

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TEMEL VE ENDÜSTRİYEL MİKROBİYOLOJİ BİLİM DALI**

**Ticari Yoğurt Örneklerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin
Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi**

Elif ÖZTÜRK

**Danışman
Prof. Dr. Fatih KALYONCU**



MANİSA-2018

1. GİRİŞ

Süt ve süt ürünleri ile ilgili çalışmaların geçmişi insanlık tarihine kadar dayanmaktadır. Süt endüstrisinin gelişmesine birçok bilim dalı katkı sağlamıştır. Bunlar; biyoloji, kimya, fizyoloji, zooloji, bakteriyoloji, beslenme ve insan sağlığıdır. Pastör'ün 1850'lerin sonlarına doğru yayınladığı “Laktik Asit Fermentasyonu” adlı çalışması süt teknolojisinin hızlanmasına olanak sağlamıştır[1].

Gıda standartları açısından Türkiye için yetkin olan Türk Standartları Enstitüsü (TSE) ve Türk Gıda Kodeksi sütü tanımlamıştır. Türk Standartları (TS) 1018 çiğ süt standardına göre: “Süt; inek, koyun, keçi ve mandaların meme bezlerinden salgılanan, kendine özgü tat ve kıvamda olan, içine başka maddeler karıştırılmamış, içinden herhangi bir maddesi alınmamış, beyaz veya krem renkli sıvıdır”. Türk Gıda Kodeksine göre: “çiğ süt; bir veya daha fazla inek, keçi, koyun veya mandanın sağılmasıyla elde edilen, 40°C'nin üzerinde ısıtılmamış veya eşdeğer etkiye sahip herhangi işlem görmemiş kolostrum dışındaki meme bezi salgısıdır”[2].

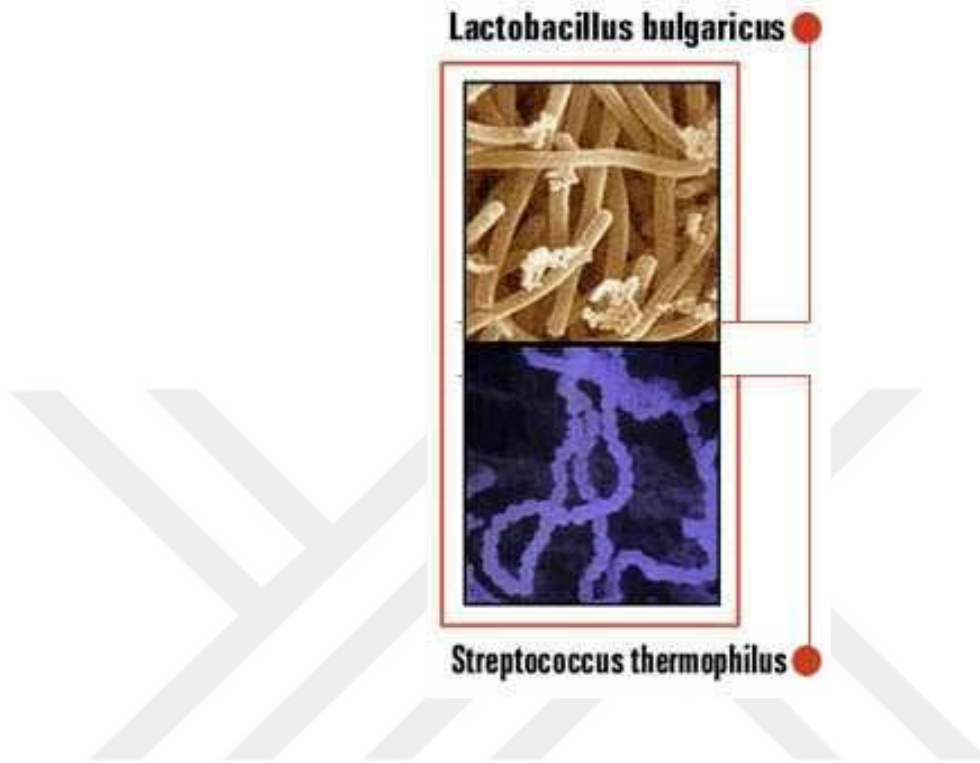
Fermente süt ürünleri için hazırlanan kültürlerdeki laktik asit bakterilerinin en önemli özelliği çıkardıkları laktaz (beta-galaktosidaz) enzimi ile süt şekerini parçalayıp süt asidi oluşturmalarıdır. Homofermentatif bakteriler fermentasyon sonucu %99 oranında süt asidi, %1 oranında diğer maddeleri meydana getirirken; heterofermentatif bakteriler %70 oranında süt asidi ve %30 oranında asetik asit, etil alkol, CO₂ vb. oluştururlar [3].

1.1. Yoğurt ve Tarihçesi

Yoğurt, Türk Standartlar Enstitüsü'nün 1330 sayılı standardında “çiğ süt veya pastörize süt standartlarına uygun, tercihen homojenize edilmiş sütlerin *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*'un etkisiyle laktik asit fermentasyonu sonucu elde edilen ve yoğurt kültürlerini canlı olarak içeren fermente bir süt ürünüdür” şeklinde tanımlanmıştır[1].

Yoğurt Türkiye'de en bilinen fermente süt ürünüdür. Besleyici değerinin yüksek olması, sindirim sistemini düzenlemesi, laktoz intolerans kişiler tarafından

rahat tüketilmesi, soğukta muhafaza edildiğinde (3-10°C) uzun süre bozulmaması ve pH değerinin düşük olmasından dolayı patojen mikroorganizmaların canlılıklarını uzun süre muhafaza edememeleri nedeniyle en çok tercih edilen süt ürünüdür[4].



Şekil 1.1.1. *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* bakterilerinin elektron-mikroskobu altındaki görüntüleri [36].

Yoğurdun ilk fermentasyon kaynağı bilinmemektedir [5]. İlk yapılışı ile ilgili olarak şöyle bir görüş ileri sürmüşlerdir. Yoğurt Anadolu'ya Orta Asya'dan Türklerle birlikte gelmiş ve oradan Rumeli'ye geçmiştir. Bu yüzden yoğurt, Balkan ülkelerinde de çok uzun yıllardır hâkimiyetini sürdürmektedir. Türk hâkimiyeti ve Türk kültürü etkisi altında kalan ülkelerde bilinen yoğurt, daha sonra diğer ülkelere de yayılmıştır. Bu da Türkler tarafından gerçekleştirilmiştir[6].

Yoğurt üretiminde geleneksel olarak sütteki laktozu laktik aside çeviren iki bakteri, *Streptococcus salivarius subsp.thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus*'un görev aldığı bilinmektedir. Sütün 40-45~°C'de "mayalanmasıyla", önce *Lactobacillus bulgaricus*'un yaptığı esansiyel aminoasitlerle *Streptococcus thermophilus* hızla çoğalır. Ortamdaki laktik asit düzeyi yükselince, pH *Lactobacillus bulgaricus*'un çoğalabileceği en uygun hale gelir. pH

düzeyi 4.2-4.4 olunca *Streptokok*'ların çoğalması baskılanırken, *Laktobasiller* ortam pH düzeyi 3.5-3.8 olana kadar çoğalmaya devam eder. Geleneksel ürünlerin pH düzeyleri 3.7-4.3 kadardır. Günümüzde yoğurda *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium* türleri (AB-kültürleri) eklenerek “biyoyoğurtlar” yapılmaktadır [5].

1.2. Kefir ve Tarihçesi

Kafkasya orjinli bir süt ürünü olan kefir; keçi, koyun, inek sütünden yapılmaktadır. Tarihçesi hakkında çok fazla fikir yoktur. Ferahlatıcı, iştah açıcı, sindirim rahatlığı ve bazı hastalıkları iyileştirici özelliği ile birçok araştırmacının da ilgisini çekmiştir. İlk kez Kafkasya'nın “Gaucase” köyünde olduğu ve burada yaşayan köylülerin, sütleri deri tulumlar içinde fermentasyona bırakmaları ile “airan” denilen bir süt ürünü elde edildiği bilinmektedir [7].

Kefir tanesinde bulunan bakteri ve maya türlerinin simbiyotik aktivitesi sonucu bu üründe laktik asit ve alkol fermentasyonunun bir arada oluşması, kefir diğer fermente süt ürünlerinden ayıran en önemli özelliktir. Hem mayaların fermentasyonu hem de laktik asit bakterileri sonucu kefirde laktik asit, asetik asit, az miktarda karbondioksit (CO₂), etil alkol ve yoğurda kıyasla farklı organoleptik özellikleri olmasını sağlayan aromatik bileşikler ortaya çıkarmaktadır [8].

İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda *Lactobacillus acidophilus* ve *L. bulgaricus* içeren fermente süt ürünlerinin kullanılmasıyla, midedeki koliform grup organizmaların sayısında azalma, *Laktobasiller*'de yükselme görülmüştür. Böylece fermente süt kullanımının bağırsak florasını yenilediğini ve bağırsaklarda oluşan şikâyetlerin ortadan kaybolduğunu vurgulamaktadır [7].

1.3. Laktik Asit Bakterileri

Doğada çok yaygın olarak bilinen laktik asit bakterileri ile ilgili çalışmalar mikrobiyoloji bilimi ile birlikte başlamıştır. İlk kez 19. yüzyıl sonlarında sütte fermentasyona ve koagülasyona yol açan bakteriler ‘laktik asit bakterileri’ olarak adlandırılmış ve sonra *Lactobacillaceae* familyası içinde sınıflandırılmıştır.

Morfolojik açıdan çok değişken özellik gösteren (kısa veya uzun çomak veya kok şekilli) familya üyeleri fizyolojik açıdan oldukça benzer özellik bulundurmaktadırlar [9]. *Sporolactocillus inulinus* hariç hiçbirisi spor oluşturmaz [10]. Gram pozitif, katalaz negatif, kok/basil/kokobasil formundadırlar. Mezofilik ve termofilik özellikte olabilen bakterilerdir [11].10-45 °C arası sıcaklıklarda, yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişme ve asit veya alkali tolere etme yeteneklerine sahiptirler. Süt ve süt ürünlerinde, hayvan barsak mukozalarında, bitkilerde-bitki artıklarında ve insanda bulunabilirler [12].

