

Kargı Tulum Peynir'inden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Starter ve Probiyotik
Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi

Özlem Elçioğlu

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Temmuz 2010

Lactic Acid Bacteria Which is Isolated From Kargı Tulum Cheese to Establish Starter
and Probiotic Culture Properties

Özlem Elçioğlu

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

July 2010

Kargı Tulum Peynir'inden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Starter ve Probiyotik Kültür
Özelliklerinin Belirlenmesi

Özlem Elçioğlu

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Buket Kunduhoğlu

Temmuz 2010

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Özlem Elçioğlu' nun YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Kargı Tulum Peyniri’nden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Starter ve Probiyotik Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Buket Kunduhoğlu

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Yrd. Doç. Dr. Buket Kunduhoğlu

Üye : Doç. Dr. Semra İlhan

Üye : Doç. Dr. Mustafa Yamaç

Üye : Doç. Dr. Cansu Filik İşcen

Üye : Doç. Dr. Ahmet Çabuk

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada, Kargı Tulum Peynir'inden izole edilen laktik asit bakterileri (LAB) tanımlanarak, bunların peynir fermentasyonunda starter kültür olma özellikleri araştırılmıştır.

Yedi Kargı tulum peynirinden toplam 96 LAB izolatu elde edilmiştir. İzolatlar, API CH50 ve API 20Strep identifikasyon sistemi ile tanımlanmıştır. Buna göre; 22 izolat *Lactobacillus plantarum*, 11 izolat *Lb. brevis*, 9 izolat *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, 3 izolat *Lb. pentosus*, 3 izolat *Lb. fermentum*, 1 izolat *Lb. curvatus* subsp. *curvatus*, 1 izolat *Lb. rhamnosus*, 9 izolat *Enterococcus durans*, 5 izolat *E. faecium*, 3 izolat *Streptococcus thermophilus*, 1 izolat *St. mitis*, 1 izolat *St. equinus* olarak tanımlanmıştır. 8 izolat *E. faecium/durans*, 1 izolat *E. faecium/gallinarum*, 1 izolat *E. faecium/faecalis*, 1 izolat *E. gallinarum/casseliflavus* ve 1 izolat *St. acidominimus/pluranimalium* genus düzeyinde tanımlanabilmiştir. *Aerococcus viridans* (1), *Granulicatella adiacens* (1), *Gemella morbillorum* (7) gibi LAB olmayan izolatlar bulunmuştur. İzolatlardan altı tanesi tanımlanamamıştır.

Lb. plantarum (5, 7), *E. durans* (103), *E. faecium* (71) suşlarının, yüksek asit üretimleri (6 saatte) ve asidik pH değerlerine dirençli olmaları nedeniyle, tulum peynirinin üretiminde starter kültür olarak kullanımı uygundur. Buna ek olarak *Lb. pentosus* (15), *Lb. plantarum* (3, 8, 9), *E. faecium* (112), *Lb. brevis* (46) gibi suşlar güçlü proteolitik aktiviteye sahip olmaları, asidik pH'a dirençli olmaları ve dekstran ve/veya diasetil üretmeleri nedeniyle bu listeye eklenebilir.

Lb. brevis (37, 44), *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (43) and *E. faecium* (71); insanlardaki biyolojik engellere (% 1-3 sifra tuzu, 1-3 aralığındaki pH değerleri, oksijen varlığı/yokluğu) dayanıklılıkları, bazı antibiyotiklere dirençli olmaları, laktaz, H₂O₂, diasetil ve/veya bakteriyosin benzeri maddeler üretmeleri nedeniyle, probiyotik kültür olarak en fazla ümit vaad eden suşlardır.

Anahtar Kelimeler: Laktik Asit Bakterileri, Kargı Tulum peyniri, starter kültür, probiyotik kültür.

SUMMARY

The present work was aimed at identifying strains of Lactic Acid Bacteria (LAB) from Kargı Tulum Cheese, with properties suitable for use as starter cultures in cheese fermentation.

A total of 96 LAB isolates were obtained from seven samples of Kargı tulum cheese. The isolates were identified by API 50CH and API 20Strep identification systems and shown to be, 22 strains of *Lactobacillus plantarum*, 11 strains of *Lb. brevis*, 9 strains of *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, 3 strains of *Lb. pentosus*, 3 strains of *Lb. fermentum*, 1 strain of *Lb. curvatus* subsp. *curvatus*, 1 strain of *Lb. rhamnosus*, 9 strains of *Enterococcus durans*, 5 strains of *E. faecium*, 3 strains of *Streptococcus thermophilus*, 1 strain of *St. mitis*, 1 strain of *St. equinus*, 8 strains of *E. faecium/durans*, 1 strain of *E. faecium/gallinarum*, 1 strain of *E. faecium/faecalis*, 1 strain of *E. gallinarum/casseliflavus* and 1 strain of *St. acidominimus/pluranimalium*. There were non lactic acid bacteria identified such as *Aerococcus viridans* (1), *Granulicatella adiacens* (1), *Gemella morbillorum* (7). Six of the isolates could not be identified.

Strains of 5, 7 (*Lb. plantarum*), 103 (*E. durans*) ve 71 (*E. faecium*) could be suitable as starter culture for tulum cheese fermentation because of its strong acid production (in 6 h) and high acid tolerance. Additionally, *Lb. pentosus* (15), *Lb. plantarum* (3, 8, 9), *E. faecium* (112), *Lb. brevis* (46) can be added to this list because of its high proteolytic activity, acid tolerance, dextran and/or diacetyl production.

Lb. brevis (37, 44), *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (43) and *E. faecium* (71) can be selected as the most promising strains as probiotic culture because of their surviving in the human biological barriers (1-3% bile salt, pH values between 1-3, presence or absence of oxygen), resistance to some antibiotics in general use and can produce, lactase, H₂O₂, diacetyl and/or some bacteriocin-like substances.

Key words: Lactic Acid Bacteria, Kargı Tulum Cheese, Starter Culture, Probiotic Culture

TEŞEKKÜR

Bu çalışmamın yürütülmesi ve hazırlanması sırasında bilgisi ve yakın ilgisiyle bana yol gösteren danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Buket Kunduhoğlu'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarına destek verdiği için ve bana moral verdiği için Doç. Dr. Mustafa Yamaç'a, karşılaştığım zorluklarla mücadelede her an yanımda olan Öğretim Görevlisi Dr. Sevil Pilatin'e çok teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren aileme verdikleri maddi ve manevi desteklerden dolayı teşekkür ederim. Ayrıca gerekli araştırmamı yerinde yapabilmem için ulaşımımı sağlayan ablam Gülen Elçioğlu'na teşekkür ederim.

Çalışmamda yanımda olduğu her an yardımına koşan Özge Akcoşkun'a çok teşekkür ederim.

Beni bu yolda yalnız bırakmayan, en zor çalışma anlarımda yanımda destek olan ve desteğini hiçbir zaman çekmeyeceğine inandığım Volkan Çakır'a çok teşekkür ederim.

2007-19027 nolu proje ile yüksek lisans çalışmama verdikleri destek için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Laktik Asit Bakterileri	3
1.1.1. Laktik Asit Bakterilerini Tanımlama Yöntemleri.....	6
1.1.1.1. Fenotipik karakterlerin belirlenmesi	7
1.1.1.2. Genotipik karakterlerin belirlenmesi	7
1.2. Probiyotiklerin Tanımı.....	7
1.2.1. Probiyotiklerin Etki Mekanizmaları	9
1.2.2. Probiyotik Bakterilerin Bazı Metabolik Özellikleri.....	9
1.2.2.1. Sitrat metabolizması	10
1.2.2.2. Proteolitik aktivite.....	10
1.2.2.3. Safra ve safra tuzlarına direnç	10
1.2.2.4. Bakteriosin üretimi	11
1.2.2.5. Ekzopolisakkaritlerin (EPS) üretimi	11
1.2.3. Probiyotiklerin yararlı etkileri	12
1.2.3.1. Kolesterolün düşürülmesi	12
1.2.3.2. Laktoz intoleransının azaltılması	13
1.2.3.3. Bağırsak biyotası ve enfeksiyonlara etkisi.....	13
1.2.3.4. İmmun yanıtın güçlenmesi.....	14
1.2.3.5. İltihabi veya alerjik reaksiyonların azaltılması.....	14
1.2.3.6. Kolon kanseri riskinin azaltılması	14

İÇİNDEKİLER DİZİNİ(devam)

Sayfa

1.2.3.7. Ürogenital enfeksiyonlarına karşı koruma.....	15
1.2.3.8. Helicobacter pylori enfeksiyonu üzerine etki	15
1.2.3.9. Diğer hastalıklar üzerine etki.....	15
1.2.3.10. Ağır metallerin ve mikotoksinlerin giderilmesi.....	16
1.2.4. Gıda ve Peynir Teknolojisinde Probiyotikler	16
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
2.1. Materyal	19
2.1.1. Peynir örnekleri.....	19
2.1.2. Kullanılan standart kültürler	19
2.1.3. Kullanılan besiyerleri.....	20
2.1.3.1. MRS Agar	20
2.1.3.2. MRS Broth.....	20
2.1.3.3. MRS Broth çift kuvvetli	21
2.1.3.4. MRS Broth Ph 3.9.....	21
2.1.3.5. MRS Broth % 2 tuz ilaveli.....	21
2.1.3.6. MRS Broth % 4 tuz ilaveli	21
2.1.3.7. MRS Broth % 6.5 tuz ilaveli.....	21
2.1.3.8. MRS Broth Ph 1	22
2.1.3.9.MRS Broth Ph 2.....	22
2.1.3.10. MRS Broth Ph 3.....	22
2.1.3.11. M17 Agar	22
2.1.3.12. M17 Broth.....	23
2.1.3.13. M17 Broth Ph 9.6.....	23
2.1.3.14. Nutrient Agar	23
2.1.3.15. Salisinli Nutrient Agar	24

İÇİNDEKİLER DİZİNİ(devam)

	<u>Sayfa</u>
2.1.3.16. Nutrient Agar % 7.5 tuz ilaveli	24
2.1.3.17. Nutrient Agar % 10 tuz ilaveli	24
2.1.3.18. Nutrient Broth	24
2.1.3.19. Salisinli Nutrient Broth	24
2.1.3.20. Nutrient Broth % 7.5 tuz ilaveli	25
2.1.3.21. Nutrient Broth % 10 tuz ilaveli	25
2.1.3.22. Sporulasyon besiyeri	25
2.1.3.23. Dekarboksilasyon medyum (Arjinin hidrolizi).....	25
2.1.3.24. Skim Milk Agar	26
2.1.3.25. %10 Sukrozlu MRS Agar	26
2.1.4. Kullanılan Çözeltiler	26
2.1.4.1. Fizyolojik tuzlu su	26
2.1.4.2. % 20 lik gliserollü stok çözelti	26
2.1.4.3. Peptonlu su.....	27
2.1.4.4. α - Naftol çözeltisi	27
2.1.4.5. % 40 lık KOH çözeltisi	27
2.1.4.6. % 1 lik çift kuvvetli safra çözeltisi	27
2.1.4.7. % 2 lik çift kuvvetli safra çözeltisi	27
2.1.4.8. % 3 lük çift kuvvetli safra çözeltisi	28
2.1.4.9. Vancomycin çözeltisi.....	28
2.1.4.10. Rifampicin çözeltisi	28
2.1.4.11. Nalidixic asit çözeltisi.....	28
2.1.4.12. 1N H ₂ SO ₄ çözeltisi	28
2.1.4.13. Amonyum molibdat çözeltisi.....	29
2.1.4.14. Potasyum iyodur çözeltisi	29
2.1.5. APIZYM Test Kitinde Kullanılan Çözeltiler.....	29
2.1.5.1. ZYM A çözeltisi	29

İÇİNDEKİLER DİZİNİ(devam)

	<u>Sayfa</u>
2.1.5.2. ZYM B çözeltisi.....	29
2.1.6. Kullanılan Boyalar.....	30
2.1.6.1. Kristal violet	30
2.1.6.2. Lugol.....	30
2.1.6.3. Safranin.....	30
2.1.6.4. Malaşit yeşili.....	30
2.1.7. Kullanılan Antibiyotikler.....	30
2.2. Yöntem.....	32
2.2.1. Peynir örneklerinin kimyasal özellikleri.....	32
2.2.2. Peynir Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu.....	32
2.2.3. LAB İzolatlarının Tanımlanması.....	33
2.2.3.1. Gram boyama.....	33
2.2.3.2. Spor boyama	33
2.2.3.3. Katalaz testi.....	34
2.2.3.4. Oksidaz testi.....	34
2.2.3.5. LAB izolatlarının stok kültürlerinin saklanması.....	34
2.2.3.6. Ph 9.6 da gelişme	35
2.2.3.7. Glikozdan gaz oluşturma	35
2.2.3.8. Ph 3.9 da gelişme	35
2.2.3.9. Farklı sıcaklıklarda gelişme	36
2.2.3.10. Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme	36
2.2.3.11. Arjinin hidrolizi	36
2.2.4. Suşların Tür / Cins Tayinlerinin API CH50 ve API STREP 20 Test Kitleri İle Yapılması.....	37
2.2.5. Suşların starter olarak kullanım potansiyellerinin belirlenmesi	40
2.2.5.1. Asitleştirme kapasitesi	40
2.2.5.2. Proteolitik aktivite.....	40
2.2.5.3. Diasetil oluşumu	40

İÇİNDEKİLER DİZİNİ(devam)

Sayfa

2.2.5.4. Dekstran üretimi.....	40
2.2.5.5. APIZYM Test Bantlarının Kullanımı İle Enzimatik Aktivitelerin Belirlenmesi	41
2.2.6. Suşların probiyotik olarak kullanım potansiyellerinin belirlenmesi.....	43
2.2.6.1. Safrada canlı kalabilme.....	43
2.2.6.2. Mide asitliğine direnç	44
2.2.6.3. Antibiyotik duyarlılık testi.....	44
2.2.6.4. LAB'nin hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) üretme yetenekleri.....	45
3. BULGULAR.....	46
3.1. Peynir örneklerinin kimyasal özellikleri.....	46
3.2. Kargı Tulum peynirinden Laktik Asit Bakterilerinin izolasyonu.....	46
3.3. Peynirden izole edilen bakterilerin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri	49
3.4. Suşların tür/cins tayinlerinin API CH50 ve API20 Streptest kitleri ile değerlendirilmesi	57
3.5. Suşların starter olarak kullanım potansiyellerinin belirlenmesi	61
3.5.1. Suşların asitleştirme kapasitesi	61
3.5.2. Proteolitik aktivite.....	63
3.5.3. Diasetil oluşumu	63
3.5.4. Dekstran üretimi	64
3.5.5. API ZYM enzim testi.....	66
3.6. Suşların probiyotik olarak kullanım potansiyellerinin belirlenmesi.....	68
3.6.1. 96 suşun safrada canlı kalabilme yetenekleri	68
3.6.2. suşların mide asitliğine direnci	71
3.6.3. Antibiyotik duyarlılık testi.....	74
3.6.4. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) üretime yetenekleri	82

İÇİNDEKİLER DİZİNİ(devam)

	<u>Sayfa</u>
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	84
5. KAYNAKLAR	92
6. EKLER	96
Ek-1.....	96
Ek-2.....	106
Ek-3.....	108

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>		<u>Sayfa</u>
1.1	Laktik asit bakterilerinde homofermentatif ve heterofermentatif metabolizma	4
2.1	API CH50 uygulaması	38
2.2	API 20Strep uygulaması	39
2.3	API ZYM test kitinin uygulanışı	43
3.1	NRRL-B2354 <i>E.faecium</i> standart suşuna ait API 20Strep test kiti sonuçları	59
3.2	NRRL-B442 <i>Lb.rhamnosus</i> standart suşuna ait API CH50 test kiti sonuçları	59
3.3	API ZYM test kitindeki 19 enzim aktivitesi ve bu aktiviteyi gösteren izolat sayıları	67
3.4	NRRL-B442 <i>Lb.rhamnosus</i> standart suşuna ait API ZYM test kiti sonuçları	68
3.5	H ₂ O ₂ standart eğrisi	82

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>		<u>Sayfa</u>
2.1	API ZYM ile aktivitesi belirlenen enzimler ve substratları	42
3.1	Kargı tulum peynir örneklerine ait kimyasal analiz sonuçları	46
3.2	İzolatların elde edildiği örnekler ve izole edildikleri koşullar	48
3.3	96 izolatın elde edildiği peynir örnekleri ve izole edildikleri koşullar	50
3.4	Gram pozitif, katalaz negatif izolatlara uygulanan biyokimyasal ve fizyolojik testler	51
3.5	API test kitleri tayin sonuçları	58
3.6	Tanımlanan türlerin peynir örneklerine göre dağılımı	60
3.7	96 suşun farklı inkübasyon süreleri sonucundaki pH değişimleri	61
3.8	Diasetil oluşumu, dekstran üretimi ve proteolitik aktivite sonuçları	64
3.9	API ZYM test kitinde kullanılan enzimler ve numaraları	67
3.10	Suşların safrada canlı kalabilme yetenekleri	69
3.11	Mide asitliğine direnç	72
3.12	Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları	75
3.13	LAB nin H ₂ O ₂ üretimleri	83

1.GİRİŞ

Peynir yapımının başlangıcı günümüzden 8000 yıl kadar öncesine dayanmaktadır. Dünya genelinde yapısı ve tadı itibariyle farklı 1000'in üzerinde çeşitli peynir türü bulunmaktadır. Peynir içerisindeki karışımlar ve fermentasyon süreci peynirleri birbirinden farklılaştırmaktadır. Peynir, çok geniş bir mikrobiyal ekosistemdir ve bu kompleks mikrobiyotalar peynirlerin çeşitlenmesinde etkilidir. Peynirin olgunlaştırılmasında mikrobiyota önemli bir rol oynar. Peynir üreticileri doğru suşların seçimi ile peynir aromaları geliştirilebilir veya bunu kontrol altında tutabilirler. Bu da peynirlerin tadında ve yapısında değişikliklere neden olmaktadır (Beresford, et al., 2001).

Peynir yapımı bir gıda koruma yöntemidir. Bu işlemle süt proteini ve yağı konsantre edilir ve süt şekleri (laktoz), laktik asit bakterilerince (LAB) laktik aside fermente edilir (Stanley, 1998).

Peynir üretimi ülkemizde oldukça yaygındır ve 160 çeşit yerel peynir yapılmaktadır. Peynirlerin bir kısmı soluk gölgeli, inci beyazı ve tebeşir beyazı renkten olgun sarı renge kadar çeşitli renklerde bulunur. Yapıları kaymak kıvamından başlayıp pütürlü bir yapıya kadar değişir. Üretilen peynirlerin her birinin kendine özgü tadı, kokusu ve lezzeti vardır. Her bölgede, köyde kullanılan yem, iklim ve yükseklik süt veren hayvanlardaki sütün niceliğini ve niteliğini etkiler. Bu da bölgesel peynirlerde belli bir standart peynir bulmayı olanaksız kılar (Swan, 2005). İklim koşullarındaki, coğrafik yapıdaki ve hayvanların beslenmesindeki farklılıklar, peynirler arasında çeşitliliğe neden olmaktadır. Bu farklılıklarla birlikte fermentasyon sürecindeki mikroorganizmalar da çeşitlenmede etkilidir.

Son yıllarda birçok ülkede ürün çeşitliliğini arttırmak, bölge ekonomisine katkıda bulunmak ve ürün güvenliğini geliştirmek için, birçok geleneksel ürünün üretiminin orta ve küçük ölçekli sanayiye aktarılması konusunda çalışmalar yapılmaktadır. Ülkemizde ise, son 20 yılda yöresel peynirlerin çeşitliliği ve lezzetleri, kırsal alanlardan büyük kentlere göç sonucu fark edilmiş ve geniş halk kitleleri tarafından tanınmasına yol açmıştır. Bazı geleneksel peynirlerin (İzmir tulumu, Urfa peyniri) orta ve büyük ölçekli işletmelerde üretimiyle, besin içeriği yüksek olan bu

ürünlerin üretim aşamaları büyük ölçüde standardize edilmiş, güvenliği araştırılmış ve kaliteleri korunmuştur. Ancak halen aile işletmeleri ve evlerde üretilen ve beğenilerek tüketilen peynir çeşitleri bulunmaktadır (Dost ve ark. 2004).

Yöresel olarak üretilen peynirlerin bir bölümü çiğ süt ile sütteki LAB nin fermentasyonu sonucu üretilmektedir. Standardize edilmemiş yöntemlerle üretilen peynirlerin kalitesi her üretimde farklılık gösterebileceği gibi, hijyenik kalitesinin de düşük olması muhtemeldir. Yöresel olarak üretilen bu tür peynirlerin; standartlarının olmayışı, mikrobiyolojik kalite kontrollerinin yapılmayışı ve kısa raf ömrüne sahip olması, ticari olarak farklı bölgelere güvenle pazarlanmasını sınırlanmıştır (Torres-Llanez, 2006).

Pastörize edilmemiş sütle yapılan peynirlerin kendine has lezzet ve aromasından kayıp olmaksızın, pastörize sütle üretimi giderek artan bir ilgi alanıdır. Buna yönelik çalışmaların Türkiye’de üretilen, ticari değeri olan ancak endüstriyel çapta üretilmeyen peynir çeşitlerimiz için de yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Bu amaçla öncelikle uluslar arası pazara sunabileceğimiz aroma ve lezzete sahip, spontan fermantasyonla yapılan geleneksel peynirler incelenip, bunlar arasından daha önce endüstriyel üretimi yapılmamış Çorum-Kargı Tulum Peyniri seçilmiştir.

Kargı Tulum Peyniri’nin yapımında keçi, koyun ve inek sütünden yararlanılır. Yaylalardaki ve dağlardaki kekikle beslenen hayvanlar Mart ayından başlayarak Ağustos ayına kadar sağılır. Sağılan süt kendi sıcaklığında, hiçbir ısıtma işlemine maruz bırakılmadan (incir acı suyu) mayası ile iyotsuz tuz ilave edilerek çöktürülür. Çöktürüldükten sonra bez torbalara basılır. 5 ay süreyle yaylanın rüzgârında olgunlaştırılır. Bu süre içinde her 15 günde bir peynir yoğrulur ve tekrar bez torbaya koyulur. Burada belirli bir olgunluğa ulaştıktan sonra; tuzlanmış, kurutulmuş ve iyice yıkanmış koyun derisinden hazırlanmış tulumlara basılır. Bu tulumlar 2-3 ay yaylada bekletilerek peynirin iyice olgunlaşması sağlanır (Kişisel görüşme,2009).

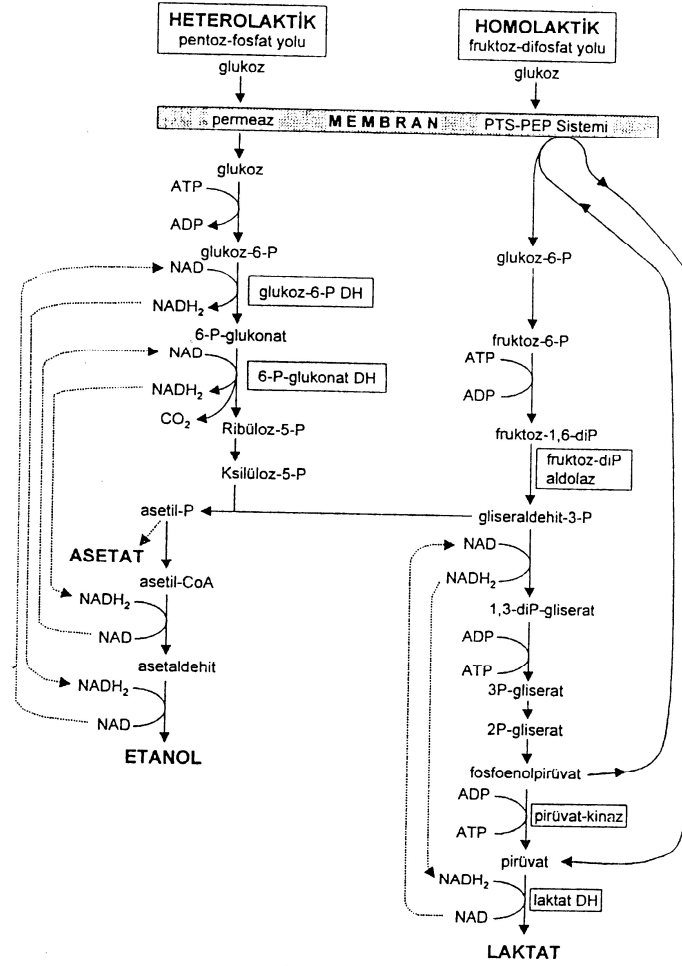
Geleneksel tekniklerle ve çiğ sütün spontan fermantasyonuyla üretilen bu peynirdeki fermentasyon yapan LAB mikroflorası belirlenerek, endüstriyel üretim için ‘starter kültür’ oluşturma çalışmalarına yönelik veri tabanı oluşturulmaya çalışılmıştır. Buna ek olarak, starter kültür oluşturma çalışmalarına diğer bir katkı olarak, peynirden izole edilen LAB nin, endüstriyel özellikleri ve probiyotik olarak kullanım potansiyelleri araştırılmıştır.

1.1. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB) “güvenli bakteriler” olarak kabul edilirler ve koruyucu kültürlerin özelliklerini taşırlar. Gıdalarda sadece gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaları inhibe etmek ve/veya raf ömrünü uzatmak için kullanılan ve gıdanın duyuşal özelliklerinde değişime sebep olmayan antogonistik kültürlerle “koruyucu kültürler” denir (İşleroğlu, et al., 2008).

Laktik asit bakterileri gram pozitif, katalaz negatif ve spor oluşturmayan bakterilerdir. En önemli cinsleri; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weisella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* ve *Bifidobacterium*’ dur. LAB ların gastrointestinal sistemde canlılıklarını sürdürebilme kabiliyetleri bu mikroorganizmaların düşük pH ve/veya safra tuzları ile geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilme yetileriyle ilgilidir. Taksonomik değerlendirilmelerinde önemli fizyolojik özellikler; karbonhidratları fermentasyon biçimleri, farklı tuz konsantrasyonlarına direnç, farklı besin ortamlarında ve sıcaklıklarda gelişebilme özelliği ve antibiyotiklere direnç olarak sıralanabilmektedir (Gürsoy ve Kınık, 2005).

