düşürülerek etkisiz hale getirmektedirler (Bogaert ve Naidu, 2000).

2.4.1.1. Laktik asit

Laktik asit hayvan, bitki veya mikroorganizma gibi değişik hayat formlarında bulunan bir madde olup, karbonhidrat ve amino asit metabolizmasının bir ara ürünü olarak kendisini göstermektedir. Aynı zamanda, laktik asit optik izomerlerin olduğu karışımlarda kendisini değişik oranlarda göstermektedir (Bogaert ve Naidu, 2000).

Laktik asit genel olarak hemen hemen her dokuda mevcut olup, özellikle biyolojik salgılarda miktar olarak fazla derecede bulunmaktadır. Örneğin, kan'da 1.4 $\mu\text{mol/ml}$, sperm'de 4.1 $\mu\text{mol/ml}$, ürin'de 0.3 $\mu\text{mol/ml}$ olarak bulunmuştur. İnsan vücudunda laktik asit'in L(+) formunun daha baskın olduğu görülmekle beraber, ürin'de laktik asit'in D(-) formuna da rastlanmıştır (Bogaert ve Naidu, 2000). Laktik asit'in D(-) formu, karaciğer tarafından metalobize edilmekte olup, laktik asit'in bu yüzden hepatik yetmezlik yaşayan ve özellikle üç yaşın altı çocuklara gıda olarak verilmemesi tercih edilmektedir. Biyolojik sistemlerde, laktik asit'in L(+) formu, pürivik asit'in indirgenmesi ile oluşmaktadır. Bu hidrojen transferi NADH bazlı enzim olan, laktat dehidrogenaz enzimi ile gerçekleşmekte ve laktik asit seviyesi piruvat konsantrasyona göre ve NADH/NAD⁺ oranına göre değişmektedir. Ayrıca, laktik asit bileşen konsantrasyonlarının bazı özel dokulara göre değişmesinin yanında, bir istisna olarak, iskelet kaslarındaki tüm hücrelerde laktat/piruvat oranı her zaman sabit olmaktadır. Yeteri kadar oksijenin bulunduğu ortamlarda, laktat 12 mol, pürivat ise 1 mol oluşmakta ve bu oran hep sabit kalmaktadır. Laktat ve pürivat molekülün hidrofobik doğası gereği, bu moleküller hücre zarına kolaylıkla girebilmektedir. Hücre zarı kandaki bu iki molekül konsantrasyonu ve NADH/NAD⁺ redoks dengesi arasında direk bir ilişki kurmaktadır (Bogaert ve Naidu, 2000). Ortamda eğer oksijen varsa, kas hücrelerine beslenen enerji, adenosin trifosfat (ATP) yada keratin fosfat gibi enerji bileşiklerini sentezleyen glikozun oksidatif indirgenmesiyle sağlanmaktadır. Eğer ortamda gerekli oksijen mevcut değilse veya fiziksel aktivite gibi ihtiyaç olunandan daha fazla miktarda enerji gerektiğinde, gerekli olan enerji glikoliz yolu ile sağlanmaktadır. Glikoliz reaksiyonu, kaslardaki laktik asitin birikmesine sebep olmaktadır. Bununla beraber, fazla asit kan akışına

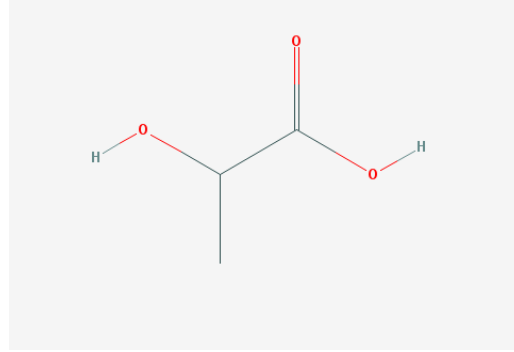
diffuz ederek karaciğer ve böbrek tarafından absorbe edilir. Fazla asit, karaciğer ve böbrek tarafından emildikten sonra, burada glikoz ve glukojen sentezi için kullanılır ve bu metabolik durum laktik asitin oksidatif indirgenmes sonucunda açığa çıkan enerjiyi kullanır (Bogaert ve Naidu, 2000).

1930 yılında, Meyerhof, kullanılan laktik asit ile okside olan laktik asit oranının beşe bir oranında olduğunu bulmuştur. Laktik asit, karaciğerde veya böbrekte yeniden bir senteze gidildiği takdirde, glikoz molekülü kan akışına sirküle olarak enerjiye veya laktik asite dönüşümün sağlandığı kas hücrelerine ulaşır. Bu döngüye, 'Cori' döngüsü adı verilmektedir. Glukoz ve % 6 oranındaki toplam glukoz hacminin oluşturduğu en az % 40 oranındaki laktik havuzun, 'Cori' döngüsü yardımı ile geridönüşümü sağlanmaktadır. Yapılan çalışmalara göre, laktik asitin yetişkin bir erkekteki günlük geri dönüşüm oranı 120-150 g arasında olduğu belirtilmiştir (Bogaert ve Naidu, 2000).

Laktik asit, bir çok mikroorganizma tarafından sentezlenmektedir. Özellikle bazı grup bakteri türleri yüksek miktarlarda laktik asit sentezlemektedirler. Bu grup bakteriler, *Lactobacillus*, *Sporolactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve *Bifidobacteria* olarak isimlendirilmektedir (Bogaert ve Naidu, 2000).

Laktik asit'in iki izomerlerinin ikisi de *Lactobacillus* türü tarafından sentezlenmektedir. Yapılan çalışmalarda, özellikle *Lb. maltaromicus*, *Lb. agilis*, *Lb. sharpae*, *Lb. amylophilus*, *Lb. murinus* bakterilerin sadece laktik asit'in L (+) formunu sentezlediği ve buna karşılık *Lb. delbrueckii*, *Lb. vitulinus*, *Lb. coryniformis* bakterilerinin ise laktik asit'in D(-) izomerini sentezlediği görülmüştür. Diğer yandan, *Lb. plantarum* ve *Lb. helveticus* bakterilerinin ise laktik asit'in iki adet izomerini yani hem L (+) hem de D(-) formunu ürettikleri görülmüştür. pH derecesinin ve bakteri türlerinin yaşının, L(+)/D(-) üretilme oranını etkilediği saptanmıştır. Bunun yanında, laktik asit'in stereospesifiklik özelliği, pürivat'ın laktoza dönüştürülmesinde etkin rol oynayan bir veya diğer laktat dehidrogenaz enziminin varlığından etkilenmektedir. Laktat dehidrogenaz enzimi, laktik asitin iki formunu birlikte üretiminde kullanılmaktadır. Buna bağlı olarak, saf kültürlerde laktik asit'in L(+) ve D(-) formlarını üretmek için birbirinden bağımsız laktat dehidrogenaz enzimi'ni üreten iki adet gen bulunduğu anlaşılmaktadır. Fakat, rasemaz adı verilen enzim *Clostridium butylicum* veya *Lactobacillus sake* bakterilerinde olduğu gibi bu iki izomeri diğer formlara dönüştürmektedir (Bogaert ve Naidu, 2000).

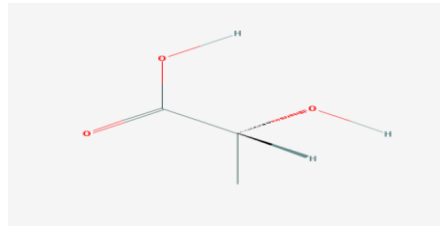
Laktik asit üretiminde kullanılan, fermente edilen substrat genelde heksoz şekeri olmaktadır. Fakat, özellikle bifidobakteriyal fermentasyon prosesi oldukça özel bir proses olmakta ve laktik asit sentezi iki farklı yoldan meydana gelebilmektedir. Bu iki farklı yol homolaktik ve heterolaktik olarak adlandırılmakla beraber, her iki durumda da sadece laktik asit üretilmekte veya laktik asit, etanol, carbondioksit veya asetat gibi diğer yan ürünlerle beraber üretilmektedir (Bogaert ve Naidu, 2000). Şekil 2.3’de laktik asit molekülünün yapısı gösterilmiştir.



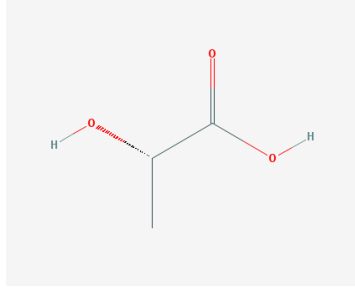
Şekil 2.3 : Laktik asit molekülünün yapısı (Anonim, 2011a).

2.4.1.2. Laktik asit molekül özellikleri

Laktik asit zayıf asitler sınıfında giren bir asit çeşidir. Yapısında bulunan asimetrik karbon atomuna sahip olması nedeni ile L(+) ve D(-) formları olarak adlandırılan farklı stereoisomerlere sahiptir. Artı ve eksi işaretler, molekülün polarize ışıktaki dönme yönünü temsil etmekle beraber, artı işaret sağ yönü (dextro), eksi işaret ise sol yönü (levo) göstermektedir. Laktik asit’in stereoisomerlerinin uzaydaki görünüşleri L ve D sembolleriyle ifade edilmesi, iki gliseraldehit izomerleriyle bağlantılıdır. Molekülün su içermediği durumlarda, 16.4°C’de ve optik olarak aktif asitlerin, rasemik karışımın %50 oranını içerdiği durumlarda, sıcaklığın 52.7-52.6°C gibi yüksek derecelere çıktığında eriyen beyaz katı kristal şekline dönüştüğü saptanmıştır (Bogaert ve Naidu, 2000). Şekil 2.4 ve şekil 2.5’de D-laktik asit molekülünün yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.4 : D-laktik asit molekülünün yapısı (Anonim, 2011b).



Şekil 2.5 : L-laktik asit molekülünün yapısı (Anonim, 2011c).

Bunun yanında, optik aktivite, herhangi bir laktik asit molekülü hem karboksilik hem de hidroksil gruplarını içermektedir. Bu iki grup, ya asit olarak ya da alkol olarak çeşitli reaksiyonlara girebilmektedirler. Bu grupların çift yönlü fonksiyonel özellikleri, çözelti konsantrasyonunun termodinamik dengesini sağlayan boşalan su ile birlikte, esterlerin moleküller içi formlarının doğal bir şekilde oluşmasını sağlamaktadır (Bogaert ve Naidu, 2000). Bu yoğunlaşma reaksiyonunun kinetiği sıcaklığa, kataliz türlerine (Lewis Asitleri) ve çözelti dengesindeki farklılıklara bağlıdır. Her esterifikasyon reaksiyonunda olduğu gibi, oluşan oligomerlerin hidrolizleri sonucunda ortaya çıkan su, reaksiyonun geri dönüşümlü olmasını sağlamaktadır. Bunun yanında, laktik asit çözelti konsantrasyonunun ve ısıtma sırasında oluşan laktik asit oligomerleri, atmosferik basınç altında saf ürünün kaynama noktasının doğru bir şekilde ölçülmesini olanaksız kılmaktadır (Bogaert ve Naidu, 2000).

Laktik asit, 25°C’de 3.86 pKa değerine sahiptir. pH değeri arttıkça, daha fazla asit molekülü çözülmeye eğilimli olduğu görülür. Ayrıca, aynı pH değerinde farklı asitlerin pKa değerleri düşükse, hangi asitin pKa değeri daha düşükse o çözülmeye daha elverişli olmaktadır. Asit protinize olmuşsa yani çözülmemişse, asitin antimikrobiyal özellik göstermek kabiliyeti daha fazla olmaktadır. (Bogaert ve Naidu, 2000).

Laktik asit’in tuzları çok sayıda olup, yapılan çalışmalar laktik asit’in elliye yakın metal ve laktat iyonuna sahip yirmiye yakın çift tuzları olduğunu göstermiştir. Özellikle sodyum ve potasyum laktatlar, genel olarak laktik asit’in hidroksit veya metalik iyon karbonatının reaksiyona girmesi ile üretilmektedir. Bu laktatlar, ya katı toz ya da ağırlıkça %50 veya %60 olan sulu çözelti olarak görülmektedirler (Bogaert ve Naidu, 2000).

Genel olarak, laktik asit ve laktatlar gıda endüstrisinde potansiyel laktik asitin asitlendirilmesinde, sodyum ve potasyum laktatların pH'ını dengeleyici olmalarında, sodyum laktat tarafından su aktivitesinin düşürülmesinde, askorbik asit gibi yaygın antioksidanlarla beraber kullanılarak sinerjik etkinin yaratılmasında ve antimikrobiyal madde olarak yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Bogaert ve Naidu, 2000).

Gıdalarda bulunan laktik asit içeriğinin anlaşılmasında, Association of Official Analytical Chemists (AOAC) metotları referans alınmaktadır. Uçucu asitlerin gıda örneklerinden ayrışmasında buhar distilasyonu kullanılmaktadır. Asit karışımlarının ayrılmasında ise distilat, silisilik asit kolonları kullanılmasının yanında, bileşen asitler ise kağıt veya ince tabaka kromatografisi ile ayrılmaktadır. Gaz kromatografisi ise asit türevlerinin tayini için kullanılmakta ve bileşikler kolonda kalma zamanına göre tanımlanmaktadır. Bunun yanında, değişik Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) metotları, gıdanın asit içeriğinin belirlenmesinde geliştirilmiş olup, bu tayin için özellikle HPLC'nin iyon dışlama kromatografisi ile birlikte kullanımı oldukça yaygındır. Buna ek olarak, laktik asit tayininde enzimatik analiz yöntemleri de kullanılmaktadır (Bogaert ve Naidu, 2000).

2.4.1.3. Laktik asit'in üretimini etkileyen faktörler

Laktik asit üretimini etkileyen şartları üç ana başlık halinde toplamak mümkün olabilmektedir.

1. pH'ın Etkisi: Laktik asit üretimini etkileyen en önemli ve kritik faktör pH olmaktadır. Laktik Asit'in optimal üretimi için pH değerinin 5.0-6.0 arasında olması önem arz etmektedir.
2. Oksijen Varlığı: Özellikle küf fermentasyonu sırasında, laktik asit oluşumu için, aerobik ortam sağlanması ihtiyacı dolayısı ile oksijen bu ortamın hazırlanmasında önemli bir oynamaktadır.
3. Sıcaklık: Sıcaklık değeri, laktik asit fermentasyonunda önemli rol oynayan diğer bir etkidir (Theron ve Rykers t.y.).

2.4.1.4. Laktik asit'in diğer organik asitlerle karşılaştırılması

Genel olarak, laktik asit'in sorbik, benzoik, probiyonik ve asetik asitten daha az etkili olduğu düşünülmektedir. Laktik asit'in pKa değerine göre, ortamda yüksek pH

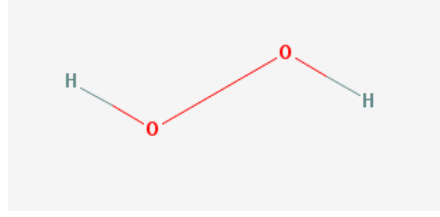
düşüşleri beklenebilirken, büyük oranda bakteri gelişimini engelleme etkisi beklenememektedir. Fakat, verilen pH değerinde, laktik asit diğer asitlere göre daha fazla miktarda iyonize olmaktadır. *Yersinia enterocolita* üzerinde yapılan bir çalışmada, asitlerin ortamın pH değerine göre belirlenen antimikrobiyal etkileri sırasıyla karşılaştırılmış ve güçlü etki sırasına göre propiyonik asit, laktik asit, asetik asit ve en son da sitrik asit oldukları belirlenmiştir. Bunun yanında, asitin çözünen kısmı dolayısı ile sağlanan antimikrobiyal özelliğin ise, laktik asitte en çok, propiyonik asitte orta derecede ve en az olarak da asetik asit de görüldüğü belirlenmiştir. Ayrıca, eşit mol konsantrasyonundaki antimikrobiyal aktivitenin en çok sitrik asitte belirlendiği, daha sonra sırasıyla laktik, propiyonik ve asetik asitle devam ettiği gözlemlenmiştir. Yapılan bu çalışma, diğer çalışmalarla desteklenmiş olup, asitler arasında çok önemli bir farkın bulunmadığı, yaratılabilecek farkın ise konsantrasyon miktarından olabileceği belirtilmiştir (Bogaert ve Naidu, 2000).

Diğer yapılan çalışmalarda ise, laktik asit'in diğer asitlere göre patojen ve gıdalarda bozulmaya sebep olan bakterilerin inhibisyonu konusunda daha büyük potansiyel bir etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca, asitlerin beraber kullanımının sinerjik etki yarattığı ve daha etkili sonuçların alındığı diğer gözlemlenen konulardan olmuştur (Bogaert ve Naidu, 2000).

2.4.2. Hidrojen peroksit

Ortamdaki oksijen varlığında, LAB'leri flavoprotein yapısında bulunan NADH oksidaz, superoksidaz disoksidaz gibi oksidaz enzimleri yardımı ile hidrojen peroksit (H_2O_2) molekülünü sentezleyebilmektedirler. Bu maddelerin yokluğunda ise LAB'leri hidrojen peroksitin yok etmek amacıyla sentezlemiş olduğu katalaz enzimini üretememektedir. Diğer yapılan çalışmalar neticesinde, H_2O_2 'in hücre içinde önemli ölçüde birikmediği gözlenmiş olup, bu birikim azlığının sebebi olarak da H_2O_2 'in peroksidaz, flavoproteins ve pseodokatalaz gibi enzimler yardımıyla parçalanması gösterilmiştir. H_2O_2 'in bakterisidal etkisi ise, bakteri hücrelerini güçlü oksitleme özelliği ile birlikte, hücre proteinlerinin sülfür gruplarının ve hücre zarı lipidlerinin okside olma özelliği olarak tanımlanabilir. Bunun yanında H_2O_2 oksijen molekülünün bağlanmasını sağlayarak, ortamı anaerobik hale sokmaktadır. Normal şartlar altında, laktoperoksidaz'ın ve tiyosiyanat'ın, H_2O_2 molekülünün antimikrobiyal etkisini arttırdığı gösterilmiştir (Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

H_2O_2 'nin en önemli antimikrobiyal özelliği, hücre içindeki glikoliz reaksiyonunu bloklamasıdır. H_2O_2 , glikoz molekülünün taşınmasını, hekzokinaz ve gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz enziminin aktivitesini, onların sülfidril gruplarını bağlaması ile engellemektedir. Gliseraldehit 3-fosfat enzimi, H_2O_2 için en önemli hedef olmaktadır. Ayrıca, H_2O_2 'nin gram pozitif ve özellikle LAB üzerinde bakteriyostatik etkisi bulunurken, gram negatif bakterilerin ise kolayca yok olmasını sağlamaktadır (Ouwehand ve Vesterlund, 2004). Şekil 2.6'da hidrojen peroksit molekülünün yapısı gösterilmiştir.

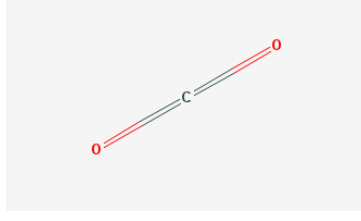


Şekil 2.6 : Hidrojen peroksit molekülünün yapısı (Anonim, 2011d).

2.4.3. Karbondioksit

Karbondioksit (CO_2), heksoz şekerinin heterofermentatif laktik asit fermentasyonu sırasında oluşan temel bileşiklerden biri olup, fermentasyon sırasında diğer metabolik reaksiyonlar sonucunda da ortaya çıkmaktadır. CO_2 molekülünün çift yönlü antimikrobiyal etkisi bulunmaktadır. CO_2 molekülü yapısı dolayısıyla antimikrobiyal özellik gösterirken, diğer yandan da anaerobik ortam sağlayarak antimikrobiyal ortam oluşmasına sebep olmaktadır. Genel olarak CO_2 molekülünün etki mekanizması tam olarak açıklanamamakla beraber, enzimatik dekarboksilasyonun inhibe olabileceği belirtilmiştir. Diğer yandan, CO_2 molekülünün yağ çift katmanında birikmesi sonucu hücre zarı geçirgenliğinde bozulma yarattığı da gözlenmiştir. Düşük CO_2 konsantrasyonu bazı mikroorganizmaların gelişmesini uyardığı gibi, yüksek konsantrasyondaki CO_2 uygulamaları ise mikroorganizma gelişmesini önlemektedir (Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

CO_2 molekülünün bu antimikrobiyal özellikleri dolayısı ile, gıdaların korunmasında, özellikle modifiye atmosfer paketleme (MAP) sistemlerinin başlıca kullanılan bileşeni olarak başı çekmektedir. MAP sisteminde, gram negatif bakterilerin gram pozitif bakterilere göre daha hassas olduğu da bilinmektedir (Ouwehand ve Vesterlund, 2004). Şekil 2.7'de karbondioksit molekülünün yapısı gösterilmiştir.

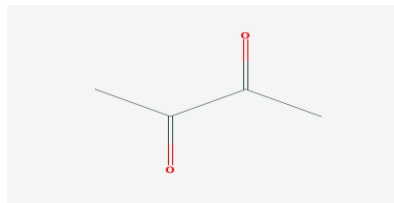


Şekil 2.7 : Karbondiyoksit molekülünün yapısı (Anonim, 2011e).

2.4.4. Diasetil

Diasetil (2,3-bütandion) ilk kez Niel ve takımı sonucunda tereyağına aroma ve tat veren bileşik olarak bulunmuştur. 1927 tarihinde ise, diasetil molekülünün özellikle *Bacillus spp.*'ye karşı antimikrobiyal özellikte olduğu bulunmuştur (Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

Diasetil özellikle *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* tür ve cinsleri tarafından sentezlenmekte olup, diğer organizmalar tarafından da sentezlenmektedir. Heksoz şekerinin metabolize edilmesinden diasetil molekülü oluşmaktadır. Bunun yanında sitrat metabolize olduğunda ise ortamda fazla miktarda diasetil oluştuğu ve bu metabolizma sonucundaki sirtat oluşumu pürivat yardımı ile olmaktadır (Ouwehand ve Vesterlund, 2004). Diasetil'in en etkili olduğu pH değeri 7 olup, bu maddenin antimikrobiyal özelliği, glikoz, asetat ve Tween 80 varlığında engellenmektedir. Diasetil, gram negatif bakterilerin, mayaların ve küflerin gelişiminin önlenmesinde, gram pozitif bakterilere göre daha etkili olduğu olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmekle beraber, molekülün gram negatif bakterilerilerin protein yapılarındaki arginin aminoasiti ile reaksiyona girerek, bu aminoasitin kullanımına engel olduğu belirtilmiştir (Ouwehand ve Vesterlund, 2004). Şekil 2.8'de diasetil molekülünün yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.8 : Diasetil molekülünün yapısı (Anonim, 2011f).

2.4.5. Düşük molekül ağırlıklı antimikrobiyal maddeler

Laktik Asit Bakterilerinin düşük molekül ağırlığında ve antimikrobiyal özellik gösteren maddeler de sentezlediğini gösteren birçok çalışma mevcuttur. Düşük

molekül ağırlıklı bu antimikrobiyal özellikte olan moleküllerin aynı zamanda düşük pH değerlerinde ve geniş bir aralıkta aktif ve ısıya dayanıklı olma, asetonda çözünebilme gibi ortak özelliklere sahiptirler (Ouweland ve Vesterlund, 2004).