Laktik asit bakterileri (LAB), biyokontrol amacıyla en yaygın kullanılan mikroorganizmalardır. LAB, fonksiyonel özelliklerinin yanı sıra, gıda ortamındaki yüksek besin rekabeti ve ürettikleri antimikrobiyal bileşikler ile bozulma ve hastalık etkeni mikroorganizmalar üzerinde gösterdikleri antimikrobiyal aktivite nedeniyle gıda güvenliği açısından büyük öneme sahiptir. Gıdaların korunmasında LAB kullanımı yanı sıra, bu kültürlerden elde edilen bakteriyosinler de kullanılmaktadır [11].

Doğal mikroflora ilave edilmesi ile gıdaların güvenliğini sağlamak ve raf ömrünü uzatmak amacıyla biyokoruma işlemi yapılmaktadır. Süt ve süt ürünlerinde bu amaçla en fazla yararlanılan ürünler laktik asit bakterileri (LAB) ve bu bakterilerin ürettikleri antimikrobiyal ürünlerdir [13].Gıda piyasasının küreselleşmesi, yeni gıdalara olan isteğe karşılık işlevsel ürünlerin üretimi, yeni üretim yöntemleri ve minimal işlenmiş hazır ürünlere artan istek yüzünden mikrobiyolojik bulaşma tehlikesini arttırabilecek daha uzun ve kompleks gıda zincirine ihtiyaç duyulmaktadır [14].

Normal depolama koşullarında koruyucu kültürler, ürünün duyuşal özelliklerini etkilememelidir. Koruyucu kültürler, organik asitler (laktik, asetik veya propiyonik asit gibi), alkoller, karbondioksit, diasetil, hidrojen peroksit, bakteriyosinler, reuterin ve reutersiklin gibi düşük moleküllü bileşikler üreterek istenmeyen mikroorganizmaları önlemektedir[13].

Başlangıç kültürü olarak kullanılan veya farklı gıdalarda doğal olarak bulunan birçok laktik asit bakterisinin gıdayı bozucu mikroorganizmalar veya gıda

kaynaklı patojenleri içinde bulunduran bir grup mikroorganizmaya karşı antagonistik aktivite gösterdiği de bilinmektedir [11]. Süt ürünlerinin yapımında kullanılan laktik asit bakterilerinin önemli bir özelliği de ortamda bulunan gıda kaynaklı patojen ve kontaminant mikroorganizmaların (*E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus* gibi) gelişimini engellemeleri ve ölümlerine sebep olmalarıdır [15].

Laktik asit bakterilerinin diğer mikroorganizmalara karşı gösterdiği bu antagonistik aktivitenin farklı bazı mekanizmaları ile olduğu bilinmektedir. Bunlar:

- a- Aerobik gelişme sırasında laktik asit bakterileri tarafından üretilen H_2O_2 , birçok mikroorganizmaya inhibitör etki gösterebilmektedir.
- b- Karbonhidrat kaynaklarını fermente eden laktik asit bakterileri asetik ve laktik gibi organik asitleri üretmektedir. Birçok mikroorganizma gıdalarda bulunan bu organik asitlere karşı hassastır ve sonuçta düşen pH'yı da tolere edememektedir.
- c- Alkol, karbondioksit, diasetil, gibi metabolitler, bazı laktik asit bakterileri tarafından üretilerek birtakım mikroorganizmalar üzerine inhibitör etki gösterebilmektedir.
- d- Birtakım laktik asit bakterisi tarafından üretilen ve "bakteriosin veya bakteriosin benzeri metabolitler" olarak adlandırılan antimikrobiyal karakterli proteinler, özellikle yakın ilişkili bakteriler üzerine inhibitör etki göstermektedir [9].

Dünyada yoğurt üretiminde genel olarak tüketilen yoğurt bakterilerinin (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*) endüstriyel özellikleri vardır. Sonuç olarak bu bakteriler ile fermantasyon sağlanarak elde edilen yoğurtlarda kullanılıncaya kadar geçen zamanda asitlik daha yavaş gelişir. Bu yararlı bakteriler (*L. acidophilus*, *L. bifidus*) probiyotik ürünlerin üretilmesinde yer almaya başlamıştır. (Bioyoğurt; *S. thermophilus* + *L. acidophilus*), (Bifiyoğurt; *S. thermophilus* + *L. bifidus*), (Biyogarde; *S. thermophilus* + *L. Acidophilus* + *L. bifidus*) [16].

Farmasötikler, kimyasal maddeler ve insana faydalı diğer ürünlerin sentezi için endüstriyel mikroorganizmalar olarak başarılı bir şekilde laktik asit bakterileri kullanılabilir, çünkü endüstriyel fermantasyonda birtakım avantaja sahiptir:

- a) Protein salgılamaktadırlar;
- b) Bu bakterilerin gelişimi diğer mikroorganizmalarla kontaminasyonu ve bozulmayı önler;
- c) Gıda endüstrisinde yıllardır kullanılmaktadır;
- d) Hidrolize nişasta, atık su, süt ve peynir altı suyu gibi çeşitli ucuz maddeleri fermente edebilir;
- e) Toksik ürünler ve toksinler ve oluşturmaz;
- f) Patojen değildir ve sindirilebilir;
- g) Kısa bir fermantasyon işlemi gerektirirler, hızlı bir şekilde ürerler;
- h) Mikroaerofilik ve aerotolerantırlar, basit bir fermantasyon işlemi gerektirirler. Nitekim büyük ölçekte üretimi henüz yeni oluşmuştur [11].

Laktik asit bakterilerinin diğer mikroorganizmalara karşı gösterdiği antagonistik aktivite, ürettikleri laktik ve asetik asit gibi organik asitler, H₂O₂, bakteriosin veya bakteriosin benzeri metabolitler, diasetil, alkol ve CO₂ gibi metabolitlerden kaynaklanmaktadır [9].

1.3.1. Laktik Asit Bakterilerinin En Önemli Cinsleri

Lactobacillus, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* ve *Bifidobacterium*'dur [32].

1.3.1.1. Laktokoklar

Karbonhidrat katabolizması sonucu ana ürün olarak L(+) laktik asit üretmekte olup homofermantatif özelliktedirler. Küre, kok şeklinde, olan bu bakteriler kısa zincir halinde bir arada bulunmaktadır. *Lactococcus lactis* alttürleri özellikle fermente süt ürünlerinin üretiminde önemli role sahiptir [31].

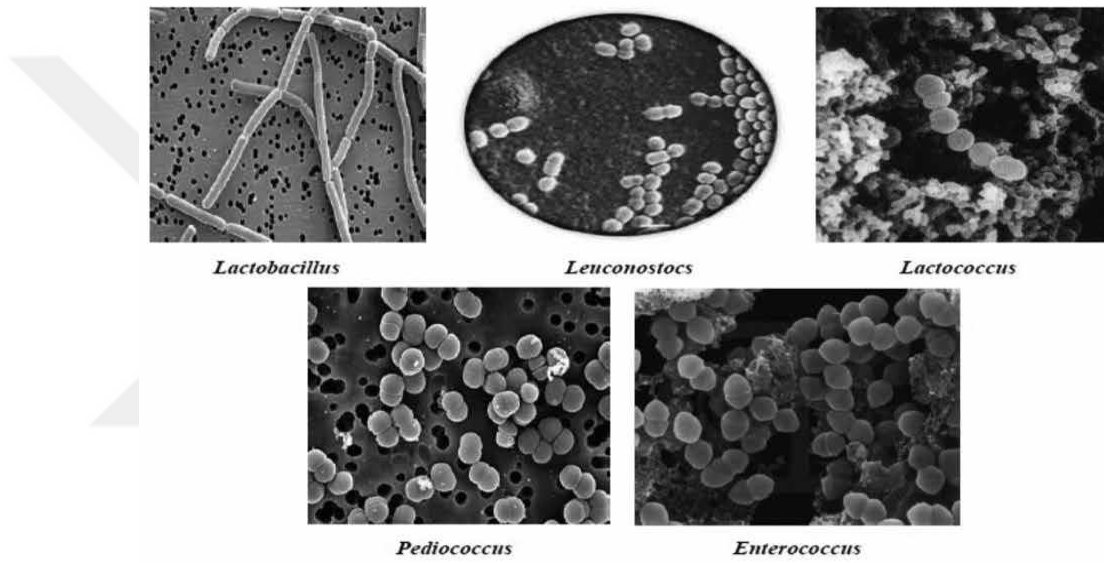
1.3.1.2. Laktobasiller

Spor oluşturmayan, mikroaerofilik, Gram- pozitif, mikroskopik olarak düzgün çubuk, kokobasil veya uzun zincir oluşturan çubuk şeklinde oldukça çok çeşit

gösteren bir grubu temsil etmektedir. *Lactobacillus* cinsi, *Thermobacterium*, *Steroptobacterium*, *Betabacterium* şeklinde fenotipik özellikleri baz alınarak yapılan değerlendirmede üç alt gruba ayrılmaktadır [35].

1.3.1.3.Streptokoklar

Yoğurt ve peynir üretimi için başlatıcı organizma *S. thermophilus*, olmasından bu genus içerisinde istisnadır. *S. thermophilus*'un taksonomisi Sherman'a göre Viridian grubunda yer alır [23].



Şekil 1.3.1.1.Bazı laktik asit bakteri genuslarına ait mikroskopik görüntüler [37].

1.3.2. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Potansiyeli

Laktik asit bakterileri laktik ve asetik asidin yanı sıra diğer inhibitör maddeleri de üretme ve salgılama yeteneğindedir. Bundan dolayı bu maddeler laktik asit bakterilerinin koruyucu aktivitesi üzerine etkisi olduğu kadar mikroorganizmaların geniş bir spektrumu üzerinde de antagonistiktir ve önemli katkıları vardır. Bunlar asetik ve laktik asitten çok daha az miktarlarda üretilirler ve serbest yağ asitleri, formik asit, asetoin, 2-3 bütandiol, amonyak, hidrojen peroksit, asetaldehit, etanol, diasetil, benzoat, bakteriyosinler ve antibiyotikler, toksinler,

bakteriyolitik enzimler, bakteriyofajlar ve hatalı bakteriyofajlar, antibiyotik maddeler gibi birkaç az tanınmış veya tamamen tanımlanmamış inhibitör maddeleri kapsarlar [11].