LAB’lar karbonhidrat metabolizmalarına göre; homofermentatif ve heterofermentatif olmak üzere iki temel gruba ayrılırlar. Homofermentatifler sadece laktik asit üretirken, heterofermentatifler laktik asitin yanı sıra CO₂, etanol, asetik asit de üretirler. Burada kullandıkları yol izleri farklıdır. Homofermantatifler glikoliz yolunu kullanırken; heterofermentatifler hegzosmono-fosfat yolunu kullanırlar. Fermentasyon sonucunda D(-)laktat, L(+)laktat ve DL- laktat oluştururlar. Fermentasyonda oluşturulan laktik asit formunun belirlenmesi bakterinin tanımlanmasına yardımcı olur (Tunail, 2009).



Şekil 1.1 Laktik asit bakterilerinde homofermentatif ve heterofermentatif metabolizma(Kılıç, 2001)

Fermentasyon ile peynir üretim sürecinde etkili olan mikroorganizmaları birincil mikrobiyota (starterler) ve ikincil biyota olarak iki ana gruba ayırabiliriz (Beresford, et al., 2001).

Starter biyota peynirin üretimi sırasında asit oluşumundan sorumludur. Starter biyotadaki başlıca türler; birlikte veya tek başına *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* ve *Lactobacillus delbrueckii*' dir.

LAB'ın en önemli özelliği laktozdan laktik asit üretebilmeleridir. Üretilen laktik asit buldukları ortamın pH değerini düşürür. Bu sayede peynirin olgunlaşması sırasında olası patojenlerin gelişimi LAB tarafından inhibe edilir. Laktik asit oluşumu ve bu sayede pH'da düşüş, patojenlerin gelişmesi için uygun olmayan bir durumdur. *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* gibi patojenlerin inhibe edilmesi bakteriyosin üretimiyle ilgilidir (Caridi, 2003).

Peynir çeşidine özgü karışık bakteri kültürleri, maya ve küfler de sekonder biyotayı meydana getirmektedir. Sekonder mikrobiyota starter olmayan laktik asit bakterileri (NSLAB), maya ve küfleri içerir. Çoğu peynirin olgunlaşması sırasında önemli rol oynayan NSLAB'lar mezofilik laktobasiller ve pediokoklardır. Bunlar normal starter biyotaya dahil değildirler, genellikle süt içerisinde iyi gelişim göstermezler ve asit üretimine katkıda bulunmazlar (Rantsiou, et al., 2008).

Probiyotik olarak en çok laktobasil, enterokok ve streptokok bakteri genusları kullanılır.

Laktobasiller doğada karbonhidrat içeren substratların zengin bir şekilde elde edilebileceği ortamlarda bulunurlar. Bundan dolayı da insan ya da hayvanların mukozal membranları (ağız içerisindeki yarık ve boşluklar, barsak sistemi ve vajina) bitkilerin ya da bitkisel materyallerin üzeri, gübreler, lağım pisliği, fermente olan ya da bozulan gıdalar gibi çok geniş bir habitatta bulunabilmektedirler. Çok sayıda bileşiği (sitrat, malat, tartarat, nitrat, nitrit vb.) metabolize edebilirler ve enerji kaynağı ya da elektron akseptörü olarak kullanabilirler. Sitratın LAB tarafından enerji kaynağı olarak kullanılması durumunda asetat, etanol, asetaldehit ve diasetil gibi peynir lezzetine katkıda bulunan bileşikler oluşmaktadır (Gürsoy ve Kınık, 2005).

Laktobasillerin sütü asitleştirme yetenekleri türler arasında farklılık göstermektedir. Asitleştirme kabiliyeti açısından en güçlü suşların *L. rhamnosus*' a ait suşlar olduğu tespit edilmiştir.

Laktobasiller de laktokoklar gibi esterazlar üretebilirler. Birçok peynir çeşidinin mikrobiyotasında baskın laktobasiller fakültatif heterofermentatif *L. casei*, *L. paracasei* ve *L. plantarum*'dur ve bunların lipolitik aktiviteleri zayıftır (Gürsoy ve Kınık, 2005).

Enterokoklar ın en belirgin özelliği birçok antibiyotiğe dirençli olmalarıdır. *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* en çok bilinen türlerdir ve insanlarda patojen olmasına rağmen fermente gıdaların üretimi ve probiyotik ürün teknolojisinde

önemli rollere sahiptirler. Enterokoklar fonksiyonel özelliklerinden yani asitlik, proteoliz ve lipolitik aktiviteleri, sitrat metabolizması, probiyotik özellikleri ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal aktiviteye sahip proteinleri sentezleme yeteneklerinden dolayı fermente gıda endüstrisinde önemli yer tutan laktik asit bakterilerinden birisidir (İşleroğlu, et al,2008). NSLAB olmalarına rağmen sitrat metabolizmalarının sonucu ürettikleri uçucu bileşiklerinden dolayı destek mikroorganizma olarak kullanılmaktadır. Enterokokların sütü asitleştirme kabiliyetleri zayıftır. Süt orijinli enterokoklar üzerine (*E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans*) yapılan çalışmalarda bunu doğrulamıştır. Bu üç türün aynı zamanda LAB'lar arasında en lipolitik türler oldukları tespit edilmiştir. *E. faecium*, enterokok türleri içerisinde en esterolitik türdür. Enterokoklar aşırı proteolitik aktiviteleri nedeniyle diğer LAB'ların gelişimine etki ederler (Gürsoy ve Kınık, 2006; Erdoğan ve Gürses, 2005).

Streptokoklar ile enterokoklar birbirine çok benzemektedir. Bazı türleri insan ve hayvanlarda patojeniktir. Laktik asit ürettikleri için fermente ürünlerin eldesinde kullanılırlar. Üç farklı genus olarak incelenirler. *Lactococcus* türleri mandıra üretiminde kullanılmaktadır. *Streptococcus* genusunun diğer türleri ise kanlı agar üzerinde hemoliz oluşturmalarına bakılarak ayrılmaktadır (Uçar vd., 2008).

1.1.1. LAB tanımlama yöntemleri

Laktik asit bakterilerini tanımlamada, ilk kez tanımlamaları yapıldığı dönemden günümüze kadar fenotipik karakterlere bağlı testler kullanılmıştır. Günümüzde genotipik karakterlerin belirlenmesi ile tanımlamada daha kesin sonuçlar elde edilmektedir.

1.1.1.1. Fenotipik karakterlerin belirlenmesi

Tanımlama yöntemlerinin başında fenotipik karakterlerin belirlenmesi gelmektedir. Bakteri morfolojisinin belirlenmesi, Gram reaksiyonu, farklı ortam koşullarında gelişme, çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal reaksiyonların belirlenmesi, glikozdan CO₂ oluşturma ve arjinin hidroliz yeteneklerinin ve laktik asit konfigürasyonunun belirlenmesi fenotipik karakterlerin başında gelir.

Yeni bulunan genotipik karakterlerin ortaya konmasına dayalı yöntemler ise fenotipik karakterlere dayalı tayinlerin güvenilirliğinin sorgulanmasına neden olmuştur.

Tanımlamayı pratik hale getirmek için yarı otomatik ve otomatik tanımlama sistemleri kullanılmaktadır. Otomatik sistemler hazır test kitleri şeklinde bulunmaktadır. Ticari olarak temin edilen tanımlama kitleri organizmaların bir dizi substratı fermente etmesine veya asimile etmesine dayanır. Örnek olarak API (bioMerieux) (API-50CHL veya API-20 strep) ve BBL CRYSTAL verilebilir. Tanımlama çalışmalarında hazır kitlerin kullanılmasının amacı; mikroorganizmaların tanımlanmasının çabuk ve doğru bir şekilde yapılmasıdır. Bu kitlerin avantajları; birçok biyokimyasal testin bir arada çalışılması, az miktarda malzeme ve örnek kullanımıyla kısa sürede sonuç vermesi, tekrarlanabilir olması ve yüksek doğrulukta sonuç vermesidir. Dezavantajları ise; yoğun hücre kültürü kullanılması, hücre morfolojisinin önceden belirlenmesinin gereği ve pahalı olmasıdır. Bu yöntemler çok yaygın bir tanımlama yöntemi olarak uzun yıllardan beri kullanılmaktadır.

1.1.1.2.Genotipik karakterlerin belirlenmesi

Özellikle son 25 senede DNA bazında tanımlama ve belirleme büyük ölçüde gelişim göstermiştir. Bu yöntemlerin amaçlarından biri mikroorganizmaların çeşitliliğinin büyüme koşullarındaki bağımsızlığıdır. Genotipik yöntemlerin çoğu Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction-PCR) prensibine dayanmaktadır. Bunlar kültüre bağımlı yöntemlerdir. Kompleks ortamların LAB suşlarını tanımlayabilmek için bazı PCR primerlerinin bilinmesi gerekir. Bu uygulamanın dezavantajı sadece olması beklenen mikroorganizmayı belirlemesidir (Temmerman, et al., 2004).

1.2. Probiyotiklerin Tanımı

“Probiyotik” terimi ilk olarak 1954 yılında Ferdinand Vergin tarafından kullanılmıştır. 1989 yılında Roy Fuller tarafından “tüketici sağlığına bireylerin sindirim sisteminin mikrobiyal dengesini koruyarak veya geliştirerek yararlı olan canlı mikrobiyal gıda katkıları” olarak tanımlamıştır (Gürsoy ve Kınık, 2005).

1974 yılında Parker probiyotik kelimesinin tanımını; “intestinal sistemin mikrobiyal dengesine katkıda bulunan madde ve organizmalar” olarak yapmıştır. Böylece bugünkü anlamına en yakın tanımlama yapılmıştır. “Probiyotik” kelimesinin tanımına son şeklini Avrupalı bilim insanları vermiştir. Onlar probiyotikleri; “vücuda alındığında konakçının gastrointestinal mikrobiyotasına olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlamışlardır (Çakır ve Çakmakçı, 2004).

1998 yılında Salminen ve arkadaşları tarafından “insan ve hayvanların sağlığını geliştirmek için tasarlanan gıda, yemler ya da besinsel katkılardaki canlı mikrobiyal preparatlar” olarak değiştirilmiştir (Gürsoy ve Kınık, 2005).

İntestinal ekosistemin fizyolojik dengesi; hastalık, yaşlılık, stres, antibiyotik veya ilaç kullanımı, diyet alışkanlıklarının değiştirilmesi, iklim koşullarında meydana gelen değişimler ve çevresel toksik maddeler gibi faktörlerden direkt veya dolaylı olarak etkilenebilir. İntestinal sistemin dengesinde meydana gelen bu düzensizlikler “disbiosis” olarak adlandırılmaktadır. Faydalı mikroorganizmaların sistemin fizyolojik dengesine olumlu yönde katkıda bulunmasına “probiyosiz”, bu mikroorganizmalara da “probiyotik mikroorganizmalar” denilmektedir. Sağlıklı bir yaşam için sindirim sistemdeki faydalı etki gösteren mikroorganizmaların sayısı yeterli seviyede değilse mutlaka dışarıdan takviye edilmesi gerekmektedir (Çakır ve Çakmakçı, 2004).

Günümüzde yaygın olarak kullanılan probiyotik özellikteki laktobasiller 1915 yılından beri barsak biyotasını düzenlemek ve enfeksiyonları önlemek için kullanılmaktadır (Gürsoy ve Kınık, 2005).

Probiyotik içerikli ürünler özellikle Japonya, Uzakdoğu ülkeleri ve Avrupa Birliği üye ülkelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. ABD’de ise son yıllarda probiyotik ürünlere olan ilgi giderek artış göstermiş olup, sağlıklı gıda tüketimi bilincinin gelişmesi sonucu ortaya çıkan tüketici talebi gıda endüstrisinin probiyotiklere olan ilgisini arttırmıştır (Çakır ve Çakmakçı, 2004).

Ağız yoluyla alınan probiyotiklerin yararlı etki gösterebilmeleri için canlı olarak ve çok sayıda barsak sistemine ulaşmaları gerekir. Bu nedenle kullanılan suşların mide asitliğine ve safra tuzlarına karşı dirençli olması gerekir. Bununla birlikte bir diğer önemli kriter de patojenlerle mücadelede bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri antimikrobiyal bileşiklerin üretimidir (Çakır ve Çakmakçı, 2004). Ayrıca; probiyotik bakteriler lizozim gibi ağız boşluğunda bulunan enzimlere karşı dirençli olmalıdır.

Probiyotikler mide ve barsaklarda sindirim süresince zarar görmemeli, canlılıklarını sürdürebilmelidirler (Chou and Weimer, 1999).

Probiyotikler barsakta B vitaminlerini, β - galaktozidazı ve antimikrobiyal bileşikleri salgıladıklarından çok yönlü etkiye sahiptirler. β - galaktozidaz enzimi sütteki laktozu metabolize edemeyen (laktoz-intolerant) insanların laktoz sindirimini olanaklı kılar (Tunail, 2009).

Farklı cinslere ait birçok mikroorganizma probiyotik olarak kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılanlar ise, enterokoklar, laktobasiller ve bifidobakterilerdir (Tok ve Aslım, 2007).

1.2.1. Probiyotiklerin etki mekanizmaları

1. İnhibe edici madde üretirler: Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizmalar üzerine etkili birçok madde üretmektedirler. Bunlardan bazıları organik asitler, yağ asitleri, hidrojen peroksit, bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddelerdir.
2. Tutunma bölgelerini bloke ederler: Tutunma bölgeleri için patojenlerle rekabete girerek sindirim sistemde yerleşmelerini engellemektedirler.
3. Besin maddeleri için rekabet ederler: Patojenler için de gerekli olan besin maddelerini tüketerek, onların sistemde uzun süre kalmasını engellemektedirler.
4. Toksin reseptörlerini yıkıma uğrattırılar.
5. Bağışıklık sistemini güçlendirirler (Çakır ve Çakmakçı, 2004).

1.2.2. Probiyotik bakterilerin bazı metabolik özellikleri

Probiyotik bakteriler tarafından üretilen çeşitli metabolitler (diasetil, asetaldehit, peptitler, aminoasitler ve parçalanma ürünleri, ekzopolisakkaritler) gıdalara özgün aroma kazandırır ve gıdaların güvenle tüketilmelerine katkı sağlar.

1.2.2.1. Sitrat metabolizması

Sitrik asit veya sitratları fermente etme yeteneğinde olan LAB sütteki sitratin tamamını kullanabilmektedirler. Tereyağı dışında olgun peynirlerde gözenek ve tat oluşumunda ve fermente süt içeceklerinde CO₂, asetat, asetaldehit ve diasetilin oluşumunda sitratlar etkindir. Sitrat metabolizması sonucu ortaya çıkan ürünler kontaminant mikrobiyota üzerinde inhibitör etki göstermektedir. Diasetil ve asetaldehit sitrat metabolizmasının son ürünleridir ve LAB tarafından oluşturulan asıl aroma bileşikleridir. Bu bileşikler endüstriyel üretimde starter seçimi ve fermentasyon koşulları ile kontrol edilebilir (Bozoğlu ve Ray; 1996, Kılıç, 2001).

1.2.2.2. Proteolitik aktivite

Süt proteinleri vücut tarafından sentezlenmeyen aminoasitleri içerir. Proteolitik türler, proteolitik aktivitesi sınırlı olan türlerin gelişmesi üzerinde teşvik edicidir. Asit oluşturan türlerin proteolitik aktiviteleri peynirin olgunlaşmasında önemlidir. Bunlar peynirin olgunlaşmasını hızlandırabilir. Bu nedenle kuvvetli ve daha zayıf proteolitik türlerin kombine edilmiş kültürleri birlikte kullanılır. Peynirde proteoliz sonucu oluşan peptitler, aminoasitler ile bunların parçalanma ürünleri tat ve kokunun oluşmasında en büyük etkindir. LAB ların proteolitik ve peptolitik aktivitesi peynirin tadına ve kıvamına katkıda bulunur (Bozoğlu ve Ray, 2006; Kılıç, 2001).

1.2.2.3. Safra ve safra tuzlarına direnç

Sindirim esnasında besinlerin mideden uzaklaştırılması 90 dakika kadar sürer ve mide pH değeri 2'ye kadar düşer. Bu nedenle probiyotik olarak kullanılacak bakteriler 90 dakika boyunca asite ve safra asitlerine karşı toleranslı olmalıdır, faydalı etki göstermeden önce; alt sindirim borusunda gelişebilmeli ve epitelyuma tutunabilmelidir. Sindirimin ilk saatinde midedeki safra konsantrasyonu % 1,5' dan % 2' ye çıkar, daha sonra bu safra konsantrasyonu % 0,3' e kadar düşer. Safra tuzları membran lipid yapısını bozar, bu yüzden mikroorganizmalar için bu yüksek safra tuzu konsantrasyonunda yaşamak zordur. Sindirim sisteminin yerel biyotası; safra tuzlarının

bu toksik etkisinden kendilerini korumak için stratejiler geliştirmek zorunda kalmış olmalarına rağmen, bu bakterilerin direnç mekanizmaları hala anlaşılammıştır (Chou and Weimer, 1999; Tsuda, et al., 2007)

1.2.2.4. Bakteriyosin üretimi

Metabolik yan ürünler, antibiyotik benzeri maddeler ve bakterisidal peptid yapısında olan ve özellikle son yıllarda oldukça fazla çalışılan bakteriyosinler LAB tarafından üretilen antagonistik maddelerdir. Bu bakteriyosinler gıda bozulmasını önlemekte ve gıdalarda üreyebilen patojen bakterilerin kontrolünü sağlamaktadır. Bu nedenle; gıda koruyucu maddesi olarak kullanım potansiyeline sahiptirler. *Lactococcus lactis subsp. lactis*' in bazı suşları tarafından üretilen nisinin çoğu ülkede üretilen fermente süt ve ürünlerinden bazılarında mikrobiyal koruyucu olarak kullanılması uygun bulunmuştur. Bunun dışında *Pediococcus acidilactici* tarafından üretilen pediocin PA-1 de gıda koruyucusu olarak pratikte kullanılmaktadır. LAB tarafından üretilen çoğu bakteriyosin sınırlı antibakteriyal spektruma sahiptir (Osmanoğlu ve Beyatlı, 2002).

Nisin, alfa-kimotripsin tarafından inaktive edilir ancak pronaza, tripsine ve asidik koşullara karşı dirençlidir. Gram-pozitif patojenlere karşı etkilidir ve *Clostridium* ve *Bacillus* sporlarının gelişmesini önler. İlk olarak peynir üretiminde kullanılmasından beri pek çok yiyecek ve içecek uygulamada tanımlanmıştır. Peynir üretiminde spor oluşturan organizmaların inhibe edilmesinde, konserve gıdalarda, pastörize sütlerin raf ömrünün uzatılmasında bira yapımında LAB ların kontrolünde kullanımı örnek olarak verilebilir. LAB tarafından üretilen bakteriyosinlere örnek olarak *Lactobacillus sake* tarafından üretilen ve pediosine çok benzeyen sakacin verilebilir (Osmanoğlu ve Beyatlı, 2002).

1.2.2.5 Ekzopolisakkarit (EPS) üretimi

Polisakkaritler, bakterilerin çoğalmaları sırasında sentezlenir. Ekzopolisakkaritlerin çoğu LAB tarafından üretilebilir ve hücre dışına salgılanırlar. Mikroorganizmalar tarafından katabolize edilmedikleri için enerji kaynağı olarak

kullanılamazlar ancak buldukları ortamda koruyucu görevindedirler. Hücrenin yüzeye tutunmasına, koloni oluşturmaya yardımcı olurlar ve mikroorganizmayı ve ortamı kurumaya karşı korurlar. Ekzopolisakkaritler; vizkoziteyi artırıcı, yapıyı düzenleyici, su bağlayıcı, stabilize ve emülsifiye edici gibi özellikleri nedeni ile süt ürünlerinin yapısal özelliklerini olumlu yönde değiştirmektedirler (Milci ve Yaygın, 2005).

1.2.3. Probiyotiklerin yararlı etkileri

Probiyotik mikroorganizmaların sağlık üzerine faydalı birçok etkisi belirlenmiştir.

- Yüksek kolesterol seviyesini azaltılması
- Laktoz intoleransının hafifletilmesi
- Barsak biyotası üzerine olumlu etki
- Sindirim sistemi enfeksiyonlarının engellenmesi
- İmmün sistemin güçlenmesi
- İltihabi veya alerjik reaksiyonların azaltılması
- Kolon kanseri riskinin azaltılması
- Ürogenital enfeksiyonlar
- *Helicobacter pylori* enfeksiyonu
- Ağır metallerin ve mikotoksinlerin giderilmesi (Tok ve Aslım, 2007)

1.2.3.1. Kolesterolün düşürülmesi

Kolesterol bütün hücre zarlarının bir bileşenidir, safra tuzları, steroid hormonlar ve D vitamininin öncül maddesidir. Kolesterol H₂O ve CO₂'ye metabolize edilemez ve enerji elde etmede kullanılamaz. Kolesterol yıkımının büyük bir kısmı karaciğerdeki safra asidi senteziyle olur ve safra içinde uzaklaştırılır. Safra tuzları, kolesterol atımını, kolesterolün metabolik bir ürünü olarak ve kolesterolün safraya atılımı için gerekli esas çözücü olarak işlev görmek suretiyle sağlarlar. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerini içeren probiyotik ürünlerin kandaki yüksek kolesterol seviyelerini azalttığı

görülmüştür. Laktobasiller iki şekilde etki gösterirler. Diyetle alınan kolesterolün barsaklardan emilimini arttırarak ve safra tuzlarının dekonjugasyonunda rol oynayarak etki ederler. Bu etkilerine ilave olarak antioksidatif etki göstererek kolestrolü düşürürler (Göktepe, et al., 2005; Tok ve Aslım, 2007).

1.2.3.2. Laktoz intoleransının azaltılması

Laktoz önemli bir enerji kaynağıdır. Gastrointestinal işlevi motive eder ve barsaklardaki istenmeyen mikroorganizmaları inhibe ederek barsak biyotasını geliştirici etki yapar. Ayrıca kalsiyum ve fosforun emilimini kolaylaştırır. Laktoz bazı kişiler tarafından absorbe edilemez ve buna bağlı olarak da zararlı etkiler ortaya çıkar. Probiyotik bakteriler tarafından üretilen β - galaktozidaz enzimi sütteki laktozu metabolize edemeyen (laktoz-intolerans) insanların laktoz sindirimini olanaklı kılar (Kılıç 2001; Tunail, 2009).

Laktoz intoleransı olanlarda sindirime uğramayan laktoz barsak lümeninde kalır ve kolona ulaşır. Laktoz kolonda bakteriyel fermentasyona uğramasıyla kısa zincirli yağ asitleri (laktat, butirat, asetat, propionat) oluşur. Lümeninde osmotik basınç artışı ile su ve elektrolit artar, diyare olur (Özden, 2006).

1.2.3.3. Barsak biyotası ve enfeksiyonlara etkisi

Probiyotikler barsak epiteline tutunarak dayanıklı bir canlı tabaka oluştururlar. Probiyotiklerin bu özellikleri mide ve barsak rahatsızlıklarına karşı koyucu ve tedavi edici bir ürün olarak kullanılmasını sağlamaktadır. Biyofilm veya benzeri bir tabaka oluşturarak kolonize olurlar ve bu sayede peristaltik barsak hareketlerine karşı koyabilirler. Böylece bağırsağa yerleşen istenmeyen bakterileri ve patojenleri inhibe ederler. Bu sayede hem sindirim sistemi biyotası korunmuş olur hem de enfeksiyonlara karşı koruma sağlanmış olur (Kılıç, 2001).

Lactobacillus acidophilus kültürlerinin antibiyotik veya radyasyonla tedavi sonrasında bozulan barsak mikrobiyotasının yeniden düzenlenmesinde kullanılabileceği tespit edilmiştir. Barsak hastalıklarının birçoğunda *Lb. acidophilus* içeren sütle beslenen hastaların dışkılarında laktobasillerin yüksek oranda arttığı koliform sayısının

ise düştüğü belirlenmiştir. *Lb. acidophilus*'lu fermente sütler mide, barsak iltihabı, diyare, çeşitli deri enfeksiyonları ile ağızda yara, aft, uçuk tedavisinde kullanılmıştır. *Lb. acidophilus*'un barsak patojenlerine karşı sahip olduğu antibakteriyel etki, üretmiş olduğu laktik asit, hidrojen peroksit ve değişik bakteriyosinlerden ileri gelmektedir (Özden, 2006).

1.2.3.4. İmmün yanıtın güçlenmesi

Probiyotikler bağışıklık yanıtını güçlendirerek enfeksiyonlarla mücadeleye katkıda bulunurlar. Makrofajların aktivasyonunu arttıırlar, IgA üretimini arttıırlar ve antikorların üretimini kolaylaştırarak bağışıklık sistemini uyarırlar (Göktepe, et al., 2005 ; Özden, 2006).

Probiyotik bakterilerden *Lb.johnsonii*' nin vücudun savunma hücrelerini uyararak doğal aktivitelerinin yükseldiği kanıtlanmıştır. Bu bakteriyi içeren fermente süt ürünlerinin 3 hafta boyunca tüketilmesinden sonra vücudun savunma hücrelerinin yabancı cisimleri inaktive etme oranının % 20 arttığı görülmüştür (Kılıç, 2001).

1.2.3.5. İltihabi veya alerjik reaksiyonların azaltılması

Bağışıklık sisteminin iç dengesini onararak ve sitokin sentezini düzenleyerek alerjik reaksiyonları ve iltihaplanmaları azaltır (Göktepe, et al., 2005).

1.2.3.6. Kolon kanseri riskinin azaltılması

Gıdaları işlemede kullanılan nitritlerin barsak sisteminde kanserojen nitrozaminlere dönüştüğü, bazı probiyotik bakterilerin ise bu bileşiklerin sentezini enzimatik yolla yavaşlattığı belirtilmiştir. *Lb. acidophilus* suşlarından bazılarının nitrit kullandığı ve bunun barsak kanseri riskini azalttığı belirlenmiştir. Kolon kanserinde fermente süt ürünlerinin tüketimine bağlı olarak azalmalar görülmüştür. Bu azalmaya immun sistemin güçlenmesi, barsakta fekal bakteriler tarafından sentezlenen beta-glukuronidaz gibi enzimlerin miktarındaki düşmeler ile kanserojen maddelerin parçalanarak absorbe edilmesi neden olmaktadır.