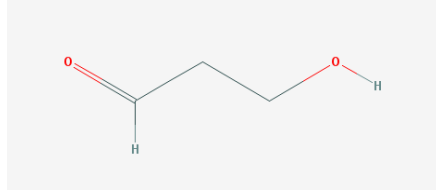
2.4.5.1. Reuterin

Lactobacillus reuteri, insan ve birçok hayvan sindirim sisteminde, doğal olarak mevcut olan bir bakteri türüdür. Bakterinin, glukoz ve gliserol veya gliseraldehit karışımlarının olduğu anaerobik bir ortamda, düşük molekül ağırlıklı antimikrobiyal özellik gösteren reuterin adlı maddeyi sentezlediği görülmüştür. Bakterinin log faz evresinde ise glikoz metabolizmasının düşürücü gücü sayesinde, reuterin üretilmemektedir. Buna karşılık, hücreler sabit faz evresine girdiği zaman, reuterin birikmeye başlamaktadır. Eğer hedeflenen hücrelerle iletişim halinde olunmaya izin verilirse, *Lb. reuteri* bakterisi, reuterin üretmek için uyarılmış demektir. Sulu çözeltilerde reuterin maddesi üç formda bulunabildiği belirtilmiş ve bu formların başlıca monomerik, sulu monomerik ve küçük uzayan siklik dimerik olduğu bulunmuştur. Belirtilen formlardan hangisinin daha etkili veya form kombinasyonunun yapılmasının etki değeri ise henüz bilinmemektedir. Diğer bakteri türleri aynı metabolik yol yardımı ile gliserolu farklı şekilde kullanmalarına rağmen, reuterin molekülünün birikmesi ve dışa salınımı aynı *Lactobacillus reuteri* bakterisinin spesifik özelliğindeki gibi olmaktadır (Ouweland ve Vesterlund, 2004).

Reuterin kullanımı sırasında reuterin maddesinin çok geniş bir aralıkta etki eden antimikrobiyal madde olduğu saptanmış olup, antibakteriyal, antifungal, antiprotozoal ve antiviral aktivite özelliklerine de sahip olduğu anlaşılmıştır. Maddenin, aynı glütaraldehit molekülü gibi biyolojik dokularda çapraz bağlama yaptığı belirlenmiş olsa da, hiçbir çalışma henüz reuterin maddesinin insan hücresinde negatif bir etkide bulunduğu saptamamıştır (Ouweland ve Vesterlund, 2004).

L. reuteri bakterisi gibi Laktik Asit Bakterileri de reuterin maddesine karşı hassasiyet gösteren mikroorganizmalar olup, diğer mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında ise bu maddeye karşı daha dirençli oldukları gözlemlenmiştir. Reuterin maddesinin bu geniş aralıktaki antimikrobiyal özelliğinin sebebi olarak ise kendi etki mekanizması olarak açıklanmakta ve sülfhidril enzimlerine yönelik hareket ettiği düşünülmektedir. Ayrıca, ribonükleotit redüktaz'ın alt birimlerinin bir inhibitörü olarak, DNA

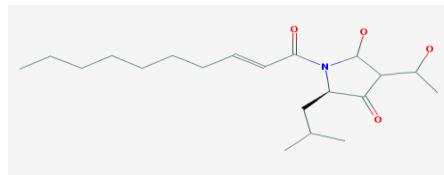
sentezini engellemektedir (Ouwehand ve Vesterlund, 2004). Şekil 2.9’da reuterin molekülünün yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.9 : Reuterin molekülünün yapısı (Anonim, 2011g).

2.4.5.2. Reuterisiklin

Lactobacillus reuter bakteri türünün düşük molekül ağırlıklı reuterin antimikrobiyal maddesinden başka diğer düşük molekül ağırlıklı antimikrobiyal özellik gösteren reutersiklin maddesini de sentezlemektedir. Reutersiklin maddesi 349 Da molekül ağırlığında, negatif yüklü ve yüksek oranda hidrofobik bir maddedir. Kültür ortamında bulunan yağ asitlerinin bu maddenin sentezini ve kültür süpernatantı ile üretici hücrenin arasındaki dağılımını etkilediği belirlenmiştir. Tween 80, reutersiklin maddesinin daha fazla sentezlenmesini uyarmakta ve özellikle kültür süpernatantın içindeki reutersiklin konsantrasyonunun büyük oranda artmasını sağlamaktadır. Yüksek tuz konsantrasyonlarında (%2) ve düşük pH değerinde (4.5) maddenin inhibitör aktivitesi önemli ölçüde artmaktadır. Gram negatif bakteriler için, minimal inhibisyon konsantrasyonu yaklaşık olarak 0.05-1 mg/l bulunmuş olup, gram negatif bakterilerin ve mayaların ise herhangi bir hassasiyetinin olmadığı belirlenmiştir (100 mg/l). Reutersiklin, hedef hücrelerin hücre zarında por oluşturmazlar fakat bir proton iyonofor olarak çalışırlar. Hidrofobik özelliklerinden dolayı, sitoplazmik hücre zarını bölerler ve pH farkından dolayı hücre zarını parçalarlar (Ouwehand ve Vesterlund, 2004). Şekil 2.10’da reuterisiklin molekülünün yapısı gösterilmiştir.

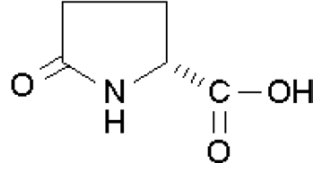


Şekil 2.10 : Reuterisiklin molekülünün yapısı (Anonim, 2011h).

2.4.5.3. Piroglutamik asit

Piroglutamik asit ya da diğer bir adı ile PCA, başlıca *Lactobacillus casei ssp casei*, *L.casei ssp. Pseudopantarum* ve *Streptococcus brevis* tarafından sentezlenen bir

maddedir. Şekil..’de piroglutamik asit’in kimyasal yapısı gösterilmiştir (Ouwehand ve Vesterlund, 2004). Şekil 2.11’de piroglutamik asit molekülünün yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.11 : Piroglutamik asit molekülünün yapısı (Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

PCA maddesinin moleküller ağırlığı 129,11 g/mol olup, molekül formülü ise $C_5H_7NO_3$ olarak literatürde yerini almaktadır (Anonim, 2011i). Molekül, 121°C’de 20 dakika süresi boyunca ısıl stabiliteye sahip olup, aktivitesini pH 2.5’in üzerine çıkınca kaybetmektedir. PCA’nın bu özellikler hedef hücreden hücreye göre de değişkenlik göstermektedir. PCA, aynı konsantrasyonlar altında laktik asit’ten daha güçlü antimikrobiyal etkiye sahip olmasına rağmen, molekülün antimikrobiyal metabolizması diğer organik asitlerin mekanizmasına benzerlik göstermektedir (Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

PCA, meyve, sebze ve yeşilliklerde bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar, PCA’nın özellikle *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida* ve *Pseudomonas fluorescens* bakterileri üzerine etkisinin olduğu saptanmıştır (Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

2.4.5.4. Bakteriyosinler:

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen ve diğer bakterilerinin gelişmesini önleyen bileşiklerdir. Bu bileşikler bu zamana kadar her bakteri türünün sentezlediği bulunmuş olmakla beraber yalnızca bazı bakteri türleri geniş bir aralıkta incelenebilmiştir (Ouwehand ve Vesterlund, 2004). Bakteriyosinler, antibiyotik özelliklerine benzer olmakla beraber bazı temel kritik noktalarda antibiyotiklerden ayrılmaktadırlar. Bu kritik başlıkların, bakteriosinlerin ribozomlardan sentezlenmesi, konakçı hücrenin bakteriyosinlerden etkilenmemesi, bakteriyosinlerin aktivite özelliklerinin antibiyotiklerden farklı olması ve dar bir spektrumda inhibe etkilerinin olması olarak gruplandırılabilir. Bakteriyosinlerin dar alanda etki mekanizmasının olması, onların sadece kendilerini üreten bakteriler üzerine üzerinde inhibisyon etkilerinin olduğu anlamına gelmektedir.

Gram pozitif bakterilerce sentezlenen bakteriyosinlerin herhangi bir membran aktif bileşen uygulaması olmadan gram negatif bakteriler üzerine etki etmesine yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu yüzden, bakteriosinlerin gıda uygulamalarındaki kullanımları kısıtlanmıştır. Fakat bu özelliğin avantaj olarak kullanıldığı bazı alanlar da mevcuttur. Örneğin, bakteriyosinler, sindirim sistemine fayda sağlayan mikroorganizmalara zarar vermeden, spesifik patojenlere karşı hedef ilaç olarak kullanılabilir. Bunun yanında, bakteriyosinler antibiyotiklerin yaygın kullanımına bir sınırlandırma getirebileceği ve böylece antibiotiklere karşı oluşan direncin ertelenebileceği de düşünülmektedir. Özellikle antibiyotik direnci hakkındaki endişeler ve tüketicilerin artık kimyasal koruyucuların potansiyel sağlık risklerine karşı daha duyarlı olmaları, bakteriyosinlere karşı olan ilginin artmasına yol açmıştır. Bakteriosinler doğal olarak sentezlenmekte olduğu için, tüketiciler için kolayca kullanum kabulü görebileceği düşünülmektedir (Ouwehand ve Vesterlund, 2004). Belirtildiği gibi bakteriyosinler Laktik Asit Bakterileri tarafından sentezlenmekte olup, üç ana sınıfa ayrılabilirler. İlk grup, lantibiotikler olarak, ikinci grup küçük ısı stabilitesine sahip peptitler olarak ve üçüncü grup ise büyük ısıya karşı kararsız proteinler olarak adlandırılmaktadır (Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

İlk gruptaki bakteriyosinlerin molekül ağırlığı 5kDa'dan küçük olup, ilgili bakteriyosinler küçük peptit sınıfına girmektedir. Bu gruptaki bakteriosinler, doğada normal olarak bulunmayan lantiyonin, beta-metil l antiyonin ve çok sayıda dehidrat amino asit gibi amino asit türlerini içermektedirler. İkinci grup bakteriyosinler de küçük peptit grupları olup, molekül ağırlığı 10 kDa dolaylarındadır. Genel olarak bu grup ısı stabilitesi sahip olmaktadır. Aynı zamanda, bu grup membran aktif olmamakta ve lantiyonin aminoasidini içermeyen peptitler olarak da adlandırılmaktadır. Bu gruptaki bakteriyosinlerin en belirgin özellikleri, inhibisyon özelliklerinin oldukça dar bir alanda olmasıdır. Ayrıca, bu grup bakteriyosinlerin hedef hücre zarındaki reseptör molekülüne etki edip etmediği en önemli belirsizlik konusudur. Üçüncü grup bakteriyosinler, diğer iki gruba göre kısmen daha büyük kalıp, molekül ağırlıkları 30 kDa'dan büyük olmaktadır. Bu grubun, hemolisin ve muramidaz gibi hücre dışı enzimlere sahip oldukları ve bu enzimlerin de bakteriosinlerin fizyolojik aktivitelerine benzer bir aktivite gösterdikleri düşünülmektedir. Ayrıca, bu gruptaki bakteriyosinlerin sadece *Lactobacillus* türlerinin üyeleri tarafından sentezlendiği belirtilmiştir. Dördüncü grup

bakteriyosinler yağ ve karbonhidrat kısımlarının kullanıldığı kompleks yapılar olarak adlandırılmakta fakat henüz genel olarak kabul edilmemektedir. Birinci ve ikinci sınıfa giren bakteriyosinler, yüksek miktarda bulunmaları ve ticari uygulamalarda kullanımları dolayısı ile bakteriyosin grubunun ana bileşikleri olarak sayılmaktadırlar. Bakteriyosinler hakkındaki bilgiler günümüzde artmasına rağmen, kendi kendini koruma yada bağışıklık ve hedef hücre spesifikliğinin moleküler temeli gibi konular hala tam anlamıyla açıklık kazanamamıştır (Ouweland ve Vesterlund, 2004).

2.5. Laktik Asit Bakterilerinin Gıda Patojenleri Üzerine Etkileri

Gıdaların patojen bakteriler tarafından infekte edilmesi önlemek için, geçmiş yıllardan bu yana kullanılan başlıca metotlar ısıtma işlem uygulamaları ve gıda katkı maddelerinin kullanımı olmaktadır. Bu metotların yanında, günümüzde gıdaların doğal yollarla korunması önem kazanmaktadır (Taş ve Erkinkaya, 2008).

Laktik Asit Bakterileri, GRAS statüsünde bulunmaktadır. LAB'nin GRAS statüsünde yani güvenli mikroorganizma sınıfında sayılmalarının başlıca sebepleri, patojenik bakterilere karşı antagonist etki göstermeleri, hedef gıda ürününün fiziksel, kimyasal ve sensorik özelliklerine çok hasar vermemeleri, konakçı hücrede gelişebilmeleriyle birlikte konakçı hücrede yaşamlarını sürdürebilme yeteneklerinin olmaları ve düşük derecelerde bile patojen bakterilerle birlikte gıdalarda bozulmaya yol açan bakteriler üzerindeki etkilerini kaybetmemeleri olarak belirtilmiştir (Taş ve Erkinkaya, 2008).

Ayrıca, LAB'nin başlıca ürettiği metabolitler olan laktik veya asetik gibi organik asitler, hidrojen peroksit, diasetil, antimikrobiyal enzimler, bakteriyosinler, reuterin, laktoperoksidad ve diasetil gibi maddeler antagonistik etki yatattıkları için, gıdalarda patojen bakterilerin önlenmesinde, gıdaların raf ömrünün uzatılmasında ve diğer mikrobiyal yükün azaltılmasında kullanılmaktadır (Sakaridis ve diğ., 2011).

Son yıllarda üzerinde en çok çalışılan patojenlerden birisi de *Escherichia coli* O157:H7 (*E.coli*) olmaktadır. Patojenin, gıda mikroorganizmaları arasında en tehlike patojen bakteri sınıfına girmesinin sebebi, 1982 yılında yılında aynı zincire bağlı fast food restoranlarında satılan hamburger etlerinin tüketilmesi sonucunda ortaya çıkan iki büyük ishal salgınıdır. Buna ek olarak, *E.coli* patojen bakterisi bu salgının sebebi

olarak belirlenen yeteri kadar pişmemiş etlerde bulunabileceği gibi, pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinde ve elma suyu gibi meyve sularında da rastlanmaktadır (Taş ve Erkinkaya, 2008).

Yapılan bir çalışmada, *E. coli* O157:H7 üzerine LAB'nin inhibisyon etkileri araştırılmıştır. LAB'nin antibakteriyel etkilerini belirlemek için iki farklı metot kullanılmıştır. Metotlardan ilki olan, kuyu difüzyon yöntemi ile kullanılan bütün LAB'lerinin *E. coli* O157:H7 üzerine antibakteriyel etki gösterdiği bulunmuş olup, bu patojen üzerinde en etkili suşlarının ise 11 mm'yi bulan zon çapı ile *L. casei* ve *L. acidophilus* olduğu belirlenmiştir. İkinci yöntem olan kültürel sayım yönteminde ise, elde edilen süpernatant patojen bakteriye inoküle edilip 24 saat inkübasyon sonucunda canlı hücre sayısında azalma görülmüştür. Patojen bakterileriye LAB'nin süpernatantlarının inokülasyonu sonucunda patojen sayısında en fazla azalmanın meydana geldiği süpernatanta sahip olan bakterilerin *L. rhamnosus*, *L. casei* ve *L. acidophilus* suşları olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, kullanılan tüm LAB'nin *E. coli* O157:H7 üzerine antibakteriyel etki göstermiş olduğu ve bu antimikrobiyal etkinin pH' nın azalması, substrat rekabeti, bakteriyosinler gibi birçok faktöre bağlı olabildiği anlaşılmıştır (Taş ve Erkinkaya, 2008).

Yapılan diğer bir çalışmada, vakum altında paketlenerek derin dondurucuda saklanan etlerin kalitesini, gıda güvenliğini ve raf ömrünü arttırmak için, patojenlerden olan *Listeria monocytogenes* inhibisyonunda LAB kullanılmıştır. 181 adet izole edilen LAB'nin 75 izolatu dondurulmuş etlerden, geriye kalan 106 izolat ise büyükbaş hayvanın mide-işkembe bölgesi ile yeşilliklerden izole edilmiş ve DNA teknikleri kullanılarak tanınmaları sağlanmıştır. *Listeria monocytogenes* ise ilgili etten izole edilmiştir. Yapılan deney sonucunda göre, etlerin ısıtılma maruz kalma süresinden 8 saat sonra *L. sakei* 2 suşunun ürettiği süpernant'ların *L. monocytogenes*'i en yüksek oranda inhibe ettiği ortaya çıkmıştır (Jones ve diğ., 2008).

Yapılan diğer bir çalışmada ise, liyofilize kültürlerden ve kültür koleksiyonlarından temin edilen LAB'den olan *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* tek başına, *L. lactis* subsp. *biovar. lactis diacetylactis* ve *Candida kefir* 23 birlikte, *L. lactis* subsp. *lactis* tek başına ve *L. lactis* subsp. *lactis* ve *C. kefir* yine birlikte kullanılarak, *E. coli* 3339 ve *S. enteritidis* 949575 patojenleri üzerindeki inhibisyon etkisine bakılmıştır. Patojenler, gıda zehirlenmesi salgınına yol açan ilgili üründen

izole edilmiş ve kullanılan LAB'den *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis* tek suş halinde veya *Candida kefir* 23 ile birlikte, *L. lactis subsp. lactis* Lc261 yine tek suş halinde veya *C. kefir* 23 ile birlikte kullanılmıştır. LAB ve patojenler, sterilize edilmiş yağsız süt'e aşılanmış ve sterilize yağsız süt örneğine önce seçilen LAB suşları inoküle edilerek, gelişmeleri sağlanmıştır (Mufandaedza ve diğ., 2006).

Daha sonraki aşamalarındaki çalışmalar, *L. lactis subsp. biovar. lactis diacetylactis* suşunun tek başına ve *L. lactis subsp. lactis* Lc261 suşu ile *C. Kefir* 23 suşunun birlikte kullanılması ile patojenlerin sayısında büyük bir düşüş ün olduğunu kaydetmişlerdir. Buna ek olarak, *L. lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis* suşunun *E.coli* inhibisyonu için oldukça önemli olduğu vurgulanmıştır. Bunun aksine, *E.coli* patojeninin *L. lactis subsp. lactis* Lc261 bakterisinin inhibe edici özelliğinden çok etkilenmediği görülmüştür. Ayrıca, *S. enteritidis* 949575 patojen bakterisi, *E.coli* bakterisine göre LAB'nin sebep olduğu inhibisyon açısından daha hassas olduğu bulunmuştur. Seçilen LAB'nin , patojen inhibisyonundaki etkisinin pH değerini düşürmelerinden olduğu anlaşılmıştır (Mufandaedza ve diğ., 2006).

Yapılan diğer bir çalışmada ise, 635 adet LAB ile çalışılmış ve aralarından seçilen 2 adet bakteri suşu'nun seçilerek, *L. monocytogenes* ve *S. enteritidis* üzerindeki antimikrobiyal etkilerinin anlaşılması için tavuk eti yüzeyine inoküle edilmişlerdir. Seçilen suşlar, *E. faecium* PCD71 ve *L. fermentum* ACA-DC17suşları olup, bu iki türün *L. monocytogenes* ve *S. enteritidis* patojenleri üzerinde yüksek derecede inhibisyon etkisine sahip olduğu anlaşılmıştır. LAB'nin bu inhibisyon etkisinin, bakterilerin ürettiği asitlerden ve aynı zamanda ürettiği olduğu bakteriyosinlerden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Diğer yandan, bu iki LAB türünün tavuğa inokülasyonu sonucunda, tavuğun dokusunda ve tadında herhangi bir bozulma olmadığı da gözlemlenmiştir (Maragkoudakis ve diğ., 2009).

Diğer bir çalışma ise seçilen *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Carnobacterium piscicola* LAB tek veya grup halinde olarak soğuk ve dumanlanmış somon balığına inküle edilerek, yine balığa inokülasyonu sonucu 30 günde vakum altında gelişen *Listeria innocua* patojeni üzerindeki antimikrobiyal etki incelenmiştir. Inoküle edilen *Listeria innocua* patojeni balıkta gelişme göstermiş ve eklenen tüm LAB'nin bakteriyostatik ve bakterisidal etki göstererek *Listeria innocua* patojeni

üzerinde inhibisyon etkisine sahip olduğu anlaşılmıştır. LAB'nin eklenmesinin gıdaya negatif yönde bir etkide bulunmadığı da belirlenen diğer bir sonuç olmuştur.

Inoküle edilen LAB'nin etki mekanizmasını anlamak için, balığın depolanma işlemi sonunda yapılan testlerden faydalanılmıştır. Bu testlere göre, *Lactobacillus casei* bakterisinin 6 log cfu/g olarak inoküle edildiği zaman bakteriyostatik etki gösterirken, 8 log cfu/g sayısında eklendiğinde ise bakterisidal etki gösterdiği ve *Listeria innocua* patojeninin 3.3 log cfu/g oranında azaldığı belirlenmiştir. Bunun yanında, *Lactobacillus plantarum* ve *C. piscicola* bakterilerinin tek suş olarak ve 6 log cfu/g oranında balığa inoküle edildiğinde ise, *Listeria innocua* patojeninin sayısında sırası ile 2.8 ve 2.7 log cfu/g oranında azalma görülmüştür. Ayrıca, 6 log cfu/g oranında *Lactobacillus casei* ve *Lactobacillus plantarum* suşları beraber kullanıldığında, *Listeria innocua* patojeninin inhibisyonunda daha etkili sonuçlar elde edildiği ve patojenin 3.2 log cfu/g kadar düştüğü görülmüştür. Buna ek olarak *Lactobacillus casei* ve *C. piscicola* bakterilerinin birlikte kullanımının *C. piscicola* bakterisinin tek başına kullanımına göre daha az antimikrobiyal etkiye sahip olduğu da anlaşılan diğer sonuçlardan olmuştur (Vescovo ve diğ., 2006).

Deniz ürünleri üzerinde yapılan diğer bir çalışmada ise, probiyotik özellik de gösteren 3 adet LAB suşu seçilmiştir. Bu suşlar, *Lactococcus lactis subsp. lactis* CLFP100, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CLFP102 ve *Lactobacillus curvatus* CLFP150 suşları olmuştur. Deniz ürünlerinde sıklıkla rastlanan patojenlerden olan *F. psychrophilum* ve *R. salmoninarum* bakterilerinin ise seçilen LAB tarafından üretilen maddeler ile herhangi bir inhibisyona uğramadığı belirlenmiştir. Buna karşın, balık patojenleri olan *A. salmonicida subsp. salmonicida* ve *Y. ruckeri* bakterileri LAB tarafından inhibe edilmiştir. Ayrıca, sadece *Lactococcus lactis subsp. cremoris* suşunun *Lc. garvieae* üzerine inhibe edici etkiye sahip olduğu da diğer bir sonuçtur (Balca'zar ve diğ., 1997).