1.3.3. Organik Asitlerin Antimikrobiyal Aktivitesi

Asetik, propiyonik ve laktik asit gibi organik asitler gıdaların biyolojik olarak korunmasında önem taşımaktadırlar. Bu asitler gıdalardaki pH'yı düşürerek hammaddede bulunan veya bulaşma ile ortaya çıkan istenmeyen mikroorganizmaların çoğalmasını engelleyici ya da gelişimini azaltıcı etkide bulunmaktadır [17].

Bakterilere karşı daha çok antimikrobiyal etkiye sahip olan bakteri; asetik asit bakterisidir. Özellikle *Salmonella*'lar ve genel olarak patojen bakteriler sirke asidine karşı çok duyarlıdırlar. Her ne kadar süt asidinin antimikrobiyal etkisi çok sınırlı olsa da etkisi daha çok anaerob bakterilere karşıdır [18].Örneğin; sütte *Salmonella typhimurium* hücreleri pH laktik asit ile 4'e düşürüldüğünde daha hızlı ölmektedir. Benzer şekilde hidroklorik asit yerine laktik asit ile pH 5,5'e ayarlandığında hücrelerin büyümesi daha da yavaşlar[17].

Organik asitlerin mikroorganizmalar üzerine inhibitör ajan olarak etki göstermesi, asidin sahip olduğu üç farklı etkiye bağlanmaktadır.

a- Zayıf asitler; hücre zarından geçebilirler. Birinci etkileri, bu asitlerin sitoplazmik pH'ı düşürmeleri kanalıyla olur. Lakin direkt disosiyeye olmamış formları da metabolizma üzerine spesifik inhibitör etkiye sahiptir.

b-Karbonat süfit, nitrat, gibi asit potansiyelli iyonlar düşük pH'da potansiyel inhibitörlerdir. Laktik asit pH 5'de spor oluşturan bakterilere karşı aynı pH'da maya ve küflere karşı etkisiz kalmakla birlikte aynı zamanda mükemmel bir inhibitör olmaktadır.

b- Kuvvetli asitler düşük pH derecesine sahiptirler. Fakat kendi kendilerine hücre zarından geçememekle beraber güçlü asidik etkileri sayesinde hücre zarında bulunan enzimlerin yapısını bozarak inhibitör etkide bulunabilirler [9].

1.3.4 H₂O₂ Üretiminin Antimikrobiyal Etkisi

Hidrojen peroksit laktik asit bakterilerinin üremeleri sonucu oluşmaktadır. Hidrojen peroksit miktarı, laktik asit bakterilerinin cins, tür ve hatta suşlarına göre çeşitlilik gösterir. Hidrojen peroksit termodinamik bakımdan kararsız bir bileşiktir, su ve oksijene ayrışır [7]. H₂O₂, oksitleyici bir bileşiktir. Birçok mikroorganizmanın vejetatif hücreleri ve sporları üzerinde öldürücü etkiye sahiptir. *Laktobasiller* katalaz enzimine sahip olmadıkları için farklı mekanizmalarla, gelişme sırasında H₂O₂ oluşturabilirler. H₂O₂ 'in antimikrobiyal etkisi bilinen bir durumdur. H₂O₂ 'in antagonistik etkisi *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas* spp.'de belirlenmiştir [19].

Bazı laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkileri H₂O₂ üretimlerine dayandırılmakla beraber laktik asit bakterileri gibi katalaz negatif mikroorganizmalar tarafından aerobik şartlarda üretilmektedir. Glukoz oksidaz, ksantin oksidaz, sülfidril oksidaz, askorbik asit, pirüvat oksidaz, NADH oksidaz ve laktat oksidaz veya α -gliserofosfat oksidaz vasıtası ile katalizlenen reaksiyonda atmosferik oksijenin direkt indirgenmesi ile meydana gelmektedir. Özellikle birçok *Laktobasil* ve *Streptokok* türü aerobik şartlar altında önemli miktarlarda H₂O₂ 'nin üretebilmektedir [9].

1.3.5. Bakteriosin Üretimi ve Antimikrobiyal Aktivitesi

Genellikle üretici suşa yakın akraba türlere karşı antimikrobiyal etki gösteren bakteriyosinler, bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen peptit ya da protein yapısındaki bileşiklerden oluşurlar [20]. Laktik asit bakterilerinin tüm cinslerinde bakteriosin üretimi belirlenmiştir. Özellikle, *Streptococcus* ve *Lactobacillus* cinslerinde bu metabolitin üretimi oldukça yaygındır [9].

Birçok kaynakta bakteriyosinler benzer aktivite özelliklerinden ötürü antibiyotiklerle karıştırılmaktadır. Bunları antibiyotiklerden ayıran pek çok fark olmakla birlikte, temel kısım, antibiyotiklere göre çok daha dar bir etki spektrumuna sahip olmalarıdır [20].

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen antimikrobiyal proteinler içerisinde en çok bilinen ve karakterize edilen bakteriyosin olan nisin (E234), *Lactococcus lactis* tarafından üretilir ve şimdiye kadar gıdalarda biyo-koruyucu olarak kullanılan tek lisanslı bakteriyosin olup, *Clostridium sporogenes* üzerine engelleyici etkiye sahiptir [21].

Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler başlıca üç sınıfa ayrılmaktadırlar.

1.3.5.1. Birinci Sınıf Bakteriyosinler

Birinci sınıf bakteriyosinler, lanbiyotikler olarak adlandırılmaktadır. Bu sınıftaki bakteriyosinlerin çoğu gram pozitif olan *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ve *Clostridium botulinum* patojenleri üzerinde antagonistik etki göstermektedir.

1.3.5.2. İkinci Sınıf Bakteriyosinler

İkinci sınıf bakteriyosinler, karakterize edilmiş en geniş bakteriyosin grubudur. Pediyosinler, plantarisinler ve laktokoksinler bu sınıfa örnek bakteriyosinlerdir.

1.3.5.3. Üçüncü Sınıf Bakteriyosinler

Helvetisin bu sınıfa örnek bakteriyosindir. Bakteriyosinlerin sınıflanmasında aktiviteleri için karbonhidrat veya lipid grupları içeren bakteriyosinler bir dördüncü sınıf olarak bulunmaktadır [22].

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin etki mekanizması üzerine ilk bilgiler kolisinler ile yapılan çalışmalara dayandırılmış ve geniş kabul görülmüştür [9].

1.3.6.Reuterin ve Antimikrobiyal Etkileri

Reuterin anaerobik koşullarda *Lactobacillus reuteri* tarafından gliserolden üretilen düşük molekül ağırlığında protein yapıda olmayan yüksek çözünürlüğe sahip

bir bileşiktir. Reuterin, *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. gibi gram pozitif ve *Salmonella* spp., *Shigella* spp. gibi gram negatif bakterilere, *Candida* türü mayalara ve *Trypanosoma* protozollerine karşı antimikrobiyal etki göstermektedir [11].

1.3.7. Diasetil ve Asetaldehit Üretimi ve Antimikrobiyal Etkileri

Streptococcus leuconostoc, *Lactobacillus* ve *Pediococcus* cinslerinin bazı tür ve suşları tarafından üretilen diasetil, tereyağı kokulu sıvı bir bileşiktir. Diasetil üretim yolu en fazla homofermantatif *Lactococcus diacetylactis* ve heterofermantatif *Leuconostoc cremoris* türünde araştırılmıştır. Üç farklı ticari kaynaktan elde edilen diasetilin 10 LAB, 4 maya, 12 gram pozitif ve 14 gram negatif bakteriden oluşan 40 kültüre karşı test edilmesi sonucunda, asetilin pH $\leq 7,0$ 'da aktif, pH $\geq 7,0$ 'da ise inaktif olduğu belirlenmiştir. Diasetilin etkisi, Gram pozitif bakteriler için genellikle genelde gelişmeyi durdurucu, Gram negatif bakteriler için ise letal olarak belirtilmektedir [23].

1.3.8. Mikroorganizmaların Karbondioksit Üretimi ve Antimikrobiyal Etkisi

Karbondioksit, heterofermantatif laktik asit bakterilerinin heksozu fermente etmeleri sonucu oluşur [11]. Aerobik solunum yapan mikroorganizmalar laktik asit bakterileri ile kıyaslandıklarında CO₂'e çok daha fazla dayanıklı bulunmuşlardır. 12 adet fakültatif aneorob mikroorganizma ile yapılan bir çalışmada da (%100 CO₂ atmosferi, 25°C sıcaklıkta) birkaç *Enterobacter* hariç *Laktobasiller* yine en dayanıklı cins olarak görülmüştür. Hücrelerin CO₂'e karşı hassasiyetinin sebebi hakkında bazı fikirler ileri sürülmüştür. Aeroblar üzerindeki etkinin daha yüksek bulunmasının nedeni olarak solunum metabolizması yolunda inhibisyon bölgelerinin bulunması düşüncesi ile dekarboksilaz, özellikle de süksinat dehidrogenazın inhibisyonunu ileri sürmüşlerdir [9].

CO₂ diğer metabolik yollarla oluşsa bile esasında heterofermantatif laktik asit bakterilerinin heksozu fermente etmeleri süresince şekillenir. CO₂, amino asitlerin (histidin, tirozin) dekarboksilasyonu sonucu şekillenmektedir. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkilerine katkı sağlayan CO₂, çift antimikrobiyal etkiye

sahiptir. Birincisi, gıda ortamında küfler gibi zorunlu aerobik mikroorganizmaların üremelerini engellemesidir. İkincisi ise CO₂' in kendi antimikrobiyal etkisidir [11].

1.3.9. Alkol Üretimi ve Antimikrobiyal Etkisi

Heterofermentatif laktik asit bakterileri tarafından şekerlerin fermentasyonu sonucu diğer oluşan maddeler ile birlikte alkol de üretilmektedir. Etil alkol yaygın olarak kullanılan orta etkinlikte bir antimikrobiyal ajandır. Çeşitli vejetatif hücrelere karşı alkolün yıkıcı etkisi halen tartışılmaktadır. Genellikle patojen bakterilerin büyük çoğunluğuna karşı bakterisit etki göstermekle birlikte bakteri sporlarına karşı etkisizdir. Alkolün mikroorganizmalar üzerine bahsedilen bakterisit etkisi; onun konsantrasyonu, muamele süresi ve molekül ağırlığı ile ilişkilidir [9].