Metabolizmada bulunan bakterilerin ürettiği fekal enzimler prokanserojenlerin kanserojen maddelere dönüşmesini sağlamaktadır. Bu yüzden bu enzimler mukoza kanserinin teşhisinde kullanılmaktadır. Barsak bakterileri ise fekal enzimlerin aktivitelerini önleyerek kanserojen maddelerin oluşumunu geciktirmektedir (Kılıç, 2001).

1.2.3.7. Ürogenital enfeksiyonlara karşı savunma

İdrar yolları enfeksiyonlarında *Lactobacillus* türlerinin etkisi gözlemlenmiştir. Bakteriyal enfeksiyon sırasında vajinal mikrobiyota değişir. Vajinada *Lb. acidophilus* mekanizması gelişerek asidik pH korunur. Epitelyumu kaplayan laktobasiller bu patojenlerin reseptörlere ulaşmasını engeller ve böylece idrar yollarına ait normal biyota patojenlere karşı korunuş olur (Kılıç, 2001).

1.2.3.8. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu üzerine etkileri

Helicobacter pylori'nin ortadan kaldırılmasında ideal bir ilaç olmadığından ve antibiyotiklere direnç kazanılması nedeniyle problemler yaşanmaktadır. Probiyotikler günümüzde tek başına *H. pylori*'yi yok edememektedir. Ancak probiyotikler (*Lactobacillus* GG) bu amaçla kullanılan antibiyotiklerin yan etkilerini azaltmaktadır. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi probiyotikler açığa çıkardıkları antimikrobiyal bakteriosinler veya organik asitler ile in vitro *H.pylori*'nin üremesini inhibe etmektedirler. Probiyotikler mide bariyerini güçlendirdikleri gibi mukozal inflamasyonu da azaltmaktadırlar (Özden, 2006).

1.2.3.9. Diğer hastalıklar üzerine etkiler

Probiyotik bakterilerden *Bifidobacterium* türlerinin karaciğer hastalığına karşı olumlu etkisi olduğu belirtilmiştir. Sindirim sistemindeki amonyak, fenoller, indol ve aktif aminler karaciğer tarafından ayrıştırıldıktan sonra idrara karışır. Organizmada amonyak oluşumunun önemli bir bölümü barsaklarda meydana gelir. Ancak düşük pH'da barsaklardaki amonyak absorbe edilemeyen amonyum halinde bulunur.

Karaciğer sirozu olan bir grup hastaya tedavi amacıyla bifiduslu süt verilmiş ve uygulama sonunda hastaların kanlarında amonyak ve fenol miktarının başlangıçtakine göre düştüğü gözlemlenmiştir (Kılıç, 2001).

1.2.3.10. Ağır metallerin ve mikotoksinlerin giderilmesi

Ağır metal iyonları; gıdanın yapısında doğal olarak bulunmayan, çevreden gıdaların üretimi sırasında kullanılan metalik alet-ekipmanlardan, depolama ve dağıtım sırasında kullanılan ambalaj materyallerinden gıdalara bulaşmaktadır. Gıdalarda kirliliğe neden olan ağır metal iyonlarının başlıcaları; civa, kadmiyum, nikel, kurşun, arsenik ve çinkodur. Ağır metal iyonlarına adhezyon ile tutunur ve agregat oluşturarak çökerler. Bu şekilde LAB ların ağır metal iyonlarını sudan hızla uzaklaştırabildiği görülmüştür (Vural,1993).

Mikotoksinler küfler tarafından üretilen sekonder metabolizma ürünleridir. Gıda ve yemlerin tüketilmesiyle veya üretimin herhangi bir aşamasında toksinli materyalin üretime girmesiyle bulaşır. LAB, küf gelişimini inhibe ederek mikotoksinlerin oluşumunu önleyebilir veya ortamda bulunan mikotoksinleri bağlayarak ortamdan uzaklaştırır.

Ağır metallerin ve mikotoksinlerin giderilmesinde farklı LAB suşlarının kombinasyonu kullanılmaktadır (Halttunen, et al., 2006; 2007).

1.2.4. Gıda ve peynir teknolojisinde probiyotikler

En popüler probiyotik içeren gıdalar yoğurt ve fermente süt gibi taze fermente olmuş ürünler ya da yeterli sayıda canlı probiyotik kültür ilave edilmiş fermente olmamış ürünlerdir (Gürsoy ve Kımık, 2005).

Fermente süt ürünleri çok çeşitlidir; tat, lezzet, koku, kıvam, yapı ve görünüşleri çok farklı olan bu ürünlerin üretimine ve olgunlaştırılmasına birçok gruba dahil pek çok organizma katılır. Ancak hemen hepsinde laktik asit gelişimini sağlamak üzere öncelikle homofermantatif laktik asit bakterilerinin birincil mikrobiyota olarak mutlak katılması gerekir. Bu amaçla en fazla kullanılan bakteriler asit geliştiriciler (starterler) olarak bilinen *Lactococcus* cinsinden; *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris*

suşları ile *Lactobacillus* lardan; *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *helveticus*, *L. acidophilus* ve *Streptococcus* lardan *S. salivarius* subsp. *thermophilus* tur. Bu bakteriler süt ürününün çeşidine göre seçilip, sütün laktozunu fermente etmeleri ve hızlı bir şekilde laktik asit geliştirmeleri amacıyla pastörize süte veya kremaya katılır (Tunail, 2009).

Laktik asit bakteri kültürleri laktik asit gelişimini başlattıkları için starter olarak adlandırılmıştır. Starterlerin bir kısmı mezofilik, bir kısmı da termofiliktir. En fazla kullanılan starterler mezofilik kültürlerdir. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *helveticus*, *L. acidophilus* homofermantatif termofilik starter bakterilerdir. Bu bakteriler; yoğurt ve pıhtısına ısı işlem uygulanarak yapılan peynirlerin kültürlerini oluştururlar. Mezofilik kültürlerin optimum gelişimleri için 25-30 °C sıcaklık yeterli olurken, termofiller için optimum gelişme sıcaklığı 37-43 °C dir (Tunail, 2009).

Fermente süt ürünlerinden bazılarında tereyağı elde etmek için krema ekşitilmesinde ve ticari buttermilk (yayıkaltı, aromatize) süt içeceği gibi ürünlerde aroma maddesi olarak, diasetil geliştirici mikrobiyotaya ihtiyaç duyulur (Tunail, 2009).

Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*'inde bulunduğu laktobasillerin bir çoğu peynir üretiminde kültür ya da destek kültür olarak kullanılmaktadır (Gürsoy ve Kınık, 2005).

Destek kültürler (ikincil biyota); çoğunlukla laktobasillerden oluşan, peynirde lezzet oluşumunu hızlandırmak ve peynir lezzetini arttırmak amacıyla standart mezofilik starterlere ilave olarak kullanılan ve genellikle ilgili peynirin starter olmayan mikrobiyotasında da bulunabilen mikroorganizmalardır. Peynir lezzeti üzerine etkili bileşiklerin önemli bir bölümü starter bakterilerin etkileriyle oluşmaktadır. Starterlerin erken lizisi, hücre içi enzimlerin substratlara daha kolay ulaşmasını sağlamak ve bu durum peynir lezzetinin gelişimini hızlandırabilmektedir (Gürsoy ve Kınık, 2005).

Asit geliştirici starterler peynir yapımında kullanılan ikincil mikrobiyotaya uygun koşullar hazırlar. Aroma geliştiricilere uygun ortam hazırlayarak dolaylı katkıda bulunurlar ve kontaminantları sınırlayarak olumsuz lezzet gelişimlerinden ürünü korurlar. Birincil ve ikincil mikrobiyota peynirde pH'a bağlı olarak yapı, tekstür ve

lezzet oluşturur. Fermente ürünlerde ise pH; kıvam, aroma ve bazı ürünlerde CO₂ oluşumu üzerinde belirleyici role sahiptir (Tunail, 2009).

Laktik asit bakterileri starter olarak et ve et ürünleri yapımına da hizmet ederler. Fermentasyonla olgunlaştırılan sucuk ve salamlarda ürünün olgunlaşmasını kolaylaştırır, dayanıklı ve güvenli hale gelmesini sağlar. Turşuların yapımında, bazı ekmek hamurlarının yapımında ve şarap yapımında alkolik fermentasyon tamamlandıktan sonra malolaktik fermentasyonda kullanılırlar (Tunail, 2009).

2. MATERYAL VE METOD

2.1. MATERYAL

2.1.1. Peynir örnekleri

Çalışmada kullanılan peynir örnekleri Çorum'un Kargı ilçesinde yöresel olarak üretilmektedir. Bu peynirler üretim sonrası belirli olgunluğa ulaştıktan sonra temin edilmiş ve +4°C de laboratuvarımıza getirilmiştir. Çalışma süresince +4°C de muhafaza edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan standart kültürler

Standart kültürler iki kaynaktan temin edilmiştir. Bunlar NRRL ARS Culture Collection (Northern Regional Research Laboratory), Microbial Genomics & Bioprocessing Research, U.S.A. ve Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir.

NRRL-B1951	<i>Lactobacillus plantarum</i>
NRRL-B4496	<i>Lactobacillus plantarum</i>
NRRL-B1837	<i>Lactobacillus plantarum</i>
NRRL-B442	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
NRRL-B548	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
NRRL-B633	<i>Lactobacillus brevis</i>
NRRL-B1840	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
NRRL-B1118	<i>Enterococcus durans</i>
NRRL-B2354	<i>Enterococcus faecium</i>
Anadolu Üniv. Fen Fak.	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
Anadolu Üniv. Fen Fak.	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>

2.1.3. Kullanılan besi yerleri

2.1.3.1. MRS Agar (Lactobacillus Broth acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE) (MERCK)

	g/L
Kazein peptonu	10
Et ekstraktı	10
Maya ekstraktı	4
D(+) glukoz	20
K ₂ HPO ₄	2
Tween 80	1
Di- Amonyum hidrojen sitrat	2
Sodyum asetat	5
MgSO ₄	0,20
MnSO ₄	0,04
Agar-agar	14

Litrede 68,20 gram (g) olacak şekilde saf suda ısıtılarak eritilmiştir. pH'ı 5,2 ± 0,2 olmalıdır. Otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.3.2. MRS Broth (MERCK)

	g/L
Kazein peptonu	10
Et ekstraktı	8
Maya ekstraktı	4
D(+) glukoz	20
K ₂ HPO ₄	2
Tween 80	1
Di - Amonyum hidrojen sitrat	2
Sodyum asetat	5
MgSO ₄	0,20
MnSO ₄	0,04

Litrede 52,20 g olacak şekilde saf suda eritilmiştir. pH'ı $5,7 \pm 0,2$ olmalıdır. Vidalı tüplere 5'er mililitre (ml) dağıtılmış ve otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.3.3. MRS Broth çift kuvvetli

İçeriği 2.1.3.2' de verilen besiyeri birim hacim başına 2 misli tartılarak hazırlanmıştır. Otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.3.4. MRS Broth pH 3,9

İçeriği verilmiş olan MRS broth ortamı saf suda eritilmiş, 1M HCL ile pH'ı 3,9'a ayarlanmıştır. Vidalı tüplere 5'er ml dağıtılmış ve otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.3.5. % 2 tuz ilaveli MRS Broth

İçeriği verilmiş olan MRS broth ortamına 20 g/L sodyum klorür(NaCl) ilave edilmiş ve saf suda eritilmiştir. Vidalı tüplere 5'er ml dağıtılmış ve otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.3.6. % 4 tuz ilaveli MRS Broth

İçeriği verilmiş olan MRS broth ortamına 40 g/L NaCl ilave edilmiş ve saf suda eritilmiştir. Vidalı tüplere 5'er ml dağıtılmış ve otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.3.7. % 6,5 tuz ilaveli MRS Broth

İçeriği verilmiş olan MRS broth ortamına 65 g/L NaCl ilave edilmiş ve saf suda eritilmiştir. Vidalı tüplere 5'er ml dağıtılmış ve otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.3.8. MRS Broth pH 1.0

İçeriği verilmiş olan MRS broth ortamı saf suda eritildikten sonra derişik HCL kullanılarak pH'ı 1.0' a ayarlanmıştır. Sonra otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.3.9. MRS Broth pH 2.0

İçeriği verilmiş olan MRS broth ortamı saf suda eritildikten sonra derişik HCL kullanılarak pH'ı 2.0' a ayarlanmıştır. Sonra otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.3.10. MRS Broth pH 3.0

İçeriği verilmiş olan MRS broth ortamı saf suda eritildikten sonra derişik HCL kullanılarak pH'ı 3.0' a ayarlanmıştır. Sonra otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.3.11. M17 Agar acc. to Terzaghi (MERCK)

	g/L
Soya peptonu	5
Et peptonu	2,50
Kazein peptonu	2,50
Maya ekstraktı	5
D(+) laktoz	5
Askorbik asit	0,50
Na- B- gliserofofat	19
Magnezyum sülfat	0,25
Agar-agar	12,75

Litrede 55 g olacak şekilde saf suda ısıtılarak eritilmiş, pH'ı $7,2 \pm 0,2$ olmalıdır. 121°C de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

2.1.3.12. M17 Broth acc. To Terzaghi (MERCK)

	g/L
Soya peptonu	5
Et peptonu	2,50
Kazein peptonu	2,50
Maya ekstraktı	2,50
Et ekstraktı	5
Laktoz monohidrat	5
Askorbik asit	0,50
Sodyum-B- gliserofosfat	19
Magnezyum sülfat	0,25

Litrede 42,50 g olacak şekilde saf su içinde eritilmiş, pH'ı $7,2 \pm 0,2$ olmalıdır. Vidalı tüplere 5'er ml dağıtılmış ve otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.3.13. M17 Broth pH 9,6

İçeriği 2.1.3.12' de verilmiş olan M17 broth besiyeri saf suda eritilip 1M NaOH ile pH'ı 9,6'a ayarlanmıştır. Vidalı tüplere 5'er ml dağıtılmış ve otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.3.14. Nutrient Agar (MERCK)

	g/L
Etten pepton	5
Et ekstraktı	3
Agar-agar	12

Litrede 20 g olacak şekilde saf suda ısıtılarak eritilmiştir. pH'ı $7 \pm 0,2$ olmalıdır. Otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.3.15. Salisinli Nutrient Agar

İçeriği 2.1.3.14' de verilmiş olan Nutrient agar ortamı saf suda eritilmiş, otoklavda 121°C de 15 dakika steril edildikten sonra % 0,50 (w/v) salisin filtre ile steril edilerek ortama ilave edilmiştir.

2.1.3.16. % 7, 50 tuz ilaveli Nutrient Agar

Yukarıda verilmiş olan Nutrient agar ortamına 75 g/L NaCl ilave edilmiştir. Saf suda ısıtılarak eritilmiş ve otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.3.17. % 10 tuz ilaveli Nutrient Agar

Yukarıda içeriği verilmiş olan Nutrient agar ortamına 100 g/L NaCl ilave edilmiştir. Saf suda ısıtılarak eritilmiş ve otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.3.18. Nutrient Broth (MERCCK)

	g/L
Etten pepton	0,50
Et ekstraktı	3

Besiyeri içeriği litrede 8 g olacak şekilde saf suda çözülmüştür. pH'ı $7 \pm 0,2$ olmalıdır. Vidalı tüplere 5'er ml dağıtılmış ve otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.3.19. Salisinli Nutrient Broth

Yukarıda içeriği verilmiş olan Nutrient broth ortamı saf suda eritilip otoklavda 121°C de 15 dakika steril edildikten sonra, % 0,5 salisin filtre ile steril edilerek ortama ilave edilmiştir. Otoklavda 121°C de 15 dakikada önceden steril edilmiş vidalı tüplere 5'er ml dağıtılmıştır.

2.1.3.20. % 7,50 tuz ilaveli Nutrient Broth

Yukarıda verilmiş olan Nutrient broth ortamına 75 g/L NaCl ilave edilmiştir. Saf suda ısıtılarak eritilmiştir. Vidalı tüplere 5'er ml dağıtıldıktan sonra otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.3.21. % 10 tuz ilaveli Nutrient Broth

Yukarıda verilmiş olan Nutrient broth ortamına 100 g/L NaCl ilave edilmiştir. Saf suda ısıtılarak eritilmiştir. Vidalı tüplere 5'er ml dağıtılmış ve otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir

2.1.3.22. Sporulasyon besiyeri

	g/L
Nutrient agar	20
MnSO ₄	0,04
CaCl ₂	0,10

Nutrient agar içerisine verilen oranlarda ilave edilmiştir. Otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra 15'er ml steril petrilere dağıtılmıştır.

2.1.3.23. Dekarboksilaz Ortamı (Arjinin hidrolizi)

	g/L
Pepton	5
Maya ekstraktı	3
Dekstroz	1
Bromkresol moru	0,02
L- aminoasit	5
Veya D-L aminoasit	10

Besiyeri verilen oranlarda saf su içinde hazırlanmıştır. Vidalı tüplere 5'er ml dağıtıldıktan sonra otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.3.24. Skim Milk Agar

Skim milk	% 10 (w/v)
Agar-agar	% 2 (w/v)

Besiyeri içeriği saf suda eritilmiştir. Otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir. 45-50°C'ye soğuduktan sonra 15'er ml steril petrilere dağıtılmıştır.

2.1.3.25. % 10 Sükroz ilaveli MRS Agar

İçeriği verilmiş MRS agara 100 g/L sükroz ilave edilmiştir. Otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir. 45-50°C'ye soğuduktan sonra 15'er ml steril petrilere dağıtılmıştır.

2.1.4. Kullanılan çözeltiler

2.1.4.1. Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

Litreye 8,50 g NaCl ilave edilip saf su da eritilmiştir. Vidalı tüplere 4,50'şer ml olacak şekilde dağıtılmış ve otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.4.2. % 20'lik gliserollü stok çözelti

Besiyeri içerisine litreye 250 ml gliserol ilave edilmiş ve otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.4.3. Peptonlu Su

	g/L
Pepton	10
Sodyum klorid	5
Disodyum fosfat	3,50
Monopotasyum fosfat	1,50

Litrede 20 g olacak şekilde saf suda çözülmüş ve pH'ı $7 \pm 0,1$ olmalıdır. Otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.4.4. α – Naftol çözeltisi

5 g α – Naftol 100 ml % 95'lik etil alkol içerisinde çözdürülerek hazırlanmıştır.

2.1.4.5.% 40'lık KOH çözeltisi

40 g potasyum hidroksit (KOH) yaklaşık 50 ml saf su içinde çözdürülmüş sonra saf su ile 100 ml' ye tamamlanmıştır.

2.1.4.6. % 1'lik safra tuzu çözeltisi çift kuvvetli

Litrede 20 g olacak şekilde safra tuzu (Fluka) tartılmış ve üzerine saf su ilave edilmiştir. Eritildikten sonra otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.4.7. % 2'lik safra tuzu çözeltisi çift kuvvetli

Litrede 40 g olacak şekilde safra tuzu tartılmış ve üzerine saf su ilave edilmiştir. Eritildikten sonra otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.4.8. % 3'lik safra çözeltisi çift kuvvetli

Litrede 60 g olacak şekilde safra tuzu tartılmış ve üzerine saf su ilave edilmiştir. Eritildikten sonra otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.4.9. Vancomycin çözeltisi

5 mm çaplı (Whatman No 42) disklere 30 µg/disk olacak şekilde 0,60 mg/ml vancomycin tartılmış ve saf suda çözülmüştür. Tek kullanımlık filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

2.1.4.10. Rifampicin çözeltisi

5 mm çaplı (Whatman No 42) disklere 5 µg/disk olacak şekilde 0,01 mg/ml rifampicin tartılarak saf suda çözülmüştür. Tek kullanımlık filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

2.1.4.11. Nalidixic asit çözeltisi

5 mm çaplı (Whatman No 42) disklere 5 µg/disk olacak şekilde k şekilde 0,60 mg/ml tartılarak saf suda çözülmüştür. Tek kullanımlık filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

2.1.4.12. 1N H₂SO₄ çözeltisi

Sülfürik asit	1,67 ml
Saf su	100 ml

Saf sülfürik asit saf suya ilave edilerek 1N çözelti hazırlanmıştır.

2.1.4.13. Amonyum molibdat çözeltisi

Amonyum molibdat	0,12 g
Saf su	100 ml

Amonyum molibdat tartılıp 100 ml safsu içinde çözülerek çözelti hazırlanmıştır.

2.1.4.14. Potasyum iyodür çözeltisi

Potasyum iyodür	16,60 g
Saf su	100 ml

Potasyum iyodür (KI) saf su içerisinde çözülerek çözelti hazırlanmıştır

2.1.5. APIZYM test kitinde kullanılan çözeltiler

2.1.5.1. ZYM A çözeltisi

Tris	25 g
HCl % 37	11 ml
Sodium Lauryl Sulfate	10 g
d H ₂ O	100 ml

2.1.5.2. ZYM B çözeltisi

Fast blue BB	0,12g
Methanol	40 ml
DMSO	60 ml

2.1.6. Kullanılan boyalar

2.1.6.1. Kristal violet

0,50 g kristal violet 100 ml saf su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

2.1.6.2. Lugol

2 g Potasyum iyodür (KI) 300 ml saf su içinde çözülerek hazırlanmıştır. Bu çözeltiye 1 g iyice ezilmiş iyot kristali eklenmiş ve oda sıcaklığında tam bir çözünme sağlanıncaya kadar karıştırılmıştır.

2.1.6.3. Safranin

0,50 g safranin 10 ml % 95'lik etil alkol içinde çözülmüştür ve 100 ml saf suyla karıştırılmıştır.

2.1.6.4. Malaşit yeşili

5 g malaşit yeşili 100 ml saf su içinde çözdürülerek hazırlanmıştır.

2.1.7. Kullanılan antibiyotikler

Streptomycin (10µg/disk) (Bioanalyse)

Erytromycin (15µg/disk) (Bioanalyse)

Amoxycillin (25µg/disk) (Oxoid)

Penicilin (10µg/disk) (Bioanalyse)

Tetracycline (30µg/disk) (Oxoid)

Chloramphenicol (30µg/disk) (Oxoid)

Vancomycin (30µg/disk) (BioChemica)

Gentamicin (10µg/disk) (Oxoid)

Rifampicin (5µg/disk) (Fluka)

Nalidixic asit (30µg/disk) (Fluka)

2.2. Yöntem

2.2.1. Peynir örneklerinin kimyasal özellikleri

Çalışılan peynir örneklerinin; rutubet miktarı (TS 2134), titre edilebilir asitlik (TS 591), toplam protein (TS EN ISO 8963-3), toplam azot (TS EN ISO 8963-3), yağ miktarı (TS 3046), kuru madde yağ miktarı (TS 3046) ve tuz miktarı (GMAY-TKB yayınları) analizleri Eskişehir Tarım İl Müdürlüğü'nde Türk Standartları'na göre yaptırılmıştır.

2.2.2. Peynir örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu

Çalışmamızda Kargı tulum peynirine ait yedi farklı örnek ile çalışılmıştır. Bu peynir örneklerinden laktik asit bakterilerinin izole edilebilmesi için MRS agar, M17 agar, salisinli NA, % 7,50 NaCl içeren NA, % 10 NaCl içeren NA besi yerleri kullanılmıştır.

Çalışılacak peynir örneklerinden aseptik olarak 10 gram örnek alınıp, 90 ml FTS içeren steril parçalayıcıya eklenmiştir. Örnekler önce düşük sonra yüksek hızda parçalanarak homojenize edilmiştir. 10^{-1} den 10^{-6} 'ya kadar desimal dilüsyonları hazırlanmış ve iki paralelli olarak petrilere dökme plaka yöntemi ile ekim yapılmıştır.

Petrilere 1 ml dilüsyon sıvısı konulduktan sonra üzerine 20 ml 45°C ye soğutulmuş MRS agar, M17 agar, salisinli NA, % 7,50 NaCl içeren NA, % 10 NaCl içeren NA dağıtılarak karıştırılmıştır ve donduktan sonra 30 °C, 37 °C ve 42 °C ye hem aerobik hem de anaerobik olarak 5 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda LAB olması muhtemel tipik; mt, krem renginde ve mekik şeklindeki koloniler seçilerek izole edildikleri besi yerlerinin sıvı besiyerlerine inoküle edilmiştir. Seçilen koloniler burada geliştirildikten sonra katı besi yerlerine çizgi ekim yapılarak saflaştırılmıştır. Birinci ve ikinci peynir örnekleri sadece MRS ve M17 besi yerlerine ekilmiş, diğer peynir örnekleri ise bu besi yerleriyle birlikte NaCl ve salisin içeren NA ortamlarına da ekilmiştir.

2.2.3. LAB izolatlarının tanımlanması

2.2.3.1. Gram boyama

Belirlenen izolatların Gram boyama reaksiyonu belirlenmiştir. İzolatların çizgi ekim ile tek düşürülen 24 saatlik aktif kolonilerinden bir kısım alınarak lam üzerinde 1 damla kadar saf su ile karıştırılarak yüzeye iyice yayılmıştır. Lam havada kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra üzerine methanol (*Microlog Minutes, 2003*) damlatılarak havada kurumaya bırakılarak fiske edilmiştir. Hazırlanan preparat ilk önce 1 dakika kristal violet ile boyanmış ve fazla boya akıtılmıştır. Sonra 1 dakika lugol- iyot çözeltisi ile muamele edilmiştir ve fazla boya akıtıldıktan sonra 15 saniye saf alkol ile muamele edilmiştir. Saf su ile alkol uzaklaştırıldıktan sonra 45 saniye safranin ile boyanmıştır. Boyama sonunda preparat saf su ile yıkanarak havada kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra mikroskopta immersiyon objektifinde immersiyon yağı ile hücre morfolojileri ve Gram boyama reaksiyonları belirlenmiştir. Mor renkli bakteriler Gram pozitif, pembe renkli olanlar ise Gram negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu boyama işleminden sonra, saf kültür oldukları belirlenen, Gram pozitif basil ve kok formunda bakteri kültürleri ayrılmıştır. Ayrılan bu kültürlerin laktik asit bakterileri olup olmadığını belirlemek için çeşitli testler uygulanmıştır. Bu testler yapılmadan önce, saf izolatlar iki kez uygun besiyerine çizgi ekimle pasajlanarak aktiflenmiştir.