Diğer bir çalışmada ise, sütte bulunan patojenler üzerine LAB'lerin üretmiş olduğu bakteriyosinler ile reuterin maddesinin kombinasyonun nasıl bir etkiye sahip olduğu araştırılmıştır. Çalışmada, *Listeria monocytogenes* üzerinde en güçlü etkiyi reuterin, nisin, laktisin 481 ve enterosin AS-48 maddelerinin birlikte kullanımının yarattığı görülmüştür. Nisin maddesinin ise sadece *Staphylococcus aureus* üzerinde etkili olduğu belirlenmekle beraber, reuterin maddesinin ise *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* ve

Campylobacter jejuni üzerinde yaratmış olduğu bakterisidal aktivitesinin diğer bakteriosinlerin eklenmesiyle artmadığı saptanmıştır. Tüm patojenlerin inaktive olduğu düşük sıcaklık derecelerinde bile varlıklarını sürdürebilen *L. monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* patojenleri üzerinde nisin ve reuterin'nin birlikte kullanıldığı zaman, bu patojenlerin inhibisyonunun sağlandığı görülmüştür. Sonuç olarak, özellikle bu iki bakteriyosinin birlikte kullanılması süt ve süt ürünlerinin saklama veya üretimi sırasında görülen patojen bakterilerin inhibisyonunda önemli bir yere sahip olabileceği belirtilmiştir (Arqués ve diğ., 2011).

Diğer bir çalışmada ise, tavuk karkası örneklerinden izole edilen psikotrofik özellikteki LAB'nin *Salmonelle spp.* ve *Listeria monocytogenes* patojenleri üzerine olan etkileri incelenmiştir. Gram pozitif, katalaz negatif veya oksidaz negatif testleri ile birlikte, psikotrofik özelliklerin de test edilmesi için uygulanan testler ile API kitleri ile, antimikrobiyal özellik gösteren LAB belirlenmiştir. Testler sonucunda, belirlenen LAB'nin *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Pediococcus acidilactici* ve *Lactobacillus paralimentarius* bakterileri olduğu anlaşılmıştır (Sakaridis ve diğ., 2011).

2.5.1. Laktik asit bakterilerinin ürettiği laktik asit süpernatant'ının *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon etkisi

Son yıllarda *Staphylococcus aureus* patojeni ile Laktik Asit Bakterileri arasındaki ilişkiyi anlamak ve LAB'nin hem *S. aureus* hem de onların üretmiş olduğu enterotoksin üzerindeki inhibisyon etkisini incelemek için birçok çalışma yapılmıştır (Charlier ve diğ., 2009).

Staphylococcus türü bakterilerin hücreleri küre şeklinde olup, boyutları 0.5-1.5 µm arasındadır. Hücreleri tekli, ikili veya çoklu şekle buluanbilmektedir. Bakteriler, gram pozitif, hareketsiz ve sporsuzdur. Ayrıca, bu gruptaki bakteriler fakültatif anaerob özellikte olup, koloniler genelde opak ve beyaz veya krem renginde, bazen ise sarı renkte bulunmaktadır. Bakteriler, genel olarak katalaz pozitif ve oksidaz negatif özellikte olup, nitrat genel olarak nitrite dönüşmektedir. Hücreler %10 NaCl içeren ortamda gelişme gösterebilirken, optimum gelişme sıcaklıkları ise 30-37°C olarak belirlenmiştir. Genel olarak, *Staphylococcus* kolonileri gıda ürünlerinden, toz ve sulardan izole edilebilmektedir. Bu gruptaki bazı bakteriler, insan ve hayvanlar

için patojen özellik göstermekte olup, hücre dışı toksin üretebilmektedirler (Holt ve diğ., 1998).

Staphylococcus türü bakterilerinden olan *Staphylococcus aureus* bakterisi bu grubun en önemli bakterilerinin başında gelmektedir. Bakterinin *Staphylococcus aureus subsp. anaerobius* ve *Staphylococcus aureus subsp. aureus* olmak üzere iki adet alt türü mevcuttur (Holt ve diğ., 1998). *Staphylococcus aureus* bakterisi özellikle insan ve hayvanlar için patojen olma özelliklerinden ve üretmiş olduğu enterotoksin sebepleri ile önem arz etmekte, gıda mikrobiyolojisinde *Staphylococcus* bakteri türü denilince akla *Staphylococcus aureus* bakterisi bu sebep ile gelmektedir. Yapılan çalışmalar, *S. aureus* bakterisinin her suşlarının enterotoksin üretmediği, sadece koagülaz negatif suşlarının enterotoksin ürettiği belirtmiştir. Bu bakteriler yüksek ısı işlemlere oldukça hassas olmakla beraber, özellikle gıda ekipmanlarında, *S. aureus* bakterisine veya üretmiş oldukları enterotoksinlerine rastlanması, yeteri kadar sanitasyonun yapılmadığının kanıtı olmaktadır. Buna ek olarak, *S. aureus* sığır ve domuz etleri, süt ve krema, peynir gibi süt ürünlerinde bulunabilmektedir (*Staphylococcus aureus*, 2011j).

Fermente ürünlerle yapılan çalışmalarda, asit çeşitlerinin *S. aureus* patojeninin inhibisyonu üzerine aynı etkiyi göstermedikleri ve asit etkisinin asitten aside değişebildiği gözlenmiştir. Özellikle süt ile yapılan çalışmalarda, sütün fermentasyonu sırasında, LAB'nin üretmiş olduğu başta laktik asit'in ve diğer asetik asit gibi asitlerin pH değerini 4.4-4.5 değerlerine düşürmesi ile *S. aureus* patojeninin tamamen yok olmasını sağladığı anlaşılmıştır. Aynı şekilde, sütün asitlendirilmesi sonucunda 4.6 pH değerine düşen ortamda %99 oranında biyokütle azalımının olduğu anlaşılmıştır. Bununla beraber, aynı etki pH değerinin asetik asit uygulanması ile 5'e düşmesi, sitrik asit ile 4.5'e, fosforik asit ile 4.1'e ve hidroklorik asit ile de 4 değerine düşmesi aynı inhibisyon etkiyi yaratmıştır. Genel olarak, organik asitlerin sağladığı inhibe edici etki asitlerin çözünmeyen kısımları ile ilgili olmakta ve ilgili asit sitoplazmik hücre zarına diffüze olmaktadır. Sitoplazmadaki pH değeri arttığında, asit çözünerek, ortama protonlarını bırakır. Bu sebeple, pK değeri 4.8 ve 4.9 olan asetik ve propiyonik asitin, laktik asit'den daha fazla inhibe edici özelliğe sahip olduğu belirtilmiştir (Charlier ve diğ., 2009).

S. aureus patojeninin gen profiline bakıldığında, bakterinin sahip olduğu bazı genlerin pH değerinin 7.5 ile 5.5 arasındaki değerlerden etkilendiği ortaya çıkmıştır. Buna ek

olarak, *S. aureus* patojen bakterisinin inhibe edilmesinin başlıca nedeninin fermentasyon sonucunda LAB'nin sebep olduğu ortamın asitlendirilmesidir. Diğer bir deyişle, ne kadar fazla ortamın asitlendirilmesine sebep olan LAB varsa, okadar fazla *S. aureus* patojeninin inhibe olma durumu oluşmaktadır (Charlier ve diğ., 2009).

Yapılan bir çalışmada, hayvanların sindirim borusundan izole edilen LAB'nin ve *S. aureus* patojeninin sosis gıda ürününe inoküle edilerek, 20°C ve 35°C gibi iki farklı fermentasyon sıcaklığında gelişmeleri ve LAB'nin *S. aureus*'un gelişmesi ve ürettiği enterotoksinlerin üzerindeki etkisi incelenmiştir. Başlangıç inokülasyon değerleri *S. aureus* için 10⁴ cfu/g, *Lactobacillus* türleri için ise 10⁷ cfu/g olmuştur. Yapılan çalışma sonunda, seçilen 3 adet *Lactobacillus* suşlarından olan *L. rhamnosus* FERM P-15120 ve *L. paracasei* subsp. *paracasei* FERM P-15121 suşlarının her iki fermentasyon sıcaklığında da *S. aureus*'un gelişimini ve *S. aureus*'un üretmiş olduğu enteretoksinlerin oluşmasını önlediği gözlemlenmiştir. Buna karşılık, *L. acidophilus* FERM P-15119 suşunun ise *S. aureus*'un gelişmesini ve enteretoksin oluşumunu önleyemediği belirtilmiştir. Ayrıca, *S. aureus* ve üretmiş olduğu enteretoksinlerin inhibisyonuna neden olan bu iki bakteri suşunun et ürünlerinin fermentasyonunda kullanılan ticari *L. sake* bakterisinin gerçekleştirmiş olduğu fermentasyon zamanı, asit üretimi ve *S. aureus* patojenini yok etme gibi özelliklerinin aynısına sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar ile et ürünlerindeki mikrobiyal kontrol *L. rhamnosus* FERM P-15120 ve *L. paracasei* subsp. *paracasei* FERM P-15121 ile sağlanabildiği ve bakterilerin starter kültür olarak da kullanılabileceği anlaşılmıştır (Sameshimaa ve diğ., 1998).

Diğer yapılan bir çalışmada ise keçi sütünden izole edilen 64 LAB'nin *S. aureus* üzerindeki inhibisyon etkisine bakılmıştır. İzole edilen LAB'nin çoğu *Lactobacillus* grubuna girmekte olup, 64 suşun 11 tanesinin *S. aureus* patojenine karşı inhibisyon özellik gösterdiği saptanmıştır. Bu suşlar genel olarak *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. fermentum*, *Lactobacillus paraplantarum* and *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* olup, yürütülen deney çalışmalarının sonucunda bu suşlardan olan *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* ve *Lb. rhamnosus* bakterilerinin *S. aureus* üzerinde güçlü inhibisyon etkisine sahip olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak, 24 saat sonunda *Lb. plantarum* bakterisinin *S. aureus* patojen sayısını 1.6 log düşürdüğü ve 72 saat sonunda ise *S. aureus* bakterisinin

ortamda bulunmadığı bulunan diğer bir sonuçtur. *Lb. plantarum* bakterisinin *S. aureus* üzerindeki güçlü inhibisyon etkisinin bakteriyosin benzeri maddelerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Buna ek olarak, 24 saatte en yüksek asit üretme kapasitesine göre sıralama yapıldığında *Lb. plantarum* yine ilk sırada olup, bakteriyi *Lb. rhamnosus* ve *Lb. paracasei subsp. paracasei* bakterileri izlediği anlaşılmıştır. Ayrıca, *Lb. plantarum* ve *S. aureus*'un birlikte bulunduğu ortamda, laktik asit'in yüksek miktarlarda üretildiği görülürken, *Lb. rhamnosus* ile *Lb. paracasei subsp. paracasei* bakterilerinin laktik asit üretim kapasiteleri düşmüştür. Ayrıca, *Lb. plantarum* supernanat'larının etkisine bakıldığında, ilk 6 saatteki ilk dilusyonlardaki *S. aureus* patojeninin ölüm oranı %90 olmakla beraber, patojenin 24 saatteki ölüm oranı ise %95 ile %92 arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Buna ek olarak, daha yüksek dilusyonlarda ise 6. saatteki *S. aureus* ölüm oranı %50 olup, 24. saatin sonunda ise bu oran % 4 ile % 4.9 oranına düşmüştür (Anas ve diğ., 2008).

Buna ek olarak, çiğ süttten yapılmış peynirden izole edilen LAB'den olan 4 suş *Lactococcus garviea*, 3 suş *Lactococcus lactis subsp. lactis* ve 1 suş *E. Faecalis* bakterilerinin, çiğ süttten izole edilen *S. aureus* SA15 suşu üzerindeki inhibisyon etkisi incelenmiştir. İzole edilen *S. aureus* SA15 ve LAB suşları, mikofiltrelerden geçirilmiş süte ve tamponlanmış TS ortamına inoküle edilmiştir. Mikrofiltrelerden geçirilmiş sütte yapılan deney sonucunda, *S. aureus* SA15 suşunun, *L. garvieae* bakterisi tarafından 0. saatte yok edilemediği fakat 6. saat sonunda ise önemli ölçüde inhibe edildiği gözlenmiştir. Bunun yanında, *S. aureus* SA15 suşunun *L. garvieae* tarafından inhibe edilmesi için bakteri sayısının minimum 1.2 log olması gerektiği belirlenmiştir. Ayrıca, *L. lactis* ve *E. Faecalis* bakterisinin tüm suşlarının 3. saatten 24. saate kadar olan zaman diliminde *S. aureus* SA15 suşunun gelişmesini durduğu gözlemlenmiştir. Genel olarak, *Lactococcus* ve *Enterococcus* türlerinin süt ortamında 6. saatten sonra, tamponlanmış ortamda ise 24. saatin sonunda *S. aureus* SA15 suşunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği ortaya çıkmıştır. Ayrıca, LAB'nin arasında *S. aureus* SA15 suşu üzerinde en güçlü inhibisyon etkisini *L. garvieae* bakterisinin sağladığı belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada, LAB'nin *S. aureus* SA15 üzerindeki inhibe edici etkinin bakteriyosin ve benzeri maddelerden kaynaklandığı düşünülmüştür (Alomara ve diğ., 2008).

Diğer bir çalışmada ise 75 adet *Lactococcus lactis* türlerinin süt ortamında *S. aureus* üzerindeki inhibisyon etkisine bakılmıştır. *Lactococcus lactis* suşları 36 adet *L. lactis*

subsp. lactis suşu (%48), 19 adet *L. lactis subsp. lactis biovar.diacetylactis* suşu (%25)ve 20 adet *L. lactis subsp. cremoris* (%27) suşu seçilmiş olup, ayrıca 2 adet *S. aureus* suşu kullanılmıştır. Yapılan çalışmada *Lactococcus* bakterilerin çoğunun güçlü antogonist etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır. Genel olarak, asitlenmenin *S. aureus* üzerinde güçlü inhibe etkisinin bulunduğu bilinse de, yapılan çalışmada asitlenmenin ilk 24 içinde *S. aureus* üzerindeki inhibisyonda bir etkisin olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu etkinin de sebebi olarak, *Lactococcus lactis* bakterilerinin güçlü antagonist etkiye sahip olmaları gösterilmiştir. Buna ek olarak, antagonist etki sonucunda, çiğ süttten yapılan yumuşak peynirlerde olduğu gibi düşük asitlenme oranı *S. aureus* patojeninin inhibisyonunda daha etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Charlier ve diğ., 2008).

Diğer bir çalışmada ise starter yarışçıl LAB'nin ve *S. aureus* bakterisinin gelişmeleri ve inhibisyon etkilerinin incelenmesi için yine süt ortamında çalışılmıştır. LAB ve *S. aureus* bakterileri steril süt ortamına ekimleri yapılmış ve LAB'nin *S. aureus* patojenini inhibe etme özellikleri belirlenmiştir. Ayrıca, *L. monocytogenes* inhibisyonu için geliştirilen model, *S. aureus* patojeni için ayrıca geliştirilmiş ve model 12°C'den 25°C'ye kadar olan sıcaklık aralıklarında kullanılmıştır. Bu sıcaklık aralıklarında, LAB'nin *S. aureus* patojeninin inhibe etme özelliğinin, patojenin lag fazına ve başlangıç büyüme oranına önemli ölçüde bir etkisinin bulunmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca, LAB'nin *S. aureus* patojeni üzerinde inhibisyon etkisine sahip olması için, LAB'nin kritik bir yoğunluğa ulaşmalarının gerekli olduğu diğer bir gözlemlenen sonuç olmuştur (Le Marc ve diğ., 2009).

3. METARYAL VE METOT

3.1 Metaryal

3.1.1 Laktik asit'in L(+) ve D(-) cins ve miktarlarının belirlenmesinde kullanılan materyaller

Laktik asit'in L(+) ve D(-) izomerlerinin cins ve miktarlarının belirlenmesinde kullanılan Laktik Asit Bakteri suşları, *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* türleri'ne aittir. Kullanılan bakteri suşları, daha önce bozadan izole edilip, dondurucuda saklanan liyofilize saf kültürler olmuştur.

Çizelge 3.1'de Laktik asit'in L(+) ve D(-) cins ve miktarlarının belirlenmesinde kullanılan *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* suşları türüne ait suşlar gösterilmiştir.

Çizelge 3.1: *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* suşları.

Suş No	Suş Adı
B2	<i>Lactobacillus fermentum</i>
C3	<i>Lactobacillus fermentum</i>
B23	<i>Lactobacillus paracasei</i>
D29	<i>Lactobacillus para.sub.paracasei</i>
E8	<i>Lactobacillus para.sub.paracasei</i>
F30	<i>Lactobacillus plantarum</i>
E32	<i>Lactobacillus brevis</i>
C19	<i>Lactobacillus carpophilus</i>
A15	<i>Lactobacillus delb.sub.delb</i>
C55	<i>Lactobacillus salivarius</i>
F39	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
B49	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
E55	<i>Leuconostoc lactis</i>
B56	<i>Leuconostoc citreum</i>
A31	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

L-laktik asit ve D-laktik asit cins ve miktarlarının belirlenmesinde ise D/L Laktik Asit kiti kullanılmıştır.

3.1.2 Laktik asit bakterilerinden elde edilen laktik asit süpernatantının *Staphylococcus aureus* üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan materyaller

Laktik asit'in *Staphylococcus aureus* üzerindeki etkisine bakmak için, önceki deneyle aynı şekilde olmak üzere, daha önce bozadan izole edilen ve dondurucuda saklanan liyofilize *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* laktik asit bakteri suşları kullanılmıştır. Çizelge 3.2'de *Staphylococcus aureus* patojeninin inhibe edilmesinde kullanılan *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* türlerinin kullanılan suşları gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 : *Staphylococcus aureus* inaktivasyonunda kullanılan *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* suşları.

Suş No	Suş Adı
D41	<i>Lactobacillus plantarum</i>
F30	<i>Lactobacillus plantarum</i>
B10	<i>Lactobacillus fermentum</i>
E32	<i>Lactobacillus brevis</i>
B23	<i>Lactobacillus paracasei</i>
E8	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>
C19	<i>Lactobacillus carphophilus</i>
C55	<i>Lactobacillus salivarius</i>
F29	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
B49	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
F39	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
E57	<i>Lactococcus lactis</i>
F45	<i>Leuconostoc lactis</i>
A47	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>
E55	<i>Leuconostoc lactis</i>
A40	<i>Leuconostoc lactis</i>
A31	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
B56	<i>Leuconostoc citreum</i>

3.2. Metot

3.2.1 Laktik asit bakterilerinden laktik asit süpernatant eldesi

Daha önce yapılan çalışmalar sonucunda bozadan elde edilen ve dondurucu muhafaza edilen liyofilize *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* saf kültürleri önce laktik asit bakterileri için genel besi yeri olarak kullanılan MRS Broth'a alınarak, 30°C'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmış ve bu şekilde gelişmeleri sağlanmıştır. Gelişmeleri sağlanan bakteriler daha sonra öze yardımı ile buradan yatık MRS agar'a alınmış ve yine gelişmeleri için 30°C'de 48 saat inkübasyona

bırakılmıştır. Yatık MRS agar'da çoğalan bakteriler yine öze yardımı ile hazırlanan 10 ml fizyolojik tuz içeren tüplere alınarak bu şekilde konsantrasyonlarının belirlenmiştir. Bakteri konsantrasyonlarının 10^6 - 10^8 olması istendiği için 3MF kullanılmıştır. Fizyolojik tuz içerisinde bu şekilde konsantrasyonları belirlenen bakteriler, yeniden gelişmesi için MRS Broth'a inoküle edilerek 30°C'de 48'de inkübasyona bırakılmıştır.

İstenilen konsantrasyonda gelişen bakterilerin MRS Broth'da üretmiş olduğu laktik asit'i elde etmek için saf haldeki supernatant'a ihtiyaç duyulmuştur. Saf bir supernatant eldesi için bakteri süspansyonu çeşitli işlemlerden geçirilmiştir. İlk olarak, bakterilerin ve diğer sentezlenmesi muhtemel yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerin çökmesi için, MRS Broth-bakteri süspansiyonu 3000 rpm'de 10 dakika santrifuj işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlemden sonra, molekül ağırlığı yüksek olup dibe çöken moleküller ayrılmış, üst faz ise diğer bir tüplere alınmıştır. Diğer tüplere alınan supernatant, içerisinde yine bulunması muhtemel olan protein yapısındaki bileşiklerin molekül yapısının bozulup, dibe çökmesi için 80°C'de 20 dakika su banyosunda tutulmuştur. Bu işlemden sonra dibe çöken bakteriyosin gibi protein bazlı bileşiklerin ayrımı ve kaldığı muhtemel diğer yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerin ayrımı için, süspansyon yeniden santrifuj edilmiştir. Santrifuj işlemi 4000 rpm'de 15 dakika kadar sürdürülmüştür. Çöken moleküller yeniden ayrılmış, daha iyi ayrımın sağlanması için kağıt filtrelerden geçirilmiş ve üst faz laktik asit izomerlerinin cins ve miktar tayini için hazır hale gelmiştir.

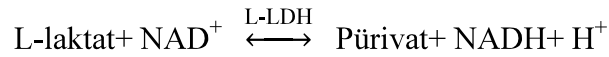
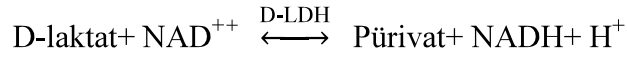
Diğer yandan, bakterilerin üretmiş olduğu laktik asit'in *Staphylococcus aureus* üzerindeki etkisinin incelenmesi için, elde edilmiş olan saf supernatant, 121°C'de otoklav edilmiştir. Uygulanan bu sterilazyonun amacı, supernatant içerisinde hiçbir mikroorganizmanın kalmadığından emin olunmak istenmesidir. Bu işlemden sonra, supernatant, içerisinde çöken bileşiklerin veya ölü canlıların bulunması ihtimaline karşı 0.2 mm'lik steril kağıt filtrelerden geçirilmiştir.

3.2.2. Laktik asit L(+) ve D(-) izomerlerinin belirlenmesi

Lactobacillus, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* bakterilerinin sentezlediği laktik asit'in L(+) veya D(-) izomerler cinsi ve miktarı'nın belirlenmesi için D/L laktik asit kitleri kullanılmıştır. Kitlerin çalışma prensibi UV metoduna dayanmakta ve absorbans

ölçümü sonucundan hesaplanan değerler ile D ve L laktik asit konsantrasyonları belirlenmiştir.

D-laktik asit D-laktat dehidrogenaz (D-LDH) enzimi yardımı ile prüvat, NADH ve hidrojen atomuna dönüşmektedir. Aynı şekilde, L-laktik asit de, L-dehidrogenaz enzimi yardımı ile prüvar, NADH ve hidrojen atomuna dönüşmektedir. Daha sonra, prüvat ve L-glutamat, GPT varlığında, L-alanine ve 2-oksogluterat'a dönüşmektedir (D-Lactic Acid/L-Lactic Acid, t.y).