Bu tez çalışması ile ticari yoğurt örneği, ticari kefir örneği ve ticari probiyotik tablet örneğinden izole edilecek laktik asit bakterilerinin ve bir fungus olan *Saccharomyces boulardii*'nin antimikrobiyal etkileri bakteri ve funguslara karşı yapılacak analizler ile belirlenmeye çalışılacaktır. Tez çalışmamız ile bu farklı suşların antimikrobiyal etkileri ortaya konulmaya çalışılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bakteriyosinlerin Antimikrobiyal Özellikleri ve Yapılan Çalışmalar

“Bakteriyosin”, bakteriler tarafından üretilen protein yapısına sahip antibakteriyel maddelerin genel olarak tanımlanması ve bu maddelerin isimlendirilmesidir. Bu tanımın ilk kullanımı 1953 yılında Pastör Enstitüsü tarafından yapılan bir yayında Frederick Jacobs ve Alexander Siminovitch adlı bilim adamları tarafından yapılmıştır. Günümüzde tanımlanarak adlandırılmış yüzden fazla bakteriyosinin var olmasına rağmen bunların büyük bir kısmı laktik asit bakterilerince üretilmektedir. *Laktobasiller* sayıca bakteriyosin üretme yeteneğine en fazla sahip olan gruptur [24].

Bakteriler tarafından sentezlenen bakteriyosinler, doğal antimikrobiyal bileşikler olup; peptid hidrofobik, küçük molekül ağırlığına ve katyonik özelliğine sahiptirler. Bazı türlerle sınırlı olan, bakteriyosinlerin etki spektrumları daha çok Gram(+) mikroorganizmalar üzerinde etkilidirler. *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leconostoc* ve *Staphylococcuscins*lerine ait birçok mikroorganizma tarafından sentezlenmelerine bilakis gıdalarda daha çok laktik asit bakterileri tarafından sentezlenen bakteriyosinler kullanılmaktadır. Önemli bakteriyosinler arasında nisin, diplokokin, asidofilin, bulgarikan, helvetisin, laktasin ve plantarisin bulunmaktadır. En çok bilinen ve karakterize edilen bakteriyosin olan nisin (E234), *Lactococcus lactis* tarafından üretilir ve şimdiye kadar gıdalarda biyo-koruyucu olarak kullanılan tek lisanslı bakteriyosin olup, *Clostridium sporogenes* üzerine engelleyici etkiye sahiptir [21].

Aşağıdaki kriterler bir bakteriyel ürünün bakteriyosin olarak tanımlanabilmesi için dikkate alınmaktadır.

- a- spesifik hücre reseptörlerine tutunması.
- b- üretiminin ve konakçı-hücre bağıışıklığının plazmid-kökenli genetik determinantlara bağlı olması.
- c- dar bir inhibisyon spektrumuna sahip olması.
- d-biyolojik yönden aktif bir proteine sahip olması.
- e-üretiminin letal biyosentez yoluyla gerçekleşmesi.

f. bakterisit etki göstermesi.

Son yıllarda *Pediococcus* ve *Lactobacillus* türlerini de kapsayan yoğun çalışmalar neticesinde önemli sayıda bakteriyosinin varlığı ortaya konmuştur. *Laktobasillerin* bir diğer özelliği de çok güçlü hidrojen peroksit üretici olmalarıdır. *Leuconostoc* cinsi bakteriler pek fazla araştırılmamıştır. Bunların inhibisyon etkisinin, esas olarak laktik asit, asetik asit ve diasetilden ileri geldiği belirtilmektedir [25].

Laktik asit bakterileri içinde bakteriosin üreten *Laktobasil*, *Lactococ*, *Leuconostoc*, *Pediococ*, *Micrococ* ve cinsleri gıda maddelerinin korunmasında doğal koruyucu olarak yer almaktadır. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriosinler, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria* türleri ve *Staphylococcus aureus* gibi gıda maddelerinin bozulmasına neden olan patojen mikroorganizmalar üzerinde bakteriosidal etki gösterirler [7].

Bakteriyosinler, proteazlar, bakteriyosin benzeri bileşikler, lizozim ve hidrojen peroksit gibi kimyasal maddeler probiyotik bakteriler tarafından salgılanmaktadır ve Gram pozitif, Gram negatif bakterileri inhibe etmektedirler. Bakteriyosin üretiminin, Gram pozitif bakterilerde, Gram negatiflere oranla çok daha yaygın olduğu bildirilmektedir. Gram (+) bakterilerin ürettikleri bakteriyosinler katyonik protein yapıda bileşikler olup, hücre geçirgenliğini bozabilen mekanik etkiye sahiptir. Ayrıca bu bakteriyosinler, Gram (-) bakterilerin ürettikleri bakteriyosinlerden daha farklı özelliklere de sahiptirler [21].

2.1.1.Nisin

Nisin 1928 yılında keşfedilmiş bir bakteriyosindir [27]. Nisin tip I lantibiyotik grubuna dâhil olan ve *Lactococcus lactis*'de tanımlanan ilk bakteriyosindir. Fermentasyon ortamının kompozisyonu, ortamda üretilen nisin derişimi, pH ve en önemlisi hücrenin gelişimi kültür ortamlarında yüksek miktarda üretilen nisin ile ilişkilidir. Gıda koruyucusu olarak önemli potansiyele sahip olan nisinin daha verimli üretiminin sağlanması hem endüstriyel açıdan ve hem de bu suşların starter kültür olarak kullanımı açısından önem taşımaktadır [26]. *Stereptococcus lactis* tarafından üretilen nisin, gıda koruyucusu, süt mayalamada, besin üretiminde kullanılmaktadır. Nisin, laktik asit bakterisi tarafından üretilen antimikrobiyal içinde en fazla karakterize olanıdır [7].

2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Özellikleri ve Yapılan Çalışmalar

Kluyveromyces lactis ve *Geotricum candidum* yoğurdun mikrobiyal florasında kontaminant olarak bulunmaktadır. Bu mikroorganizmalarının gelişimine karşı doğal yolla koruma sağlamak üzere Biyo profit koruyucu kültürünün etkisi araştırılmış, ayrıca yoğurt bakterileri üzerindeki olabilecek etkileri ortaya konmaya çalışılmıştır [13].

Dahiya ve Speck (1967) çalışmalarında özellikle *L. bulgaricus* hidrojen peroksit üretiminden dolayı *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir [28].

L. bulgaricus ve diğer laktik asit bakterileri katalaz enzimi oluşturmadığı için, gelişim esnasında meydana getirdikleri H₂O₂'in de *S. aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas* spp. gibi patojen ve kontaminant bakterilere karşı inhibisyon etkisinin olduğu ileri sürülmektedir [30].

Joerger ve Klaenhammer (1986) yaptıkları çalışmada *Lactobacillus helveticus* tarafından helveticin J ve helveticin V-1829 bakteriyosinlerinin üretildiği bildirilmiştir [31].

Abdel-Bar ve ark., (1987) yaptığı çalışmalarda, *L. bulgaricus*'un laktik asitten farklı bir antimikrobiyal madde ürettiğini ve bu maddenin gram pozitif bakterilerden *S. aureus* ve gram negatif bakterilerden de *Pseudomonas fragilis* etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Laktik asit bakterilerinin, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Enterococcus*, *Listeria* ve *Pseudomonas* cinsi a karşı da antagonistik etki gösterdikleri saptanmıştır [7].

Hidrojen peroksit ve asetik asit antibiyotikler, kefirde mikroorganizmalar tarafından oluşturulmaktadır. Bu maddeler *E. coli* ve *Salmonella* gibi patojen bakteriler üzerine antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmiştir [11].

Kılıç (1990) çalışmalarında *B. cereus* suşları 12 *L. bulgaricus* suşlarına karşı antibakteriyal etkileri zayıf bulundu [28].

Vandenbergh (1993), çalışmalarında nisin Gram-negatif bakterilerin gelişimini önlemek için kullanılmış ve yapılan çalışmalarda nisin şelat yapma özelliğine sahip maddelerle birlikte kullanıldığında, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı bakterisidal etki gösterdiği bulunmuştur [31].

Kwak ve ark., (1996) yaptığı çalışmalarda, kefir taneleri *Laktobasil*, *Laktokok* ve *lökönostok* türlerini içerir. *Laktobasil* türlerini, *Laktobacillus caucasicus*, *L.casei*, *L.plantarum*, *L.acidophilus*, *löptokok* türlerini, *Lactococcus lactis ssp.lactis*, *L.lactis ssp. cremoris*, *Stereptococcus thermophilus* ve yaygın *lökönostok*'ları *Leuconostoc dextranicum*, *L. mesenteroides* ve *L. kefir* olarak belirtmişlerdir [7].

Mama ve ark.,(2002), incelenen laktobasiller içerisinde asitleştirme açısından en zayıf suşların *L. reuteri* suşlarının olduğu görülmüştür [32].

Yüksekdağ ve ark., (2003), bazı araştırmacılar *Lactobacillus ssp.* nin *Streptococcus ssp.*'ye göre antimikrobiyal etkisinin daha yüksek olduğunu bulmuşlardır [28].

Caridi (2003), yapılan bir araştırmada Pecorino del Poro peynirinden toplam 225 laktik asit bakterisi izole etmiş, bunlardan 18 tanesinin *E. coli*'ye karşı antagonistik aktivitesini incelemiş ve 9 *laktobasilin* antagonistik aktivitesi tespit edilmiştir. Çalışmada *L. paracasei ssp. paracasei* ve *L. curvatus*'un *E. coli*'ye karşı yoğun bir antagonistik aktivite gösterdiğini belirlenmiştir [32].

Ukuku ve Fett'in (2004) yaptığı çalışmada farklı gıda sistemlerinde nisin sodyum laktat ile birlikte uygulanması halinde antimikrobiyal etkinliğin arttığı yapılan çalışmada belirtilmiştir [33].

Mezaini ve ark.,(2009) yaptıkları çalışmada Cezayir sütünden izole edilen yirmi LAB suşunun, *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis*, *B. cereus*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli* ve *Salmonella*

typhimurium'a karşı antagonistik aktiviteleri açısından tarandığını bildirmişlerdir. [28].