2.2.3.2. Spor boyama

Gram boyama reaksiyonu sonucu saflığından emin olunan Gram pozitif basil morfolojisindeki bakterilerin spor oluşturup oluşturmadıklarını tespit etmek için spor boyama testi yapılmıştır. Bunun için sporulasyon besi yerine belirlenen izolatların ekimi yapılmış ve 5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda öze ile lam üzerine örnek alınıp bir damla kadar su ile yayılmıştır. Üç kez ateşten geçirilerek fiske edilmiştir. Su banyosu düzeneği üzerinde preparat % 5'lik malaşit yeşili boyası ile 5 dakika boyanmıştır, boyama anında preparat üzerine kurutma kağıdı kapatılmıştır ve kuruma gerçekleşmeden kurutma kağıdı üzerinden boya takviyesi yapılmıştır. Bu işlem

bitiminde kağıtlar atılmış ve preparat saf su ile yıkanmıştır. 30 saniye kadar safranin ile boyanmıştır. Boyama bittikten sonra preparat saf su ile yıkanmıştır ve havada kurutulmuştur. Kuruduktan sonra mikroskopta immersiyon objektifinde immersiyon yağı ile incelenmiştir. Sporangiumlar kırmızı, endospor ise yeşil olarak belirlendirilmiştir (Temiz,1996).

2.2.3.3. Katalaz testi

MRS agarda iki kez pasajı yapılan saf izolatlardan bir miktar büyüme, steril kürdan yardımı ile alınmış ve lam üzerine koyulmuştur. Üzerine H₂O₂ (hidrojen peroksit) damlatılarak gaz kabarcıklarının çıkıp çıkmadığı gözlenmiştir. Gaz kabarcığı çıkışı görülenler için test pozitif, görülmeyenler için ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 1996).

2.2.3.4. Oksidaz testi (Fluka)

Bu test ile sadece aerobik mikroorganizmalarda bulunan sitokromoksidaz enziminin bu bakterilerde olup olmadığı tespit edilmiştir. Bu testte ticari hazır diskler (Fluka) kullanılmıştır. Her bir disk dört öze dolusu saf su ile ıslatılmıştır. Bir öze dolusu aktif kültür bolca alınarak disk yüzeyine sürülmüştür. İnokulasyon yapılan bölümde koyu maviden mor-siyah bir renge dönüşüm olması durumunda test sonucu pozitif, değilse sonucu negatif olarak değerlendirilmiştir (Sneath ve ark., 1986).

2.2.3.5. LAB izolatlarının stok kültürlerinin saklanması

Gram pozitif, spor oluşturmeyen, katalaz ve oksidaz negatif olduğu belirlenen izolatların, muhtemel laktik asit bakterisi oldukları kabul edilerek, stok kültürleri yapılmıştır. Bunun için, LAB olması muhtemel izolatlar, izolasyonlarında kullanılmış olan (MRS ya da M17) sıvı besi yerlerinde aktifleştirilmiştir. Steril kapaklı ependorf tüplerine 1 ml % 20'lik gliserollü stok çözeltiden ve 0,50 ml de sıvı besiyerinde geliştirilmiş aktif kültürden ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan stok kültürler, -80 °C'deki derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

2.2.3.6. pH 9,6 da gelişme

Bu test, pH 9,6' da gelişmeyen laktik asit streptokoklarını diğer koklardan ayırmak için uygulanmıştır (Sneath ve ark., 1986). Gram boyama reaksiyonu sonucu, kok formunda olduğu belirlenen izolatlar, pH 9,6 da gelişme testi uygulanmıştır. 1 N NaOH ile M17 broth un pH değeri 9,6' ya ayarlanmıştır ve steril edilmiştir. 24 saatlik aktif kültürlerden inokule edilerek 30°C de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. pH 9,6 değerinde gelişme üremenin varlığı ya da yokluğunun kontrolü ile yapılmıştır. Bulanıklık gözlenen tüplerde sonuç pozitif, olmayanlarda ise negatif olarak kabul edilmiştir.

2.2.3.7. Glikozdan gaz oluşturma

Homofermentatif ve heterofermentatif LAB'ları ayırmak için bu test kullanılmıştır. Steril MRS broth ve Durham tüpü içeren tüplere aktiveleştirilmiş izolatlardan ekim yapılmıştır. Kültürler üç gün 37°C' de anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir ve Durham tüpünde kabarcık oluşan (gaz biriken) tüpler için test pozitif, hiçbir değişim gözlenmeyenler için ise negatif kabul edilmiştir (Şengül,2006). Pozitif sonuç gösterenler homofermentatif LAB, negatif sonuç gösterenler ise heterofermentatif LAB olarak belirlenmiştir.

2.2.3.8. pH 3,9 da gelişme

Laktobasillerin türüne ve cinsine bağlı olarak, ortam pH' ının 3,6- 4 arası laktobasiller için sınır değerdir (Sneath ve ark., 1986). MRS broth hazırlanarak pH'ı 1 N HCl ile 3,9' a ayarlanmıştır. Aktiveleştirilmiş izolatlardan ekim yapılmış aerobik ve anaerobik olarak 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Gelişmeleri bulanıklıklarına bakılarak değerlendirilmiştir. Bulanıklık görülen tüplerde test pozitif, görülmeyenler için test sonucu negatiftir.

2.2.3.9. Farklı sıcaklıklarda gelişme

Saf izolatların farklı sıcaklıklardaki üreme yeteneklerini belirlemek için steril MRS broth M17 broth tüplerine 24 saatlik aktif kültürlerden ekim yapılmıştır ve 10°C'de 7 gün, 15°C'de 5 gün, 45°C'de 3 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Gelişmeleri bulanıklıklarıyla belirlenmiştir. Gelişme olan tüpler pozitif olarak, üreme olmayanlar ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

2.2.3.10. Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme

İzolatların farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme yeteneklerini belirlemek için bu test yapılmıştır. % 2, 4, 6,5 NaCl içeren MRS broth tüplerine 24 saatlik aktif kültürlerden inoküle edilmiştir. 48 saat süreyle optimum gelişme sıcaklıklarında inkübasyona bırakılmıştır ve bulanık tüplerde gelişme pozitif, bulanıklık gözlenmeyenlerde ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

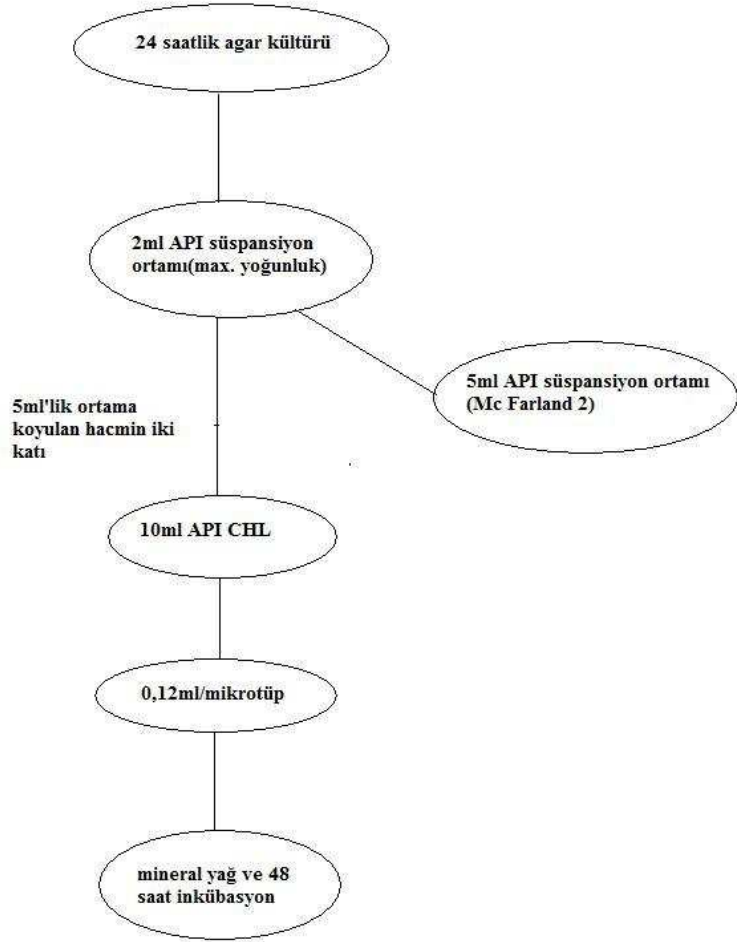
2.2.3.11. Arjinin hidrolizi

İzolatların arjininden amonyak (NH₃) oluşturma yeteneklerini belirlemek için yapılmıştır. Bu amaçla dekarboksilaz ortamı kullanılmıştır. Bu besiyeri hem amino asitli, hem de testin doğruluğunu ortaya koymak için aminoasitsiz olarak hazırlanmıştır. Her bir izolata ait 24 saatlik aktif kültürden hem aminoasit içeren hem de aminoasit içermeyen tüplere ekim yapılmış ve üzeri mineral yağ ile kapatılmıştır. Kültürler 40-48 saat süre inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda aminoasit içermeyen ortamın renginin mordan sarıya dönmesi testin geçerliliğini ortaya koymaktadır. İnkübasyon sonunda aminoasitli ortamda mor renk oluşumu dekarboksilasyon pozitif, ortamda sarı renk oluşumu ise dekarboksilasyon negatif olarak değerlendirilmiştir.

2.2.4. Suşların cins/tür tayininin API CH50 ve API20 Strep test kiti ile yapılması

Basil formundaki izolatların fenotipik tür tayininde API CH50 test kiti kullanılmıştır. 24 saatlik agar kültüründen 2 ml FTS içeren API süspansiyon ortamına bol miktarda kültür aktarılmıştır. Buradan 5 ml lik FTS ortamına belirli hacimde süspansiyondan aktararak Mc Farland No: 2 yoğunluğuna ayarlanmıştır. İstenilen yoğunluğa ulaşıldıktan sonra aynı hacmin iki misli 2 ml'lik süspansiyon ortamından alınarak 10 ml lik API CHL ortamına aktarılmıştır. Test stribinin kendi mikrotüplerine bu ortamdan 120 µl kadar pipetlenmiş, üzeri mineral yağ ile kaplanmıştır. 48 saat inkübe edilmiş ve bu süre içinde 24 ve 48 saat sonunda sonuçlar kaydedilmiştir (Şekil 2.1). Test stribindeki, eskulin mikrotüpünde siyah renk oluşumu ve diğer tüm mikrotüplerde sarı renk oluşumu pozitif (+) sonuç olarak değerlendirilmiştir. 48 saat sonunda alınan sonuçlar (<https://apiweb.biomerieux.com/>) veritabanına girilerek izolatların tür düzeyinde tayinleri yapılmıştır.

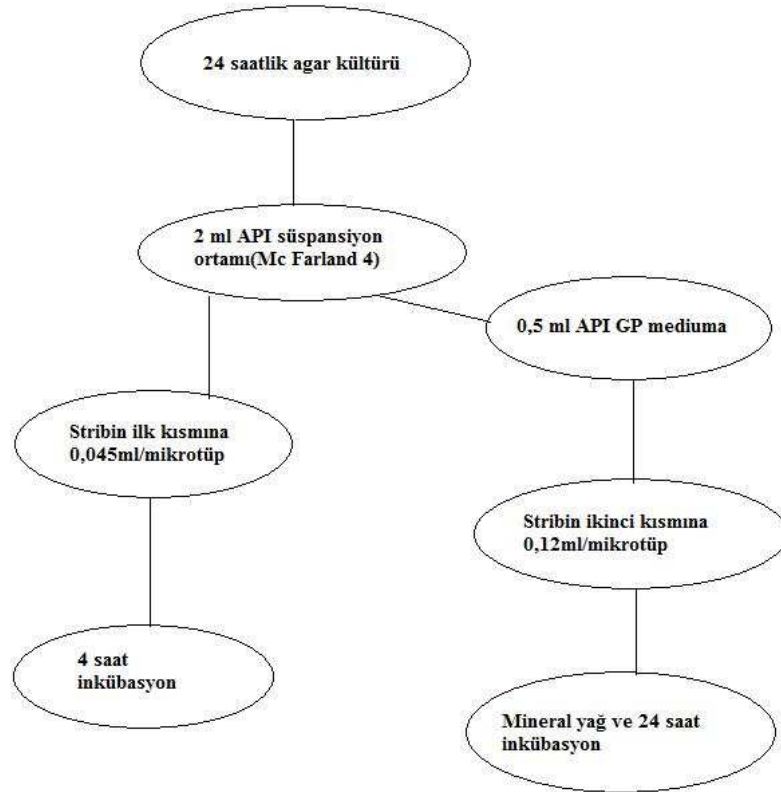
API CH 50 hazır test kiti ile 49 farklı karbohidratın fermentasyonu test edilebilmektedir. Bu karbonhidratlar: Gliserol, eritritol, D- arabinoz, L- arabinoz, riboz, D- ksiloz, L- ksiloz, adonitol, inositol, galaktoz, glukoz, fruktoz, mannoz, sorboz, rhamnoz, dulcitol, salisin, sellobioz, maltoz, laktoz, melibioz, sukroz, trehaloz, inulin, melezitose, rafinoz, nişasta, glikojen, ksilitol, gentiobiose, D- turanoz, D- lyxose, D- tagatoz, eskulin, α - metil- D- mannosid, , α - metil- D- glukozid, N- asetil- glukozamin, amigidalin, arbutin, D- arabitol, L- arabitol, glukonat, 2- keto- glukonat, 5- keto- glukonat, mannitol, sorbitol, D- fukoz, L-fukoz, b-metil-D- ksilosid dür.



Şekil 2.1: API CH50 uygulaması

Kok formundaki izolatların fenotipik tür tayininde API 20 Strep test kiti kullanılmıştır. 24 saatlik agar kültüründen 2 ml fizyolojik tuzlu su (FTS) içeren API süspansiyon ortamına bol miktarda kültür aktarılmıştır ve Mc Farland 4 e göre kültür yoğunluğu ayarlanmıştır. Bu test stribi iki kısımdan oluşmaktadır. İlk kısma hazırlanan bu süspansiyondan her bir mikrotüpe 45 µl pipetlenmiştir. 2 ml lik süspansiyondan 500 µl kadar API GP mediuma aktarılmıştır iyice karıştırıldıktan sonra test kitinin ikinci kısmındaki mikrotüplere 120 µl pipetlenmiş, ikinci kısmın üzeri mineral yağ ile kaplanmıştır. 37 °C de inkübe edilmiştir (Şekil 2.2).

Stribin ilk kısmında; VP, hipurik asit, eskulin, piroglutamik asit β -naftilamid, 6-bromo 2-naftil- α D galactopiranozid, naftol ASBI-glukuronik asit, 2-naftil β D galactopiranozid, 2-naftil fosfat, L-lözin β -naftilamid ve L-arjinin testleri bulunmaktadır. Bu kısım 4 saat sonunda sonuç vermektedir. İkinci kısım ise; D-riboz, L-arabinoz, D-mannitol, D-sorbitol, D-laktoz, D-trehaloz, inulin, D- rafinoz, Amidon ve Glikojen testlerini içermektedir. Bu kısım ise 24 saat sonunda sonuç vermektedir. Bu test kiti için üretici tarafından verilmiş tipik renk değişimleri gözlenerek pozitif/negatif sonuçlar belirlenmiştir. Sonuçlar (<https://apiweb.biomerieux.com/>) veritabanına girilerek tür düzeyinde tayinleri yapılmıştır.



Şekil 2.2: API 20 STREP uygulaması

2.2.5. Suşların starter olarak kullanım potansiyellerinin belirlenmesi

2.2.5.1. Asitleştirme kapasitesi

Gecelik aktif kültürler 5000 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiş ve peptonlu su ile yıkanmıştır. 10 ml tam yağlı UHT süt içeren tüplere % 1 (v/v) oranında inoküle edilmiş ve 37°C’de inkübasyona bırakılarak 2, 4, 6, 8, 24 ve 48. saatlerde pH’ları pH metre ile ölçülerek kaydedilmiştir (Franciosi et al., 2008).

2.2.5.2. Proteolitik aktivite

Aktifleştirilmiş kültürler 5000 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek peptonlu su ile yıkanmıştır. Skim milk agar içeren petrilere her bir örnekten 2 µl ekim yapılmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilere oluşan zon çapları cm cinsinden ölçülerek proteolitik aktiviteleri belirlenmiştir (Franciosi et al., 2008).

2.2.5.3. Diasetil oluşumu

Suşların sitratı metabolize etmeleri sonucu diasetil oluşturup oluşturmadıklarını belirlemek amacıyla bu test uygulanmıştır. 24 saatlik aktif kültürler 5 ml UHT süt içeren steril tüplere inoküle edilmiştir. 30 °C’ de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her tüpten 1 ml hücre süspansiyonu alınarak üzerine 0,50 ml α – naftol (% 1 w/v) ve KOH (% 16 w/v) üstüne eklenmiştir. 30 °C de 1 dakika inkübe edilmiştir. Üstte kırmızı renkli halka oluşumu diasetil oluşumu için pozitif olarak değerlendirilmiştir (Franciosi et al., 2008).

2.2.5.4. Dekstran oluşumu

Suşların sükrozdan dekstran oluşturup oluşturmadıklarını belirlemek için bu test yapılmıştır. % 10 sükroz içeren MRS agara 24 saatlik aktif kültürlerden damlatma yöntemi ile ekim yapılmıştır. 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda

üremelerde sünme olup olmadığına bakılmıştır. Sünme olan izolatlar için test sonucu pozitif kabul edilmiştir.

2.2.5.5. API ZYM Test bantlarının kullanımı ile enzimatik aktivite belirlenmesi

API ZYM test kiti, mikroorganizmaların enzimatik faaliyetlerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan yarı kantitatif bir mikro-test yöntemidir. Bu test kiti 19 enzimatik reaksiyonun sistematik ve hızlı bir biçimde çalışmasını sağlamaktadır. Bu enzimler ve substratları çizelge 2.1. de gösterilmektedir.

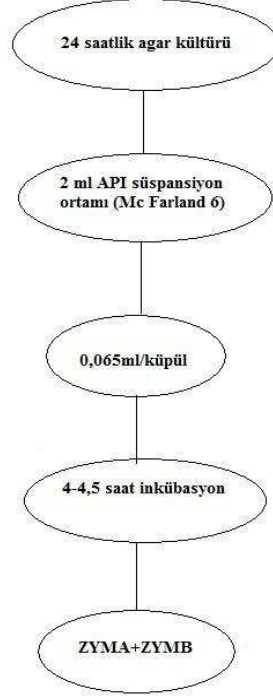
API ZYM bantı, uç bölümlerinde enzimatik substrat ve tampon içermek üzere tasarlanmış 20 küpülden oluşmuştur. Bu bölüm enzim ve genellikle çözünür olmayan substrat arasındaki teması sağlamaktadır. Enzimatik test küpülllerine, enzimatik substratları yeniden hidrate etmek için, yoğun LAB süspansiyonu ile inoküle edilmiştir.

İnkübasyon periyodu sırasında oluşturulan metabolik son ürünler reaktiflerin eklenmesiyle ortaya çıkarılan renkli reaksiyonlarla saptanmıştır. Reaksiyonlar, üretici firmanın (bioMérieux, Fransa) değerlendirme tablosuna göre yorumlanmıştır.

İşlem basamakları şu şekildedir; 2 ml lik süspansiyon ortamına (FTS), 24 saat MRS agarda geliştirilen LAB kültüründen aktarılmıştır ve süspanse edilmiştir. Süspansiyonun yoğunluğu Mc Farland 6 tüpüne göre ayarlanmıştır. API ZYM Test bantının içine yerleştirileceği inkübasyon kabı 5 ml saf su ile ıslatılmıştır. Test bantındaki her bir küpüle 65'er µl LAB süspansiyonu koyulmuştur. API ZYM Test bantları 37°C de 4-4.5 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüm küpüllere birer damla sırası ile Zym A ve Zym B çözeltisi damlatılmıştır. 5 dakika sonra oluşan renk değişimlerine göre test değerlendirilmiştir (Şekil 2.3).

Çizelge 2.1: API ZYM (test kitindeki numara sırasıyla) ile aktivitesi belirlenebilen enzimler ve substratları

Enzimler	Enzim substratları
2. Esteraz	2- naftil butirat
3. Esteraz lipaz	2- naftil caprilat
4. Lipaz	2- naftil miristat
5. Lösin arilamidaz	L- lösil- 2- naftilamid
6. Valin arilamidaz	L- valil- 2- naftilamid
7. Sistin arilamidaz	L- sistil- 2- naftilamid
8. Tripsin	N- benzol-DL- arjinin- 2- naftilamid
9. α - kimotripsin	N- glutaril-fenilalenin- 2- naftilamid
1. Alkalin fosfataz	2- naftil fosfat
10. Asit fosfataz	2- naftil fosfat
11. Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz	Naftol- AS- BI- fosfat
12. α - galaktozidaz	6- Br- 2- naftil- α D- galaktopiranozid
13. β - galaktozidaz	2- naftil- β D- galaktopiranozid
14. β - glukronidaz	Naftol- AS- BI- β D- glukronid
15. α - glukozidaz	2- naftil- α D- glukopiranozid
16. β - glukozidaz	6- Br- 2- naftil- β D- glukopiranozid
17. N-asetil- β -glukozaminidaz	1- naftil-N- asetil- β D-glukozaminid
18. α -mannozidaz	6- Br- 2- naftil- α D- mannopiranozid
19. α -fukosidaz	2- naftil- α L- fukopiranozid



Şekil 2.3: APIZYM test kitinin uygulanışı

2.2.6. Suşların probiyotik olarak kullanım potansiyellerinin belirlenmesi

2.2.6.1. Safrada canlı kalabilme

Suşların farklı konsantrasyonlarında canlı kalabilme potansiyellerini belirlemek için bu test yapılmıştır. 24 saatlik aktiveleştirilmiş kültürlerin yoğunluğu, FTS ile Mc Farland 0.5 tüpüne göre (10^8 kob/L) ayarlanmıştır. Çalışmada 96 kuyucuklu mikrokuyu plakları kullanılmıştır. Her bir kuyuya 100 µl çift kuvvetli MRS broth, 100 µl çift kuvvetli % 1, 2 ve 3'lük safra çözeltisi eklenmiştir. Bu kuyulara, yoğunluğu Mc Farland standardına göre ayarlanmış aktif kültürler (10 µl) eklenmiştir. Plaklar 37°C de 8 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 1, 2, 4 ve 8. saatlerinde MRS agar petrilere

damlatma yöntemi ile 5 µl ekim yapılarak, ekim yapılan petriyer 37 °C de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda oluşan koloniler sayılmıştır.

2.2.6.2. Mide asitliğine direnç

Suşların mide pH aralığında hayatta kalabilme yeteneklerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. 24 saatlik aktifleştirilmiş kültürler FTS ile Mc Farland 0.5' e ayarlanmıştır. Çalışmada 96 kuyucuklu mikro-kuyu plakları kullanılmıştır. Kuyulara 200 µl pH 1, 2 ve 3'e ayarlı MRS broth eklenmiştir, daha sonra üzerine 10 µl Mc Farland standardıyla yoğunluğu ayarlanmış aktif kültürler eklenmiştir. Plaklar 37 °C de 8 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 1, 2, 4 ve 8. saatlerinde MRS agar petriyelerine damlatma yöntemi ile 5 µl ekim yapılarak, petriyer 37 °C de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda oluşan koloniler sayılmıştır.

2.2.6.3. Antibiyotik duyarlılık testi

Peynir örneklerinden izole ettiğimiz suşların antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek için Kirby- Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Çalışmamız iki paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Bu testte kullanılan antibiyotikler streptomycin (10µl), erytromycin (15µl), amoxycillin (25µl), penicilin (10µl), tetracyclin (30µl), chloramphenicol (30µl), vancomycin (30µl), gentamycin (10µl), rifampicin (5µl) ve nalidixic asit (30µl) tir. Vancomycin, rampisin ve nalidixic asit çözelti şeklinde hazırlanarak disklere emdirilmiştir. Diğer antibiyotiklerde ise hazır ticari disklerden yararlanılmıştır.

MRS brothlarda aktifleştirilmiş kültürlerin yoğunluğu, FTS ile Mc Farland No: 0.5 tüpüne göre ayarlanmış ve bu tüpün 10^{-2} lik dilüsyonu hazırlanmıştır. MRS agar petriyelerine bu dilüsyonlardan 0,1 ml alınarak, yayma yöntemi ile ekimleri yapılmıştır. Besiyeri yüzeyine antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir (10 disk/petri). Plaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda, disklerin çevresinde oluşan zon çapları milimetre (mm) cinsinden ölçülerek antibiyotiklere dirençliliklerine bakılmıştır.

2.2.6.4. LAB'nin hidrojen peroksit (H₂O₂) üretme yetenekleri

LAB izolatları 5 ml'lik MRS broth ortamında 48 saat süre inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerin üzerine 5 ml saf su eklenmiş ve kültürler 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında üstte oluşan berrak sıvı 0,45 µm por çaplı selüloz nitrat filtreden geçirilerek süzülmüştür. Elde edilen filtratın 4 ml'si ayrılarak üzerine sırayla 0,50 ml sitrik asit, 0,50 ml amonyum molibdat, 0,50 ml potasyum iyodür çözeltileri eklenmiştir. Örnekler iyice karıştırıldıktan sonra spektrofotometrede (SHIMADZU UV-2450) 350 nm dalga boyunda okunarak optik yoğunlukları belirlenmiştir. Elde edilen optik yoğunluk değerleri; önceden hazırlanan standart eğriye göre µl/ml cinsinden hesaplanmıştır.

Hidrojen peroksit testinde kullanılan standart eğri için; % 30'luk saf H₂O₂ ile 0,01 µl/ml hacimde stok çözelti hazırlanmıştır. Buradan 1:2 oranında seyreltmeler yapılmış ve farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanmıştır. Standart eğri; Microsoft Excel programı kullanılarak çizilmiştir.