Pürivat + L-glutamat GPT L-alanine + 2-Oksogluterat

Kullanılan kitler 7 ayrı şişelerdeki solüsyonları içermektedir. Bu solüsyonlar, deney sırasında sırasıyla kullanılmıştır. 6 ve 7 numaralı solüsyonlar, deneylerin yüzde kaç olasılık ile doğru sonuca ulaşıldığının anlaşılması için kontrol amaçlı kullanılan solüsyonlardır (D-Lactic Acid/L-Lactic Acid, t.y). Çizelge 3.3'te D/L kitinin içerdiği 7 solüsyonun herbirinin bileşimini göstermektedir.

Çizelge 3.3 : Şişelerdeki solüsyon bileşimleri.

Şişe ve Solüsyon	Aktif Maddeler
1. Şişe Solüsyonu	Glisilglisin tampon, 440 mg L-glutamic asit
2. Şişe Solüsyonu	210 mg NAD, Liyofilizat
3. Şişe Solüsyonu	0.7 ml glutamat-pürivat transaminaz süspansiyonu
4. Şişe Solüsyonu	0.7 ml D-laktat dehidrogenaz solüsyonu
5. Şişe Solüsyonu	0.7 ml L-laktat dehidrogenaz solüsyonu
6. Şişe Solüsyonu	D-laktat deney kontrol solüsyonu
7. Şişe Solüsyonu	L-laktat deney kontrol solüsyonu

Deney, örnek ve blank üzerinden yürütülmüş, spektrofotometre kullanılarak spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Deneyin temel prensibi, reaksiyonlar sonucu oluşan NADH miktarının ölçülmesine dayanmaktadır. NADH miktarı aynı zamanda ortamda oluşan D(-) ve L(+) laktik asit miktarlarını göstermektedir. Oluşan laktik asit izomerlerinin tayini için 334, 340 veya 365 nm'de ölçüm yapılabilir. Yapılan tez çalışmasında ölçümler 340 nm'de yapılmıştır. Spektrofotometrik ölçümde, blank ve diğer örnekler için disposel kuvvetler tercih edilmiş olup, kit

içersindeki solüsyonlar deneyde sırasıyla kullanılmıştır. Laktik asit süpernatant örnekleri deneye başlamadan önce 1/20 oranında seyreltilmiştir.

Deneye ilk önce 1. Şişeden alınan 1.000 ml solüsyonun, blank ve ilgili örnek için içerisine konulması kararlaştırılan boş küvetlerin içine aktarılmasıyla başlanmıştır. Daha sonra, 2. şişedeki solüsyondan 0.200 ml alınıp, yine aynı küvetlerin içerisine konulmuştur. Hemen ardından, 3. şişedeki solüsyondan 0.020 ml alınmış ve yeniden bu küvetlerin içerisine aktarılmıştır. Bu işlemten sonra, ilgili bakteri süpernatant'larından 0.100 ml alınmış ve kendilerine ait olan küvetlere aktarımı yapılmıştır. Blank için hazırlanan küvete ise bu aşamada hiçbirşey eklenmemiştir. Süpernatant'ların küvetlere ekleme işleminden sonra, blank için hazırlanan küvetin içine 1.000 ml, ilgili bakterilere ait olan küvetlerin içine ise 0.900 ml distile su konulmuştur. Distile su eklendikten sonra, küvetler karıştırılıp, karışımdaki maddelerin reaksiyona girmeleri için 5 dakika beklenmiştir. 5. dakikadan sonra, örneklerin absorbansları ölçülmüş ve bu değerler A_1 değerleri olarak kaydedilmiştir. A_1 değerinin ölçülmesinden sonra 4. Şişede bulunan solüsyondan 0.020 ml alınarak, blank ve örnekleri içeren küvetlere eklenmiş ve sonrasında 30 dakika beklenilmiştir. Bu beklemeden sonra aynı şekilde blank ve örneklerin absorbans değerleri ölçülmüş ve değerler A_2 değerleri olarak not edilmiştir. A_2 değerlerinin bulunmasından sonra, son olarak tüm küvetlere 5. şişenin içermiş olduğu solüsyondan 0.020 ml eklenmiş ve yeniden 30 dakika kadar beklenilmiştir. Bu beklemenin sonucundaki absorbans ölçümü değerleri A_3 olarak kaydedilmiştir. Absorbans ölçümleri iki defa yapılmış olup, D(-) ve L (+) laktik asit cinsi ve miktarını belirlemek için yapılan bu deney tamamlanmıştır (D-Lactic Acid/L-Lactic Acid, t.y).

Deney sonucunda elde edilen laktik asit D(-) ve L (+) cinslerini belirlenmesi için bazı eşitlikler kullanılmıştır. Deneylerde bulunan absorbans değerlerinden, A_2 - A_1 absorbans farkının sayısal değeri $\Delta A_{D\text{-laktik asit}}$ olarak, A_3 - A_2 absorbans farkının sayısal değeri ise $\Delta A_{L\text{-laktik asit}}$ olarak, D(-) ve L (+) laktik asit cinslerinin konsantrasyonlarının belirlenmesi için ilgili eşitliklerde kullanılmıştır (D-Lactic Acid/L-Lactic Acid, t.y).

$$c = \frac{V \times M_a}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \text{ [g/l]}$$

c = Konsantrasyon

V = Son hacim (ml)

v = Örnek Hacmi (ml)

M_a = Deneydeki maddenin molekül ağırlığı (g/mol)

d = Işık yolu (cm)

ε = NADH için katsayı değeri (340 nm için, 6.3 l x mmol⁻¹ x cm⁻¹)

F = Seyreltme oranı olarak belirtilmiştir (D-Lactic Acid/L-Lactic Acid, t.y).

Gerekli sadeleştirmeler yapıldığında,

D-Laktik Asit miktarını belirlenmesi için kullanılan eşitlik,

$$c = \frac{2.240 \times 90.1}{\varepsilon \times 1.00 \times 0.100 \times 1000} \times \Delta A = \frac{2.018}{\varepsilon} \times \Delta A \text{ [g D-Laktik/1 örnek çözelti]}$$

L-Laktik Asit miktarını belirlenmesi için kullanılan eşitlik ise ,

$$c = \frac{2.260 \times 90.1}{\varepsilon \times 1.00 \times 0.100 \times 1000} \times \Delta A = \frac{2.036}{\varepsilon} \times \Delta A \text{ [(g L-Laktik)/(1 örnek çözelti)]}$$

olarak belirlenmiştir (D-Lactic Acid/L-Lactic Acid, t.y).

3.2.3. Laktik asit süpernatantının *Staphylococcus aureus* üzerine olan etkisi

Mueller Hinton (MH) Broth içerisinde +4'de saklanan *Staphylococcus aureus* patojen bakterileri, öncelikle 1/10 distile su ile seyreltilmiş MH Broth'a ekimleri yapılarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem sonucunda 24 saatlik taze kültür elde edilmesi amaçlanmıştır.

Deneyde kullanmak üzere hazırlanan 24 saatlik taze *Staphylococcus aureus* kültürlerinin konsantrasyonunu 10⁶- 10⁸ olarak ayarlamak için 3MF kullanılmıştır. Konsantrasyonu ayarlanan taze kültürden 20µl, taze hazırlanmış MH Broth'tan 90 µl ve daha önce filtreden geçirilip steril halde hazırlanmış olan supernatant'lardan da 90 µl alınarak, ELISA mikro kuyucuklarına inoküle edilmiştir. İnoküle edilen bu solüsyonlar, 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve 3 saatte bir OD₆₆₀ değerinde absorbans ölçümü yapılmıştır (Portella ve diğ., 2009).

Deneyde, kontrol amaçlı olarak kontrol solüsyonu adı verilen solüsyon hazırlanmıştır. Bu solüsyon, 20µl *Staphylococcus aureus* taze kültür, 90 µl taze hazırlanmış MH Broth ve %20 oranında distile su ile seyreltilmiş 90 µl taze hazırlanmış MRS Broth içermektedir. Aynı şekilde, kontrol solüsyonu da ELISA mikrokuyucuklarına inoküle edilmiş, 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır ve 3 saatte bir OD₆₆₀ değerinde absorbans ölçümü yapılmıştır. Kontrol solüsyonun amacı referans değeri sağlamaktadır.

3 saatte bir ölçülen değerler ile laktik asit bakterilerinin üretmiş olduğu laktik asit’in *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyonun yüzde değeri şu formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{İnhibasyon Yüzdesi (\%)} = \left(\frac{\text{OD Artışı (kontrol)} - \text{OD Artışı (örnek)}}{\text{OD Artışı (kontrol)}} \right) \times 100$$

OD Control: Kontrol’deki optik yoğunluğun artması

OD Örnek: Örnek’teki optik yoğunluğun artması (Portella ve diğ., 2009).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Leuconostos* Türleri'nin Üretmiş Olduğu Laktik Asit'in D (-) ve L(-) İzomerlerinin Cins ve Miktarları

Çizelge 4.1'de *Lactobacillus* türü LAB'nin üretmiş olduğu laktik asit'in cins ve miktarları gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 : *Lactobacillus* türü LAB'nin üretmiş olduğu laktik asit'in cins ve miktarları.

	Suş No	A ₁		Ort. A ₁	A ₂		Ort. A ₂	A ₂ - A ₁	$\Delta A_{D-laktik\ asit}$	D-Laktik Asit Konsantrasyonu (g/l)	A ₃		Ort. A ₃	A ₃ - A ₂	$\Delta A_{L-laktik\ asit}$	L-Laktik Asit Konsantrasyonu (g/l)
Blank		0,136	0,137	0,137	0,137	0,136	0,136	0,000	-0,014	-0,092	0,144	0,143	0,143	-11,856	-11,861	-76,663
B2 <i>Lactobacillus fermentum</i>	1	0,368	0,370	0,369	0,827	0,863	0,845	0,476	0,462	2,961	1,292	1,307	1,299	1,299	1,295	8,367
C3 <i>Lactobacillus fermentum</i>	2	0,365	0,366	0,366	0,859	0,853	0,856	0,490	0,476	3,051	1,377	1,378	1,377	1,377	1,372	8,870
B23 <i>Lactobacillus paracasei</i>	3	0,352	0,351	0,351	1,564	1,570	1,567	1,216	1,202	7,699	2,171	2,129	2,150	2,150	2,145	13,865
D29 <i>Lactobacillus para.sub.paracasei</i>	4	0,362	0,363	0,362	0,891	0,897	0,894	0,532	0,518	3,317	1,410	1,417	1,413	1,413	1,408	9,103
E8 <i>Lactobacillus para.sub.paracasei</i>	5	0,336	0,336	0,336	1,144	1,151	1,148	0,812	0,798	5,112	1,657	1,650	1,653	1,653	1,649	10,655
F30 <i>Lactobacillus plantarum</i>	6	0,357	0,360	0,358	1,192	1,202	1,197	0,839	0,825	5,283	1,696	1,705	1,701	1,701	1,696	10,960
E32 <i>Lactobacillus brevis</i>	7	0,352	0,353	0,353	0,916	0,916	0,916	0,564	0,550	3,522	1,400	1,416	1,408	1,408	1,403	9,068
C19 <i>Lactobacillus carphophilus</i>	8	0,363	0,364	0,363	1,053	1,056	1,054	0,691	0,677	4,336	1,620	1,625	1,622	1,622	1,618	10,455
A15 <i>Lactobacillus delbrueckii sub.delb.</i>	9	0,366	0,367	0,366	1,479	1,505	1,492	1,126	1,112	7,124	1,740	1,764	1,752	1,752	1,747	11,292
C55 <i>Lactobacillus salivarius</i>	10	0,360	0,362	0,361	1,293	1,303	1,298	0,937	0,923	5,913	1,696	1,704	1,700	1,700	1,695	10,957

D/L kitleri ile yapılan deney sonuçlarına göre, çalışmada kullanılan boza kaynaklı *Lactobacillus* bakteri suşlarından B2 *Lactobacillus fermentum* bakterisinin 2,96g/l, C3 *Lactobacillus fermentum* bakterisinin 3,05 g/l, B23 *Lactobacillus paracasei* bakterisinin 7,69 g/l, D29 *Lactobacillus paracasei spp. paracasei* bakterisinin 3,31 g/l, E8 *Lactobacillus paracasei spp. paracasei* bakterisinin 5,11 g/l, F30 *Lactobacillus plantarum* bakterisinin 5, 28 g/l, E32 *Lactobacillus brevis* bakterisinin 3,52 g/l, C19 *Lactobacillus carphophilus* bakterisinin 4,33 g/l, A15 *Lactobacillus delbrueckii spp. delbrueckii* bakterisinin 7,12 g/l, C55 *Lactobacillus salivarius* bakterisinin 5,91 g/ml miktarda D(-)-laktik asit izomerini sentezlediği ortaya çıkmıştır.

Bunun yanında, aynı bakteri suşları olan B2 *Lactobacillus fermentum* bakterisinin 2,90g/l, C3 *Lactobacillus fermentum* bakterisinin 3,33 g/l, B23 *Lactobacillus paracasei* bakterisinin 3,73 g/l, D29 *Lactobacillus paracasei spp. paracasei* bakterisinin 3,32 g/l, E8 *Lactobacillus paracasei spp. paracasei* bakterisinin 3,23 g/l, F30 *Lactobacillus plantarum* bakterisinin 3,22 g/l, E32 *Lactobacillus brevis*

bakterisinin 3,14 g/l, C19 *Lactobacillus carphophilus* bakterisinin 3,64 g/l, A15 *Lactobacillus delbrueckii spp. delbrueckii* bakterisinin 1, 64 g/l, C55 *Lactobacillus salivarius* bakterisinin 2,56 g/ml miktarda L(+)-laktik asit izomerini sentezlediği belirlenmiştir. Çizelge 4.2’de *Lactococcus* türü LAB’nin üretmiş olduğu laktik asit’in cins ve miktarları gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 : *Lactococcus* türü LAB’nin üretmiş olduğu laktik asit’in cins ve miktarları.

	Suş No	A ₁	Ort. A ₁	A ₂	Ort. A ₂	A ₂ - A ₁	ΔA _D -laktik asit	D-Laktik Asit Konsantrasyonu (g/l)	A ₃	Ort. A ₃	A ₃ - A ₂	ΔA _L -laktik asit	L-Laktik Asit Konsantrasyonu (g/l)		
Blank		0,136	0,137	0,137	0,136	0,136	0,000	-0,014	-0,092	0,144	0,143	0,143	0,139	0,895	
F39 <i>Lactococcus raffinolactis</i>	11	0,372	0,373	0,372	0,901	0,901	0,901	0,529	0,515	3,300	1,436	1,447	1,442	1,437	9,287
B49 <i>Lactococcus raffinolactis</i>	12	0,355	0,354	0,354	1,322	1,321	1,322	0,967	0,953	6,107	1,836	1,887	1,861	1,857	11,999

Yapılan çalışmada, diğer kullanılan tür olan boza kaynaklı *Lactococcus* bakteri suşlarından F39 *Lactococcus raffinolactis* bakterisinin 3,49 g/l ve B49 *Lactococcus raffinolactis* bakterisinin ise 3,45 g/l /ml miktarda miktarda L(+)-laktik asit izomerini sentezlediği bulunmuştur. Çizelge 4.3’te *Leuconostoc* türü LAB’nin üretmiş olduğu laktik asit’in cins ve miktarları gösterilmiştir.

Çizelge 4.3 : *Leuconostoc* türü LAB’nin üretmiş olduğu laktik asit’in cins ve miktarları.

	Suş No	A ₁		Ort. A ₁	A ₂		Ort. A ₂	A ₂ - A ₁	ΔA _{D-laktik asit}	D-Laktik Asit Konsantrasyonu (g/l)
Blank		0,136	0,137	0,137	0,137	0,136	0,136	0,000	-0,014	-0,092
E55 <i>Leuconostoc lactis</i>	13	0,343	0,343	0,343	1,364	1,364	1,364	1,021	1,007	6,452
B56 <i>Leuconostoc citreum</i>	14	0,357	0,356	0,357	1,049	1,051	1,050	0,693	0,679	4,353
A31 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	15	0,369	0,371	0,370	1,250	1,254	1,252	0,882	0,868	5,562

Boza kaynaklı *Leuconostoc* bakteri suşlarından E55 *Leuconostoc lactis* bakterisinin 6,45 g/l, B56 *Leuconostoc citreum* bakterisinin, 4,35 g/l /ml ve A31 *Leuconostoc mesenteroides* bakterisinin ise 5,56 g/l miktarda D(-)-laktik asit izomerini sentezlediği saptanmıştır.

4.2 *Lactobacillus* Türü’nün Ürettiği Laktik Asit Süpernatant’ının *Staphylococcus aureus* Üzerindeki İnhibasyon Etkisi

Çizelge 4.4’te *Lactobacillus* türü’nün ürettiği laktik asit süpernatantının vermiş olduğu absorbands değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.4 : *Lactobacillus* türü'nün ürettiği laktik asit süpernatantının vermiş olduğu absorbens değerleri.

Absorbans Değerleri	0.Saat	3.Saat	6.Saat	9.Saat	12.Saat	24.Saat
MRS (Kontrol)	0,245	0,373	0,751	0,882	0,867	0,887
D41 <i>Lactobacillus plantarum</i>	0,234	0,320	0,546	0,662	0,707	0,956
F30 <i>Lactobacillus plantarum</i>	0,243	0,276	0,277	0,287	0,297	0,321
B10 <i>Lactobacillus fermentum</i>	0,244	0,253	0,270	0,292	0,291	0,106
E32 <i>Lactobacillus brevis</i>	0,251	0,270	0,268	0,271	0,281	0,304
B23 <i>Lactobacillus paracasei</i>	0,250	0,270	0,271	0,279	0,282	0,317
E8 <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	0,228	0,255	0,278	0,269	0,295	0,304
C19 <i>Lactobacillus coprophilus</i>	0,250	0,250	0,282	0,289	0,308	0,321
C55 <i>Lactobacillus salivarius</i>	0,259	0,248	0,270	0,271	0,290	0,297

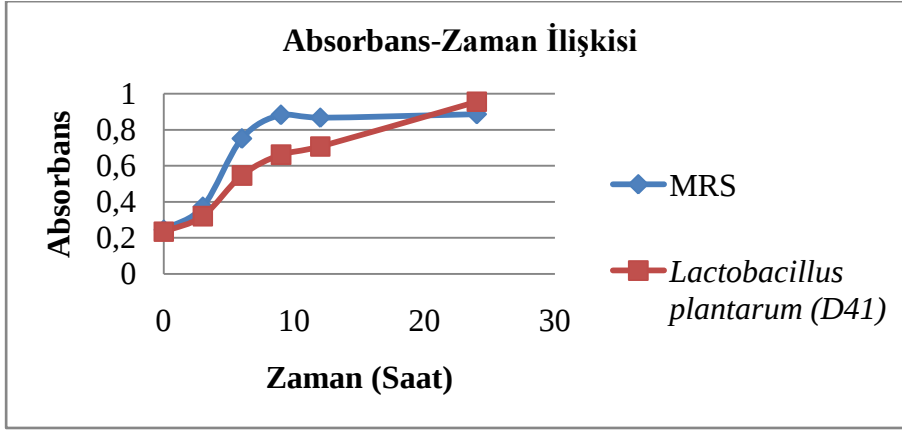
Çizelge 4.5'te *Lactobacillus* türü'nün ürettiği laktik asit süpernatantının *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.5 : *Lactobacillus* türü'nün ürettiği laktik asit süpernatantının *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

Yüzde İnhibisyon Değerleri	0.Saat	3.Saat	6.Saat	9.Saat	12.Saat	24.Saat
D41 <i>Lactobacillus plantarum</i>	4,286	14,19	27,198	24,986	18,397	-7,835
F30 <i>Lactobacillus plantarum</i>	0,816	25,971	62,974	67,479	65,686	63,811
B10 <i>Lactobacillus fermentum</i>	0,204	32,262	63,971	66,856	66,378	88,05
E32 <i>Lactobacillus brevis</i>	-2,449	27,711	64,171	69,235	67,532	65,671
B23 <i>Lactobacillus paracasei</i>	-2,041	27,577	63,772	68,385	67,474	64,262
E8 <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	6,939	31,727	62,841	69,518	65,917	65,671
C19 <i>Lactobacillus coprophilus</i>	-2,245	33,066	62,375	67,195	64,418	63,755
C55 <i>Lactobacillus salivarius</i>	-5,714	33,467	63,905	69,292	66,551	66,46

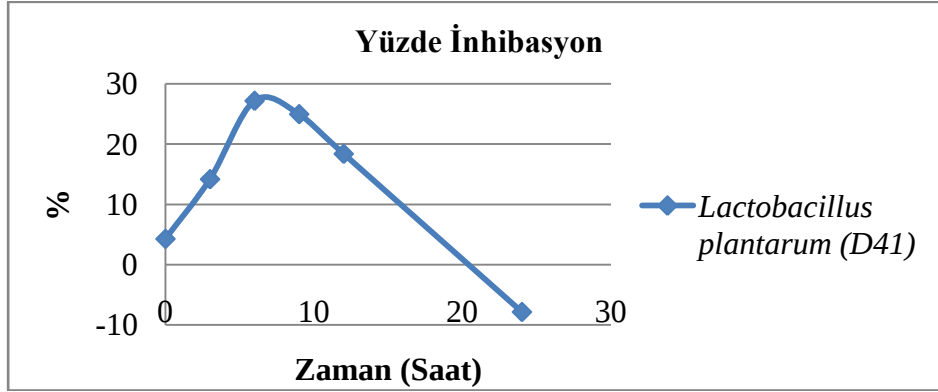
Yapılan ölçümlere göre, kontrol solüsyonun absorbens değeri ilk 3 saate kadar artmıştır. 3. saatten 6. saate olan sürede absorbens değeri ise hızla artış göstermiş, 6. saatten 24. saate kadar olan sürede ise absorbens değerleri yeniden artmıştır. 6. saatten 24. saat arasındaki zaman içerisindeki absorbens değerindeki bu artma düşük oranlarda olmuştur.

Şekil 4.1'de D41 *Lactobacillus plantarum* suşunun kontrol solüsyonuna göre absorbens değerleri gösterilmiştir. Şekle göre, D41 *Lactobacillus plantarum* bakterisi suşunun absorbens değerleri yaklaşık 24. Saate kadar düzenli bir şekilde artmıştır. Tüm değerler, kontrol solüsyonu'nun verdiği sayısal absorbens değerleriyle paralellik göstermekte ve 24. Saatin sonunda ise kontrol solüsyonunun ölçüm değerinin üzerine çıkmaktadır.



Şekil 4.1 : D41 *Lactobacillus plantarum* suşunun kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri.