Akpınar ve ark., (2011) yaptıkları çalışmada 30 farklı ev yapımı yoğurttan izole edilen 25 *Lactobacillus delbruecki ssp.bulgaricus* ve 16 *Streptococcus thermophilus* suşunun çeşitli patojen ve kontaminant bakteriler üzerindeki inhibitör etkisini belirlemişlerdir. Bu bakterilerin antibiyotik direnci de belirlenmiştir. Tüm *Lactobacillus bulgaricus* suşları, *Escherichia coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivite sergilerken, *S. thermophilus* suşlarının tümü, *Klebsiella pneumoniae*'ye karşı aynı aktiviteyi sergilemiştir. *L. bulgaricus* suşlarının hiçbiri, polimiksin-B'ye dirençli değildi, sadece OL4 suşu, bakitracin'e karşı direnç gösterdiği bulunmuştur. *S. thermophilus*'un C6 ve SL4 gibi bazı suşları novobiyosin'e direnç sergilerken SY72, M3, C1M, ve F1M'nin optochin'e direnç gösterdiği görülmüştür. ET6 ve SY73 suşlarının hem optosine hem de novobiyosine direnç gösterdiği görülmüştür [28].

Zacharof ve Lavitt (2012), son yıllarda yapılan çalışmalarda gıda fermantasyonlarında yararlanılan bakteri kültürleri ile bunların ürettikleri antimikrobiyal metabolitlerin gıda muhafazasında patojen ve bozulma etmeni bakterilere karşı doğal bir blokaj yaparak kullanılması yoğun talep gören bir uygulamadır [33].

2.3. Kefir ile Yapılan Antimikrobiyal Çalışmalar

Kefir doğanın tabii maddelerindendir ve adına birçok çalışma yapılmıştır. Kefirin; *Staphylococcus*, *Salmonella* ve *Shigella* bakterileri üzerine etkileri ile ilgili de çalışmalar yapılmıştır. Aktif kefir taneleri ile üretilen kefirin pH'ı 5.5 olarak bulunduğundan kontrol olarak inhibisyon zonuna bu pH da bakılmıştır. Ayrıca kefir ekstresi pH 7' ye ayarlanarak bu pH da kefirli ve kefirsiz inhibisyon zonu ölçülmüştür. Hem 5.5 hem de pH 7 de kefirin *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *P.vulgaris*, *S.aureus*, *S.epidermidis* ve en az *B. subtilis* olmak üzere antibakteriyel etkisi görülmüştür. Aktif kefir taneleri ekstresi ise *P. aeruginosa*'ya *K. pneumoniae*'den daha etkili olmuştur [29]

Kefir tanelerinin laktozu fermente eden ve etmeyen mayalar ile homofermantatif ve heterofermantatif laktik asit bakterileri ve asetik asit bakterilerinin farklı türlerini içeren kompleks bir mikrofloraya sahip olduğu tespit edilmiştir. Mikroorganizmaların, kefir tanesi içinde simbiyoz halde yaşadığı belirtilmiştir [7].

Kefirin antimikrobiyal aktivitesini gıda teknolojisi alanında uygulamaya koymak için bu konuyla ilgili daha fazla araştırma yapılmalıdır [34].

Farklı ticari yoğurt örneklerinden izole edilecek laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkileri bakteri ve funguslara karşı yapılacak analizler ile belirlenmeye çalışılacaktır. Ticari yoğurt üretimi yapan işletmeler yoğurt üretiminden sorumlu laktik asit bakterilerinin farklı suşlarını kullanılacaktır. Tez çalışmamız ile bu farklı suşların izolasyon ve identifikasyonları yapılacak ve antimikrobiyal etkileri ortaya konulacaktır.

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyal

Araştırma kapsamında laktik asit bakterisi (LAB) kaynağı olarak bir ticari yoğurt örneği, bir ticari kefir örneği ve bir ticari probiyotik tablet kullanılmıştır. Ayrıca bu LAB kaynaklarına ilave olarak bir fungus da (*Saccharomyces boulardii*) çalışmaya dâhil edilmiştir. Kullanılan probiyotik tablet içeriğinde toplam 3×10^9 kob *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum* ve *Enterococcus faecium* bulunmaktadır. Bu LAB kaynakları ve fungus analiz süresince $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

Antimikrobiyal aktivite testleri için test mikroorganizması olarak *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* ve *Candida krusei* kullanılmıştır. Bu mikroorganizmalar Dumlupınar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiştir ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

3.2. Yöntem

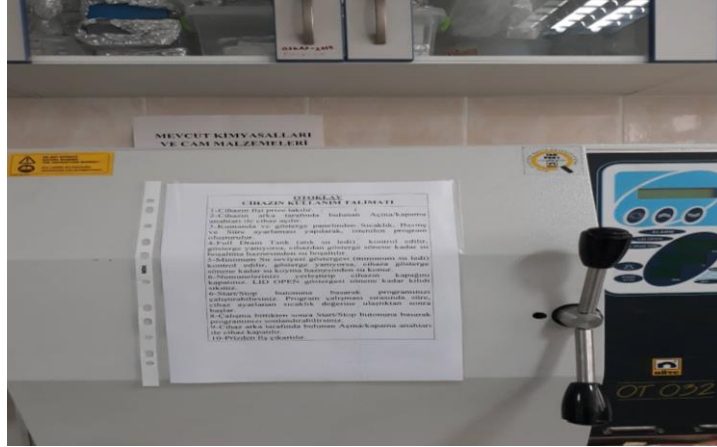
Çalışmada kullanılan LAB kaynakları ve fungus öncelikle 9 ml steril distile su içerisine 1 gr olacak şekilde ayrı ayrı aktarılmış ve vorteks cihazında iyice karıştırılarak stok solüsyonları hazırlanmıştır. Daha sonra bu stok solüsyonlardan 1 ml alınarak 90 ml modifiye laktoz broth besiyerine (laktoz 0,1 g., glikoz 0,1 g., pepton 0,1 g., yeast ekstrakt 0,1 g., su 100 ml) aşılanmıştır. Bu besiyerleri 30°C 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Test mikroorganizmalarının aktivasyonu amacıyla bakteriler için Nutrient Agar, fungus için Patates Dekstroz Agar içeren steril Petri kapları hazırlanmış ve test mikroorganizmaları çizgi ekim yöntemi ile bu besiyerlerine aşılanmıştır. Bu Petri kapları 30°C 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gelişen kolonilerden öze yardımı ile alınan bakteri ve fungus kültürleri içerisinde 9 ml steril Nutrient Broth (Merck, 1.05443) ve Patates Dekstroz Broth (Biomark, B 037) bulunan tüplere aktarılmıştır. Bu tüpler 30°C 'de 48 saat inkübasyona

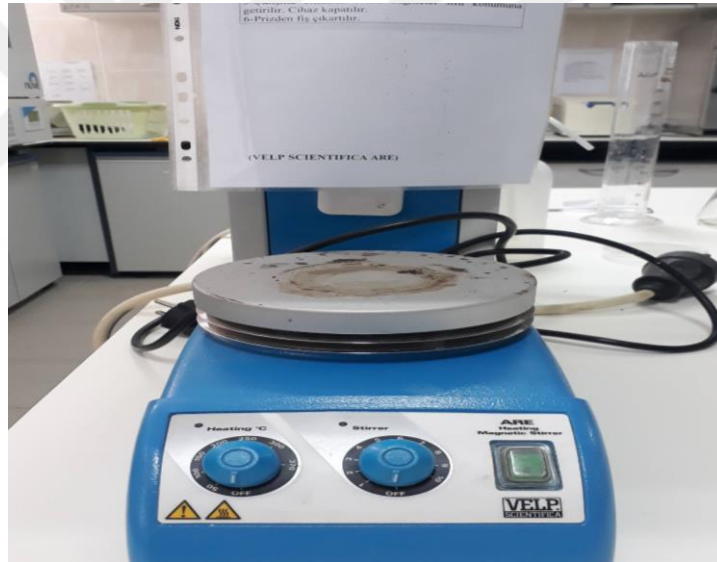
bırakılmıştır.İnkübasyon sonunda steril distile su yardımı ile 0,5 McFarland bulanıklığına eşdeğer süspansiyonlar hazırlanmıştır.

Antimikrobiyal aktivite analizleri “agar kuyucuk difüzyon testi” yöntemi ile belirlenmiştir. Bu analizler test bakterileri için Mueller Hinton Agar (Merck, 1.10293.0500) besiyeri üzerinde, test fungusu için ise Patates Dekstroza Agar besiyeri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Test mikroorganizmalarını içeren sıvı stok kültürlerden steril pamuklu eküvyon ile antimikrobiyal test besiyerleri üzerine boşluk bırakmayacak şekilde aşılama yapılmıştır. Aşılama sonrası test besiyerlerinin tam ortasına cam Pastör pipeti yardımı ile 6 mm çapında bir kuyucuk açılmıştır. Antimikrobiyal aktiviteye sahip olup olmadıkları analiz edilecek LAB’leri ve *S. boulardii* 48 saatlik sıvı kültürlerinden çalkalama sonrası 1’er ml alınarak steril eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Eppendorf tüpleri daha sonra 5 dakika boyunca on bin rpm hızında sentrifüj edilmişlerdir. Santrifüj işlemi sonunda LAB’leri ve *S. boulardii* eppendorf tüplerinin dibinde toplanmış, üst kısımda kalan süpernatant kısım ise antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılmıştır. Süpernatant kısımdan mikropipet yardımı ile alınan 40 µl sıvı Petri kaplarında açılan kuyucuklara aseptik koşullarda aktarılmıştır [38]. Aktarım işlemlerinin ardından tüm Petri kapları 30°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreci boyunca tüm Petriler incelenerek antimikrobiyal zon çapı olup olmadığı kontrol edilmiş, zon çapı oluşmuşsa cetvel yardımı ile ölçülerek kaydedilmiştir. Çalışmamızda karşılaştırma amacıyla ticari antibiyotikler de (Penisilin G, kloramfenikol, novobiocin ve nistatin) kullanılmıştır.