3.BULGULAR

3.1. Peynir Örneklerinin Kimyasal Özellikleri

Çalışılan peynir örneklerine ait kimyasal özelliklerin Türk Standartları'na göre yapılmış analiz sonuçları çizelge 3.1 de görülmektedir.

Çizelge 3.1. Kargı tulum peynir örneklerine ait kimyasal analiz sonuçları

Yapılan analizler (%)	Peynir Örnekleri						
	1	2	3	4	5	6	7
Rutubet miktarı	29,0	38,0	35,0	25,01	53,85	46,39	42,49
Titre edilebilir asitlik (laktik asit cinsinden)	2,86	2,61	2,72	2,82	1,54	3,81	2,47
Toplam protein	25,97	23,35	23,44	25,14	14,80	21,86	22,18
Toplam azot	4,07	3,66	3,67	3,94	2,32	3,43	3,48
Yağ miktarı	39,5	32	35	44,28	24	25	29
Yağ miktarı (kuru madde)	55,63	51,61	53,84	59,05	52	46,63	50,42
Tuz miktarı (kuru madde)	3,14	5,60	4,69	3,60	2,51	5,37	5,77

3.2. Kargı Tulum Peynirinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Çorum'un Kargı yöresine ait geleneksel yollarla üretilen tulum peynirinden üretim aşamasının belirli dönemlerinde peynirler temin edilmiştir. Toplamda farklı olgunlukta 7 peynir örneği ile çalışılmış ve laktik asit bakteri (LAB) izolasyonu yapılmıştır. MRS agar, M17 agar ve Nutrient agar (NA) ortamlarında gelişen farklı (LAB olması muhtemel) tipte, krem-beyaz renkli 1-3 mm çaplı ya da mekik şeklinde 405 bakteri izole edilmiştir (Çizelge 3.2). Çizgi ekim ile saflaştırılan kolonilerin katalaz aktiviteleri ve Gram boyama reaksiyonları sonuçları doğrultusunda 109 adet LAB

olması muhtemel koloni seçilmiştir. Bu izolatların ise 13 tanesinin spor oluşturdıkları tespit edilmiştir. Spor oluşturmeyen formlar seçilerek kodlanmış, toplamda 96 izolat yatık agar tüplerine çekilmiştir. Daha sonra yapılacak olan fizyolojik testlerde kullanılmak üzere içerisinde % 20 gliserol bulunan endorf tüplerine transfer edilerek -80°C'de stoklanmıştır.

Seçilen bakterilerin 29 tanesi aerobik koşullardan, 67 tanesi de anaerobik koşullardan izole edilmiştir. Aerobik inkübasyon sonucu, 30 °C'den 1(% 1,04), 37 °C'den 11 (% 11,46), 42 °C'den de 17 (% 1,71) bakteri izole edilmiş; anaerobik koşullardan ise 30 °C'den 14 (% 14,58), 37 °C'den 29 (% 30,21), 42°C'den de 24 (% 25) bakteri izole edilmiştir (Çizelge 3.3). Anaerobiklerin aerobik koşullarda, aerobiklerinde anaerobik koşullarda gelişimlerine bakılmış; 96 izolatın her iki koşulda da gelişebildiği gözlenmiştir.

Çizelge 3.2: İzolatların elde edildiği örnekler ve izole edildikleri koşullar

Gelişim koşulları			Peynir örneklerine ait izolat sayıları							Toplam izolat sayıları
Besiyeri	Sıcaklık	O ₂ istekleri	1	2	3	4	5	6	7	
MRS Agar	30 °C	Anaerob	12	6	0	0	0	0	0	18
	37 °C	Aerob	0	0	1	7	5	4	5	22
		Anaerob	13	0	7	1	11	6	6	44
	42 °C	Aerob	0	0	5	10	3	4	0	22
		Anaerob	0	0	5	15	9	0	0	29
M17 Agar	30 °C	Aerob	3	8	3	2	0	4	4	24
		Anaerob	0	1	6	7	7	3	5	29
	37 °C	Aerob	17	13	0	0	0	0	0	30
	42 °C	Aerob	15	9	0	0	0	0	0	24
%10NaCl NA	37 °C	Aerob	Y	Y	0	0	0	0	0	0
		Anaerob	Y	Y	0	1	3	0	1	5
	42 °C	Aerob	Y	Y	0	0	4	0	0	4
Salisin NA	37 °C	Aerob	Y	Y	6	9	2	3	0	20
		Anaerob	Y	Y	9	0	0	4	4	17
	42 °C	Aerob	Y	Y	7	3	4	4	10	28
		Anaerob	Y	Y	5	6	7	0	7	25
%7,5 NaCl NA	37 °C	Aerob	Y	Y	1	9	4	5	0	19
		Anaerob	Y	Y	2	7	5	0	1	15
	42 °C	Aerob	Y	Y	4	7	5	1	0	17
		Anaerob	Y	Y	5	7	1	0	0	13
Toplam			60	37	66	91	71	37	43	405

Y: yapılmadı

3.3. Kargı Tulum Peyniri Örneklerinden İzole Edilen Bakterilerin Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

İzolatların Gram boyama reaksiyonları ve morfolojilerinin incelenmesi sonucu 52 izolatın (% 54) basil, 39 izolatın (% 41) kok, 5 izolatın (% 5) kokobasil formunda olduğu belirlenmiştir.

96 izolat pH 3,9' da gelişme göstermiştir. Yalnızca kok morfolojisine sahip 39 izolata uygulanan pH 9,6' da gelişme testi sonucunda tüm koklarda gelişme gözlenmiştir.

Sıcaklık testlerine bakıldığında; 116 numaralı izolat dışında hiçbir izolat 10 °C'de gelişme göstermemiştir. 19 izolat yalnızca 15 °C'de, 32 izolat yalnızca 45 °C'de, 17 izolat ise her iki sıcaklıkta da gelişme göstermiştir. 28 izolat ise iki sıcaklıkta da gelişmemiştir.

96 izolatın hepsi % 2 NaCl konsantrasyonunda gelişim gösterirken, % 4 ve 6'lık konsantrasyonlar için değişim gözlenmiştir. 19 izolat % 4 NaCl ortamında gelişim göstermemiş, geri kalan 77 izolat gelişmiştir. 48 izolat % 6 NaCl ortamında gelişim göstermiş, 48 izolat göstermemiştir.

39 izolatta glikozdan gaz oluşumu gözlenmiş, 57 izolatta gaz oluşumu gözlenmemiştir.

İzolatlara uygulanan arjininden amonyak oluşum testinde; 66 izolat pozitif sonuç vermiş, 30 izolat negatif sonuç vermiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.3: LAB olması muhtemel 96 izolatın elde edildiği peynir örnekleri ve izole edildikleri koşullar

Gelişim koşulları			Peynir örneklerine ait izolat sayıları							
Besiyeri	Sıcaklık	O ₂ istekleri	1	2	3	4	5	6	7	Toplam izolat sayıları
MRS Agar	30 °C	Anaerob	3	4	0	0	0	0	0	7
	37 °C	Aerob	0	0	0	4	3	1	3	11
		Anaerob	10	0	3	1	11	2	1	28
	42 °C	Aerob	0	0	1	5	3	3	0	12
		Anaerob	0	0	2	12	5	0	0	19
M17 Agar	30 °C	Aerob	0	0	0	0	0	0	1	1
		Anaerob	0	0	0	1	3	1	2	7
	37 °C	Aerob	0	0	0	0	0	0	0	0
	42 °C	Aerob	0	0	0	0	0	0	0	0
%10NaCl NA	37 °C	Aerob	Y	Y	0	0	0	0	0	0
		Anaerob	Y	Y	0	0	0	0	0	0
	42 °C	Aerob	Y	Y	0	0	0	0	0	0
Salisin NA	37 °C	Aerob	Y	Y	0	0	0	0	0	0
		Anaerob	Y	Y	0	0	0	0	1	1
	42 °C	Aerob	Y	Y	0	0	0	0	5	5
		Anaerob	Y	Y	0	0	1	0	3	4
%7,5 NaCl NA	37 °C	Aerob	Y	Y	0	0	0	0	0	0
		Anaerob	Y	Y	0	0	0	0	1	1
	42 °C	Aerob	Y	Y	0	0	0	0	0	0
		Anaerob	Y	Y	0	0	0	0	0	0
Toplam			13	4	6	23	26	7	17	96

Y: yapılmadı

Çizelge 3.4: Gram pozitif, katalaz negatif izolatlara uygulanan biyokimyasal ve fizyolojik testler

İzolat numaraları	Gram boyama reaksiyonu	Hücre morfolojisi	Katalaz	pH3,9' da gelişme	pH 9,6' da gelişme	10°C'de gelişme	15°C'de gelişme	45°C'de gelişme	% 2 NaCl'de gelişme	% 4 NaCl'de gelişme	% 6,5 NaCl'de gelişme	Glikozdan CO ₂ oluşumu	Arjinin hidrolizi
1	+	Basil	-	+	Y	-	+	-	+	+	-	+	-
2	+	Basil	-	+	Y	-	+	-	+	+	-	+	+
3	+	Basil	-	+	Y	-	+	+	+	+	-	+	+
4	+	Kok	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
5	+	Kokobasil	-	+	Y	-	-	-	+	+	+	+	-
6	+	Basil	-	+	Y	-	-	+	+	+	-	-	-
7	+	Basil	-	+	Y	-	-	-	+	+	-	-	+
8	+	Basil	-	+	Y	-	+	-	+	+	+	+	+
9	+	Basil	-	+	Y	-	+	+	+	+	+	+	-
10	+	Basil	-	+	Y	-	+	-	+	+	-	+	+
11	+	Basil	-	+	Y	-	+	-	+	+	-	+	+
12	+	Kok	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
13	+	Basil	-	+	Y	-	+	+	+	+	-	-	-
14	+	Kok	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
15	+	Basil	-	+	Y	-	-	-	+	+	+	+	+
16	+	Kok	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+
17	+	Basil	-	+	Y	-	-	-	+	-	-	-	+
18	+	Basil	-	+	Y	-	-	-	+	+	-	+	+

Y: yapılmadı

Çizelge 3.4 (Devam): Gram pozitif, katalaz negatif izolatlara uygulanan biyokimyasal ve fizyolojik testler

İzolat numaraları	Gram boyama reaksiyonu	Hücre morfolojisi	Katalaz	pH3,9' da gelişme	pH9,6' da gelişme	10°C'de gelişme	15°C'de gelişme	45°C'de gelişme	% 2 NaCl'de gelişme	% 4 NaCl'de gelişme	% 6,5 NaCl'de gelişme	Glikozdan CO ₂ oluşumu	Arjinin hidrolizi
19	+	Basil	-	+	Y	-	-	+	+	+	+	-	-
20	+	Basil	-	+	Y	-	-	+	+	-	-	-	+
21	+	Basil	-	+	Y	-	-	-	+	+	+	-	+
22	+	Basil	-	+	Y	-	+	+	+	+	+	+	+
23	+	Basil	-	+	Y	-	+	+	+	+	-	+	+
24	+	Kok	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
26	+	Kokobasil	-	+	Y	-	-	+	+	+	+	+	+
27	+	Basil	-	+	Y	-	+	-	+	+	+	-	+
28	+	Basil	-	+	Y	-	+	-	+	-	-	+	+
29	+	Kokobasil	-	+	Y	-	-	+	+	-	-	-	-
30	+	Basil	-	+	Y	-	-	+	+	-	-	+	+
33	+	Basil	-	+	Y	-	+	+	+	+	-	+	-
34	+	Basil	-	+	Y	-	+	+	+	+	-	+	-
35	+	Basil	-	+	Y	-	-	-	+	-	-	+	+
36	+	Basil	-	+	Y	-	+	-	+	-	-	-	+
37	+	Basil	-	+	Y	-	-	-	+	+	+	-	+
38	+	Basil	-	+	Y	-	-	+	+	+	+	+	-
39	+	Basil	-	+	Y	-	+	-	+	+	-	-	+

Y: yapılmadı

Çizelge 3.4 (Devam): Gram pozitif, katalaz negatif izolatlara uygulanan biyokimyasal ve fizyolojik testler

İzolat numaraları	Gram boyama reaksiyonu	Hücre morfolojisi	Katalaz	pH3,9' da gelişme	pH9,6' da gelişme	10°C'de gelişme	15°C'de gelişme	45°C'de gelişme	% 2 NaCl'de gelişme	% 4 NaCl'de gelişme	% 6,5 NaCl'de gelişme	Glikozdan CO ₂ oluşumu	Arjinin hidrolizi
40	+	Basil	-	+	Y	-	+	-	+	+	-	+	-
41	+	Kokobasil	-	+	Y	-	-	-	+	+	+	-	+
42	+	Basil	-	+	Y	-	+	-	+	-	-	-	+
43	+	Basil	-	+	Y	-	-	+	+	+	-	-	-
44	+	Basil	-	+	Y	-	-	-	+	-	-	+	+
45	+	Basil	-	+	Y	-	-	-	+	+	+	-	+
46	+	Basil	-	+	Y	-	-	+	+	+	-	+	+
47	+	Basil	-	+	Y	-	-	+	+	+	-	-	+
48	+	Basil	-	+	Y	-	-	+	+	+	-	-	+
49	+	Basil	-	+	Y	-	-	+	+	+	+	-	-
50	+	Basil	-	+	Y	-	-	+	+	-	-	+	+
51	+	Basil	-	+	Y	-	+	-	+	+	-	+	+
52	+	Kok	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
53	+	Kok	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
54	+	Kok	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
55	+	Kok	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
56	+	Kok	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
57	+	Kok	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-

Y: yapılmadı

Çizelge 3.4 (Devam): Gram pozitif, katalaz negatif izolatlara uygulanan biyokimyasal ve fizyolojik testler

İzolat numaraları	Gram boyama reaksiyonu	Hücre morfolojisi	Katalaz	pH3,9' da gelişme	pH9,6' da gelişme	10°C'de gelişme	15°C'de gelişme	45°C'de gelişme	% 2 NaCl'de gelişme	% 4 NaCl'de gelişme	% 6,5 NaCl'de gelişme	Glikozdan CO ₂ oluşumu	Arjinin hidrolizi
58	+	Kok	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
59	+	Kok	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
60	+	Kok	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
61	+	Kok	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
62	+	Kok	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
63	+	Kok	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
64	+	Kok	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
65	+	Kok	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
66	+	Kok	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
67	+	Kok	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
68	+	Kok	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
71	+	Kok	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
77	+	Kok	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
80	+	Kok	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
82	+	Basil	-	+	Y	-	+	-	+	+	-	-	+
83	+	Basil	-	+	Y	-	+	-	+	-	-	-	+
84	+	Basil	-	+	Y	-	+	+	+	+	-	-	-
85	+	Basil	-	+	Y	-	+	-	+	+	+	+	+

Y: yapılmadı

Çizelge 3.4 (Devam): Gram pozitif, katalaz negatif izolatlara uygulanan biyokimyasal ve fizyolojik testler

İzolat numaraları	Gram boyama reaksiyonu	Hücre morfolojisi	Katalaz	pH3,9' da gelişme	pH9,6' da gelişme	10°C'de gelişme	15°C'de gelişme	45°C'de gelişme	% 2 NaCl'de gelişme	% 4 NaCl'de gelişme	% 6,5 NaCl'de gelişme	Glikozdan CO ₂ oluşumu	Arjinin hidrolizi
95	+	Kok	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
97	+	Kok	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
98	+	Kok	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
99	+	Kok	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
100	+	Kok	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
101	+	Kok	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
102	+	Kok	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
103	+	Kok	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
104	+	Kok	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
105	+	Kok	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
106	+	Kok	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
107	+	Kok	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
108	+	Basil	-	+	Y	-	+	-	+	-	-	-	-
109	+	Basil	-	+	Y	-	-	-	+	-	-	-	-
110	+	Basil	-	+	Y	-	+	-	+	-	-	-	+
111	+	Basil	-	+	Y	-	+	+	+	+	+	-	+
112	+	Kok	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
113	+	Kok	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+

Y: yapılmadı

Çizelge 3.4 (Devam): Gram pozitif, katalaz negatif izolatlara uygulanan biyokimyasal ve fizyolojik testler

İzolot numaraları	Gram boyama reaksiyonu	Hücre morfolojisi	Katalaz	pH3,9' da gelişme	pH9,6' da gelişme	10°C'de gelişme	15°C'de gelişme	45°C'de gelişme	% 2 NaCl'de gelişme	% 4 NaCl'de gelişme	% 6,5 NaCl'de gelişme	Glikozdan CO ₂ oluşumu	Arjinin hidrolizi
114	+	Basil	-	+	Y	-	-	-	+	+	+	+	+
115	+	Basil	-	+	Y	-	-	-	+	+	+	-	+
116	+	Basil	-	+	Y	+	+	+	+	+	+	+	+
117	+	Basil	-	+	Y	-	-	-	+	+	+	-	+
118	+	Kokobasil	-	+	Y	-	-	-	+	+	-	-	+
119	+	Basil	-	+	Y	-	+	-	+	+	+	+	+

Y: yapılmadı

3.4. Suşların Cins/Tür Tayininin API CH50 ve API20 Strep Test Kitleri ile Değerlendirilmesi

İzole edilen 96 suş MRS agar ortamında 48 saat süreyle aktifleştirilmiştir. Basil ve kokobasil morfolojisindeki suşların tanımlanmasında API CH50, kok morfolojisindeki suşların tanımlanmasında ise API20 Strep test kiti kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar çizelge 3.5 de sunulmuştur.

API test kitleri ile yapılan biyokimyasal testlerin reaksiyon sonuçları Ek 1 ve Ek 2 de çizelge biçiminde ve şekil 3.1 ve 3.2 de temsilci resim biçiminde gösterilmiştir.

API ile belirlenen türlerin peynir örneklerine göre dağılımı çizelge 3.6 da gösterilmektedir.

Çizelge 3.5: API test kitleri tayin sonuçları

İzolat numarası	Tanımlanan tür
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>
2	<i>Lactobacillus brevis</i>
3	<i>Lactobacillus plantarum</i>
4	<i>Enterococcus durans/faecium</i>
5	<i>Lactobacillus plantarum</i>
6	<i>Lactobacillus plantarum</i>
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>
9	<i>Lactobacillus plantarum</i>
10	<i>Lactobacillus plantarum</i>
11	<i>Lactobacillus brevis</i>
12	Tanımlanamadı
13	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
14	<i>Enterococcus durans/faecium</i>
15	<i>Lactobacillus pentosus</i>
16	<i>Streptococcus acidominimus/pluranimalium</i>
17	<i>Lactobacillus plantarum</i>
18	<i>Lactobacillus fermentum</i>
19	<i>Lactobacillus plantarum</i>
20	Tanımlanamadı
21	<i>Lactobacillus plantarum</i>
22	Tanımlanamadı
23	<i>Lactobacillus plantarum</i>
24	<i>Enterococcus gallinarum/casseliflavus</i>
26	Tanımlanamadı
27	<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>
28	<i>Lactobacillus fermentum</i>
29	<i>Streptococcus thermophilus</i>
30	Tanımlanamadı
33	<i>Lactobacillus plantarum</i>
34	<i>Lactobacillus brevis</i>
35	<i>Lactobacillus brevis</i>
36	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
37	<i>Lactobacillus brevis</i>
38	<i>Lactobacillus pentosus</i>
39	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
40	<i>Lactobacillus plantarum</i>
41	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
42	<i>Lactobacillus plantarum</i>
43	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
44	<i>Lactobacillus brevis</i>
45	<i>Lactobacillus plantarum</i>
46	<i>Lactobacillus brevis</i>
47	Tanımlanamadı
48	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
49	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
50	<i>Lactobacillus fermentum</i>
51	<i>Lactobacillus brevis</i>
52	<i>Streptococcus thermophilus</i>
53	<i>Enterococcus faecium</i>
54	<i>Enterococcus faecium/gallinarum</i>
55	<i>Gemella morbillorum</i>
56	<i>Streptococcus mitis</i>
57	<i>Aerococcus viridens</i>
58	<i>Gemella morbillorum</i>
59	<i>Streptococcus equinus</i>
60	<i>Gemella morbillorum</i>

İzolat numarası	Tanımlanan tür
61	<i>Enterococcus durans/faecium</i>
62	<i>Enterococcus durans/faecium</i>
63	<i>Gemella morbillorum</i>
64	<i>Gemella morbillorum</i>
65	<i>Gemella morbillorum</i>
66	<i>Granulicatella adiacens</i>
67	<i>Streptococcus thermophilus</i>
68	<i>Gemella morbillorum</i>
71	<i>Enterococcus faecium</i>
77	<i>Enterococcus durans</i>
80	<i>Enterococcus durans/faecium</i>
82	<i>Lactobacillus plantarum</i>
83	<i>Lactobacillus pentosus</i>
84	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
85	<i>Lactobacillus brevis</i>
95	<i>Enterococcus durans</i>
97	<i>Enterococcus durans/faecium</i>
98	<i>Enterococcus durans/faecium</i>
99	<i>Enterococcus durans</i>
100	<i>Enterococcus durans</i>
101	<i>Enterococcus durans</i>
102	<i>Enterococcus faecium</i>
103	<i>Enterococcus durans</i>
104	<i>Enterococcus faecium</i>
105	<i>Enterococcus durans</i>
106	<i>Enterococcus durans/faecium</i>
107	<i>Enterococcus faecium/faecalis</i>
108	<i>Lactobacillus plantarum</i>
109	<i>Lactobacillus plantarum</i>
110	<i>Lactobacillus plantarum</i>
111	<i>Enterococcus durans</i>
112	<i>Enterococcus faecium</i>
113	<i>Enterococcus durans</i>
114	<i>Lactobacillus brevis</i>
115	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
116	<i>Lactobacillus plantarum</i>
117	<i>Lactobacillus plantarum</i>
118	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
119	<i>Lactobacillus brevis</i>
NRRL-B1951	<i>Lb. plantarum</i>
NRRL-B4496	<i>Lb. plantarum</i>
NRRL-B1837	<i>Lb. plantarum</i>
NRRL-B 442	<i>Lb. rhamnosus</i>
NRRL-B548	<i>Lb. rhamnosus</i>
NRRL-B633	<i>Lb. brevis</i>
NRRL-B1840	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
NRRL-B1118	<i>E. durans</i>
NRRL-B2354	<i>E. faecium</i>
A.Ü.F.F.	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>Paracasei</i>
A.Ü.F.F.	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>
A.Ü.F.F.	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>



Şekil 3.1: NRRL-B2354 *E. faecium* standart suşuna ait API20 Strep test kiti sonuçları



Şekil 3.2: NRRL-B442 *Lb. rhamnosus* standart suşuna ait API 50CH test kiti sonuçları

Çizelge 3.6: Tanımlanan türlerin peynir örneklerine göre dağılımı

Peynir örnek numarası	Tanımlanan tür	Tanımlanan tür sayısı
1	<i>Enterococcus sp.</i>	3 (54,61,62)
	<i>E. faecium</i>	1 (53)
	<i>Aerococcus viridens</i>	1(57)
	<i>Gemella morbillorum</i>	5(55, 58,60, 63, 64)
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	1(52)
	<i>Streptococcus mitis</i>	1(56)
	<i>Streptococcus equinus</i>	1(59)
2	<i>Gemella morbillorum</i>	2 (65, 68)
	<i>Granulicatella adiacens</i>	1 (66)
	<i>St. Thermophilus</i>	1 (67)
3	<i>Enterococcus sp.</i>	1 (24,
	<i>Lb. curvatus subsp. Curvatus</i>	1 (27)
	<i>Lb. Fermentum</i>	1 (28)
	<i>St. Thermophilus</i>	1 (29)
	Tanımsız	2 (26, 30)
4	<i>Lb. Plantarum</i>	12 (1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 17, 19, 21, 23)
	<i>Lb. Brevis</i>	2 (2, 11)
	<i>Lb. paracasei subsp. paracasei</i>	1 (13)
	<i>Lb. Pentosus</i>	1 (15)
	<i>Lb. Fermentum</i>	1 (18)
	<i>Enterococcus sp.</i>	2 (4, 14)
	<i>Streptococcus sp.</i>	1 (16)
	Tanımsız	3 (12, 20, 22)
5	<i>Lb. Plantarum</i>	7 (33, 40, 42, 45, 108, 109, 110)
	<i>Lb. Brevis</i>	6 (34, 35, 37, 44, 46, 51)
	<i>Lb. paracasei subsp. paracasei</i>	6 (36, 39, 41, 43, 48, 49)
	<i>Lb. Pentosus</i>	1 (38)
	<i>Lb. Fermentum</i>	1 (50)
	<i>E. faecium</i>	2 (71, 112)
	<i>E. durans</i>	1 (111)
	<i>Enterococcus sp.</i>	1 (107)
	Tanımsız	1 (47)
6	<i>Lb. Plantarum</i>	2 (116,117)
	<i>Lb. Brevis</i>	2 (114, 119)
	<i>Lb. paracasei subsp. paracasei</i>	2 (115, 118)
	<i>E. durans</i>	1 (113)
7	<i>Lb. Plantarum</i>	1 (82)
	<i>Lb. Brevis</i>	1 (85)
	<i>Lb. Rhamnosus</i>	1 (84)
	<i>Lb. Pentosus</i>	1 (83)
	<i>Enterococcus sp.</i>	4 (80, 97, 98, 106)
	<i>E. durans</i>	7 (77, 95, 99, 100, 101, 103, 105)
	<i>E. faecium</i>	2 (102, 104)

3.5. Suşların Starter Olarak Kullanım Potansiyellerinin Belirlenmesi

3.5.1. Suşların asitleştirme kapasitesi

Elde edilen izolatlar 48 saat süreyle aktifleştirildikten sonra santrifüjlenmiş ve yoğun bir hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Bu hücre süspansiyonundan UHT süte inokülasyon yapılarak belirli aralıklarla pH ölçümleri yapılmıştır.

İnkübasyon süresinden ilk 8 saat sonra 14 numaralı suşun ortamın pH'ını belirgin şekilde düşürdüğü görülmüştür. 13 suşta ise beklenen şekilde bir değişim gözlenmemiştir.