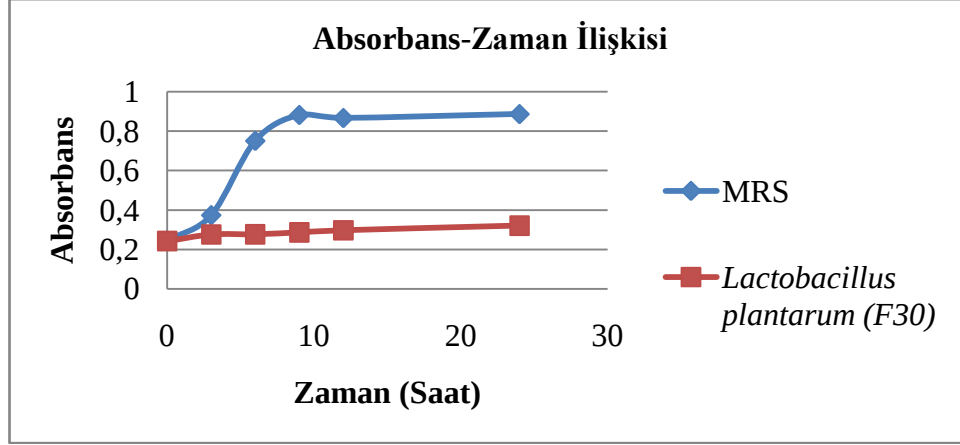
Şekil 4.2’de D41 *Lactobacillus plantarum* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.2 : D41 *Lactobacillus plantarum* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

Lactobacillus plantarum (D41) suşunun, *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon yüzdesi 0. saatten 6. saatte kadar olan zamanda artmakta ve 6. saatte % 27 değeri ile en yüksek değere ulaşmaktadır. 6. saatten 24. saate kadar olan sürede ise inhibisyon yüzdesi hızlı bir şekilde düşmektedir. Bu durum, *L. plantarum*’dan elde edilen laktik asit’in *Staphylococcus aureus*’u inhibe etmediğini göstermektedir.

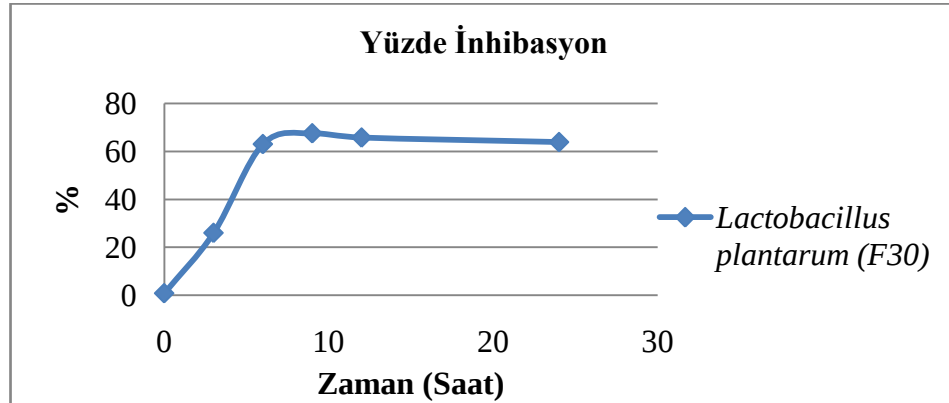
Şekil 4.3, F30 *Lactobacillus plantarum* suşunun kontrol solüsyonuna göre absorbans değerlerini göstermiştir.



Şekil 4.3 : F30 *Lactobacillus plantarum* suşunun kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri.

F30 *Lactobacillus plantarum* bakteri suşunun, ölçülen zaman aralıklarındaki absorbans değerlerinde büyük farkların bulunmamasıyla beraber, absorbans değerleri 24. saate kadar olan zaman aralığında artmıştır. Bu artış değerleri oldukça düşük oranlardadır. Ayrıca, bu değerler kontrol solüsyonunun verdiği absorbans değerlerinden oldukça düşük olduğu belirlenmiştir.

Şekil 4.4’de F30 *Lactobacillus plantarum* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.

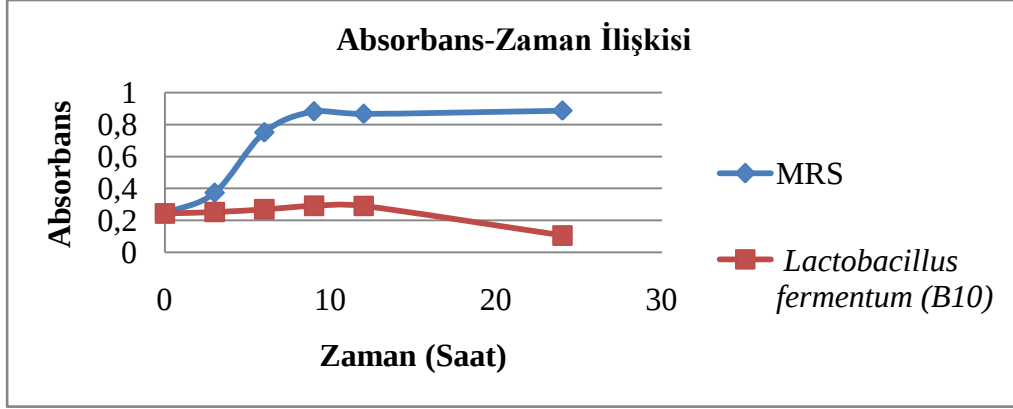


Şekil 4.4 : F30 *Lactobacillus plantarum* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

F30 *Lactobacillus plantarum* suşunun, *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon yüzdesi, 0. saatten 6. saate kadar olan zamanda büyük bir hızla artmakta, 6. saatten 9. saate kadar olan zamanda düşük artma oranına sahip olarak artmakta ve 9. saatte % 67.5 değeri ile en yüksek değere ulaşmaktadır. 9. saat ile 24. saat arasındaki geçen sürede, inhibisyon yüzdesinde bir azalma meydana gelse de, değerler arasında çok büyük bir farklılık bulunmamaktadır. Sonuç olarak bu durum, Bu durum, *L.*

plantarum'dan elde edilen laktik asit'in *Staphylococcus aureus*'u inhibe etmiş olduğunu göstermektedir.

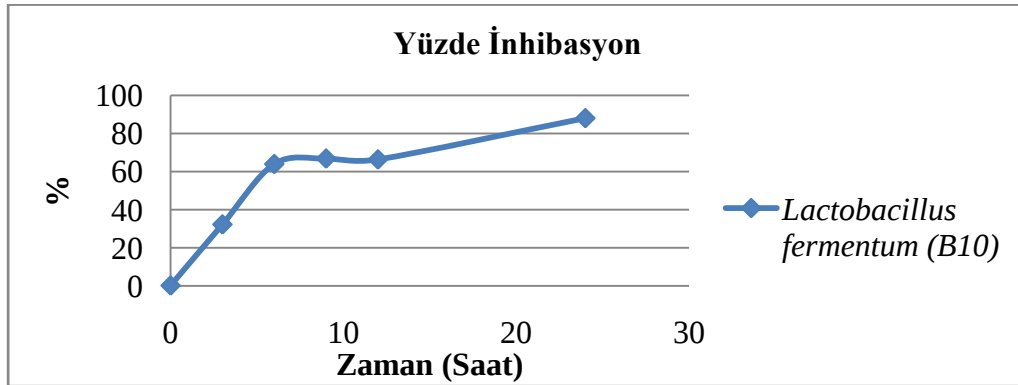
Şekil 4.5'de B10 *Lactobacillus fermentum* suşunun kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.5 : B10 *Lactobacillus fermentum* suşunun kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri.

B10 *Lactobacillus fermentum* bakteri suşunun 0. saatten 9. saate kadar olan zamanda ölçülen absorbans değerlerinin arttığı, 9. saatten 24. saate kadar olan sürede ise bu değerlerin azaldığı gözlemlenmiştir. Artan ve azalan her absorbans değerinin, kontrol solüsyonunun verdiği absorbans değerlerinden oldukça düşük olduğu belirlenmiştir.

Şekil 4.6'da B10 *Lactobacillus fermentum* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.

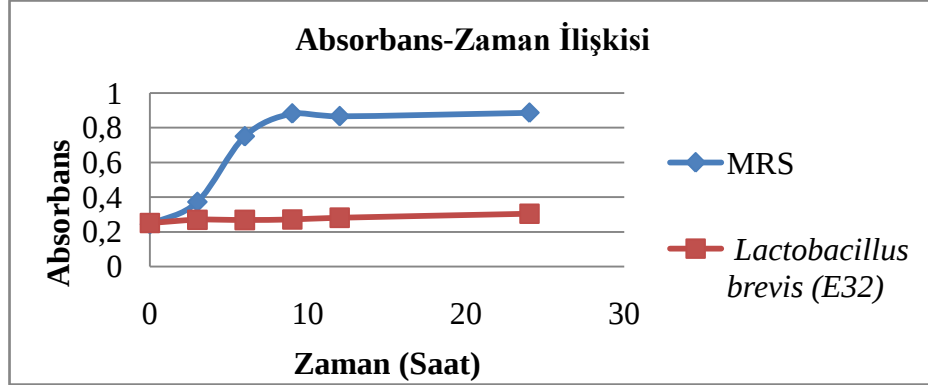


Şekil 4.6 : B10 *Lactobacillus fermentum* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

B10 *Lactobacillus fermentum* suşunun, *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon yüzdesi 0. saatten 6. saate kadar olan zamanda hızla artmakta, 6. saatten 9. saate kadar olan zamanda düşük artma oranına sahip olarak artmakta ve 9. saatte ise %67

oranı ile en yüksek değerine ulaşmaktadır. 9. saatten 24. saate kadar geçen sürede ise bu oran düşük artma oranına sahip olarak artış göstermektedir. Bu durum, *L. fermentum*'dan elde edilen laktik asit'in *Staphylococcus aureus*'u inhibe etmiş olduğunu göstermektedir

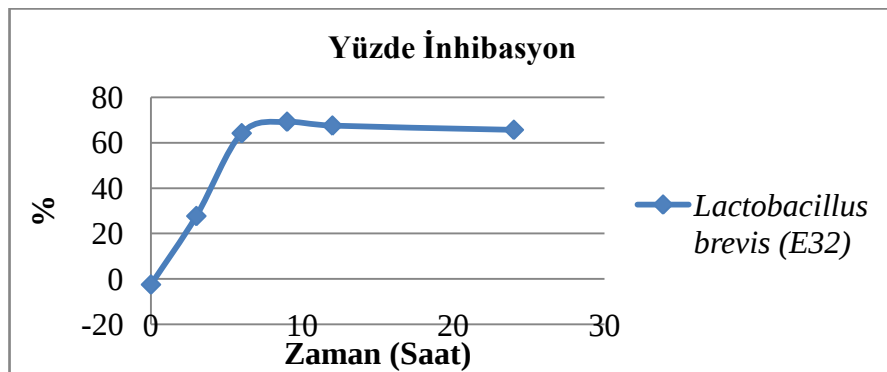
Şekil 4.7'de E32 *Lactobacillus brevis* suşunun kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.7 : E32 *Lactobacillus brevis* suşunun kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri.

E32 *Lactobacillus brevis* bakteri suşunun 0. saatten 24. saate kadar absorbans değerinde hem artış hem de azalış meydana gelerek, dalgalanma göstermiştir. Bu değerler, hiçbir ölçüm anında 0. saatteki ölçüm değerinin altına inmemekle beraber, en yüksek ölçüm değerine ise 24. Saate ulaşmıştır. Buna ek olarak, artan ve azalan her absorbans değerinin kontrol solüsyonunun verdiği absorbans değerlerinden oldukça düşük olduğu belirlenmiştir.

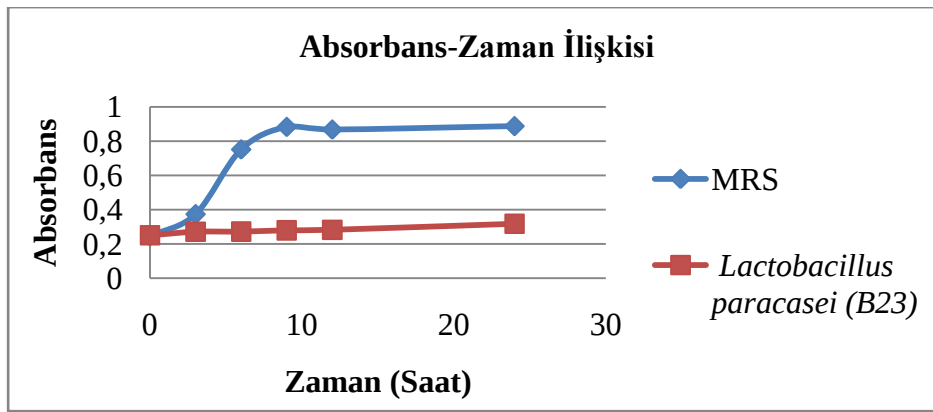
Şekil 4.8'de E32 *Lactobacillus brevis* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.8 : E32 *Lactobacillus brevis* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

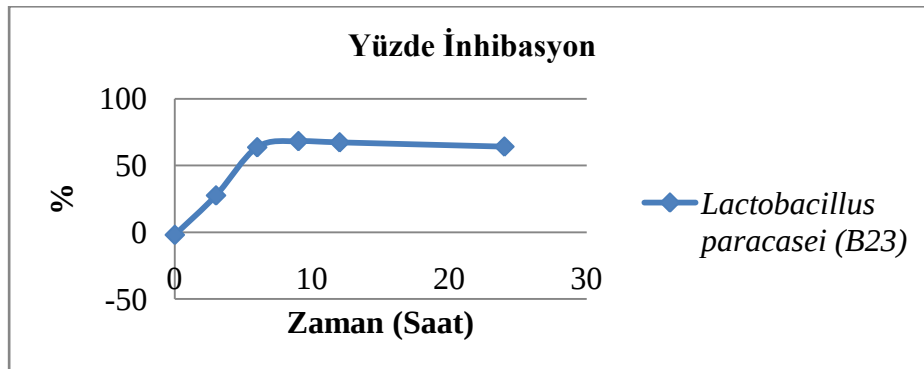
E32 *Lactobacillus brevis* suşunun, *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon yüzdesi 0. saatten 6. saate kadar olan zamanda hızla artmakta, 6. saatten 9. saate kadar olan zamanda düşük artma oranına sahip olarak artmakta ve 9. saatte % 69 oranı ile en yüksek değerine ulaşmaktadır. 9. saatten 24. saate kadar geçen sürede ise yüzde inhibisyon değerleri azalmakla beraber, azalma oranlarının değeri oldukça düşük seviyededir. Bu durum, *L. brevis*’den elde edilen laktik asit’in *Staphylococcus aureus*’u inhibe etmiş olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.9’da B23 *Lactobacillus paracasei* suşunun, kontrol solüsyonuna göre absorbands değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.9 : B23 *Lactobacillus paracasei* suşunun kontrol solüsyonuna göre absorbands değerleri.

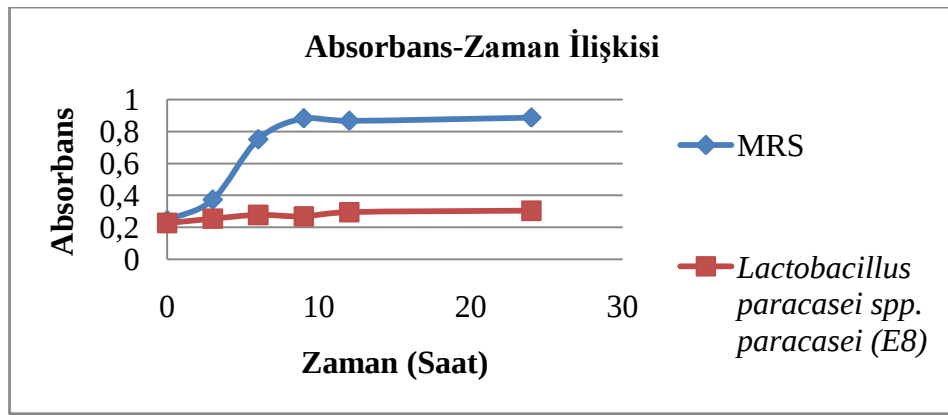
B23 *Lactobacillus paracasei* bakteri suşunun, ölçülen zaman aralıklarındaki absorbands değerlerinde büyük farkların bulunmamasıyla beraber, absorbands değerleri 24. saate kadar olan zamanda artmıştır. Bu artış değerleri oldukça düşük oranlardadır. Ayrıca, bu değerler kontrol solüsyonunun verdiği absorbands değerlerinden oldukça düşüktür. Şekil 4.10’da B23 *Lactobacillus paracasei* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.10 : B23 *Lactobacillus paracasei* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

B23 *Lactobacillus paracasei* suşunun, *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon yüzdesi 0. saatten 6. saate kadar olan sürede hızla artmakta, 6. saatten 9. saate kadar olan sürede düşük artma oranına sahip olarak artmakta ve 9. saatte ise % 68 oranı ile en yüksek değerine ulaşmaktadır. 9. saatten 24. saate kadar geçen sürede ise yüzde inhibisyon değerleri azalmakla beraber, azalma oranlarının değeri oldukça düşük seviyededir. Sonuç olarak, bu durum *L. paracasei*'den elde edilen laktik asit'in *Staphylococcus aureus*'u inhibe etmiş olduğunu göstermektedir.

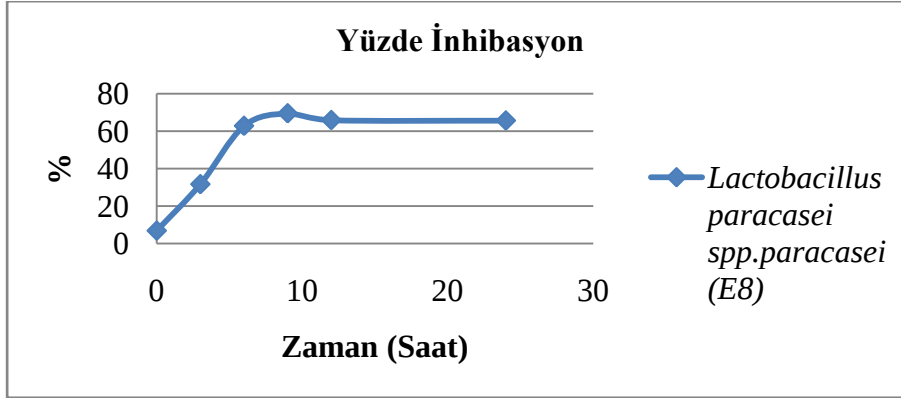
Şekil 4.11'de E8 *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* suşunun, kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.11 : E8 *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* suşunun kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri.

E8 *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* bakteri suşunun, ölçülen zaman aralıklarındaki absorbans değerlerinde büyük farklar bulunmamaktadır. Absorbans değerleri, 0. saatten 6. saate kadar artmış, 6. saatten 9. saate kadar absorbans değerinde biraz azalma görülse de, 9. saatten 24. saate kadar olan sürede, absorbans değerleri yeniden artmıştır. Artış oran değerleri oldukça düşük seviyelerdedir. Ayrıca, bu değerler kontrol solüsyonunun verdiği absorbans değerlerinden oldukça düşüktür.

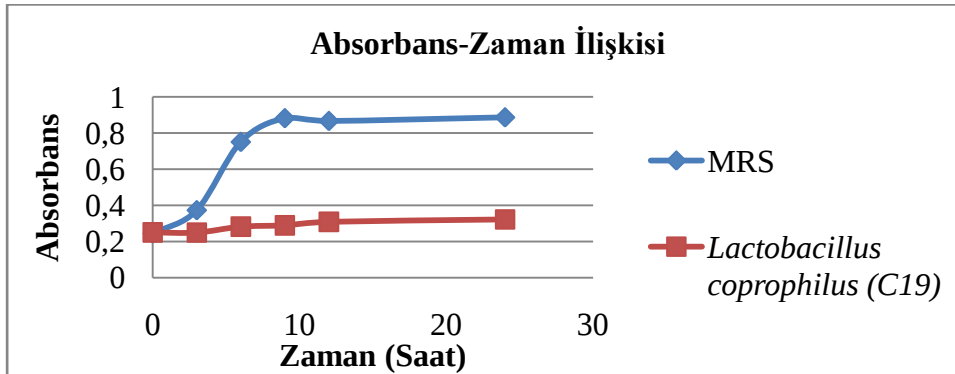
Şekil 4.12'de E8 *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.12 : E8 *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

E8 *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* suşunun, *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon yüzdesi 0. saatten 6. saate kadar olan sürede hızla artmakta, 6. saatten 9. saate kadar olan sürede düşük artma oranına sahip olarak artmakta ve 9. saatte ise % 70 oranı ile en yüksek değerine ulaşmaktadır. 9. saatten 24. saate kadar geçen sürede ise yüzde inhibisyon değerleri azalmakla beraber, azalma oranlarının değeri oldukça düşük seviyededir. Bu durum, *L. paracasei* spp. *paracasei*'den elde edilen laktik asit'in *Staphylococcus aureus*'u inhibe etmiş olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.13'de C19 *Lactobacillus coprophilus* suşunun, kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri gösterilmiştir.

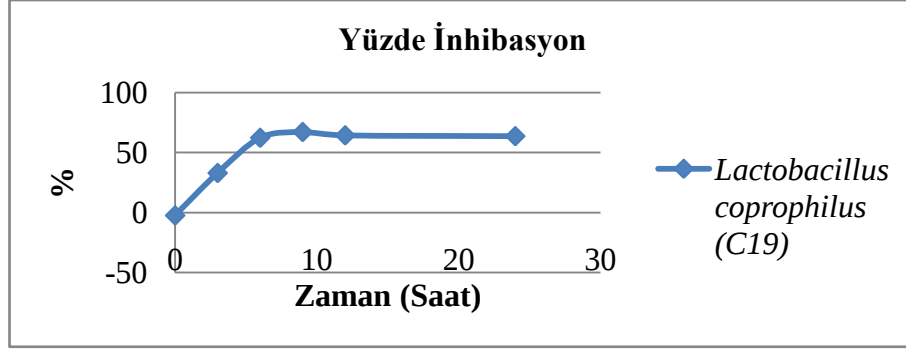


Şekil 4.13 : C19 *Lactobacillus coprophilus* suşunun, kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri.

C19 *Lactobacillus coprophilus* bakteri suşunun, ölçülen zaman aralıklarındaki absorbans değerlerinde büyük farklar bulunmamaktadır. Absorbans değerleri, 0. saatten 6. saate kadar artmış, 6. saatten 9. saate kadar absorbans değerinde biraz azalma görülse de, 9. saatten 24. saate kadar olan sürede, absorbans değerleri

yeniden artmıştır. Artış oran değerleri oldukça düşük seviyelerdedir. Ayrıca, bu değerler kontrol solüsyonunun verdiği absorbans değerlerinden oldukça düşüktür.

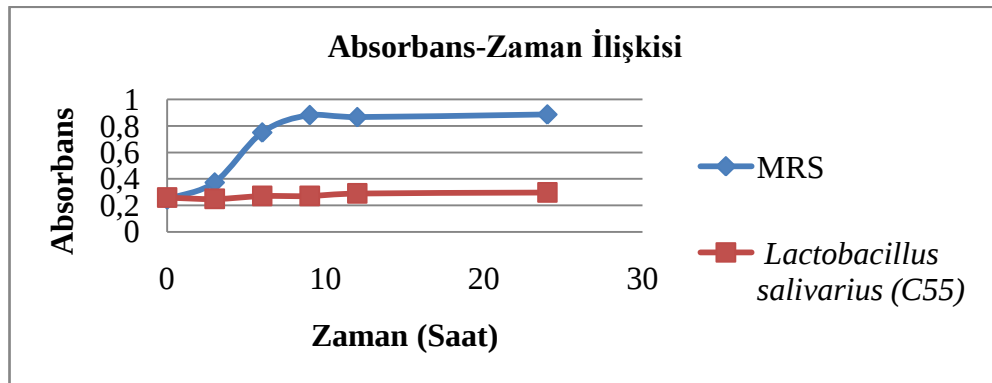
Şekil 4.14’de C19 *Lactobacillus coprophilus* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.14 : C19 *Lactobacillus coprophilus* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

C19 *Lactobacillus coprophilus* suşunun, *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon yüzdesi 0. saatten 6. saate kadar olan sürede hızla artmakta, 6. saatten 9. saate kadar olan sürede düşük artma oranına sahip olarak artmakta ve 9. saatte ise % 67 oranı ile en yüksek değerine ulaşmaktadır. 9. saatten 24. saate kadar geçen sürede ise yüzde inhibisyon değerleri azalmakla beraber, azalma oranlarının değeri oldukça düşük seviyededir. Bu durum, *L. coprophilus*’dan elde edilen laktik asit’in *Staphylococcus aureus*’u inhibe etmiş olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.15’de C55 *Lactobacillus salivarius* suşunun, kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri gösterilmiştir.