3.2.1. Çalışmada Kullanılan Ekipmanlar



Şekil 3.2.1.1. Otoklav



Şekil 3.2.1.2. Karıştırıcı



Şekil 3.2.1.3. Hassas Tartı



Şekil 3.2.1.4. Etüv



Şekil 3.2.1.5. Santrifüj

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Çalışmamız kapsamında farklı LAB'leri ve bir fungusun gelişim ortamı sıvılarının antimikrobiyal etkiye sahip olup olmadıkları beş farklı test mikroorganizmasına karşı yapılan analizler ile belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla yapılan analizler sonucu elde edilen zon çapları Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1.Test mikroorganizmalarına karşı ölçülen zon çapları (mm)

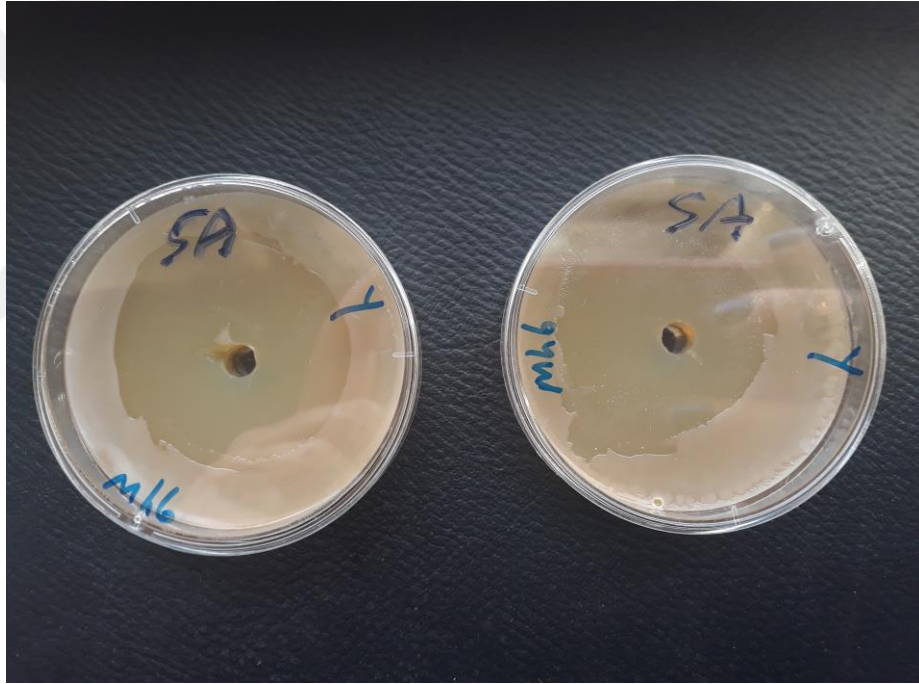
LAB - Fungus		SA	PA	EF	EC	CK
	<i>BESİYERLERİ</i>					
Y	PDB	0	0	0	0	20.0
	MHB	37,0	0	0	0	0
K	PDB	0	0	0	0	31.5
	MHB	0	18.3	0	0	0
P	PDB	0	0	0	22.6	0
	MHB	38,0	0	0	0	0
R	PDB	0	0	0	0	0
	MHB	0	0	0	0	0
PeG		24.0	0	24.0	0	0
CHL		20.0	12.0	30.0	26.0	0
NV		20.0	20.0	28.0	0	0
NYS		0	0	0	0	22.0

SA- *Staphylococcus aureus*; PA- *Pseudomonas aeruginosa*; EF- *Enterococcus faecalis*; EC- *Escherichia coli*; CK- *Candida krusei*. Y- Yoğurt; K-Kefir; P-Probiyotik; R-*Saccharomyces boulardii*, PeG-Penisilin G, CHL-Kloramfenikol, NV-Novobiocin, NYS-Nistatin

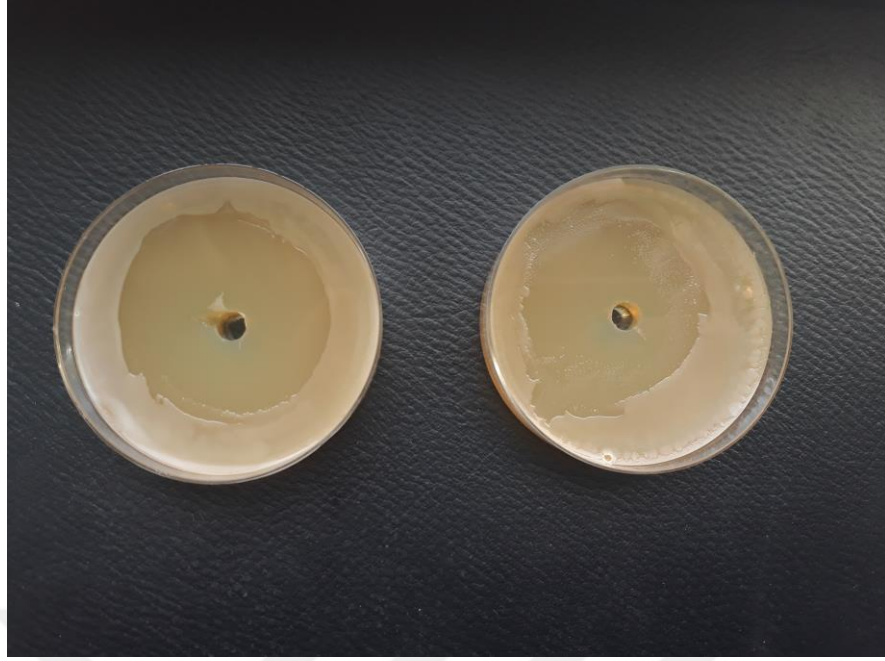
Çalışmamız sonuçlarına göre probiyotik bakterilerin ve yoğurt bakterilerinin gelişim sıvıları *S. aureus*'a karşı yüksek etkili bulunmuştur. Probiyotik bakteri gelişim sıvısı *S. aureus*'a karşı 38.0, yoğurt bakterileri gelişim sıvısı ise 37.0 mm zon

apı oluşturmuştur (Tablo 4.1). Bu iki gelişim sıvısı ayrıca *Candida kruseii*'ye karşı sırasıyla 22.6 ve 20.0 mm zon çapı oluşturmuşlardır. Kefir kaynaklı gelişim sıvısı ise *P. aeruginosa*'ya karşı 18.3 mm, *C. kruseii*'ye karşı ise 31.5 mm zon çapı oluşturmuştur. *C. kruseii*'ye karşı en yüksek etki kefir olarak tespit edilmiştir. *Saccharomyces boulardii* ise test mikroorganizmalarına karşı herhangi bir antimikrobiyal etki göstermemiştir (Tablo 4.1). Çalışmamız ile yoğurt ve probiyotik kültürleri *S. aureus*'a karşı ticari antibiyotiklerden daha etkili bulunmuştur. Kefir ise *P. aeruginosa*'ya ve *C. kruseii*'ye karşı ticari preparatlardan daha etkili olarak saptanmıştır (Tablo 4.1).

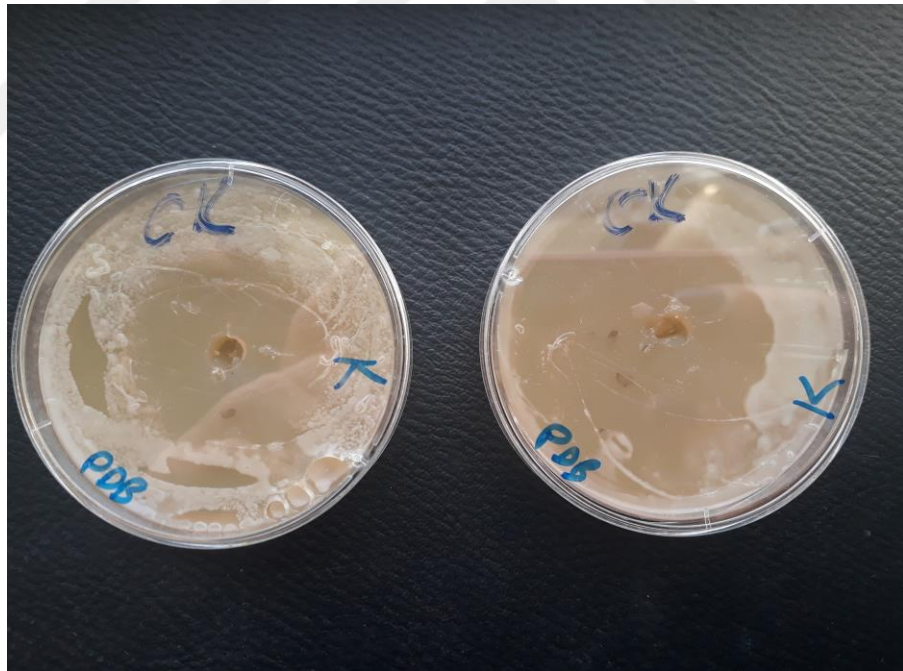
Çalışma kapsamında elde edilen verilere ilişkin görseller şekil 4.1 – 4.12 'de verilmiştir.



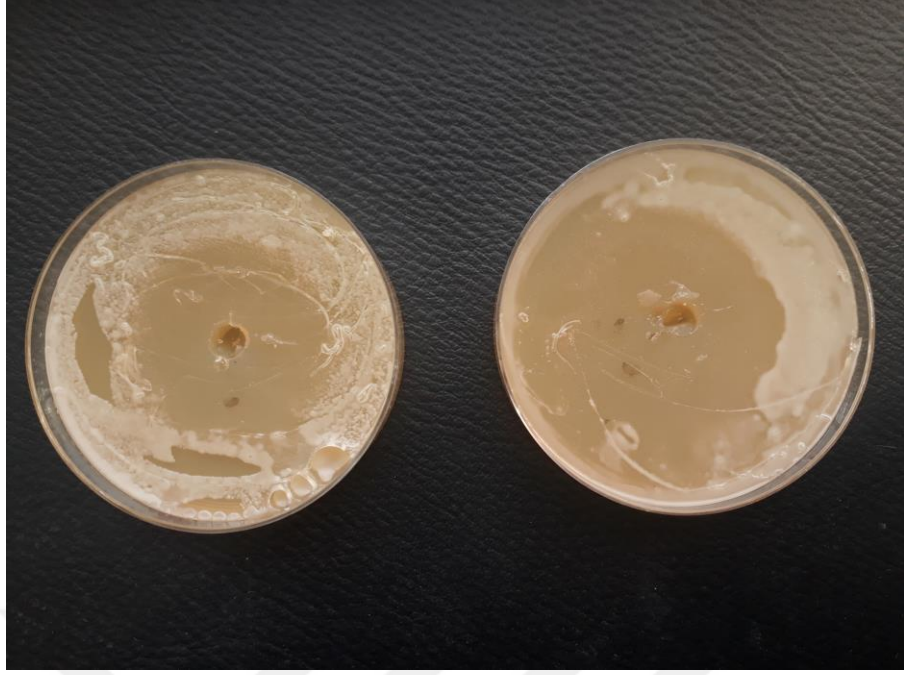
şekil 4.1. Yoğurt bakterilerinin *S.aureus*'a antimikrobiyal etkisi (A)