24 ve 48 saat sonunda ise 96 suşun tamamının ortamın pH'ını asitleştirdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte 96 suştan; 18 suşun kuvvetli asitleştirme etkisi, 8 suşun ise zayıf (neredeyse hiç) ve 70 suşun ise orta derecede asitleştirme etkileri olduğu görülmüştür (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7 96 suşun farklı inkübasyon süreleri sonucundaki pH değişimleri

İzolat no	pH Ölçümleri					
	2 saat	4saat	6saat	8saat	24saat	48saat
1	6,46	6,43	6,43	6,43	4,87	4,21
2	6,47	6,43	6,41	6,40	4,97	4,47
3	6,50	6,45	6,45	5,90	4,88	4,31
4	6,45	6,45	6,43	6,02	3,98	3,63
5	6,39	6,27	5,97	5,21	3,83	3,62
6	6,45	6,29	6,01	5,69	4,02	3,65
7	6,40	6,40	5,82	5,08	3,68	3,60
8	6,54	6,51	6,51	6,51	6,51	4,45
9	6,56	6,52	6,49	6,49	6,45	4,70
10	6,41	6,34	6,09	5,85	4,80	4,22
11	6,42	6,16	6,04	5,70	4,60	4,33
12	6,44	6,31	6,24	5,97	4,45	4,36
13	6,48	6,46	6,42	5,85	3,90	3,78
14	6,37	6,23	6,03	4,69	4,14	3,67
15	6,47	6,24	6,09	5,21	4,06	3,64
16	6,57	6,57	6,57	6,55	6,41	5,57
17	6,56	6,56	6,27	5,82	4,46	4,31
18	6,48	6,45	6,24	6,24	4,47	4,33
19	6,43	6,33	6,18	5,84	4,66	4,30
20	6,52	6,51	6,51	6,23	4,50	4,32
21	6,54	6,52	6,51	6,19	4,77	4,39
22	6,51	6,51	6,51	6,17	4,64	4,43
23	6,51	6,50	6,36	6,24	4,62	4,40

Çizelge 3.7 (Devamı) 96 suşun farklı inkübasyon süreleri sonucundaki pH değişimleri

İzolat no	pH Ölçümleri					
	2 saat	4saat	6saat	8saat	24saat	48saat
24	6,47	6,40	6,32	5,98	4,46	4,31
26	6,51	6,48	6,42	5,94	4,32	3,83
27	6,56	6,52	6,50	6,21	4,51	4,32
28	6,51	6,46	6,43	6,13	4,92	4,39
29	6,52	6,51	6,37	6,24	4,85	4,35
30	6,42	6,14	5,90	5,44	3,88	3,60
33	6,48	6,42	6,30	6,03	4,00	3,74
34	6,53	6,47	6,44	6,40	4,67	4,33
35	6,42	6,18	6,12	5,44	4,95	4,29
36	6,55	6,53	6,52	6,49	4,53	4,33
37	6,53	6,53	6,33	5,41	4,75	4,43
38	6,54	6,54	6,52	6,50	6,50	5,20
39	6,53	6,52	6,12	5,72	4,69	4,33
40	6,55	6,46	6,31	5,85	4,61	4,37
41	6,47	6,46	6,12	6,03	4,87	4,34
42	6,51	6,42	6,10	5,78	4,18	3,30
43	6,55	6,53	6,53	6,03	4,52	4,32
44	6,51	6,51	6,51	6,51	6,48	5,90
45	6,53	6,49	6,45	6,21	4,76	4,24
46	6,53	6,51	6,36	6,30	5,07	4,43
47	6,40	6,36	6,01	5,82	3,90	3,62
48	6,54	6,47	6,45	6,26	4,57	4,34
49	6,42	6,34	6,32	6,32	3,78	3,61
50	6,51	6,47	6,47	6,44	5,26	4,61
51	6,54	6,54	6,33	6,30	4,63	4,39
52	6,54	6,49	6,36	6,35	4,50	4,31
53	6,55	6,49	6,49	6,47	6,44	6,26
54	6,56	6,55	6,44	6,19	4,23	4,26
55	6,55	6,41	6,41	6,32	4,06	4,26
56	6,55	6,50	6,48	6,41	4,29	4,30
57	6,55	6,54	6,40	6,34	4,51	4,29
58	6,54	6,51	6,48	6,44	4,45	4,29
59	6,54	6,51	6,38	5,79	4,50	4,40
60	6,48	6,47	6,45	6,41	6,39	6,07
61	6,40	6,39	6,28	6,01	3,92	3,64
62	6,45	6,44	6,14	5,83	4,62	4,35
63	6,56	6,51	6,18	5,99	4,45	4,32
64	6,55	6,51	6,49	6,11	4,47	4,31
65	6,54	6,49	6,18	5,80	4,30	4,26
66	6,64	6,41	6,33	6,04	4,43	4,25
67	6,54	6,49	6,31	6,04	4,41	4,29
68	6,56	6,49	6,49	6,48	6,48	5,20
71	6,41	6,14	5,81	5,31	4,04	3,66
77	6,52	6,47	6,30	6,09	4,93	4,43
80	6,37	6,30	6,21	6,03	4,62	4,34
82	6,39	6,21	6,18	5,91	4,59	4,33
83	6,56	6,55	6,43	6,12	4,68	4,31
84	6,57	6,43	6,38	6,14	4,46	4,31
85	6,50	6,38	6,21	6,03	5,03	4,39

Çizelge 3.7 (Devamı) 96 suşun farklı inkübasyon süreleri sonucundaki pH değişimleri

İzolat no	pH Ölçümleri					
	2 saat	4saat	6saat	8saat	24saat	48saat
95	6,57	6,49	6,37	6,18	4,51	3,84
97	6,54	6,39	6,21	6,04	4,88	4,45
98	6,54	6,54	6,51	6,50	6,46	6,40
99	6,38	6,29	6,11	5,87	4,01	3,63
100	6,54	6,48	6,01	5,79	4,52	4,41
101	6,41	6,38	6,17	6,01	4,65	4,47
102	6,56	6,41	6,23	5,89	4,51	4,43
103	6,34	6,17	5,89	5,31	4,57	4,35
104	6,37	6,29	6,11	6,03	4,52	4,41
105	6,33	6,32	6,24	6,11	4,60	4,35
106	6,40	6,26	6,17	5,89	4,50	4,28
107	6,37	6,34	6,21	6,11	4,44	4,34
108	6,37	6,23	6,19	5,78	4,59	4,40
109	6,37	6,24	6,17	5,99	4,56	4,25
110	6,30	6,29	6,14	5,89	4,70	4,43
111	6,40	6,31	6,17	5,84	4,00	3,65
112	6,30	6,17	6,09	5,93	4,45	4,24
113	6,55	6,55	6,50	6,41	4,52	4,39
114	6,52	6,49	6,34	6,08	4,50	4,36
115	6,56	6,55	6,48	6,03	4,49	4,38
116	6,55	6,53	6,39	6,17	4,47	4,34
117	6,54	6,51	6,50	6,49	6,49	6,04
118	6,56	6,48	6,28	6,11	4,26	4,33
119	6,29	6,28	6,19	6,01	4,63	4,34
KONTROL	6,56	6,55	6,54	6,54	6,54	6,36

3.5.2. Proteolitik aktivite

Skim milk agara ekim yapılarak suşların proteolitik aktiviteleri belirlenmiş ve cm cinsinden kayıt edilmiştir. Yalnızca 82 numaralı izolatın proteolitik aktiviteye sahip olmadığı görülmüştür. 96 izolattan; 5' i düşük (<0,80 cm), 3' ü yüksek (>2,10 cm), 87' si orta derecede proteolitik aktivite göstermiş, 1 izolat ise (82 numaralı izolat) proteolitik aktivite göstermemiştir (Çizelge 3.8).

3.5.3. Diasetil oluşumu

Laktik asit bakterileri sitratı kullanarak tat, koku ve lezzet veren çeşitli aroma bileşikleri meydana getirmektedirler. Bu metabolitlerden birisi de diasetildir. Diasetil

oluşumunu tespit etmek için UHT süte inokule edilmiş suşlara KOH ve α -naftol damlatılmıştır. Teste ait sonuçlar çizelge 3.5 de gösterilmektedir. Buna göre; 96 suşdan 38 suşun diasetil oluşturduğu, 58 suşun ise oluşturmadığı gözlenmiştir (Çizelge 3.8).

3.5.4. Dekstran üretimi

Dekstran yapışkan bir homopolisakkarittir. Suşların sükrozu kullanarak dekstran oluşturmalarına ilişkin sonuçlar Çizelge 3.8’ de gösterilmektedir. 96 suştan; 62 suşta sünme ile dekstran oluşumu gözlenmiş, 34 suşta gözlenmemiştir.

Çizelge 3.8 Diasetil oluşumu, dekstran üretimi ve proteolitik aktivite testleri sonuçları

İzolot no	Testler		
	Diasetil Oluşumu	Dekstran Üretimi	Proteolitik Aktivite(cm)
1	-	-	1,40
2	-	+	1,90
3	-	+	2,10
4	-	-	1,30
5	-	+	1,70
6	-	-	1,50
7	-	-	1,30
8	-	-	2,10
9	-	-	2,10
10	-	-	1,70
11	-	+	1,50
12	+	+	1
13	-	-	1,50
14	-	+	1
15	+	+	2
16	+	-	1,20
17	+	-	1,50
18	-	+	1,90
19	-	+	0,90
20	-	-	1
21	+	+	1,30
22	-	+	1,40
23	-	-	1,50
24	-	-	1,30
26	+	+	1,30
27	-	+	0,90
28	-	-	1,40
29	+	-	1,30
30	-	+	1,30
33	+	-	1,30
34	-	+	1,40

Çizelge 3.8 (Devamı) Diasetil oluşumu, dekstran üretimi ve proteolitik aktivite testleri sonuçları

İzolat Numarası	Testler		
	Diasetil Oluşumu	Dekstran Üretimi	Proteolitik Aktivite(cm)
35	-	+	1,60
36	-	+	1,60
37	-	+	1,20
38	-	+	1
39	+	+	1,60
40	-	-	1,40
41	-	-	1,70
42	+	+	1,40
43	-	-	1,70
44	-	+	1,30
45	-	-	1
46	-	+	2,10
47	+	+	0,70
48	-	-	1,60
49	+	+	1,20
50	-	-	1,40
51	-	+	1,10
52	-	+	2
53	-	+	1,20
54	+	+	2,20
55	+	-	1,30
56	+	-	1,50
57	+	-	1,10
58	-	-	1,20
59	+	+	1,20
60	+	-	1,30
61	-	+	1,40
62	-	+	1,10
63	-	+	1,20
64	+	+	1,20
65	+	+	1,50
66	+	+	1,40
67	-	+	1,20
68	-	+	1,40
71	+	+	0,70
77	-	+	0,80
80	-	+	1,80
82	-	-	0
83	+	+	1,50
84	-	-	1,80
85	-	+	0,80
95	+	+	1,20
97	-	+	0,30
98	-	+	0,60
99	+	+	0,90
100	-	+	1
101	+	+	2

Çizelge 3.8 (Devamı) Diasetil oluşumu, dekstran üretimi ve proteolitik aktivite testleri sonuçları

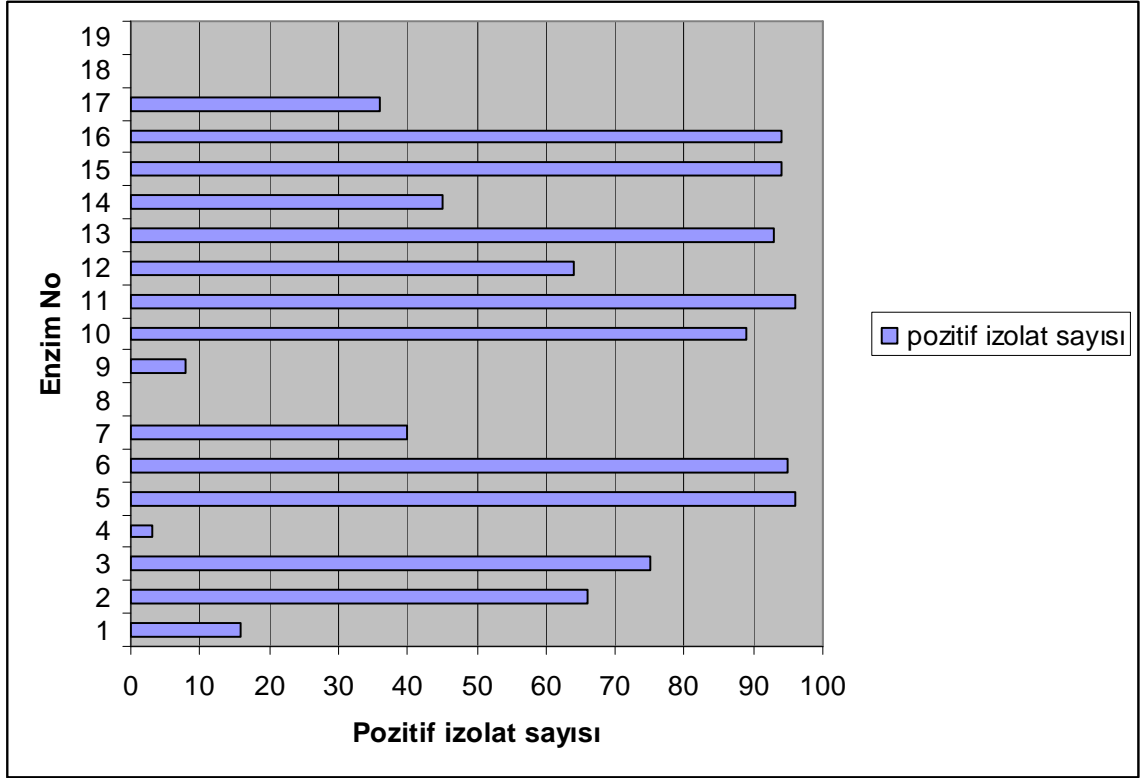
İzolat Numarası	Testler		
	Diasetil Oluşumu	Dekstran Üretimi	Proteolitik Aktivite(cm)
102	-	+	1
103	+	+	0,90
104	+	+	2,40
105	+	+	1,50
106	+	+	0,70
107	+	+	1,30
108	-	-	1
109	+	+	1
110	+	+	0,80
111	+	+	1,40
112	+	+	2,20
113	+	-	1,40
114	-	+	1,20
115	-	-	1,40
116	-	+	1,20
117	+	-	1,70
118	+	-	1,60
119	-	+	0,90

3.5.5. API ZYM enzim testi

Test kitinde bakteriler tarafından üretilen enzimler Şekil 3.4 de gösterilmiştir. Buna göre; peptidaz enzimlerinden lösin arilamidaz ve valin arilamidaz enzimlerinin, laktaz olarak bilinen β -galaktozidaz enziminin, karbonhidrat enzimlerinden ise α ve β -glukozidaz enzimlerinin üretimi suşların çoğunluğunda görülmüştür. Grafikte de görüldüğü gibi bu yoğun aktiviteyi esteraz-lipaz enzimlerinin aktivitesi izlemektedir.

Suşların çok azında veya hiçbirinde üretilmeyen enzimlerin ise lipaz, proteinazlar ve karbonhidrat enzimlerinden ise α -mannozidaz ve α -fukozidaz enzimlerinin üretiminin suşlar arasında giderek düştüğü görülmektedir.

Suşların API ZYM test kiti sonuçları Ek-3 de verilmiştir.



Şekil 3.3: API ZYM test kitindeki 19 enzim aktivitesi ve bu aktiviteyi gösteren izolat sayıları.

Çizelge 3.9 API ZYM test kitinde kullanılan enzimler ve numaraları

Enzim no	Enzim adı	Enzim no	Enzim adı
1	Alkalin fosfataz	11	Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz
2	Esteraz	12	α - galaktozidaz
3	Esteraz lipaz	13	β - galaktozidaz
4	Lipaz	14	β - glukronidaz
5	Lösin arilamidaz	15	α - glukozidaz
6	Valin arilamidaz	16	β - glukozidaz
7	Sistin arilamidaz	17	N-asetil- β -glukozaminidaz
8	Tripsin	18	α -mannozidaz
9	α - kimotripsin	19	α -fukosidaz
10	Asit fosfataz		



Şekil 3.4: NRRL-B442 *Lb. rhamnosus* standart suşuna ait API ZYM test kiti sonuçları

3.6. Suşların Probiyotik Olarak Kullanım Potansiyellerinin Belirlenmesi

3.6.1. 96 Suşun safrada canlı kalabilme yetenekleri

Yapılan safrada canlı kalabilme testinde farklı safra konsantrasyonlarında inkübasyona bırakılan suşlardan belirli aralıklarla MRS agara ekim yapılmıştır. MRS agarda gelişen hücre kolonileri sayılmıştır.

Suşların 34'ünün hiçbir safra konsantrasyonunda canlı kalamadığı görülmüştür.

1, 2, 28, 46, 50 ve 98 numaralı izolatların % 1, 2, ve 3 konsantrasyonlarda 8 saat süreyle canlı kalabildikleri görülmüştür (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10: Suşların safrada canlı kalabilme yetenekleri

İnkübasyon süresi (s.)	Safra Konsantrasyonu %											
	1				2				3			
	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8
İzolot no												
1	37	74	40	38	39	27	6	23	10	7	4	10
2	9	9	2	9	6	8	2	3	10	13	6	2
3	1	3	1	-	4	4	1	0	2	4	1	-
4	-	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	16	25	19	-	-	-	-	-	2	-	-
12	-	-	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	26	58	85	43	-	-	-	-	2	3	1	2
17	61	1	23	8	1	-	-	-	-	1	1	-
18	5	-	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	5	10	1	-	-	-	-	-	-	-	-
20	62	102	70	53	-	-	-	-	-	-	-	-
21	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	6	15	31	6	-	-	-	-	-	-	-	-
23	32	30	30	37	-	-	-	-	-	-	-	-
24	1	3	23	3	1	47	1	2	-	-	-	-
26	1	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
27	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	37	25	12	6	15	14	20	16	10	7	17	2
29	-	19	7	3	7	4	1	-	-	1	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-
35	3	9	12	-	1	5	3	-	3	6	-	5
36	-	27	20	2	-	-	-	-	-	-	-	-
37	64	4	1	2	-	1	-	-	2	1	-	1
38	48	8	30	20	1	27	-	-	-	1	1	-
39	-	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	2
40	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	10	41	30	43	1	2	1	-	2	-	-	1
45	41	-	-	47	4	1	1	-	-	-	-	-
46	4	9	16	5	9	9	2	3	12	11	5	8
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: üreme yok

Çizelge 3.10 (Devamı): Safrada canlı kalabilme yetenekleri

İnkübasyon süresi (s.) İzolot no	Safranın Konsantrasyonu %											
	1				2				3			
	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8
48	1	2	4	7	14	4	1	2	5	-	3	2
49	-	-	-	-	-	9	8	2	4	4	2	1
50	11	1	2	2	11	17	11	-	6	10	2	3
51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	3	11	4	-	-	-	5	6	-	-	-	-
54	31	17	11	12	-	-	-	-	-	-	-	-
55	49	39	25	42	-	-	-	-	-	-	-	-
56	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	40	43	55	44	-	-	-	-	-	-	-	-
58	5	2	3	4	1	-	-	-	-	-	-	-
59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62	3	-	-	1	-	-	-	23	-	7	-	-
63	61	47	67	110	-	-	-	-	1	1	-	-
64	76	41	73	81	-	-	-	-	-	-	-	-
65	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	-	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
77	-	1	-	18	-	8	4	1	2	-	1	1
80	1	1	2	-	-	-	1	1	-	-	-	-
82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83	91	43	52	26	-	-	-	-	-	-	-	-
84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
97	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
98	3	13	3	5	3	7	18	5	4	3	3	2
99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	-	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
102	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
103	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
105	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
107	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
108	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
109	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
110	-	-	1	2	4	4	3	-	1	1	1	-
111	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: üreme yok

Çizelge 3.10 (Devamı): Safrada canlı kalabilme yetenekleri

	Safra Konsantrasyonu %											
	1				2				3			
İnkübasyon süresi (s.)	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8
İzolot no												
112	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
113	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
114	1	1	-	-	-	5	5	1	1	-	-	-
115	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
115	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
116	25	92	98	121	10	25	23	11	-	1	-	-
117	14	11	21	14	-	-	-	-	-	-	-	-
118	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
119	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: üreme yok

3.6.2. Suşların mide asitliğine direnci

Suşlardan belirli saat aralıklarında (1, 2, 4 ve 8 saat) geliştikleri asit ortamlardan örnekler alınmış ve MRS agar yüzeyine ekimi yapılarak mide asitliğinde ne kadar süre canlı kalabildikleri tespit edilmiştir.

96 suşun tamamı pH 2 ve 3 de yoğun bir üreme göstermiştir. pH 1’de ise 96 suşdan 78 suş canlı kalmazken 11 suş ilk bir saat sonunda canlı kalabilmiştir. 7 suş ise 2’nci saatten sonra fark edilir şekilde canlılık özelliklerini gösterebilmiştir (Çizelge 3.11).

Çizelge 3.11: Mide asitliğine direnç

İzolot no	pH 1				pH 2				pH 3			
	1.s	2.s	4.s	8.s	1.s	2.s	4.s	8.s	1.s	2.s	4.s	8.s
1	+	-	-	112	+	+	+	-	++	++	++	-
2	+	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
3	37	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
4	+	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
5	-	-	-	-	+	40	+	55	++	++	++	37
6	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
7	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
8	-	-	-	-	+	+	+	105	++	++	++	++
9	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
10	-	-	-	5	+	+	+	+	++	++	++	++
11	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
12	-	-	-	-	+	+	+	67	++	++	++	++
13	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
14	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
15	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
16	-	-	-	-	+	+	+	66	++	++	++	++
17	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
18	-	-	-	-	+	++	+	+	++	++	++	++
19	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
20	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
21	-	-	+	-	+	+	+	+	++	++	++	++
22	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
23	-	-	+	-	+	+	+	+	++	++	++	++
24	-	-	-	-	+	69	+	+	++	++	++	++
26	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
27	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
28	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
29	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
30	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
33	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
34	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
35	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
36	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
37	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
38	-	+	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
39	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
40	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
41	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
42	58	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
43	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
44	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
45	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
46	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
47	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
48	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
49	31	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++

-: üreme yok

+: 140 dan fazla üreme

++:yoğun üreme

Çizelge 3.11 (Devamı) Mide asitliğine direnç

İzolot no	pH 1				pH 2				pH 3			
	1.s	2.s	4.s	8.s	1.s	2.s	4.s	8.s	1.s	2.s	4.s	8.s
50	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
51	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
52	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
53	-	-	-	32	+	+	+	+	++	++	++	++
54	-	+	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
55	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
56	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
57	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
58	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
59	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
60	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
61	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
62	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
63	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
64	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
65	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
66	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
67	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
68	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
71	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
77	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
80	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
82	6	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
83	9	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
84	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
85	+	+	135	-	+	+	+	+	++	++	++	++
95	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
97	35	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
98	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
99	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
100	-	-	-	1	+	+	+	+	++	++	++	++
101	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
102	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
103	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
104	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
105	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
106	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
107	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
108	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
109	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
110	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
111	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
112	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
113	+	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++

-: üreme yok

+: 140 dan fazla üreme

++:yoğun üreme

Çizelge 3.11(Devamı): Mide asitliğine direnç

İzolot no	pH 1				pH 2				pH 3			
	1.s	2.s	4.s	8.s	1.s	2.s	4.s	8.s	1.s	2.s	4.s	8.s
114	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
115	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
116	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
117	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
118	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
119	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
K	++											

-: üreme yok

+: 140 dan fazla üreme

++:yoğun üreme

3.6.3. Antibiyotik duyarlılık testi

MRS agar yüzeyine yayma ile suşların ekimi yapıldıktan sonra antibiyotik diskleri yerleştirilerek inkübasyona bırakılmıştır ve sonucunda oluşan zon oluşumları değerlendirilmiştir. Suşların 10 tanesinde hiçbir zon oluşumu gerçekleşmeyerek, bunların streptomycine karşı dirençli oldukları görülmüştür. 86 suşda ise zon oluşumu görülmüş ve bunların streptomisine duyarlı oldukları tespit edilmiştir.

Tüm suşların eritromisine karşı duyarlı oldukları tespit edilmiştir.

Tüm suşların amoksisiline karşı belirgin bir şekilde duyarlı oldukları belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan antibiyotikler içinde oluşan zon çapına bağlı en fazla hassasiyet de bu grupta görülmüştür.

Suşların tamamının penisilin, tetrasiklin, rampisin ve kloramfenikole benzer ölçülerde duyarlı oldukları tespit edilmiştir.

15 suşda vankomisine karşı direnç görülmüş, 81'inde ise hassasiyet gözlenmiştir.

Suşlardan sadece 107 numaralı izolatin gentamisine karşı dirençli olduğu, geri kalan 95 suşun ise tamamının gentamisine duyarlı oldukları tespit edilmiştir.

96 suşun tamamında nalidiksik asitin etkisiz kaldığı ve bu şekilde tamamının dirençli olduğu görülmüştür (Çizelge 3.12).

Çizelge 3.12: Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları

Kullanılan antibiyotikler	Protein sentezini inhibe eden antibiyotikler						Hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotikler			Nukleik asit sentezini inhibe eden antibiyotikler
	Streptomycin	Erytromycin	Gentamycin	Chloramphenicol	Tetracyclin	Rampisin	Amoxycillin	Penicilin	Vancomycin	Nalidixic asit
İzolat numaraları										
1	10 *	20 *	12	24	20	24	28	22	26 *	-
2	12 *	10	20	21	26	22	28	20	22 *	-
3	10 *	8	12	21	20	18	30	22	24 *	-
4	10 *	20	10	22	26	28	34	23	-	-
5	12	11	8	24	22	26	40	26	18	-
6	10 *	28	8	24	24	20	40	28	22 *	-
7	10 *	8	16 *	20	24	28	30	26	22 *	-
8	10 *	8	12	22	23	24	38	26	14 *	-
9	10	8	8 *	28	24	21	31	21	20 *	-
10	10	13	10 *	24	20	20	31	18	26 *	-
11	10	8	13	24	21	15	38	19	-	-
12	10	8	10	24	20	22	28	22	22	-
13	10 *	16*	12	24	28	28	38	26	22 *	-
14	6 *	8	8 *	23	28	22	35	27	24	-
15	8	12	8	26	20	24	28	24	24	-

* : Zon içinde üremeler görülmüştür.