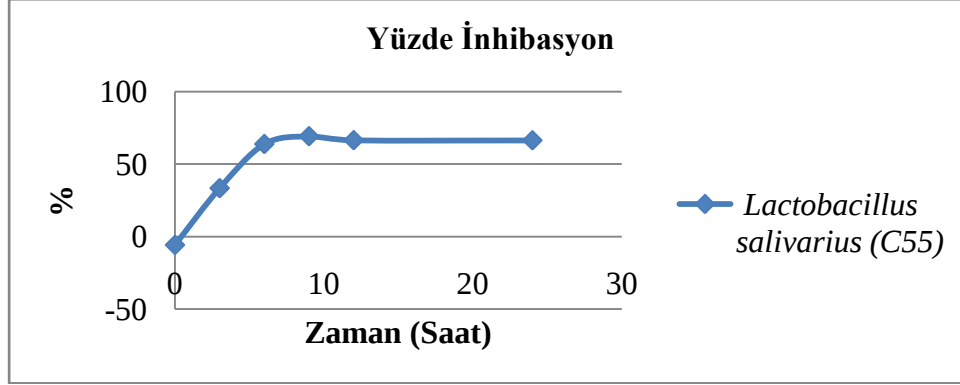


Şekil 4.15 : C55 *Lactobacillus salivarius* suşunun, kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri.

C55 *Lactobacillus salivarius* bakteri suşunun 0. saatten 3. saate kadar olan zamanda ölçülen absorbans değerlerinin azaldığı, 3. saatten 24. saate kadar olan sürede ise bu

değerlerin arttığı gözlemlenmiştir. 3. saatten 24. Saate kadar olan süredeki ölçülen absorbans değerlerindeki artış oranları oldukça düşük seviyelerde olup bu değerler kontrol solüsyonunun verdiği absorbans değerlerinden oldukça düşüktür.

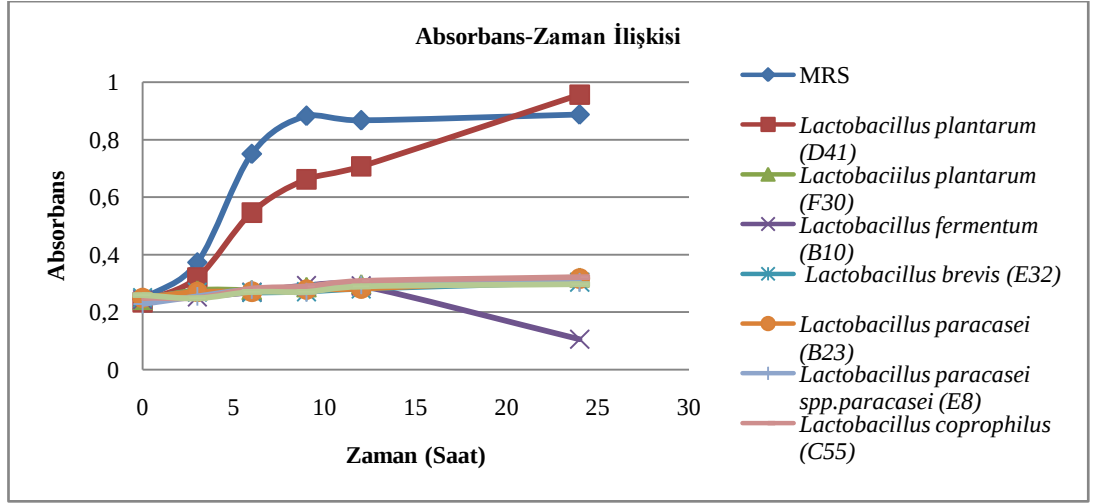
Şekil 4.16'da C55 *Lactobacillus salivarius* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.16 : C55 *Lactobacillus salivarius* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

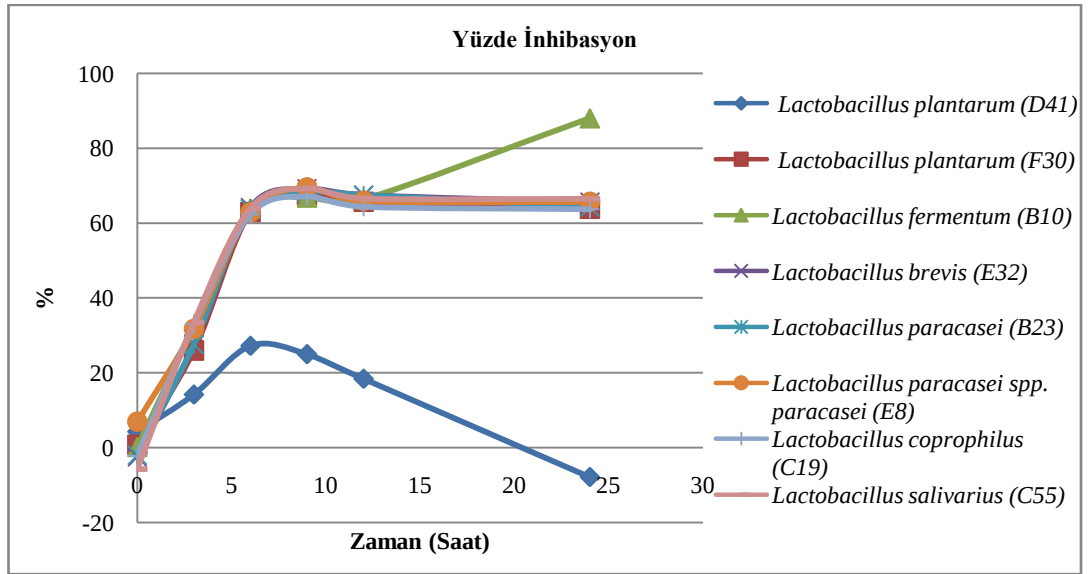
C55 *Lactobacillus salivarius* bakteri suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon yüzdesi 0. saatten 6. saate kadar olan zamanda hızla artmakta, 6. saatten 9. saate kadar olan zamanda düşük artma oranına sahip olarak artmakta ve 9. saatte % 69 oranı ile en yüksek değerine ulaşmaktadır. 9. saatten 24. saate kadar geçen sürede ise yüzde inhibisyon değerleri azalmakla beraber, azalma oranlarının değeri oldukça düşük seviyede olmaktadır. Bu durum, *L. salivarius*'dan elde edilen laktik asit'in *Staphylococcus aureus*'u inhibe etmiş olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.17'de tüm *Lactobacillus* bakteri suşlarının kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.17 : Tüm *Lactobacillus* bakteri suşlarının kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri.

Şekil 4.18’de tüm *Lactobacillus* bakteri suşlarının *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.18 : Tüm *Lactobacillus* bakteri suşlarının *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

4.3 *Lactococcus* Türü’nün Ürettiği Laktik Asit Süpernatant’ının *Staphylococcus aureus* Üzerindeki İnhibasyon Etkisi

Çizelge 4.6’da *Lactococcus* türü’nün ürettiği laktik asit süpernatant’ının vermiş olduğu absorbans değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.6 : *Lactococcus* türü'nün ürettiği laktik asit süpernatant'ının vermiş olduğu absorbands değerleri.

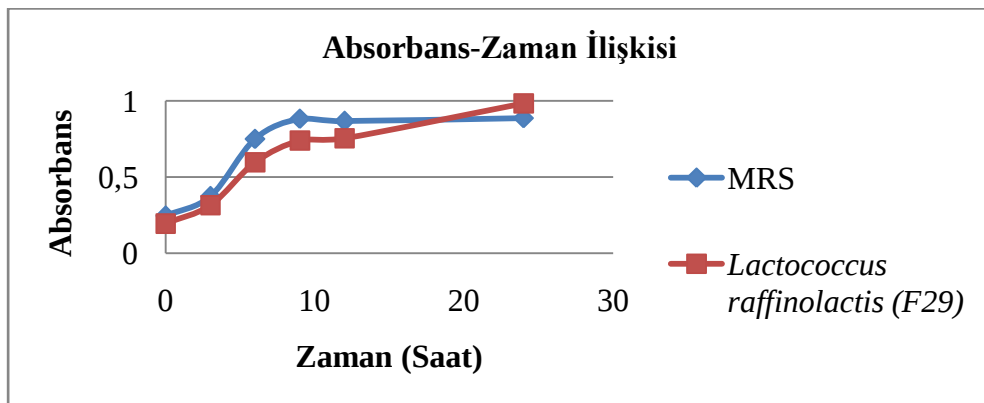
Absorbans Değerleri	0.Saat	3.Saat	6.Saat	9.Saat	12.Saat	24.Saat
MRS (Kontrol)	0,245	0,373	0,751	0,882	0,867	0,887
F29 <i>Lactococcus raffinolactis</i>	0,194	0,316	0,597	0,740	0,754	0,983
B49 <i>Lactococcus raffinolactis</i>	0,247	0,263	0,282	0,345	0,383	0,480
F39 <i>Lactococcus raffinolactis</i>	0,203	0,387	0,735	0,798	0,811	1,017
E57 <i>Lactococcus lactis</i>	0,252	0,265	0,270	0,295	0,305	0,345
F45 <i>Lactococcus lactis</i>	0,265	0,271	0,265	0,273	0,278	0,321
A47 <i>Lactococcus lactis spp. lactis</i>	0,230	0,268	0,261	0,256	0,248	0,294

Çizelge 4.7'de *Lactococcus* türü'nün ürettiği laktik asit süpernatant'ının *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.7 : *Lactococcus* türü'nün ürettiği laktik asit süpernatant'ının *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

Yüzde İnhibasyon	0.Saat	3.Saat	6.Saat	9.Saat	12.Saat	24.Saat
F29 <i>Lactococcus raffinolactis</i>	20,612	15,261	20,481	16,091	12,976	-10,879
B49 <i>Lactococcus raffinolactis</i>	-0,816	28,585	62,375	60,907	55,825	45,829
F39 <i>Lactococcus raffinolactis</i>	16,939	-3,748	2,061	9,575	6,459	-14,713
E57 <i>Lactococcus lactis</i>	-3,061	28,916	63,971	66,516	64,821	61,048
F45 <i>Lactococcus lactis</i>	-8,163	27,309	64,636	69,065	67,935	63,754
A47 <i>Lactococcus lactis spp. lactis</i>	6,122	28,112	65,168	70,935	71,396	66,798

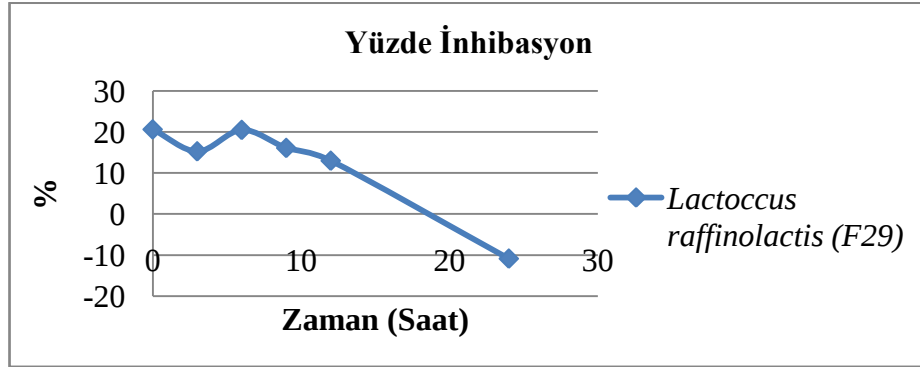
Yapılan ölçümlere göre, kontrol solüsyonun ölçülen zaman aralıklarındaki absorbands değerleri 24. saate kadar olan zaman aralığında artmıştır. Bu artış değerleri 3. saat'ten 6. saate kadar olan zamanda hızlı bir artış oranına sahip olmakla beraber, diğer zaman aralıklarında oldukça düşük oranlarda olup, bu zaman aralığındaki absorbands değerleri birbirlerine yakın değerlerdedir. Şekil 4.19'da F29 *Lactococcus raffinolactis* suşunun, kontrol solüsyonuna göre absorbands değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.19 : F29 *Lactococcus raffinolactis* suşunun, kontrol solüsyonuna göre absorbands değerleri.

F29 *Lactococcus raffinolactis* bakteri suşunun absorbans değerleri 24. saate kadar olan zamanda artmıştır. Bu değerler, 0. saatten 9. saate kadar olan zamanda hızla artmakta, 9. saatten 12. saate kadar olan zamanda düşük artma oranına sahip olarak artmakta ve 24. saatte ise en yüksek değerine ulaşmaktadır. Ayrıca, bu değerler kontrol solüsyonunun verdiği absorbans değerlerine yakın değerler olmaktadır.

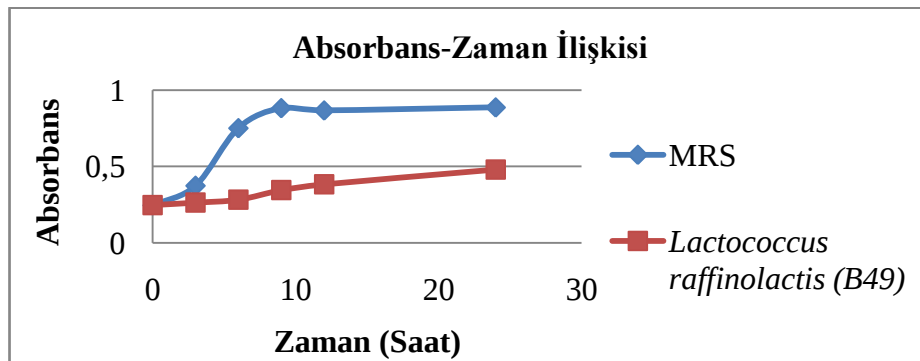
Şekil 4.20’de F29 *Lactococcus raffinolactis* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.20 : F29 *Lactococcus raffinolactis* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

F29 *Lactococcus raffinolactis* suşunun, *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon yüzdesi 0. saatten 3. saate kadar olan zamanda azalmakta, 3. saatten 6. saate kadar olan zaman diliminde ise 0. saatteki değerine ulaşarak artmakta ve 6. saatten sonra ise hızla azalmaktadır. Yüzde inhibisyon değerinin en yüksek olduğu zamanlar ise %20 değeri ile 0. ve 3. saat ölçümlerinde olmaktadır. Bu durum, *Lc. raffinolactis*’den elde edilen laktik asit’in *Staphylococcus aureus*’u inhibe etmediğini göstermektedir.

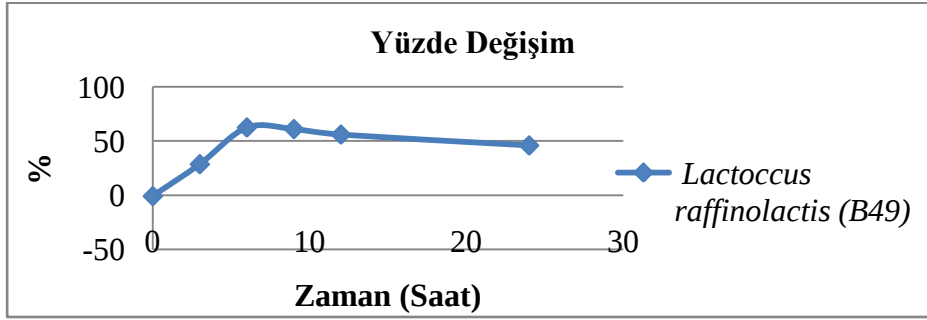
Şekil 4.21’de B49 *Lactococcus raffinolactis* suşunun, kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.21 : B49 *Lactococcus raffinolactis* suşunun, kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri.

B49 *Lactococcus raffinolactis* bakteri suşunun ölçülen zaman aralıklarındaki absorbans değerlerinde büyük farkların bulunmamasıyla beraber, absorbans değerleri 24. saate kadar olan zaman aralığında artmıştır. Ayrıca, bu değerler kontrol solüsyonunun verdiği absorbans değerlerinden oldukça düşük olduğu gözlemlenmiştir.

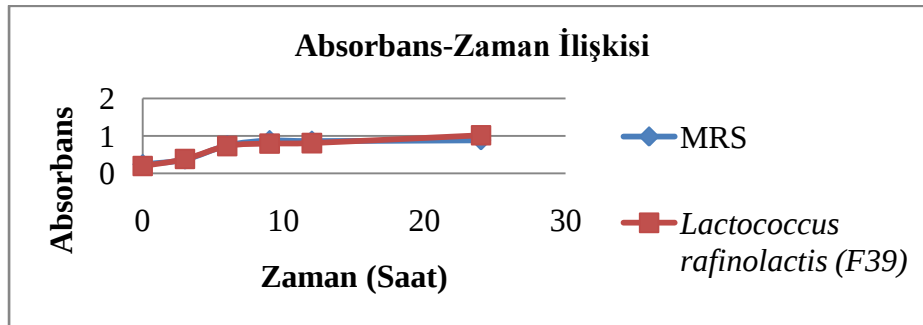
Şekil 4.22’de B49 *Lactococcus raffinolactis* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.22 : B49 *Lactococcus raffinolactis* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

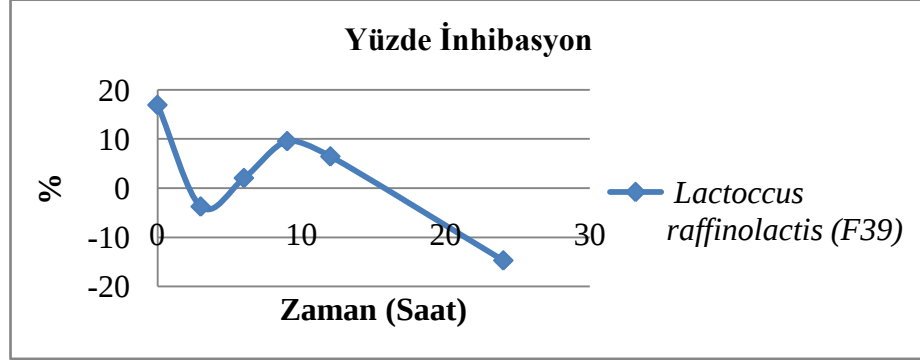
B49 *Lactococcus raffinolactis* bakteri suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon yüzdesi 0. saatten 6. saate kadar olan zamanda hızla artmakta, 6. saatte % 62 oranı ile en yüksek değerine ulaşmakta ve 6. saatten 24. saate kadar olan zamanda ise hızla düşmektedir. 6. saatten 24. saate kadar olan zamandaki yüzde inhibisyon oranlarındaki azalma düşük seviyede olmaktadır. Bu durum, *Lc. raffinolactis*’den elde edilen laktik asit’in *Staphylococcus aureus*’u inhibe etmiş olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.23’de F39 *Lactococcus raffinolactis* suşunun, kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri gösterilmiştir.



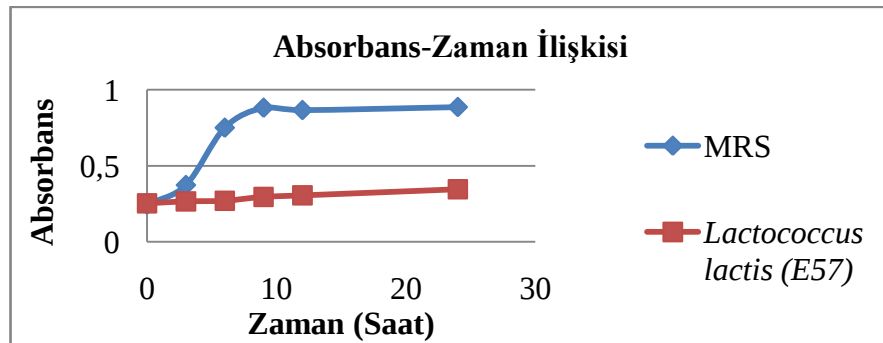
Şekil 4.23 : F39 *Lactococcus raffinolactis* suşunun, kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri.

F39 *Lactococcus raffinolactis* bakteri suşunun ölçülen zaman aralıklarındaki absorbans değerleri 24. saate kadar olan zaman aralığında artmıştır. 24. saate kadar olan zaman aralıklarında artan absorbans değerlerinin artma oranları yüksek ve düşük olarak çeşitlilik göstermiştir. Ayrıca, bu değerler kontrol solüsyonunun verdiği absorbans değerleri ile paralellik göstermektedir. Şekil 4.24’de F39 *Lactococcus raffinolactis* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.24 : F39 *Lactococcus raffinolactis* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

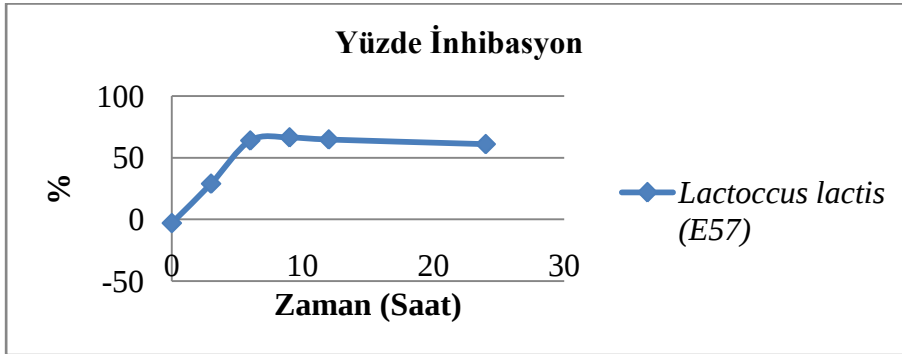
F39 *Lactococcus raffinolactis* bakteri suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon yüzdesi 0. saatten 3. saate kadar olan zamanda hızla azalmakta, 3. saatten 12. saate kadar artmakta ve 12.saatten 24. saate kadar olan zamanda ise yeniden azalmaktadır. Bu zaman aralıklarında, yüzde inhibisyonun azalma oranları oldukça yüksek olup, artma oranları ise düşük oranlardadır. Yüzde inhibisyonun en yüksek olduğu zaman ise, 0. saatteki %17 oranı ile yapılan ölçümde kendisini göstermiştir. Bu durum, *Lc. raffinolactis*’den elde edilen laktik asit’in *Staphylococcus aureus*’u inhibe etmediğini göstermektedir. Şekil 4.25’de E57 *Lactococcus lactis* suşunun, kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.25: E57 *Lactococcus lactis* suşunun, kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri.