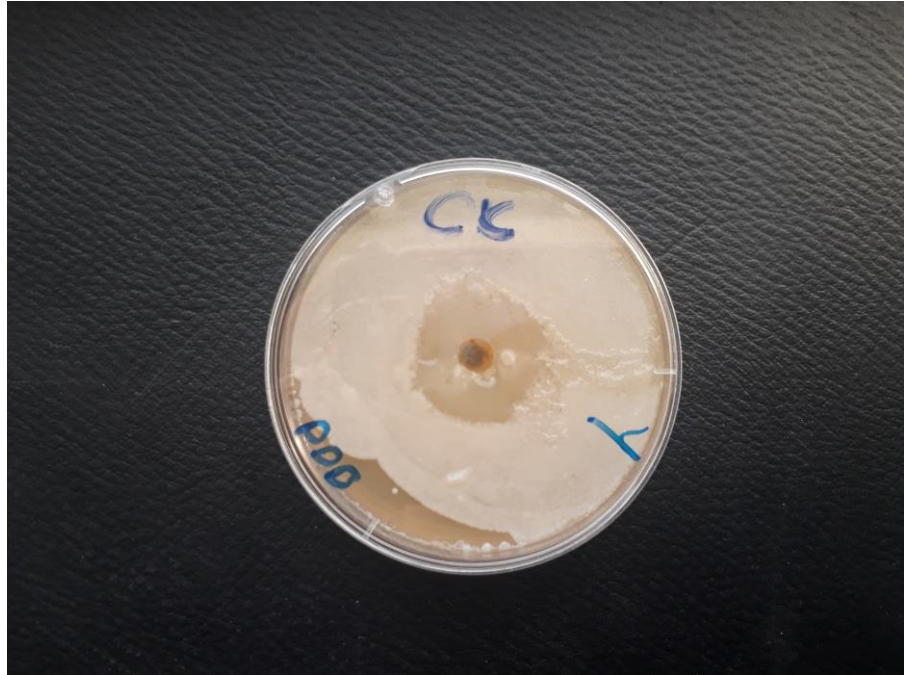
Şekil 4.2. Yoğurt bakterilerinin *S.aureus*'a antimikrobiyal etkisi (B)



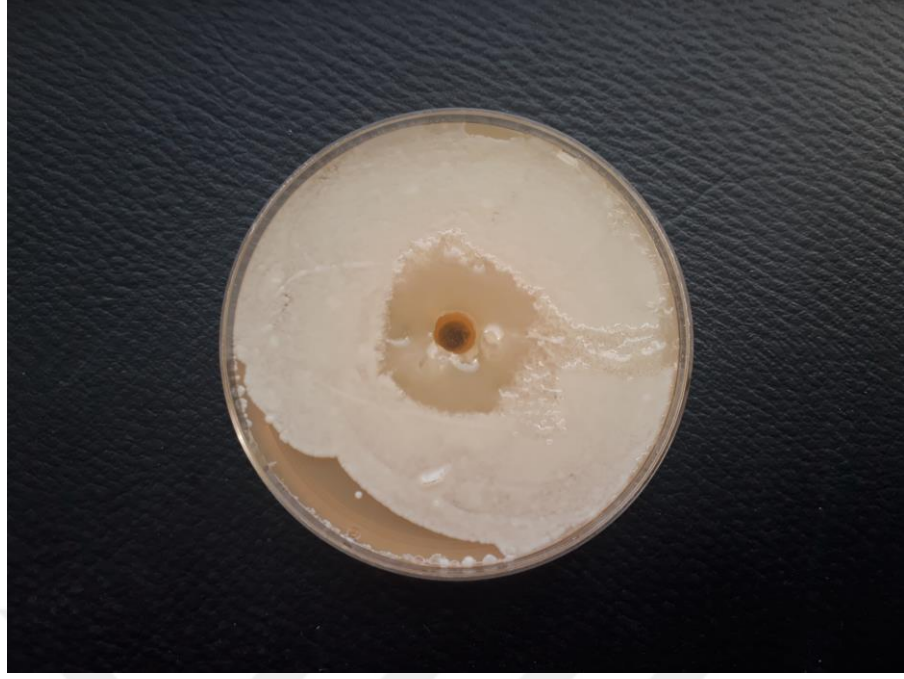
Şekil 4.3. Kefir bakterilerinin *C. krusei* 'ye antimikrobiyal etkisi (A)



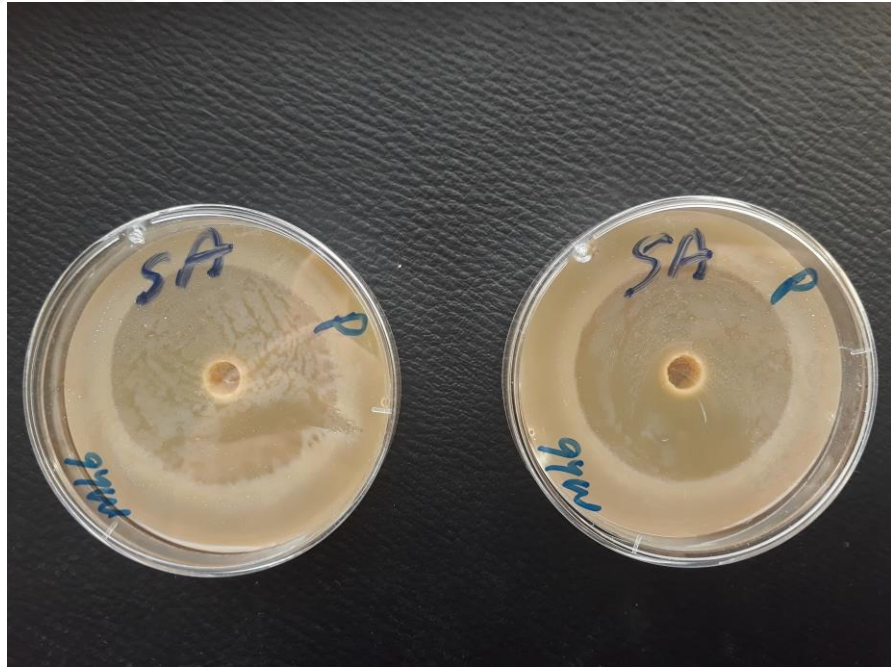
Şekil 4.4. Kefir bakterilerinin *C. krusei* 'ye antimikrobiyal etkisi (B)



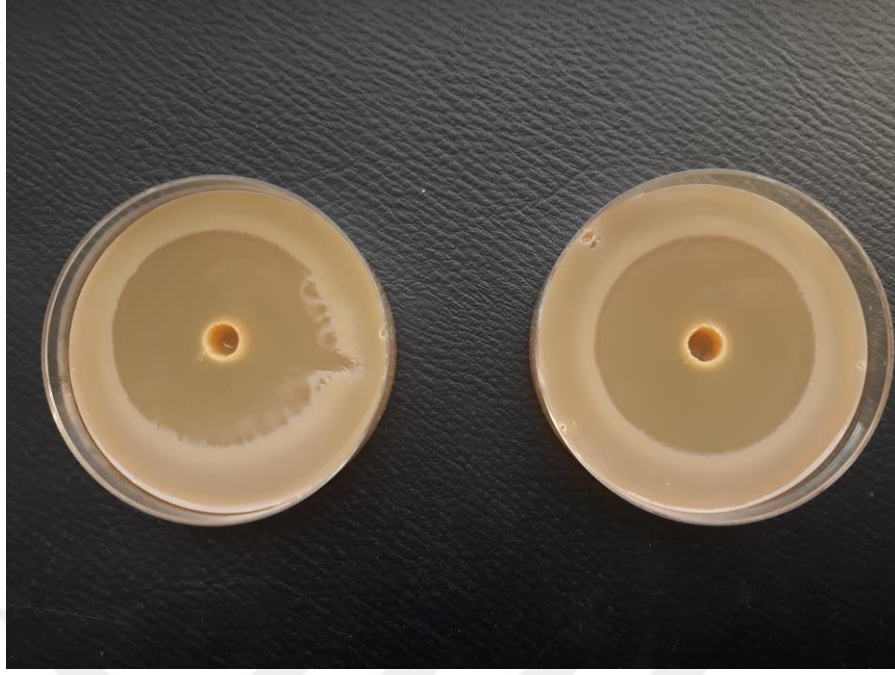
Şekil 4.5. Yoğurt bakterilerinin *C. krusei* 'ye antimikrobiyal etkisi (A)



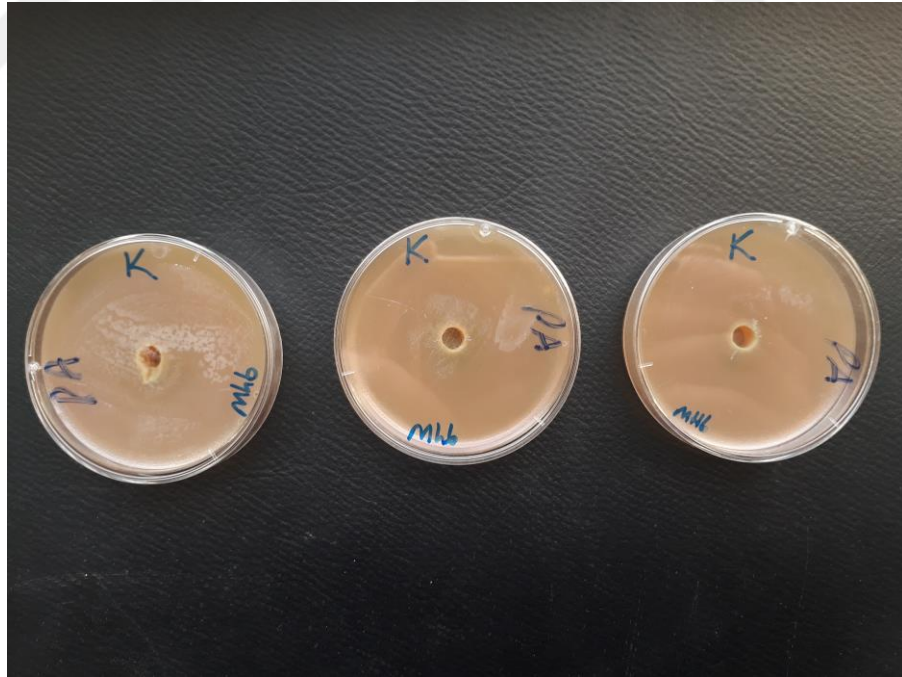
Şekil 4.6. Yoğurt bakterilerinin *C. krusei*'ye antimikrobiyal etkisi (B)