-: üreme yok

Çizelge3.12 (Devamı) : Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları

Kullanılan antibiyotikler	Protein sentezini inhibe eden antibiyotikler						Hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotikler			Nukleik asit sentezini inhibe eden antibiyotikler
	Streptomycin	Erytromycin	Gentamycin	Chloramphenicol	Tetracyclin	Rampisin	Amoxycillin	Penicillin	Vancomycin	Nalidixic asit
İzolot numaraları										
16	8 *	8	10	20	20	24	38	26	24	-
17	10 *	10	10*	24	18	19	34	22	16 *	-
18	10 *	12	11	28	21	22	38	22	24 *	-
19	10	10	12	20	26	28	38	22	20	-
20	6	8	10	22	28	24	38	24	14 *	-
21	8	8	9	23	24	22	35	20	20 *	-
22	10	8	12	24	28	20	34	26	22	-
23	10	10 *	12	22	18	24	34	22	22 *	-
24	8 *	10	10	26	24	25	32	28	22	-
26	8 *	11	16	26	24	21	30	21	6 *	-
27	10 *	8	12	24	22	26	36	20	23	-
28	10 *	10	10 *	24	22	24	32	20	22 *	-
29	10	8 *	12	22	20	24	40	26	22 *	-
30	10 *	8	8	18	21	24	29	23	22 *	-
33	10	8	6 *	24	22	24	34	24	20	-

* : Zon içinde üremeler görülmüştür.

-: üreme yok

Çizelge 3.12 (Devamı) : Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları

Kullanılan antibiyotikler	Protein sentezini inhibe eden antibiyotikler						Hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotikler			Nukleik asit sentezini inhibe eden antibiyotikler
	Streptomycin	Erytromycin	Gentamycin	Chloramphenicol	Tetracyclin	Rampisin	Amoxycillin	Penicillin	Vancomycin	Nalidixic asit
İzolat numaraları										
34	10 *	22	10	26	20	22	40	22	22	-
35	12	10 *	10 *	24	20	20	40	24	20 *	-
36	10 *	8	12	20	24	20	40	28	24 *	-
37	10	10	10 *	26	20	21	36	22	20	-
38	8	5	8	21	18	22	32	22	18 *	-
39	10	5	13 *	22	20	19	34	18	20	-
40	6 *	8 *	10	30	20	24	40	20	20 *	-
41	10 *	10	12	20	21	21	26	18	22 *	-
42	10 *	10	10	23	20	24	34	24	20	-
43	10 *	12	10 *	28	25	24	30	24	22 *	-
44	10	18	19 *	23	18	18	31	23	22 *	-
45	8	10	10*	21	20	24	30	20	24	-
46	8	10	10 *	24	20	20	30	22	24 *	-
47	10 *	20	8	23	25	21	28	22	-	-
48	10	10	8 *	26	20	22	40	24	-	-
49	-	16	6	23	20	21	31	22	-	-

* : Zon içinde üremeler görülmüştür.

-: üreme yok

Çizelge 3.12 (Devamı) : Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları

Kullanılan antibiyotikler	Protein sentezini inhibe eden antibiyotikler						Hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotikler			Nukleik asit sentezini inhibe eden antibiyotikler
	Streptomycin	Erytromycin	Gentamycin	Chloramphenicol	Tetracyclin	Rampisin	Amoxycillin	Penicillin	Vancomycin	Nalidixic asit
İzolat numaraları										
50	10	20	6	25	18	20	26	20	22 *	-
51	-	8	6 *	24	22	22	34	26	20 *	-
52	-	24	6	26	22	22	40	22	-	-
53	10 *	8	10 *	26	20	22	38	24	22 *	-
54	8	8	12	23	19	22	26	21	20 *	-
55	10	10	10 *	20	18	22	32	22	22 *	-
56	8	6	12	30	18	20	26	21	20 *	-
57	8 *	8	10	30	24	22	38	22	22 *	-
58	10	10	8	19	20	24	30	20	24	-
59	8 *	10	8 *	26	26	22	40	24	10*	-
60	8	12	10 *	26	24	24	26	28	-	-
61	10	24	8	21	18	20	38	22	-	-
62	-	16	8 *	24	14	18	30	16	-	-
63	-	8	8 *	28	24	20	32	20	12 *	-

* : Zon içinde üremeler görülmüştür.

-: üreme yok

Çizelge 3.12 (Devamı) : Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları

Kullanılan antibiyotikler	Protein sentezini inhibe eden antibiyotikler						Hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotikler			Nukleik asit sentezini inhibe eden antibiyotikler
	Streptomycin	Erytromycin	Gentamycin	Chloramphenicol	Tetracyclin	Rampisin	Amoxycillin	Penicillin	Vancomycin	Nalidixic asit
İzolat numaraları										
64	12	14	14	22	18	24	36	20	28 *	-
65	12 *	20	10	26	22	28	30	24	24 *	-
66	6 *	8	10 *	26	22	26	34	20	22 *	-
67	6	10	10 *	24	22	22	32	22	24	-
68	10	11	12	22	21	27	32	24	24	-
71	10 *	20	10 *	24	26	28	36	24	20 *	-
77	10 *	10	20 *	22	20	24	40	26	20 *	-
80	10 *	20	12 *	20	18	24	30	20	-	-
82	8 *	24	10 *	24	28	24	40	26	10	-
83	10	8	12 *	26	20	20	34	20	20 *	-
84	10	8	10	20	24	22	29	25	20 *	-
85	-	20	20	22	24	20	34	20	-	-
95	10	24	10	24	20	22	40	22	22 *	-
97	10	20	18 *	22	20	24	32	24	20 *	-

* : Zon içinde üremeler görülmüştür.

-: üreme yok

Çizelge 3.12 (Devamı) : Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları

Kullanılan antibiyotikler	Protein sentezini inhibe eden antibiyotikler						Hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotikler			Nukleik asit sentezini inhibe eden antibiyotikler
	Streptomycin	Erytromycin	Gentamycin	Chloramphenicol	Tetracyclin	Rampisin	Amoxycillin	Penicilin	Vancomycin	Nalidixic asit
İzolot numaraları										
98	10	10	6 *	26	22	25	34	16	24	-
99	10	24	8 *	22	16	20	34	20	-	-
100	10 *	8	14 *	21	16	20	40	20	21*	-
101	-	21	12*	22	22	20	34	18	20 *	-
102	20 *	10	8 *	22	20	20	36	22	20 *	-
103	14 *	20	18 *	20	20	26	36	20	20 *	-
104	10	8	10 *	24	24	22	40	26	22 *	-
105	18 *	20	10	24	18	22	36	22	20 *	-
106	10 *	20	12 *	20	28	22	40	26	16 *	-
107	6	20	-	24	21	20	21	22	-	-
108	-	25	10	24	21	25	34	26	18 *	-
109	10 *	22	11 *	24	28	26	32	24	18	-
110	10	12	6	26	25	16	29	21	26 *	-
111	10 *	20	12 *	24	25	24	38	28	20 *	-
112	-	24	10 *	18	20	20	32	21	-	-

* : Zon içinde üremeler görülmüştür.

-: üreme yok

Çizelge 3.12 (Devamı) : Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları

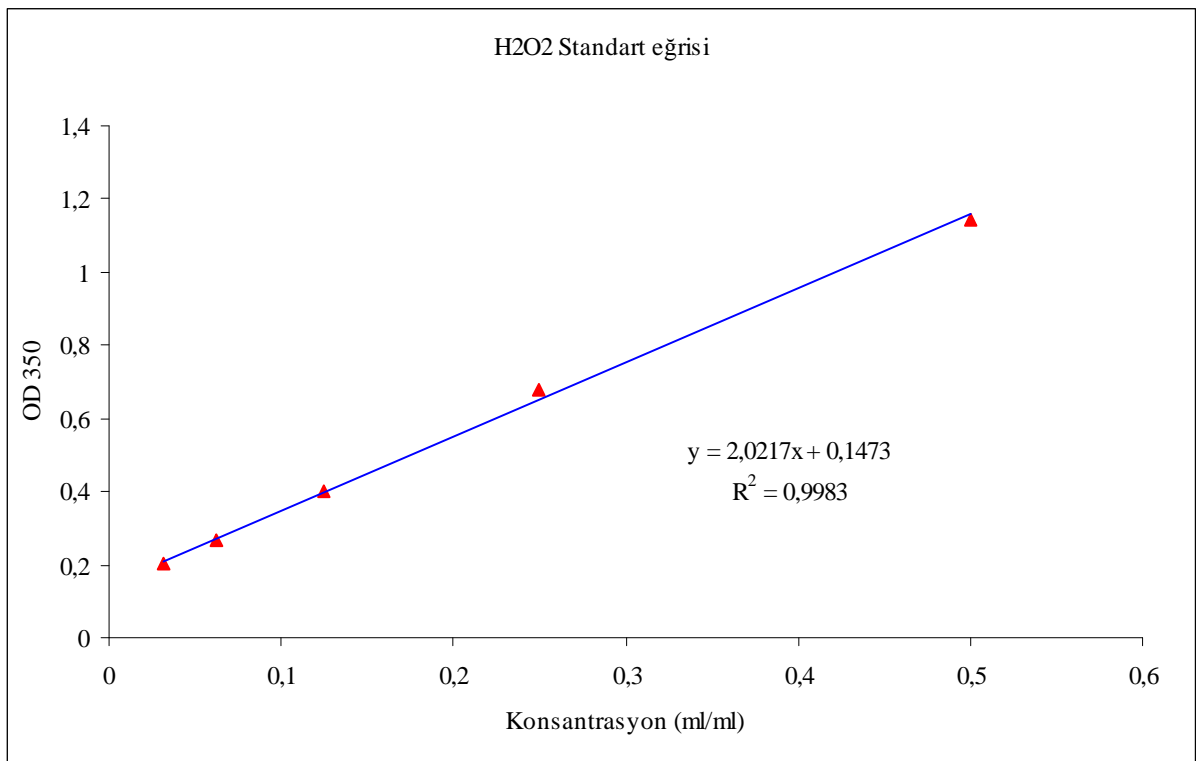
Kullanılan antibiyotikler	Protein sentezini inhibe eden antibiyotikler						Hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotikler			Nukleik asit sentezini inhibe eden antibiyotikler
	Streptomycin	Erytromycin	Gentamycin	Chloramphenicol	Tetracyclin	Rampisin	Amoxycillin	Penicillin	Vancomycin	Nalidixic asit
İzolat numaraları										
113	6 *	8 *	8 *	24	24	22	40	28	22	-
114	-	10	8	27	24	12	29	22	-	-
115	10 *	22	8 *	18	14	20	34	20	24 *	-
116	8 *	10 *	6	23	20 *	23	32	20	20	-
117	10	10 *	10 *	20	22	24	30	28	22 *	-
118	12	10 *	10 *	28	20	22	26	24	20 *	-
119	10	25	6	20	24	24	39	22	20 *	-

* : Zon içinde üremeler görülmüştür.

-: üreme yok

3.6.4. Hidrojen peroksit (H₂O₂) üretme yetenekleri

LAB izolatlarımızın MRS broth kültür ortamında H₂O₂ meydana getirip getirmediğini belirlemek için, öncelikle bir standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 3.5). Bu standart eğriye göre Çizelge 3.13 deki H₂O₂ konsantrasyonları (v/v) belirlenmiştir.



Şekil 3.5: H₂O₂ standart eğrisi

Çizelge 3.13: LAB nin H₂O₂ üretimleri

İzolat No	H ₂ O ₂ Konsantrasyonu (µl/ml)	İzolat No	H ₂ O ₂ Konsantrasyonu (µl/ml)
1	0.85	52	0.99
2	1.00	53	1.07
3	0.91	54	1.05
4	0.99	55	0.92
5	0.97	56	0.99
6	1.45	57	1.03
7	0.93	58	1.17
8	0.58	59	1.28
9	0.91	60	1.12
10	1.15	61	1.31
11	0.84	62	1.07
12	0.95	63	0.98
13	1.08	64	0.84
14	0.86	65	0.87
15	1.16	66	0.90
16	1.26	67	1.01
17	0.94	68	0.91
18	1.10	71	0.96
19	1.13	77	1.02
20	1.09	80	0.96
21	1.30	82	1.20
22	1.05	83	0.99
23	1.12	84	1.02
24	1.13	85	1.01
26	1.25	95	1.06
27	3.00	97	1.04
28	1.06	98	1.08
29	1.57	99	0.53
30	1.18	100	0.99
33	1.17	101	1.05
34	0.64	102	1.02
35	0.625	103	1.02
36	1.21	104	1.07
37	0.50	105	1.02
38	1.32	106	1.10
39	1.51	107	0.48
40	1.51	108	1.04
41	1.54	109	1.04
42	2.30	110	1.10
43	0.32	111	1.02
44	0.50	112	1.01
45	2.90	113	0.99
46	1.11	114	1.04
47	1.75	115	1.05
48	1.61	116	1.08
49	1.69	117	0.37
50	1.58	118	0.60
51	1.08	119	0.49

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Laktik asit bakterileri (LAB) fermente süt ve süt ürünleri başta olmak üzere, fermente et ürünleri, turşu vb. gıdaların yapımında kullanılmaktadır. LAB'lar Gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyan bakterilerdir. Fermentatif metabolizma sonucu laktik asit üretilirler. Bütün LAB'lar anaerobik olarak büyüyebilirler, dolayısı ile aerotolerant organizmalardır. Başlıca yeleri ise Laktobasiller, Laktokoklar, Enterokoklar, Bifidobakterler ve Streptokoklardır (Uçar, 2008).

Bu alışmada; Kargı yöresine ait farklı olgunluklardaki 7 peynir rneği ile çalışılmıştır. Yöresel olarak üretilen ve endüstriyel olarak üretimi yapılmayan bu peynirden LAB izolasyonu ve tanımlaması yapılmış, peynirlerden izole edilen suşların starter kültür özellikleri araştırılmıştır.

Kullandığımız peynir örneklere ait kimyasal analiz sonuçları incelendiğinde rutubet, titre edilebilir asitlik, toplam protein, yağ ve tuz oranlarının da oldukça değişken olduğu belirlenmiştir. Bu duruma, farklı kalitede süt kullanımının, üretimde farklı yöntemler kullanılmasının neden olduğu düşünülmektedir.

Peynirlerden LAB izolasyonu aşamasında MRS, M17 agar, salisinli-NA, % 7,5 tuz içeren NA, % 10 tuz içeren NA besiyerleri kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda mekik şeklinde, mat ve krem rengine, tipik koloniler seçilerek saflaştırılmıştır. Elde edilen izolatlardan 96 tanesinin istenen özelliklerde (Gram pozitif, katalaz negatif ve sporsuz) olduğu belirlenmiştir ve stoklanmıştır.

Uygulanan Gram boyama sonucunda izolatların; 52'si (% 54) basil, 39'u (% 41) kok, 5'i (% 5) ise kokobasil olarak belirlenmiştir.

Peynirin endüstriyel üretiminde, belli bir standartta ürün elde edebilmek için homofermentatif starter kültürler tercih edilmektedir. Laktik asit bakterileri glikozun taşınması ve katabolize edilmesi sonucu 2 mol laktat ve 2 mol ATP üretilir ise bu homolaktik yolizinin kullanıldığını, 1 mol glikozdan 1 mol ATP, 1 mol laktat, 1 mol CO₂ ve etanol/asetat üretilirse bu heterolaktik yolizinin kullanıldığını gösterir (Kılıç, 2001).

Çalışmamızda yaptığımız izolasyon sonucunda; kok morfolojisindeki 39 bakteriden; 11 tanesi heterofermentatif, 28 tanesi homofermantatif olarak belirlenmiştir.

Basil morfolojisindeki 52 bakteriden; 26 tanesi heterofermentatif, 26 tanesi homofermentatif olarak belirlenmiştir. Kokobasil morfolojisindeki 5 bakteriden 2'si heterofermentatif, 3'ü homofermantatif olarak belirlenmiştir.

Laktik asit bakterilerinin büyümeleri pH 3,6 ile pH 4 aralığında sınırlanır (Sneath ve ark, 1986). İzole ettiğimiz LAB olması muhtemel bakterilerinin pH 3,9' da sınırlanıp sınırlanmadığını tespit etmek için bakteriler pH 3,9 ortamına ekilmiştir. Bütün izolatlar pH 3,9'da gelişme göstermiştir.

Laktik streptokoklarla enterokokları ayırmak için; pH 9,6'da kokların üremelerine bakılmıştır. Yapılan testin sonucunda tüm kok morfolojisindeki izolatlarımızın ürediği görülmüştür.

Yapılan fizyolojik testlere ek olarak API CH50 ve API 20STREP test kitleri kullanılarak izolatların cins/tür düzeyinde tayinleri yapılmıştır. Buna göre 22 izolat *Lb. plantarum* (1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 17, 19, 21, 23, 33, 40, 42, 45, 82, 108, 109, 110, 116, 117), 11 izolat *Lb. brevis* (2, 11, 34, 35, 37, 44, 46, 51, 85, 114, 119), 9 izolat *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (13, 36, 39, 41, 43, 48, 49, 115, 118), gliserol ve rhamnoz karşılaştırma testleri yapılmasına rağmen; 8 izolat *Enterococcus durans/faecium* (4, 14, 61, 62, 80, 97, 98, 106), 1 izolat *E. gallinarum/casseliflavus* (24), 1 izolat *E. faecium/gallinarum* (54), 1 izolat *E. faecium/faecalis* (107), 1 izolat ise *Streptococcus acidominimus/pluranimalium* (16) olarak tanımlanmıştır. 9 izolat *E. durans* (77, 95, 99, 100, 101, 103, 105, 111, 113), 5 izolat *E. faecium* (53, 71, 102, 104, 112), 3 izolat *Lb. pentosus* (15, 38, 83), 3 izolat *Lb. fermentum* (18, 28, 50), 1 izolat *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* (27), 1 izolat *Lb. rhamnosus* (84), 3 izolat *St. thermophilus* (29, 52, 67), 1 izolat *Streptococcus sp.* (16), 1 izolat *St. mitis* (56), 1 izolat *St. equinus* (59), 1 izolat *Aerococcus viridans* (57), 1 izolat *Granulicatella adiacens* (*Streptococcus adjacens*, Bouvet et al. 1989) (66), 7 izolat *Gemella morbillorum*(55, 58, 60, 63, 64, 65, 68) olarak tanımlanırken; 6 izolat (12, 20, 22, 26, 30, 47) tanımlanamamıştır.

Aguirre ve Collins (1993); *Enterococcus faecalis*'den sonra *E. faecium*'un en yaygın patojen enterokok türü olduğunu, *Aerococcus viridans*'ın ise endokardite neden olduğunu belirtmişlerdir. *Gemella* ve *Granulicatella* türlerinin de endokardite neden olduğu belirtilmiştir (American Heart Association, 2007). *St. mitis* olarak tanımladığımız türün ise Rossetti ve ark. (2008) peynirin yapımı sırasında kontaminasyon ile geliştiğini düşünmektedirler.

Şengül (2006) tarafından yöresel peynirlerimizden Erzurum Civil peynirinin mikrobiyal kalitesi üzerine yapılan çalışmada; peynirin mikrobiyotasında ağırlıklı LAB türünün *Lb. malefermentas* olduğu ve peynirdeki diğer türlerin ise *Lb. fermentum*, *Lb. parabuchneri* ve *Lb. vaccinostercus* oldukları bildirilmiştir. Kargı tulum peynirinden bizim izole ettiğimiz LAB türü ağırlıklı olarak *Lb. plantarum*'dur. Bunu *Lb. brevis* (11 izolat), *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (9 izolat), *Enterococcus* sp. (11 izolat) ve *E. durans* (9 izolat) takip etmektedir.

Rantsiou ve ark. (2008); Yunan peynirinin mikrobiyotasını incelemişler ve peynirden izole ettikleri türlerin ağırlıklı olarak *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. coryniformis*, ve *Lb. fermentum* olduğunu bildirmişlerdir.

Torres- Llanez ve ark. (2006) ise; Meksika'da ticari olarak üretilen taze peynirde enterokoklar arasında baskın türlerin *E. faecium* olduğunu ancak inceledikleri peynirin *E. durans* ve *E. faecalis*'i de içerdiğini bildirmişlerdir.

Öksüztepe ve ark. (2005); Şavak tulum peyniri ile yaptıkları çalışmada peynirin ilk olgunlaşması aşamasında *Streptococcaceae* familyasının oranının *Lactobacillaceae* familyasından daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ancak olgunlaşma süreci ilerlediğinde *Lactobacillaceae*'nin arttığı görülmüştür.

İzole edilen türlerin starter kültür özelliklerine sahip olup olmadıklarını belirlemek için yapılmış testlerin başında bakterilerin buldukları ortamın pH'ı üzerine etkilerine (UHT sütü asitleştirme kapasitesi) bakılmıştır. 48 saat sonunda yapılan ölçümlerde sütün pH'ını 4'ün altına düşüren suşlar; 4, 5, 6, 7, 13, 14, 15, 26, 30, 33, 42, 47, 49, 61, 71, 95, 99 ve 111 olarak tespit edilmiştir. Bunlar *Lactobacillus*, *Enterococcus* ve tanımlanamayan türleri içermektedirler. 53, 60, 98 ve 117 numaralı suşlar sütün pH'sını 6'nın altına düşürmemiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda suşlarımızdan *Lb. plantarum*, *Enterococcus* sp. ve *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* suşlarının ortamı hızla asitleştirdiği görülmüştür.

Garabal ve ark. (2008); pH'ı ilk 6 saat içinde 5'lere düşürebilen bakterilerin peynir üretiminde starter türler olarak kullanılabilirliklerini söylemişlerdir. Bulut ve ark. (2004); çömlük peyniri ile yaptıkları bir çalışmada ise sütü asitleştiren bir starter kültürün ilk 6 saatlik inkübasyon sonunda pH'ı 6,6 dan 5,3 e düşürmesi gerektiğini bildirmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar arasında ortam pH'ını 5,81- 5,97 arasında

indirenler; 5, 7 (*Lb. plantarum*), 30, 103 (*E. durans*) ve 71 (*E. faecium*) numaralı izolatlardır. Ortamı hızlı asitleştirebilme özellikleriyle bu suşların starter kültür hazırlamada kullanılabilecekleri düşünülebilir.

Dağdemir ve ark. (2008), Türkiye’de üretilen beyaz salamura peynirle yaptıkları çalışmada; *Lactobacillus* türlerinin 6 saatlik inkübasyon sonunda en düşük asit aktivitesine sahip türler olduklarını, 24 saat sonunda ise *Lb. plantarum* ve *Lb. casei* türlerinin en yüksek asit aktivitesi gösteren türler olduklarını belirlemişlerdir.

Proteoliz sonucu oluşan peptidler, aminoasitler ve sitrat metabolizması sonucu oluşan diasetil ile birlikte peynirde tat ve kokunun oluşmasında etkin rol oynamaktadır. İzolatlar arasında en yüksek proteolitik aktiviteye sahip türlerin Enterokoklar olduğu görülmüştür. 82 numaralı izolat hariç tüm suşlar proteolitik aktivite göstermiştir, bununla birlikte bu izolatta diasetil oluşumunda görülmemiştir. Proteolitik aktivite de ise *E. faecium/gallinarum* ve *E. faecium* da yüksek proteolitik aktivite belirlenmiştir.

Diasetil oluşumu gösteren; 12, 15, 16, 17, 21, 26, 29, 33, 39, 42, 47, 49, 54, 55, 56, 57, 59, 60, 64, 65, 66, 71, 83, 95, 99, 101, 103, 104, 105, 106, 107, 109, 110, 111, 112, 113, 117 ve 118 numaralı izolatlarda diasetil oluşumu tespit edilmiştir. Bu nedenle de bu izolatların ikincil mikrobiyotayı oluşturduğu düşünülmektedir. Yapılan tür teşhisine göre bu izolatlar ağırlıklı olarak *Enterococcus* türlerini içermektedir.

Dekstran bir homopolisakkarit olup gıda endüstrisinde reçel yapımında, dondurma yapımında, kristallenmeyi önlemek için, nemlendirmeyi arttırmada kullanılmakta ve gıdalarda lezzet farklılaşmasına neden olmaktadır (Qader et al.,2006). Süt ürünlerinde istenen dokunun oluşmasında, mikroorganizmanın veya ortamın kurumaya karşı korunmasında dekstran görev alır (Kılıç, 2001). Yaptığımız çalışmada belirlenen 62 suşda (% 65) dekstran üretimi olduğu belirlenmiş; bunun diasetil oluşumu ve proteolitik aktivite ile birlikte lezzet çeşitlenmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

Gürsoy ve Kınık (2006); Enterokoklardan *E. faecium*, *E. durans* ve *E. faecalis* türlerinin proteolitik aktivitelerinin peynir teknolojisinde yararlı ve yerinde olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, enterokokların geleneksel peynirlerin olgunlaşmasında ve aroma gelişiminde önemli rol oynadıklarını bildirmişlerdir.

Garabal ve ark. (2008); Galicia’da üretilen peynirlerle yaptıkları çalışmada *Lactobacillus* türlerinin pastörize sütlerde güçlü aroma etkisinin olduğunu belirtirken,

Leuconostoc türlerinin ise çok düşük düzeylerde diasetil-asetoin ürettiklerini bildirmişlerdir.

Süt yağı lipaz enziminin etkinliği ile yağ asidi ve gliserole parçalanır. Laktik asit bakterilerinin lipaz aktivitesi tür ve cinslere göre farklılık gösterir. Lipolitik aktivite sonucu oluşan serbest yağ asitleri karakteristik peynir aroması aroması oluştururlar. Bunun yanı sıra peynirin olgunlaşması sırasında tat ve tekstür oluşmasında etkilidirler (Kılıç, 2001).