E57 *Lactococcus lactis* bakteri suşunun, ölçülen zaman aralıklarındaki absorbans değerlerinde büyük farkların bulunmamasıyla beraber, absorbans değerleri 24. saate kadar olan zamanda artmıştır. Bu artış değerleri oldukça düşük oranlardadır. Ayrıca, bu değerler kontrol solüsyonunun verdiği absorbans değerlerinden oldukça düşüktür.

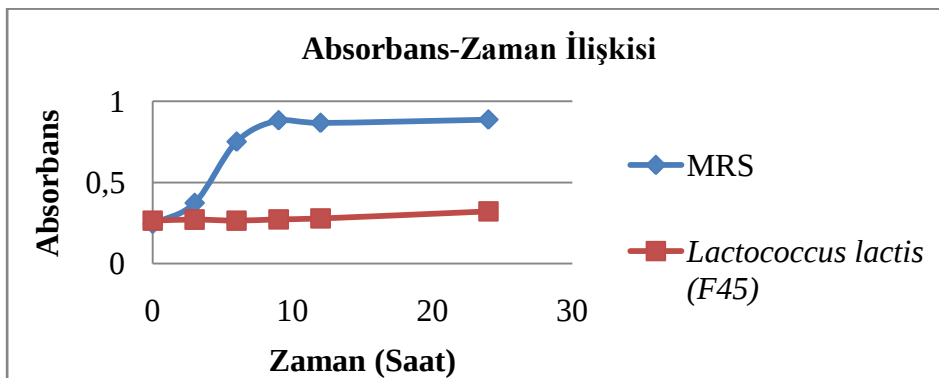
Şekil 4.26’da E57 *Lactococcus lactis* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.26: E57 *Lactococcus lactis* suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

E57 *Lactococcus lactis* bakteri suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon yüzdesi 0. saatten saatten 6. saate kadar olan zamanda hızla artmakta, 6. saatten 9. saate kadar olan zamanda düşük artma oranına sahip olarak artmakta ve 9. saatte % 66 oranı ile en yüksek değerine ulaşmaktadır. 9. saatten 24. saate kadar geçen sürede ise yüzde inhibisyon oranı azalmakla beraber, azalma oranlarının değeri oldukça düşük seviyede olmaktadır. Bu durum, *Lc. lactis*’den elde edilen laktik asit’in *Staphylococcus aureus*’u inhibe etmiş olduğunu göstermektedir.

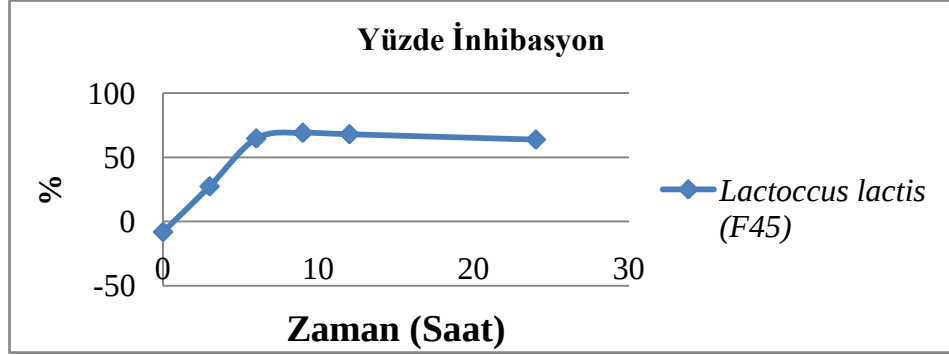
Şekil 4.27’de F45 *Lactococcus lactis* suşunun kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.27 : F45 *Lactococcus lactis* suşunun kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri.

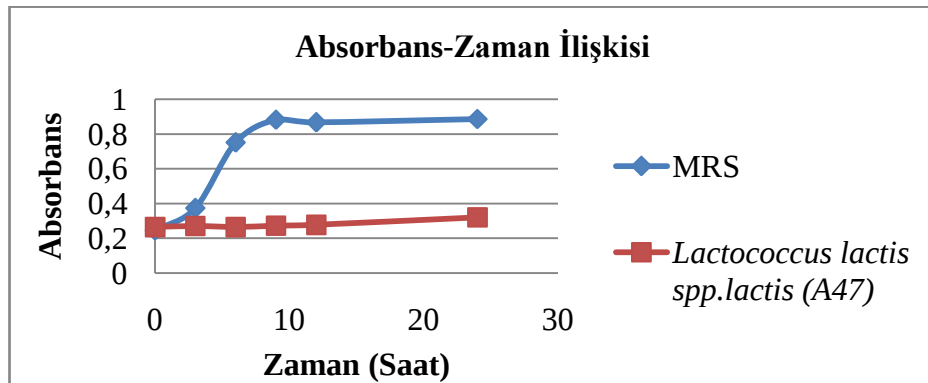
F45 *Lactococcus lactis* bakteri suşunun, ölçülen zaman aralıklarındaki absorbans değerlerinde büyük farkların bulunmamasıyla beraber, absorbans değerleri 24. saate kadar olan zamanda artmıştır. Bu artış değerleri oldukça düşük oranlardadır. Ayrıca, bu değerler kontrol solüsyonunun verdiği absorbans değerlerinden oldukça düşüktür.

Şekil 4.28’de F45 *Lactococcus lactis* bakteri suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.28 : F45 *Lactococcus lactis* bakteri suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

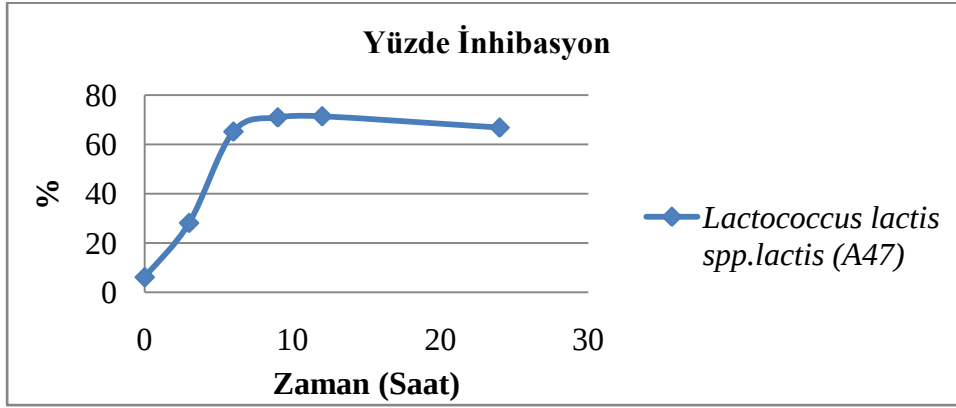
F45 *Lactococcus lactis* bakteri suşunun, *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon yüzdesi 0. saatten 6. saate kadar olan sürede hızla artmakta, 6. saatten 9. saate kadar olan sürede düşük artma oranına sahip olarak artmakta ve 9. saatte ise % 69 oranı ile en yüksek değerine ulaşmaktadır. 9. saatten 24. saate kadar geçen sürede ise yüzde inhibisyon değerleri azalmakla beraber, azalma oranlarının değeri oldukça düşük seviyededir. Bu durum, *Lc. lactis*’den elde edilen laktik asit’in *Staphylococcus aureus*’u inhibe etmiş olduğunu göstermektedir. Şekil 4.29’da A47 *Lactococcus lactis* spp. *lactis* bakteri suşunun, kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.29 : A47 *Lactococcus lactis* spp. *lactis* bakteri suşunun, kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri.

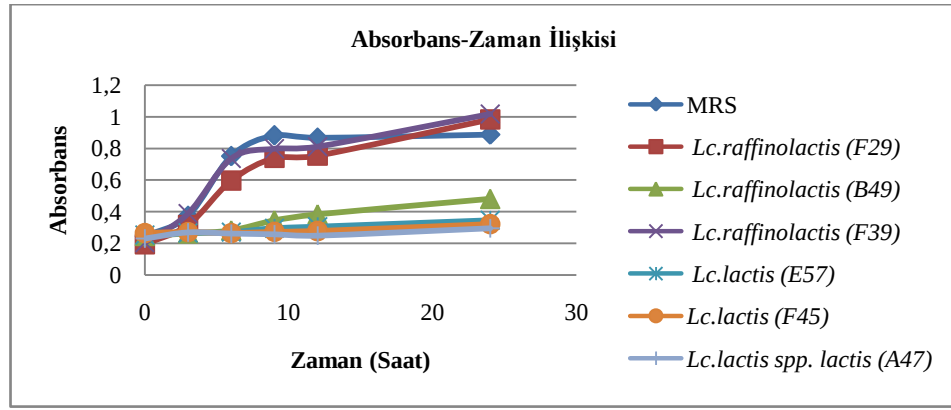
A47 *Lactococcus lactis* spp. *lactis* bakteri suşunun absorbans değerleri, 0. saatten 3. saate kadar olan zaman aralığında artmakta, 3. saatten 12. saate kadar olan zamanda düşük azalma oranına sahip olarak azalmakta ve 12. saatten 24. saatte olan zaman diliminde de absorbans değeri yeniden artmaktadır. Ayrıca, bu değerler kontrol solüsyonunun verdiği absorbans değerlerine yakın değerler olmaktadır.

Şekil 4.30'da A47 *Lactococcus lactis* spp *lactis* bakteri suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.

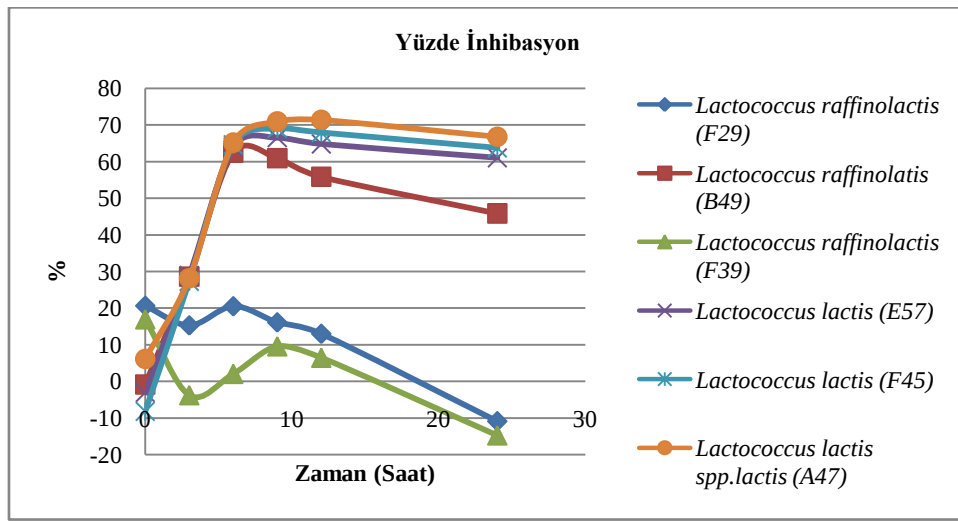


Şekil 4.30 : A47 *Lactococcus lactis* spp *lactis* bakteri suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

A47 *Lactococcus lactis* spp *lactis* bakteri suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon yüzdesi 0. saatten 12. saate kadar olan sürede artmaktadır. Yüzde inhibisyon oranındaki bu artışın oranı 0. saatten 6. saate kadar olan zaman diliminde artarak olmakta, 6. saatten 12. saate kadar ise azalarak olmaktadır. Yüzde inhibisyonun en yüksek olduğu saat 12. saat olup, inhibisyon oranı ise % 71 olmaktadır. 12. saatten 24. saate kadar olan sürede ise yüzde inhibisyon değeri azalma göstermiş, azalma oranı ise düşük seviyede olmuştur. Bu durum, *Lc. lactis*'den elde edilen laktik asit'in *Staphylococcus aureus*'u inhibe etmiş olduğunu göstermektedir. Şekil 4.31'de Tüm *Lactococcus* bakteri suşlarının kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri, Şekil 4.32'de ise Tüm *Lactococcus* bakteri suşlarının *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.31 : Tüm *Lactococcus* bakteri suşlarının kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri.



Şekil 4.32 : Tüm *Lactococcus* bakteri suşlarının *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

4.4 *Leuconostoc* Türü'nün Ürettiği Laktik Asit Süpernatant'ının *Staphylococcus aureus* Üzerindeki İnhibasyon Etkisi

Çizelge 4.8'de *Leuconostoc* Türü'nün Ürettiği Laktik Asit Süpernatant'ının vermiş olduğu absorbans değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.8 : *Leuconostoc* türü'nün ürettiği laktik asit süpernatant'ının vermiş olduğu absorbans değerleri.

Absorbans Değerleri	0.Saat	3.Saat	6.Saat	9.Saat	12.Saat	24.Saat
MRS (Kontrol)	0,245	0,373	0,751	0,882	0,867	0,887
E55 <i>Leuconostoc lactis</i>	0,230	0,274	0,275	0,289	0,296	0,318
A40 <i>Leuconostoc lactis</i>	0,246	0,265	0,262	0,267	0,274	0,307
A31 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,234	0,265	0,328	0,444	0,502	0,734
B56 <i>Leuconostoc citreum</i>	0,249	0,280	0,313	0,336	0,387	0,481

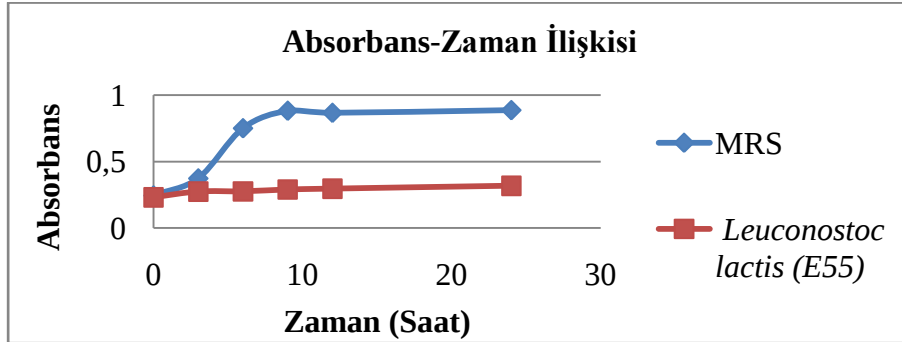
Çizelge 4.9’da *Leuconostoc* türü’nün ürettiği laktik asit süpernatant’ının *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.9 : *Leuconostoc* türü’nün ürettiği laktik asit süpernatant’ının *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

Yüzde İnhibasyon	0.Saat	3.Saat	6.Saat	9.Saat	12.Saat	24.Saat
E55 <i>Leuconostoc lactis</i>	5,918	26,640	63,240	67,195	65,859	64,149
A40 <i>Leuconostoc lactis</i>	-0,612	28,916	65,035	69,745	68,339	65,389
A31 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	4,490	28,916	56,191	49,632	42,042	17,249
B56 <i>Leuconostoc citreum</i>	-1,837	24,900	58,252	61,870	55,306	45,772

Yapılan deney sonuçlarına göre, kontrol solüsyonun ölçülen zaman aralıklarındaki absorbans değerleri 24. saate kadar olan zaman aralığında artmıştır. Bu artış değerleri 0. saat’ten 6. saate kadar olan zamanda hızlı bir artış oranına sahip olmakla beraber, diğer zaman aralıklarında oldukça düşük oranlarda olup, bu zaman aralığındaki absorbans değerleri birbirlerine yakın değerlerdedir.

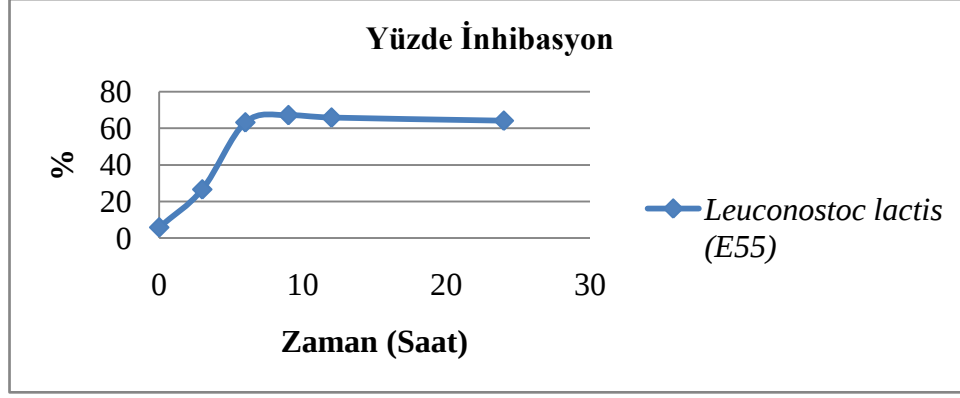
Şekil 4.33’de E55 *Leuconostoc lactis* suşunun, kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.33 : E55 *Leuconostoc lactis* suşunun, kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri.

E55 *Leuconostoc lactis* bakteri suşunun absorbans değerleri 24. saate kadar olan zaman aralıklarında artmıştır. Absorbans değerleri birbirine oldukça yakın değerler olup, bu değerler kontrol solüsyonunun verdiği absorbans değerlerinden oldukça düşüktür.

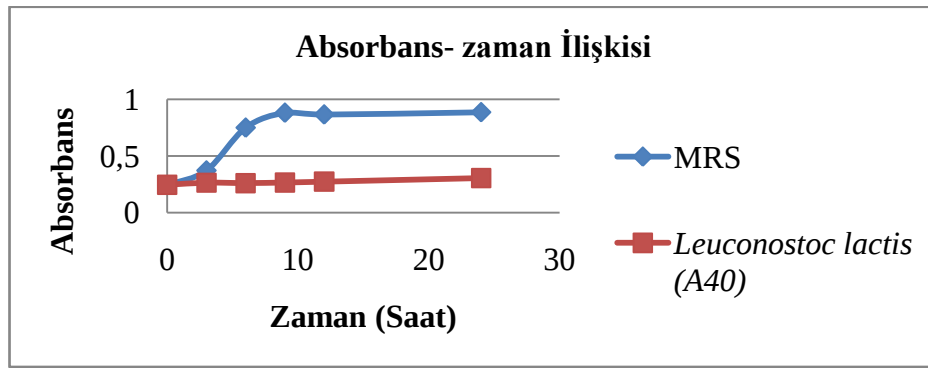
Şekil 4.34’de E55 *Leuconostoc lactis* bakteri suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.34 : E55 *Leuconostoc lactis* bakteri suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

E55 *Leuconostoc lactis* bakteri suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon yüzdesi 0. saatten 9. saate kadar olan sürede artmaktadır. Yüzde inhibisyon oranındaki bu artışın oranı 0. saatten 6. saate kadar olan zaman diliminde artarak olmakta, 6. saatten 9. saate kadar ise azalarak olmaktadır. Yüzde inhibisyonun en yüksek olduğu saat 9. saat olup, yüzde inhibisyon oranı ise % 67 olmaktadır. 9. saatten 24. saate kadar olan sürede ise yüzde inhibisyon değeri azalma göstermiş, azalma oranı ise düşük seviyede olmuştur. Bu durum, *Leuconostoc lactis*'den elde edilen laktik asit'in *Staphylococcus aureus*'u inhibe etmiş olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.35'de A40 *Leuconostoc lactis* suşunun, kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri gösterilmiştir.

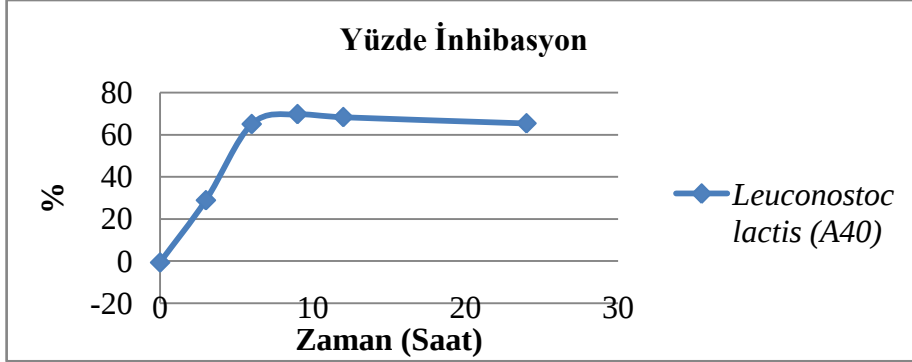


Şekil 4.35 : A40 *Leuconostoc lactis* suşunun, kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri.

A40 *Leuconostoc lactis* bakteri suşunun absorbans değerleri 24. saate kadar olan zaman aralıklarında artmıştır. Absorbans değerleri birbirine oldukça yakın değerler

olup, bu değerler kontrol solüsyonunun verdiği absorbans verdiği absorbans değerlerinden oldukça düşüktür.

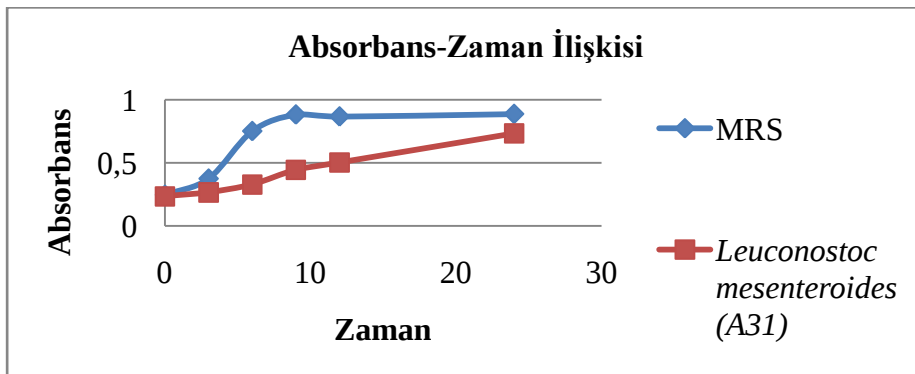
Şekil 4.36'da A40 *Leuconostoc lactis* bakteri suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.36 : A40 *Leuconostoc lactis* bakteri suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

A40 *Leuconostoc lactis* bakteri suşunun, *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon yüzdesi 0. saatten 6. saate kadar olan sürede hızla artmakta, 6. saatten 9. saate kadar olan sürede düşük artma oranına sahip olarak artmakta ve 9. saatte ise % 70 oranı ile en yüksek değerine ulaşmaktadır. 9. saatten 24. saate kadar geçen sürede ise yüzde inhibisyon değerleri azalmakla beraber, azalma oranlarının değeri oldukça düşük seviyededir. Bu durum, *Lueconostoc lactis*'den elde edilen laktik asit'in *Staphylococcus aureus*'u inhibe etmiş olduğunu göstermektedir.