Şekil 4.7. Probiyotik bakterilerin *S.aureus*'a antimikrobiyal etkisi (A)



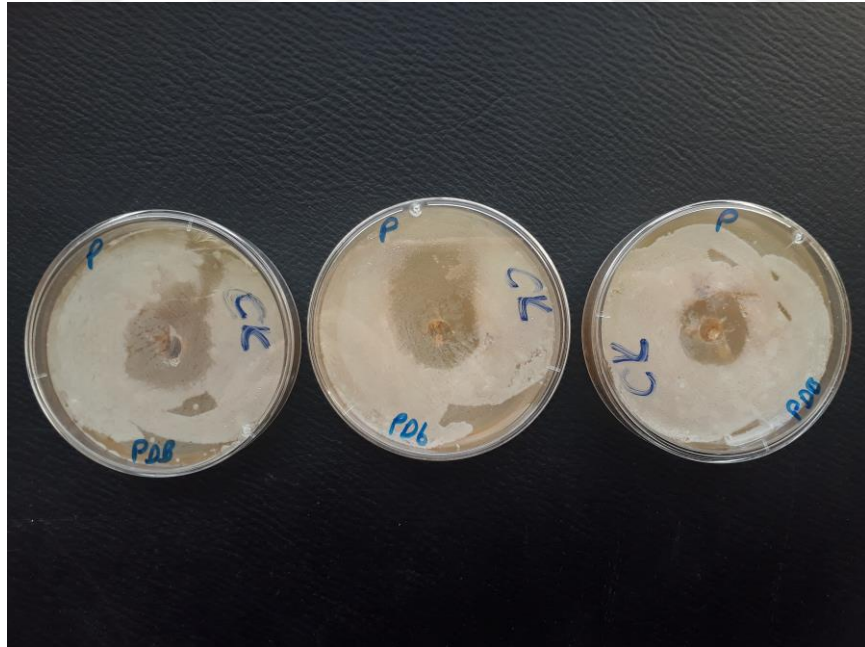
Şekil 4.8. Probiyotik bakterilerin *S.aureus*'a antimikrobiyal etkisi (B)



Şekil 4.9. Kefir bakterilerinin *P. aeruginosa*'ya antimikrobiyal etkisi (A)



Şekil 4.10. Kefir bakterilerinin *P. aeruginosa*'ya antimikrobiyal etkisi (B)



Şekil 4.11. Probiyotik bakterilerin *C. krusei*'ye antimikrobiyal etkisi (A)



Şekil 4.12. Probiyotik bakterilerin *C. krusei*'ye antimikrobiyal etkisi (B)

Akpınar ve ark. [28] çalışmalarında ev yapımı yoğurt örneklerinden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkiye sahip olup olmadıklarını araştırmışlardır. Çalışma sonunda *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*'un altı straini *S. aureus*'a karşı, 16 straini *Pseudomonas flourecens*'e karşı ve tüm strainler *E. coli*'ye karşı etkili bulunmuştur. Aynı çalışmada diğer yoğurt bakterisi *S. thermophilus*'un 8 straini *S. aureus*'a karşı, 11 straini *P. flourescens*'e karşı ve 13 strainin de *E. coli*'ye karşı etkili olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda da laktik asit bakterilerinin *S. aureus*'a ve *P. aeruginosa*'ya karşı etkili bileşikler ürettikleri belirlenmiştir. Bu yönü ile söz konusu araştırma ile tez çalışmamız arasında benzerlik bulunmaktadır.

Todorov ve ark. [39] bozadan elde edilen *L. pentosus*'un bakteriyosin üretimine, farklı besiyeri koşullarının etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, elde edilen bakteriyosinin *L. casei*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *L. curvatus* gelişimini inaktive ettiği belirtilmiştir. Çalışmamızda da laktik asit bakterilerinin *P. aeruginosa*'ya karşı etkili bileşikler ürettikleri belirlenmiştir. Bu yönü ile söz konusu araştırma ile tez çalışmamız arasında benzerlik bulunmaktadır.

Üner [39], laktik asit bakterilerinden elde edilen süpernantların *C. krusei* gelişimi üzerindeki bir çalışmada, Kontrol ile kıyasladığında, *C. krusei* gelişiminde lag fazının uzadığı, büyüme seviyesinin ise önemli derecede azaldığı görülmüştür. Çalışmamızda da laktik asit bakterilerinin *C. krusei*'ye karşı etkili bileşikler ürettikleri belirlenmiştir. Bu yönü ile söz konusu araştırma ile tez çalışmamız arasında benzerlik bulunmaktadır.

Gülseren[40], boza kaynaklı laktik asit bakterilerinin laktik asit miktarlarının ve *S. aureus* üzerine antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi çalışmasında, laktik asit bakteri türlerinden seçilen ilgili suşlarının *S.aureus* üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Seçilen *Lactobacillus* suşlarının *S. aureus* üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri oldukça yakın değerler olmuştur. B10 *Lactobacillus fermentum* bakterisi *S. aureus* 'u en yüksek inhibisyon oranına sahip olarak inhibe etmiştir. Buna karşılık, D41 *Lactobacillus plantarum* bakterisinin *S. aureus* üzerine inhibisyon etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir. *Lactococcus* türü suşları arasında, F45 *Lactococcus lactis* bakterisi *S. aureus* 'u en yüksek inhibisyon oranına sahip olarak inhibe etmiştir. Buna karşılık, F39 *Lactococcus raffinolactis* bakterisinin *S. aureus* üzerine inhibisyon etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir. *Leuconostoc* türü suşları arasında ise, A40 *L. lactis* bakterisi *S. aureus*'u en yüksek inhibisyon oranına sahip olarak inhibe etmiştir. Buna karşılık A31 *Leuconostoc mesenteroides* bakterisinin *S. aureus* üzerine inhibisyon etkisinin az miktarda olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda da laktik asit bakterilerinin *S. aureus*'a karşı etkili bileşikler ürettikleri belirlenmiştir. Bu yönü ile söz konusu araştırma ile tez çalışmamız arasında benzerlik bulunmaktadır.

Varadaraj [41] çalışmasında, *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbruckii subssp. bulgaricus*, *Streptococcus salivarius* ve *L. lactis* izolatlarının *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *B. brevis*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. laterosporus*, *B. subtilis* ve *Pseudomonas aeruginosa*'yı inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda da laktik asit bakterilerinin *Pseudomonas aeruginosa* 'ya karşı etkili bileşikler ürettikleri belirlenmiştir. Bu yönü ile söz konusu araştırma ile tez çalışmamız arasında benzerlik bulunmaktadır.

Zengin [11] çalışmalarında doğal olarak üretilen yoğurt örneklerinden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkiye sahip olup olmadıklarını araştırmışlardır. Çalışma sonunda *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* izolatlarından 1, 4, 5 numaralı izolatlar *Enterococcus faecalis* indikatör patojen bakterisinin gelişimini sırasıyla 7.3, 9.1, 10.2 mm zon çaplarıyla inhibe ederken 2 ve 3 numaralı izolatlar bu indikatör patojen bakterinin gelişimini inhibe edici bir etki göstermemiştir. *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* izolatlarından 1, 4, 5 numaralı izolatlar *Pseudomonas fluorescens* indikatör patojen bakterisinin gelişimini sırasıyla 8, 8, 8.4 mm zon çaplarıyla inhibe ederken 2 ve 3 numaralı izolatlar bu indikatör patojen bakterinin gelişimini inhibe edici bir etki sergilememiştir. *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* izolatlarından 1, 4, 5 numaralı izolatlar *Staphylococcus aureus* indikatör patojen bakterisinin gelişimini sırasıyla 8.1, 8.9, 7.7 mm zon çaplarıyla inhibe ederken 2 ve 3 numaralı izolatlar bu indikatör patojen bakterinin gelişimini inhibe edici bir etki sergilememiştir. Elde edilen sonuçlara göre en geniş inhibisyon zonunu 10.2 mm zon çapıyla 4 numaralı izolat *Enterococcus faecalis*' e karşı sergilemiştir. Çalışmamızda da laktik asit bakterilerinin *S. aureus*'a, *Enterococcus faecalis*'e, *P. aeruginosa*'ya karşı etkili bileşikler ürettikleri belirlenmiştir. Bu yönü ile söz konusu araştırma ile tez çalışmamız arasında benzerlik bulunmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız ile farklı laktik asit bakterisi kaynaklarının ve gastrointestinal sistem düzenleyici etkisi bulunan ticari bir mayanın üretiminde kullanılan gelişim sıvılarının bakteri ve funguslara karşı antimikrobiyal etki gösterip göstermediği araştırılmıştır. Bu amaçla laktik asit bakterisi kaynağı olarak bir ticari yoğurt örneği, bir ticari kefir örneği, probiyotik bakteri içeren bir ticari tablet kullanılmıştır. Maya örneği olarak da *Saccharomyces boulardii* çalışmaya dâhil edilmiştir.

Çalışmamız sonunda elde edilen verilere göre laktik asit bakterileri içinde geliştikleri ortam sıvısına antimikrobiyal özellik gösteren kimyasal bileşikler bırakmaktadırlar. Bu kimyasalların çalışmamız kapsamında kullanılan test mikroorganizmalarına karşı farklı derecede inhibisyon etkisine sahip oldukları belirlenmiştir. Bu etki değerlerinin bir kısmı ticari antibiyotiklerden daha yüksek bulunmuştur.

Bu sonuçlara göre laktik asit bakterilerinin insan sindirim sisteminin düzenlenmesinde, bağırsak florasının sürdürülebilirliği ve olası patojenlerin etkilerinden korunmasında, gıda ürünlerinin biyokorumasında ve raf ömürlerinin uzatılmasında kullanım imkânlarının bulunduğu anlaşılmaktadır. Çalışmamızın ileriki çalışmalar için yol gösterici olacağı ve bu tip çalışmaların artarak devam etmesinin sağlık, çevre, gıda güvenliği gibi alanlarda laktik asit bakterilerinin kullanımını artıracakı düşünülmektedir.