API ZYM test kiti kullanılarak izole ettiğimiz suşların bazı biyokimyasal faaliyetleri incelenmiş ve enzimatik aktivitelere bakılmıştır. Peynir yapımında starter olarak kullanılacak suşların, yüksek esteraz-lipaz ve peptidaz aktivitesinin olması ancak zayıf proteinaz aktivitesine sahip olması tercih edilir (Arora, et al., 1990). Suşların esteraz-lipaz enzim aktivitelere bakıldığında esteraz ve esteraz lipaz üretimi olmayan suşların lipaz enzimini de üretmediği görülmüştür. Esteraz-lipaz enzimi 96 suşdan 75 suşta üretilmektedir. Esteraz-lipaz enziminin etkinliği safra tuzları varlığında çok yüksektir. Yağların sindiriminde aktif olan lipaz enzimi ise sadece 13, 43 ve 60 numaralı suşlarda üretilmektedir. Yaptığımız tanımlamaya göre bu suşlardan ikisinin *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* olduğu, diğer suşun ise *Gemella morbillorum* olduğu görülmüştür.

Beta- galaktozidaz enzimi laktaz enzimi olup, laktozu parçalayan enzimdir. Bu enzimin 96 suştan 93 suşta üretilbildiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda izole ettiğimiz suşların büyük çoğunluğunun peptidaz üretebildiği görülmüştür. Çalışmamızda kimotripsin ve alfa-kimotripsin proteinaz enzimlerinin üretimine bakılmıştır. Kimotripsin enziminin suşların hiçbirinde üretilmediği görülürken alfa-kimotripsinin yalnızca 8 suşta üretildiği görülmüştür. Bunların çoğunun ise *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* suşuna ait oldukları görülmüştür.

Probiyotik özellikteki bakterilerin yararlı etkilerini gösterebilmek için canlı olarak çok sayıda barsak sistemine ulaşmaları gerekmektedir. Canlı olarak sindirim sisteme geçebilmeleri için midenin asidik ortamından zarar görmeden ve sayılarında azalma olmadan geçerek barsak sistemine ulaşmaları ve burada da canlılık özelliklerini yitirmemeleri gerekir. Bu nedenle de probiyotik olarak seçilecek mikroorganizmalar;

safra tuzuna karşı ve mide asitliğine karşı dirençli olmalıdır ve bu koşullarda uzun süre canlı kalabilmelidir.

Çalışmamızda suşların farklı safra konsantrasyonlarında canlılıklarını koruyabilme özellikleri belirlenmiştir. *Lb. plantarum* olarak tanımlanan 1, 23 ve 116 numaralı izolatlar, *Lb. brevis* olarak tanımlanan 2 ve 46 numaralı izolatlar, *Lb. fermentum* olarak tanımlanan 28 ve 50 numaralı izolatlar, *Lb. pentosus* olarak tanımlanan 83 numaralı izolat, *E. durans/faecium* olarak tanımlanan 98 numaralı izolat, *S. acidominimus/pluranimalium* olarak tanımlanan 16 numaralı izolatlar yüksek safra tuzu konsantrasyonlarında (% 1- 3) 8 saat süreyle canlılıklarını koruyabilmişlerdir. Safra konsantrasyonu arttıkça tüm dirençli izolatların canlı hücre sayısının azaldığı görülmüştür.

Mide pH'ı 1- 3 arasında değişim göstermektedir. Uzun süre asit ortamda canlı kalabilen bakteriler probiyotik olarak seçilmelidir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgulara göre; farklı asit konsantrasyonlarında en iyi dayanıklılığı gösteren türler *Lb. plantarum* (21, 23) ve *Lb. brevis* (85) olarak belirlenmiştir. Chou ve Weimer (1999); çalışmaları sonucu asit ve safra toleransının birlikte ele alınmasının gereğini vurgulamışlardır.

Çalışmamıza benzer olarak Tsuda ve ark.(2007); yaptıkları çalışmada *Lb. plantarum* suşunun asit ve safraya karşı dirençli olduğunu ortaya koymuşlardır.

Probiyotikler hastalıkların tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli olmalıdırlar. Çalışmada hücre duvarı sentezini inhibe eden, protein sentezini inhibe eden ve nukleik asit sentezini inhibe eden toplam 10 farklı antibiyotik kullanılmıştır. İzolatların tamamının nalidiksik asite karşı dirençli olduğu ancak; eritromisin, amoksisilin, penisilin, tetrasiklin, kloramfenikol ve rampisine karşı hassas oldukları görülmüştür. İzolatlardan 4, 11, 47, 48, 49, 52,60, 61, 62, 80, 85, 99, 107, 112 ve 114'ün vankomisine; 49, 51, 52, 62, 63, 85, 101, 108,112 ve 114 numaralı izolatların streptomisine karşı dirençli olduğu görülmüştür. Yalnızca 107 numaralı izolat gentamisine karşı dirençlilik göstermiştir.

Yaptığımız çalışmada vankomisine karşı dirençlilik gösteren suşlar ağırlıklı olarak *Enterococcus* türleridir. Lactobasillerden ise *Lactobacillus brevis* türüdür.

Facklam ve ark. (1989); vankomisine karşı direnç gösteren, insanlardan izole ettikleri bakteriler üzerinde yaptıkları çalışmada kullandıkları farklı *Lactobacillus* suşlarının % 90 kadarının vankomisine dirençli olduğunu belirlemişlerdir.

Elde ettiğimiz bulgulara benzer olarak Georgieva ve ark. (2008); peynirden izole ettikleri farklı *Lb. plantarum* suşları ile yaptıkları antibiyotik duyarlılık testi sonucu antibiyotiklere duyarlılığın ve hassasiyetin suşlar arasında farklılık gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Hamilton ve ark. (1997); laktobasillerle yaptıkları çalışmada çalıştıkları *Lactobacillus* türlerinin özellikle de *Lb. acidophilus* ve *Lb. delbreuckii*'nin % 90'ının gentamisin, ve eritromisine, % 83'ünün tetrasikline duyarlı olduğunu belirlemişlerdir. Diğer *Lactobacillus* türlerinin ise (*Lb. rhamnosus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* var. *rhamnosus*) vancomisine karşı dirençli olduğunu belirlemişlerdir.

Hidrojen peroksit (H_2O_2) bakteriyosin benzeri bir maddedir. LAB tarafından üretilen H_2O_2 farklı bakteriler üzerinde toksik etkiye sahiptir. En duyarlı bakteri grubu Gram negatif bakterilerdir (Kılıç, 2001).

Çalışmamızda izolatlarımızın ürettiği hidrojen peroksit miktarları 0,32 μ l/ml ile 3 μ l/ml arasında değişmektedir. En az H_2O_2 üreten tür 43 (*Lb. paracasei* subsp. *paracasei*) numaralı izolat olarak belirlenirken; en yüksek üretimin olduğu tür ise 27 (*Lb. curvatus* subsp. *curvatus*) numaralı izolat olarak belirlenmiştir.

Aslım ve ark. (2000), yoğurt starterleri tarafından oluşturulan hidrojen peroksit ve diğer metabolitlerin tek tek ve kombine inhibisyon etkilerini belirlemişlerdir. *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* bakterilerinin metabolitlerinin *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* suşları üzerine etkileri ile ilgili çalışmalarında *L.bulgaricus* suşlarının ürettikleri hidrojen peroksit miktarının 0,46 μ g/ml ve *S.thermophilus* bakteri suşlarınınkini ise 0,31 μ g/ml olarak bulmuşlardır. Ancak bu laktik asit bakterilerinin kontaminant mikrobiyota üzerindeki inhibisyon etkisinin olmadığını belirtmişlerdir.

Sonuç olarak, esteraz-lipaz ve peptidaz aktivitesi yüksek ve proteinaz aktivitesi düşük suşların aynı zamanda homofermentatif olduklarından, kargı tulum peynirinin endüstriyel üretiminde starter kültür olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Peynir örneklerinden ağırlıklı olarak izole edilen tür *Lb. plantarum* olmuştur, bunu *Lb. brevis*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* ve *E. durans* izlemiştir. Bunlar arasında; tuza ve asidik pH'a dirençli, güçlü ve hızlı asitleştirme kapasitesinde, yüksek esteraz-lipaz ve peptidaz aktivitesine ve zayıf proteinaz aktivitesine sahip, homofermentatif olan izolatlar bulunmaktadır. Hızlı bir şekilde asit oluşturmaları (6 saatte) nedeniyle; 5, 7 (*Lb. plantarum*), 103 (*E. durans*) ve 71 (*E. faecium*) numaralı izolatlar starter kültür olabilecek türlerdir.

Lb. pentosus (15), *Lb. plantarum* (3, 8, 9), *E. faecium* (112), *Lb. brevis* (46) izolatları, güçlü proteolitik aktiviteye sahip olmaları, nispeten hızlı asitleştirme kapasitesine sahip olmaları, asidik pH'a dirençli olmaları, dekstran, diasetil üretmeleri nedeniyle, Kargı tulum peynirinin endüstriyel üretiminde, starter kültür hazırlama çalışmalarında kullanılabilir. Ayrıca *Lb. brevis* (37 ve 44), *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (43) ve *E. faecium* (71) izolatlarının; % 1- 3 safra tuzu konsantrasyonlarında ve pH 1-3 arasında canlı kalabilmeleri nedeniyle, probiyotik olarak kullanım potansiyeline sahip oldukları düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aguirre, M. and Collins, M.D., 1993, Lactic Acid Bacteria and Human Clinical Infaction, *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 95-107p
- American Heart Association, 2007, Infective Endocarditis, AHA Scientific Statement, 404p
- Arora, G., Lee, B.H. and Lamoureux, M., 1990, Characterization Of Enzyme Profiles Of Lactobacillus Casei Species By A Rapid API ZYM System, *Journal Of Dairy Science*, 73, 264-273p.
- Aslım, B., Beyatlı, Y. ve Halkman, K., 2000, Yoğurt Starter Kültür Metabolitlerinin İnhibisyon Etkisi, *Turk J Biol.*, Tübitak, 24, 65-78s.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L. and Cogan T.M., 2001, Recent Advances In Cheese Microbiology, *International Dairy Journal*, 11, 259-274p.
- Bozoğlu, F.T., Ray, B., 1996, Lactic Acid Bacteria Current Advances In Metabolism, Genetics And Applications, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, H-98.
- Bulut, Ç., Güneş, H., Okuklu, B., Harsa, Ş., Kılıç, S., Çoban H.S. and Yenidünya, A.F., 2005, Homofermentative Lactic Acid Bacteria of a Traditional Cheese, Çömlek Peyniri From Cappadocia Region, *Journal of Dairy Research*, 72, 19-24p.
- Caridi, A., 2003, Identification And First Characterization Of Lactic Acid Bacteria Isolated From The Artisanal Ovine Cheese Pecorino del Poro, *Society of Dairy Technology*, 105-110p.
- Chou, L. and Weimer, B., 1999, Isolation and characterization of acid and bile tolerant isolates from strains of Lactobacillus acidophilus, *Dairy science*, 82, 23-31p.
- Çakır, İ. ve Çakmakçı, M.L., 2004, Probiyotikler: Tanımı, Etki Mekanizması, Seçim Ve Güvenilirlik Kriterleri, *Gıda Teknolojisi Derneği*, 29(6), 427-434s.
- Dağdemir, E. and Özdemir, S., 2008, Technological Characterization of The Natural Lactic Acid Bacteria of Artisanal Turkish by Pickled Cheese, *International Journal of Dairy Technology*, 61(2), 133-140p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Dost, A., Yenikan, H., Okumuş, F. ve Işıklı, N.D., 2004, Bazı Geleneksel Peynirlerin Üretim Yöntemleri, Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, Filiz Matbaacılık San. ve Tic Ltd. Şti., Ankara, 271-274s.
- Erdoğan, A. and Gürses, M., 2005, Lactic Acid Bacteria Isolating From Blue Mouldy Tulum Cheese Produced With *Penicillium roqueforti*, International Journal of Food Properties, 8(2), 405-411p.
- Facklam, R., Hollis, D. and Collins, M.D., 1989, Identification of Gram Positive Coccal and Coccobacillary Vancomycin Resistant Bacteria, Journal of Clinical Microbiology, 27 (4), 724-730p.
- Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A. and Poznanski, E., 2008, Biodiversity and Technological Potential of Wild Lactic Acid Bacteria From Raw Cows' Milk, (in press).
- Garabal, J.I., Alonso, P.R. and Centebo, J.A., 2007, Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated From Raw Cows' Milk Cheeses Currently Produced in Galicia (NW Spain), LWT- Food Science and Technology 41, 1452- 1458p.
- Georgieva, R.N., Illiev, I.N., Chipeva, V.A., Dimitonova, S.P., Samelis, J. and Danova, S.T., 2008, Identification and In Vitro Characterization of *Lactobacillus plantarum* Strains From Artisanal Bulgarian White Brined Cheeses, Journal of Basic Microbiology, 48, 234-244p.
- Göktepe, I., Junaja, V.K. and Ahmedna, M., 2005, Probiotics In Food Safety and Human Health, Taylor & Francis Group, 512p.
- Gürsoy, O. ve Kınık, Ö., 2005, Laktobasiller ve Probiyotik Peynir Üretiminde Kullanım Potansiyelleri, Pamukkale Üniv. Mühendislik Bilimleri Derg., 11(3), 361-371s.
- Gürsoy, O. ve Kınık, Ö., 2006, Peynir Teknolojisinde Enterokoklar-I: Biyokimyasal Özellikleri ve Peynir Teknolojisindeki Önemleri, Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg., 43(3), 79-90s.
- Halttunen, T., Callado, M.C., El-Nezami, H., Merilioto, J. and Salminen, S., 2007, Combining Strains Of Lactic Acid Bacteria May Reduce Their Toxin And Heavy Metal Removal Efficiency From Aqueous Solution, Letters In Applied Microbiology, 46, 160-165p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Halttunen, T., Salminen, S. And Tahvonen R., 2006, Rapid Removal Of Lead And Cadmium From Water By Specific Lactic Acid Bacteria, International Journal Of Food Microbiology, 114, 30-35p.
- Hamilton-Miller, J.M.T. and Shah, S., 1997, Vancomycin Susceptibility As An Aid To The Identification Of Lactobacilli, Lettrs In Applied Microbiology, 26, 153-154p.
- İşleroğlu, H., Yıldırım, Z. ve Yıldırım, M., 2008, Yöresel Peynirden Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip Laktik Asit Bakterisinin İzolasyonu Ve Tanısı, GOÜ.Ziraat Fakültesi Dergisi, 25(1), 1-6s.
- Kılıç, S., 2001, Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri, Ege Üniv. Ziraat Fak. Yayınları, 542s.
- Microlog Minutes, 2003, Differentiating Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria, 1 (1), 1-3p.
- Milci, S. Ve Yaygın, H., 2005, Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritler Ve Süt Ürünlerindeki Fonksiyonları, Gıda Teknolojisi Derneği, 30 (2), 123-129s.
- Osmanağaoğlu, Ö. and Beyatlı, Y., 2002, The Use Of Bacteriocins Produced By Lactic Acid Bacteria In Food Biopreservation, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derg., 32, 294-306p.
- Öksüztepe, G., Patır, B. and Çalıcıoğlu, M., 2005, Identification And Distrubution Of Lactic Acid Bacteria During The Ripening Of Şavak Tulum Cheese, Turk J vet. Anim. Sci., 873-879p.
- Özden, A., 2006, Probiyotik Sağlıklı Yaşam İçin Yararlı Dost Bakteriler, Danone Enstitüsü Derneği, Ankara, 16-34-36s.
- Quader, S.A.U., Iqbal, L., Aman, A., Shireen, E. and Azhar, A., 2005, Production of Dextran by Newly Isolated Strains of Leuconostoc mesenteroides PCSIR-4 and PCSIR-9, Turkish Journal of Biochemistry, 31 (1), 21-26p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Rantsiou, K., Urso, R., Dolci, P., Comi, G. and Cocolin, L., 2008, Microflora of Feta Cheese From Four Grek Manufacturers, *International Journal Of Food Microbiology*, 126, 26-42p.
- Rossetti, L., Fornasari, M.E., Gatti, M., Lazzi, C., Neviani, E. and Giraffa, G., 2008, Grana Padano Cheese Whey Starters: Microbial Composition and Strain Distribution, *International Journal Of Food Microbiology*, 127, 168-171p.
- Sneath, P.H.A. and Mair, N.S., 1986, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.2, Williams & Willkins, USA.
- Stanley, G., 1998, "Cheeses" In: *Microbiology of Fermented Foods*, Blackie Academic & Professional, London, 263-307p.
- Swan, S., 2005, *Türkiye'nin Peynir Hazineleri*, Boyut Yayıncılık Ve Ticaret A.Ş, İstanbul.
- Şengül, M., 2006, Microbiological Characterization Of Civil Cheese, A Traditional Turkish Cheese: Microbiological Quality, Isolation And Identification Of Its Indigeous Lactobacilli, *World Journal Of Microbiology & Biotechnology*, 22, 613- 618p.
- Temiz, A., 1996, *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri*, Hatiboğlu Yayınları, Ankara.
- Temmerman, R., Huys, G. and Swings, 2004, Identification Of Lactic Acid Bacteria: Culture- Dependent And Culture-Independent Methods, *Trends In Food Science & Technology*, 15, 348-359p.
- Tunail, N., 2009, *Mikrobiyoloji*, Danone Enstitüsü Derneği, Ankara, 434s.
- Tok, E. ve Aslım, B., 2007, Probiyotik Olarak Kullanılan Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Kolesterol Asimilasyonu Ve Safra Tuzları Dekonjugasyonundaki Rollerini, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derg.*, 37(1), 62-68s.
- Torres-Llanez, M.J., Vallejo-Cordoba, B., Diaz-Cinco, M.E., Mazorra-Manzano, M.A. and Gonzalez-Cordova, A.F., 2006, Characterization Of The Natural Microflora of Artisanal Mexican Fresco Cheese, *Food Control*, (In Press).

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Tsuda, H., Hara, K. and Miyamoto, T., 2007, High-Bile And Low Ph-Resistant Lactic Acid Bacteria Isolated From Traditional Fermented Dairy Products In Inner Mongolia, China, Milk Science, 55, 129-134p.

Uçar, F., Tamer, A.Ü., Yaşa, İ. ve Koçyiğit, A., 2008, Prokaryotik Çeşitlilik, İzmir Güven Kitabevi, 252-256s.

Vural, H., 1993, Ağır Metal İyonlarının Gıdalarda Oluşturduğu Kirlilikler, Çevre Dergisi, 8, 3- 8s.

Wijtzes, T., Bruggeman, M.R., Nout, M.J.R. and Zweiering, M.H., 1997, A Computerised System For The Identification Of Lactic Acid Bacteria, International Journal of Food Microbiology, 38, 65-70p.

<http://www.uniprot.org/taxonomy/46124> (*Streptococcus adjacens* Bouvet et al. 1989) (29.05.2010)

Ek-1

Çizelge: API CH50 sonuçları

k.h	İZOLAT NUMARALARI																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
13	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	D	-	+	+	-	-	+	D	+	D	-	+	+	-	+	-	-	-	-	D	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
19	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
20	+	-	+	-	+	+	D	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
21	-	-	+	D	-	-	-	D	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
22	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
23	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
24	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	D	+
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
26	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
27	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
28	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

D:değişken

Çizelge: API CH50 sonuçları(devamı)

k.h	İZOLAT NUMARALARI																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	15	16	17	18	19	20	21	22	23
29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
30	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
31	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
32	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
33	+	-	D	+	-	-	-	-	-	-	-	+	D	-	+	-	-	-	-	+	-
34	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
35	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
36	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	D	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	D	-	+	-	-	-	+
40	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	D	-	-	-	-	D	D	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-
47	D	-	D	D	-	-	D	D	D	D	-	-	D	-	D	-	D	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	-	-	D	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

D:değişken

Çizelge: API CH50 sonuçları(devamı)

k.h	İZOLAT NUMARALARI																				
	26	27	28	29	30	33	34	35	36	37	38	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
13	+	+	D	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	D	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
19	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
21	-	-	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
23	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
24	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
26	+	+	D	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+

D:değişken

Çizelge: API CH50 sonuçları(devamı)

k.h	İZOLAT NUMARALARI																				
	26	27	28	29	30	33	34	35	36	37	38	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
27	+	+	D	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
28	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
29	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
30	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-
31	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
32	+	+	D	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
33	+	D	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
34	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	-	D	-	+	-	D	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

D:değişken

Çizelge: API CH50 sonuçları(devamı)

k.h	İZOLAT NUMARALARI																
	50	51	71	82	83	84	85	99	108	109	110	114	115	116	117	118	119
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	D	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
5	+	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	D	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
11	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
13	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
19	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
20	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	D	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
22	D	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
23	-	-	+	+	+	+	-	D	+	+	+	-	D	+	+	-	-
24	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
25	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
26	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
27	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
28	+	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+	D	+	+	+	+
29	+	D	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

D:değişken

Çizelge: API CH50 sonuçları(devamı)

k.h	İZOLAT NUMARALARI																
	50	51	71	82	83	84	85	99	108	109	110	114	115	116	117	118	119
30	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
31	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
32	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
34	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
35	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	D	+	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	D	+	-	-
40	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
47	D	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	+	D	D	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

D:değişken

Çizelge: API CH50 sonuçları(devamı)

k.h	İZOLAT NUMARALARI							
	Lb. paracasei	NRRL- B442	NRRL- B1837	NRRL- B548	NRRL- B633	NRRL- B1951	NRRL- B1840	NRRL- B4496
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	D	-	-	-	-	-	+	+
5	+	+	+	+	-	-	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+
14	-	+	-	-	-	-	-	-
15	-	D	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-
18	D	+	+	+	+	+	-	+
19	-	+	-	+	-	+	-	+
20	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	+	-	D	+	+	+	-
22	+	+	+	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+	-	+
24	+	+	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	-	+	+	-
26	+	+	+	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+	+	+	+

D:değişken

Çizelge: API CH50 sonuçları(devamı)

k.h	İZOLAT NUMARALARI							
	Lb. paracasei	NRRL- B442	NRRL- B1837	NRRL- B548	NRRL- B633	NRRL- B1951	NRRL- B1840	NRRL- B4496
28	+	+	+	+	+	+	+	+
29	+	+	+	+	+	+	+	+
30	D	+	+	+	+	+	+	+
31	+	+	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+	+	+	+
33	-	-	-	-	+	-	-	-
34	+	+	+	+	-	+	-	+
35	-	-	-	-	+	+	+	+
36	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-
39	+	D	+	D	+	+	+	-
40	+	+	-	+	+	+	+	+
41	-	+	-	-	-	-	-	-
42	+	+	+	+	+	+	+	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-

D:değişken

Çizelge: API CH50 ile test edilen karbonhidratlar

1 Gliserol	11 D- glukoz	21 Metil α D- glukopiranozit	31 D-sakkaroz	41 D- liksoz
2 Eritritol	12 D- fruktoz	22 N- asetilglukozamin	32 D-trehaloz	42 D- tagatoz
3 D- arabinoz	13 D- mannoz	23 Amigdalin	33 İnulin	43 D- fukoiz
4 L- arabinoz	14 L- sorboz	24 Arbutin	34 D- melezitoz	44 L- fukoiz
5 D- riboz	15 L- ramnoz	25 Eskulin	35 D- rafinoz	45 D- arabitol
6 D- ksiloz	16 Dulkitol	26 Salisin	36 Amidon	46 L- arabitol
7 L- ksiloz	17 İnoizitol	27 D- sellobioz	37 Glukojen	47 Potasyum glukonat
8 D- adonitol	18 D- mannitol	28 D- maltoz	38 Ksilitol	48 Potasyum 2- ketoglutanat
9 Metil β D- ksilopranozid	19 D- sorbitol	29 D- laktoz	39 Gentiobioz	49 Potasyum 5- ketoglutanat
10 D- galaktoz	20 Metil α D- mannopiranozit	30 D- melibioz	40 D-turanoz	

Çizelge: API 20STREP sonuçları (devamı)

İzolat no.	Enzimler																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
67	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
68	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
77	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
80	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
95	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
97	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
98	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
99	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
100	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
101	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
102	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
103	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
104	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
105	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
106	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
107	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
111	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
112	+	+	+		+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
113	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Lactococcus lactis	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
NRRL-B1118	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
NRRL-B2354	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
NRRL-B4496	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-

Çizelge: API Strep20 ile test edilen enzimler

1 VP	8 2-naftil fosfat	15 D-laktoz
2 Hipurik asit	9 L-lözin β -naftilamid	16 D-trehaloz
3 Eskulin	10 L-arjinin	17 inulin
4 piroglutamik asit β -naftilamid	11 D-riboz	18 D- rafinoz
5 6-bromo 2-naftil- α D galactopiranozid	12 L-arabinoz	19 Amidon
6 naftol ASBI-glukuronik asit	13 D-mannitol	20 Glikojen
7 2-naftil β D galactopiranozid	14 D-sorbitol	21 Hemoliz testi

Çizelge: API ZYM test sonuçları (devamı)

ENZİM NO	İZOLAT NUMARALARI									
	NRRL- B548	NRRL- B1837	NRRL- B4496	NRRL- B442	NRRL- B1118	NRRL- B1951	NRRL- B2354	NRRL- B633	NRRL- B1840	Lb. paracasei
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
7	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
16	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
17	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
19	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Çizelge: APIZYM ile belirlenen enzimlerin sıralaması ve substratları

Enzimler	Enzim substratları
2. Esteraz	2- naftil butirat
3. Esteraz lipaz	2- naftil caprilat
4. Lipaz	2- naftil miristat
5. Lösin arilamidaz	L- lösil- 2- naftilamid
6. Valin arilamidaz	L- valil- 2- naftilamid
7. Sistin arilamidaz	L- sistil- 2- naftilamid
8. Tripsin	N- benzol-DL- arjinin- 2- naftilamid
9. α - kimotripsin	N- glutaril-fenilalenin- 2- naftilamid
1. Alkalın fosfataz	2- naftil fosfat
10. Asit fosfataz	2- naftil fosfat
11. Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz	Naftol- AS- BI- fosfat
12. α - galaktozidaz	6- Br- 2- naftil- α D- galaktopiranozid
13. β - galaktozidaz	2- naftil- β D- galaktopiranozid
14. β - glukronidaz	Naftol- AS- BI- β D- glukronid
15. α - glukozidaz	2- naftil- α D- glukopiranozid
16. β - glukozidaz	6- Br- 2- naftil- β D- glukopiranozid
17. N-asetil- β -glukozaminidaz	1- naftil-N- asetil- β D-glukozaminid
18. α -mannozidaz	6- Br- 2- naftil- α D- mannopiranozid
19. α -fukosidaz	2- naftil- α L- fukopiranozid