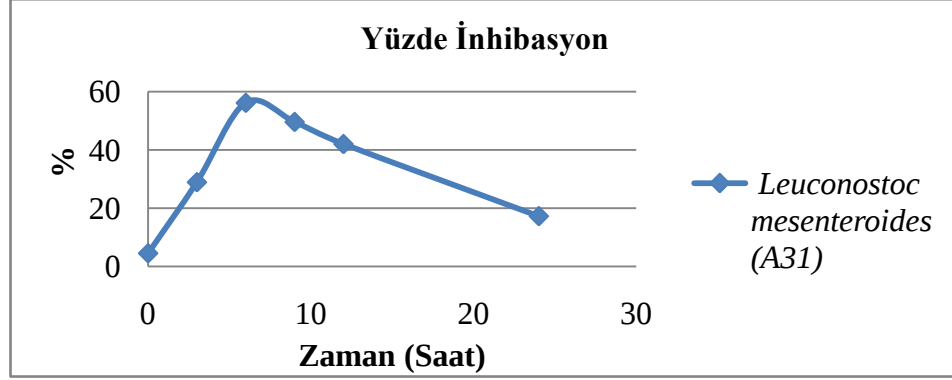
Şekil 4.37'de A31 *Leuconostoc mesenteroides* suşunun, kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.37: A31 *Leuconostoc mesenteroides* suşunun kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri.

A31 *Leuconostoc mesenteroides* bakteri suşunun absorbans değerleri 24. saate kadar olan zaman aralıklarında artmıştır. Ölçülen absorbans değerleri kontrol solüsyonunun verdiği absorbans değerlerinden daha düşük seviyelerde olmaktadır.

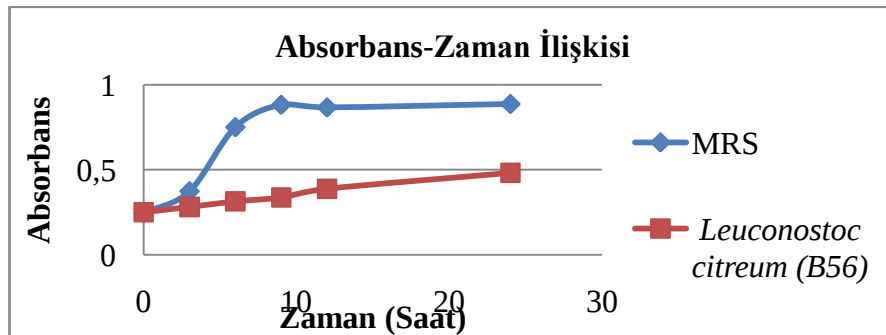
Şekil 4.38’de A31 *Leuconostoc mesenteroides* bakteri suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.38 : A31 *Leuconostoc mesenteroides* bakteri suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

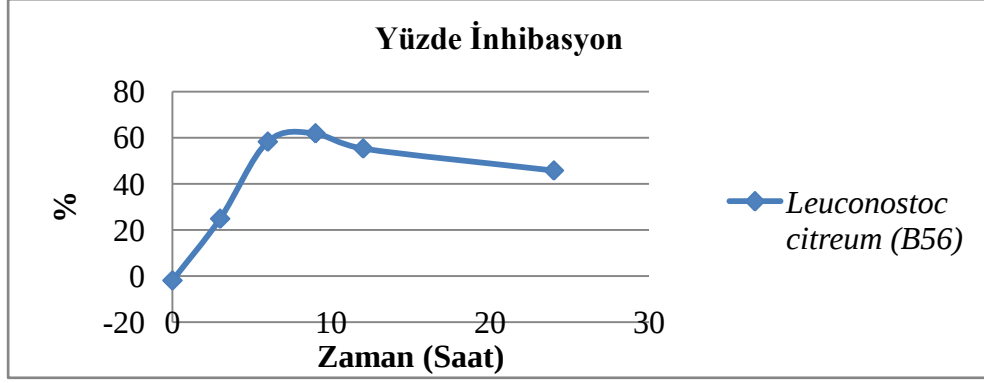
A31 *Leuconostoc mesenteroides* bakteri suşunun, *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon yüzdesi 0. saatten 6. saate kadar olan sürede hızla artmakta ve en yüksek değerine 6. saatte % 56 ile ulaşmaktadır. 6. saatten 24. saate kadar olan sürede ise yüzde inhibisyon düşüş göstermektedir. 6. saatten 12. saate kadar olan zamanda yüzde inhibisyondaki bu düşme oranı büyük oranları büyük oranlarda olmazken, 12. saatten 24. saate kadar olan zamanda ise yüzde inhibisyondaki bu oran artmaktadır. Bu durum, *Lueconostoc mesenteroides*’den elde edilen laktik asit’in az miktardaki *Staphylococcus aureus*’u inhibe etmiş olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.39’da B56 *Leuconostoc citreum* suşunun, kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri gösterilmiştir.



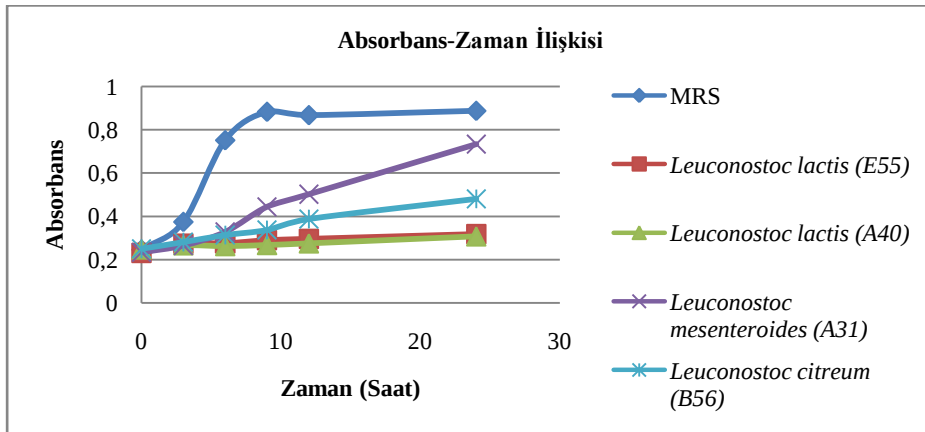
Şekil 4.39 : B56 *Leuconostoc citreum* suşunun, kontrol solüsyonuna göre absorbans değerleri.

B56 *Leuconostoc citreum* bakteri suşunun absorbands değerleri 24. saate kadar olan zaman aralıklarında artmıştır. Ölçülen absorbands değerleri kontrol solüsyonunun verdiği absorbands değerlerinden daha düşük seviyelerde olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.40'da B56 *Leuconostoc citreum* bakteri suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.



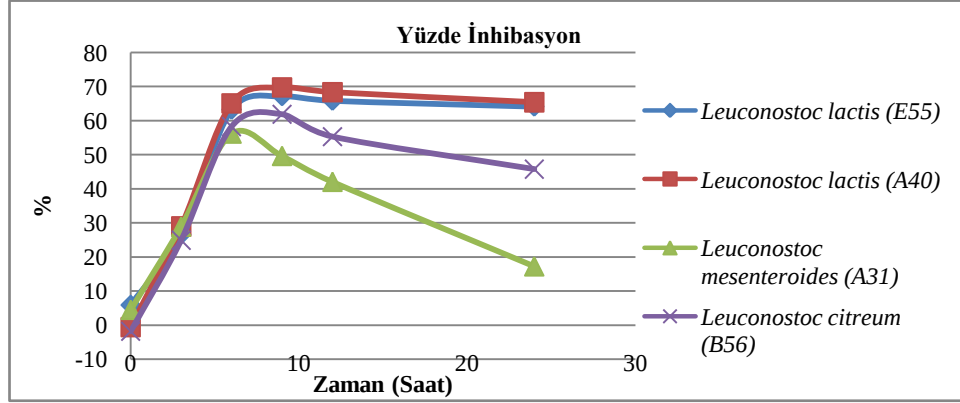
Şekil 4.40 : B56 *Leuconostoc citreum* bakteri suşunun *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

B56 *Leuconostoc citreum* bakteri suşunun, *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon yüzdesi 0. saatten 6. saate kadar olan sürede hızla artmakta, 6. saatten 9. saate kadar olan sürede düşük artma oranına sahip olarak artmakta ve 9. saatte ise % 62 oranı ile en yüksek değerine ulaşmaktadır. 9. saatten 24. saate kadar geçen sürede ise yüzde inhibisyon değerleri azalmakla beraber, azalma oranlarının değeri oldukça düşüktür. Bu durum, *Leuconostoc citreum*'dan elde edilen laktik asit'in *Staphylococcus aureus*'u inhibe etmiş olduğunu göstermektedir. Şekil 4.41'de tüm *Leuconostoc* bakteri suşlarının kontrol solüsyonuna göre absorbands değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.41 : Tüm *Leuconostoc* bakteri suşlarının kontrol solüsyonuna göre absorbands değerleri.

Şekil 4.42’de tüm *Leuconostoc* bakteri suşlarının *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.42 : Tüm *Leuconostoc* bakteri suşlarının *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmanın ilk kısmında boza kaynaklı laktik asit bakteri'lerinden *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* türlerinden seçilmiş olan suşların ürettiği laktik asitin D(-) ve L(+) izomerlerinin cinsi ve miktar tayini yapılmıştır.

Yapılan çalışma sonucunda boza kaynaklı *Lactobacillus* tür suşlarının laktik asitin D(-) ve L(+) izomerinin her ikisini birden sentezlediği sonucuna ulaşılmıştır. Seçilen *Lactobacillus* suşları arasında, B23 *Lactobacillus paracasei* suşunun en yüksek oranda laktik asitin D(-) ve L(+) izomerlerini sentezlediği belirlenmiştir. Buna karşılık, B2 *Lactobacillus fermentum* bakterisinin en düşük miktarda D(-)-laktik asit izomerini, ise A15 *Lactobacillus delbrueckii spp.delb.* bakterisinin ise en düşük miktardaki L(+)-laktik asit izomerini sentezlediği belirlenmiştir. Ayrıca, yapılan çalışmada kullanılan *Lactobacillus* bakteri suşlarının sentezlemiş olduğu D(-)-laktik asit izomeri konsantrasyon değerlerinin birbirinden farklı olduğu fakat sentezlenen L(+)-laktik asit izomer miktar değerlerinin ise birbirine oldukça yakın değerler olduğu görülmüştür.

Lactococcus türleri ile 2 farklı suşu ile çalışılmış olup, bu bakterilerin L(+)-laktik asit izomerini sentezlediği saptanmıştır. Ayrıca, bu iki suşun sentezlediği L(+)-laktik asit izomerinin miktar değerleri aynı oranda olmuştur. Sonuç olarak, aynı türün 2 farklı suşu çok yakın değerlerde laktik asitin L(+) izomerini sentezlemektedir.

Leuconostoc bakteri türünün çalışılan 3 farklı suşunun D(-)-laktik asit sentezlediği belirlenmiştir. Üç farklı türden en yüksek oranda D(-)-laktik asit sentezleyen bakteri E55 *Leuconostoc lactis* olmuştur. Üç farklı bakterinin sentezlediği D(-)-laktik asit miktarı birbirine oldukça yakın değerlerdedir.

Yapılan çalışmada elde edilen diğer sonuç ise, çalışılan *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* bakterilerinin tür özelliklerine göre sentezlemiş olduğu D(-)-laktik asit, L(+)-laktik asit veya D(-)-laktik asit ve L(+)-laktik asit miktarlarının aynı miktarlarda olduğu, aralarında çok büyük farkların bulunmadığıdır.

Çalışmanın devamında, laktik asit bakteri türlerinden seçilen ilgili suşlarının *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır.

Seçilen *Lactobacillus* suşlarının *Staphylococcus aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri oldukça yakın değerler olmuştur. B10 *Lactobacillus fermentum* bakterisi *Staphylococcus aureus*' u en yüksek inhibisyon oranına sahip olarak inhibe etmiştir. Buna karşılık, D41 *Lactobacillus plantarum* bakterisinin *Staphylococcus aureus* üzerine inhibisyon etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir.

Lactococcus türü suşları arasında, F45 *Lactococcus lactis* bakterisi *Staphylococcus aureus*' u en yüksek inhibisyon oranına sahip olarak inhibe etmiştir. Buna karşılık, F39 *Lactococcus raffinolactis* bakterisinin *Staphylococcus aureus* üzerine inhibisyon etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, *Lactococcus raffinolactis* suşları'nın *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon yüzdesi değerleri birbirinden farklı değerler olmuştur.

Leuconostoc türü suşları arasında ise, A40 *Leuconostoc lactis* bakterisi *Staphylococcus aureus*' u en yüksek inhibisyon oranına sahip olarak inhibe etmiştir. Buna karşılık, A31 *Leuconostoc mesenteroides* bakterisinin *Staphylococcus aureus* üzerine inhibisyon etkisinin az miktarda olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmanın sonucunda elde edilen bulgular, örneğin *Staphylococcus aureus*'dan korunması, raf ömrünün uzatılması için *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* gibi LAB bakteri suşları kullanılmasının olanaklı olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak, LAB'lerinin ürettiği laktik asit'in patojenlerin elimine edilmesinde etkin rol oynadığı ve bu doğrultuda kullanılabileceği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Alomara, J., Loubiereb, P., Delbesa, C., Nouailleb, S. ve Montela, M. C.** (2008). Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk, *Food Microbiology* **25**: 502–508.
- Anas, M., Eddine, H. J. ve Mebrouk. K.**(2008). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*, *World Journal of Dairy & Food Sciences* **3**(2):39-4.
- Anonim,** (2010). Probiotics-A viable concept, adres: <http://www.nfia.com/fft/201005/article2.php> alındığı tarih:11.11.2011.
- Anonim,** (2011a). Lactic acid , adres: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pcsubstance>, alındığı tarih 03.11.2011.
- Anonim,** (2011b). D-Lactic acid. adres: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pcsubstance>, alındığı tarih: 03.11.2011.
- Anonim,** (2011c). L-Lactic acid, adres: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pcsubstance>, alındığı tarih 03.11.2011.
- Anonim,** (2011d). Hydrogen peroxide, adres: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pcsubstance> alındığı tarih 03.11.2011.
- Anonim,** (2011e). Carbon dioxide, .adres: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pcsubstance>, alındığı tarih: 03.11.2011.
- Anonim,** (2011f). Dicetyl, adres: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pcsubstance>, alındığı tarih 03.11.2011.
- Anonim,** (2011g). Reuterin, adres: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pcsubstance>, alındığı tarih 03.11.2011.
- Anonim,** (2011h). Reutericyclin, adres: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pcsubstance>, alındığı tarih 03.11.2011.
- Anonim,** (2011i). Pyrrolidonecarboxylic acid - compound summary, adres: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary>, alındığı tarih 07.11.2011.
- Anonim,** (2011j). *Staphyloccous aureus*, adres: <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/>, alındığı tarih 03.11.2012.
- Arqués, J. L., Rodríguez, E., Nuñez, M., Medina, M.** (2011). Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in milk, *Food Control* **22**: 457-461.
- Bayram, B.** (2005). *Laktik Asit Bakterilerinin Sakkaroz Parçalama Aktivitelerinin Bozada İncelenmesi* (Yüksek Lisans Tezi).

- Balca'zar, J. L., Vendrell, D., De Blas, I., Zarzuela, I. R., Girone's, O. ve Mu'zquiz, J.J.** (2007). In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens, *Veterinary Microbiology* **122**: 373–380.
- Bogaert, J-C. ve Naidu, A.S.** (2000). *Natural Food Antimicrobial Systems* in Chapter V: Acid Antimicrobials, Ed. Naidu, A.S., CRS Press.
- Boucher, I. Vadeboncoeur, C. ve Moineau, S.** (2003). Characterization of Genes Involved in the Metabolism of alpha-Galactosides by *Lactococcus raffinolactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. **Vol. 69**, No. 7.
- Calasso, M ve Gobbetti, M.** (2011). *Encyclopedia of Dairy Science* in *Lactobacillus spp.: Other Species*, DIBCA, University of Bari, Bari, Italy, Elsevier Ltd.
- Charlier, C., Cretenet, M., Even, S. ve Le Loir, Y.** (2009). Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives *International Journal of Food Microbiology* **131**: 30–39.
- Charlier, C., Even, S., Gautier, M. ve Le Loir, Y.** (2008). Acidification is not involved in the early inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by *Lactococcus lactis* in milk, *International Dairy Journal* **18**: 197–203.
- Corsetti, A. ve Valmorri, S.** (2011). *Encyclopedia of Dairy Science* in *Lactobacillus spp.: Lactobacillus plantarum*, Università degli Studi di Teramo, Mosciano S. Angelo (TE), Italy, Elsevier Ltd.
- Dugas, J.** (2011). Background, lactic acid bacteria, adres: <http://www.waksmanfoundation.org/labs/mbl/lactic.html>, Alındığı tarih: 12.11.2011.
- D-Lactic Acid/L-Lactic Acid.** (t.y). Enzymatic Bioanalysis/Food Analysis, Boehringer Mannheim/R-Biopharm.
- Dickson, E. M., Riggio, M.P. ve Macpherson, L.** (2005). A novel species-specific PCR assay for identifying *Lactobacillus fermentum*, *Journal of Medical Microbiology* **54**, 299–303.
- Gobbetti, M.** (2004). *Encyclopedia of Food Microbiology* in *Lactobacillus: Lactobacillus casei*, Istituto di Produzione e Preparazione Alimentari, Agriculture Faculty of Foggia, Italy.
- Gürükan, G., C., Cebeci, A. ve Özer, B.** (2010). Probiotic Dairy Beverages in *Microbiology and Technology*, Eds. Yıldız, F., CRC Press LLC.
- Holt, J.G., Krie, N.R., Sneath, P.H.A., Staley J.T. ve Willams S.T.** (1998). Genus *Lactobacillus* in *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition.
- Holt, J.G., Krie, N.R., Sneath, P.H.A., Staley J.T. ve Willams S.T.** (1998). Genus *Lactococcus* in *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition.
- Holt, J.G., Krie, N.R., Sneath, P.H.A., Staley J.T. ve Willams S.T.** (1998). Genus *Leuconostoc* in *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition.

- Holt, J.G., Krie, N.R., Sneath, P.H.A., Staley J.T. ve Willams S.T.** (1998). Genus *Streptococcus* in *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition.
- Hui Y.H., Ghazala S., Graham D. M., Murrell K. D. and Nip W.** (2004). *Handbook of vegetable preservation and processing* in Chapter 9: Fermentation: Principles and microorganisms. Tung-Hai University, Taichung, Taiwan. CRC Press.
- Jonesa, R. J., Husseinb, H. M., Zagorecc, M., Brightwella, G. ve Tagg, J.R.** (2008). Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat, *Food Microbiology* **25**: 228–234.
- Le Marc, Y., Valík, L. ve Medved'ová, A.** (2009). Modelling the effect of the starter culture on the growth of *Staphylococcus aureus* in milk, *International Journal of Food Microbiology* **129**: 306–311.
- Maragkoudakis, P. A., Mountzouris, K. C., Psyras, D. ve Cremonese, S.** (2009). Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*, *International Journal of Food Microbiology* **130**:219–226.
- Matsuzaki, T.,** (2003). *Handbook of Fermented Functional Foods* in Health properties of milk fermented with *Lactobacillus casei* strain shirota (Lcs), Ed., Farnworth., E., R., CRC Press.
- Mills, S, Ross, R.P ve Coffey, A.** (2011). *Encyclopedia of Dairy Science* in *Lactococcus lactis*, Teagasc Food Research Centre, Moorepark, Fermoy, County Cork, Ireland, Elsevier Ltd.
- Minervini, F.** (2011). *Encyclopedia of Dairy Science* in *Lactobacillus casei* Group, Università degli Studi di Bari, Bari, Italy, Elsevier Ltd.
- Mufandaedza, J., Viljoen, B. C., Feresu, S. B., T.H. Gadaga, T. H.** (2006). Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains, *International Journal of Food Microbiology* **108**, 147 – 152.
- Ouwehand, A.C. ve Vesterlaund,S.** (2004). *Microbiology and Functional Aspects* in Antimicrobial components from lactic acid bacteria., Third Edition, Eds. Salminen, S, Wright, A ve Ouwehand A. University of Turku, Finland, CRC Press.
- Portella , A. C. F., Karp, S., Scheidt, G. N., Woiciechwski, A. L., Parada, J. L. ve Soccol, C. R.** (2009). Modelling Antagonic Effect of Lactic Acid Bacteria Supernatants on Some Pathogenic Bacteria, *An international Journal* **52**: 29-36.
- R. Martín,R., E. Jiménez, E., M. Olivares, M., M.L. Marín, M. L., Fernández, L., J. Xaus, J. ve J.M. Rodríguez, J.M.** (2006). *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother–child pair. *International Journal of Food Microbiology* **112**, 35 – 43.

- Saarela, M.** (2007). *Anti-angiogenic functional and medicinal* in Chapter 29: Functional Foods: Probiotics,, Eds. Jack N . Losso, J. N., Shahidi, F. and Debasis Bagchi CRC Press.
- Sakaridis, I., Soultos, N., Dovas, C.I., Papavergou,E., Ambrosiadis, I. ve Koidis, P.** (2011). Lactic acid bacteria from chicken carcasses with inhibitory activity against *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes*, (Baskıda).
- Sakaridis, I., Soultos, N., Dovas, C. I., Papavergou, E., Ambrosiadis, I. ve Koidis, P.** (2005). Lactic acid bacteria from chicken carcasses with inhibitory activity against *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* (Baskıda).
- Sameshimaa, T., Magomea, C., Takeshitaa,K., Ariharab, K., Itohb, M., ve Kondob, Y.** (1998). Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in fermented sausage, *International Journal of Food Microbiology* **41**:1-7.
- Sanchez, E ve Sanz, Y.** (t.y). *Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens in Lactobacillus*, Ed: Lui, D., CRC Press.
- Shah, N., P.** (2010). *Biotechnology in functional foods and nutraceuticals* in Chapter 26: Probiotics health benefits, efficacy and safety Eds. Bagchi, D., Francis C., Lau and Dilip K., Gh.,Taylor and Francis Group, LLC.
- Tas, E. ve Erginkaya, Z.** (2008). Bazı Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin *Escherichia coli* O157:H7 üzerine İnhibisyon Etkisi, Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum.
- Teixeira, P. C.,** (2004). *Encyclopedia of Food Microbiology in Lactobacillus: Lactobacillus brevis*, Escola Superior de Biotecnologia, Porto, Portugal
- Theron, M.M. ve Rykers, F. J.** (t.y). *Organic Acids and Food Preservation*, Lues CRC Press.
- Todar, K.** (t.y). *Online Textbook of Bacteriology*, University of Wisconsin, Department of Bacteriology, United State.
- Tomas, M. M ve Bou, G.** (t.y). *Molecular Detecetion of Human Bacterial Pathogens in Leuconostoc*, Ed. Liu, D.
- Ward, L.J.H., Davey, G.P ve Heap,H.A.** (2002). *Encyclopedia of Dairy Science in Lactococcus lactis*, Fonterra Research Centre, Palmerston North, New Zealand, Elsevier Science Ltd
- Vescovo, M., Scolari, G., ve Zacconi, C.** (2006). Inhibition of *Listeria innocua* growth by antimicrobial-producing lactic acid cultures in vacuum-packed cold-smoked salmon, *Food Microbiology* **23**, 689–693.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Gözde GÜLSEREN

Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul, 07/04/1984

Lisans : İstanbul Teknik Üniversitesi -Gıda Mühendisliği Bölümü (2009)

İletişim: gulsereng@itu.edu.tr

Ödüller: Yeni Ürün Geliştirme Yarışması, Türkiye 4. (2009)

ERASMUS-SOCRATES Bursu (2011)