

***Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TÜRÜNE AİT
SUŞLARIN BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ
VE TUTUKLAMAMANIN BU ÖZELLİKLER ÜZERİNE ETKİSİ**

Hatice BÖKE

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AĞUSTOS 2005
ANKARA**

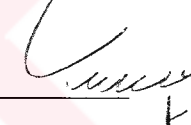
Hatice BÖKE tarafından hazırlanan "*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TÜRÜNE AİT SUŞLARIN BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE TUTUKLAMAMANIN BU ÖZELLİKLER ÜZERİNE ETKİSİ" adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

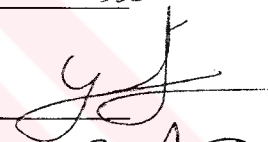


Prof. Dr. Belma ASLIM

Tez Yöneticisi

Bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Yavuz Beyoğlu 

Üye : Prof. Dr. Gönel Dinmez 

Üye : Prof. Dr. Belma ASLIM 

Üye : _____

Üye : _____

Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.



***Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TÜRÜNE AİT SUŞLARIN
BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE
TUTUKLAMANIN BU ÖZELLİKLER ÜZERİNE ETKİSİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

Hatice BÖKE

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ağustos 2005**

ÖZET

Bu çalışmada, köy yoğurtlarından izole edilen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait suşların probiyotik, starter özellikleri ve tutuklamanın bu özellikler üzerine etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Toplam 23 adet *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşunun laktik asit üretimleri ve antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Suşların laktik asit üretimleri 0,03-0,1 g/L arasında bulunmuştur. Laktik asit üretimi düşük, orta ve yüksek değerlerde 4 suşun D-LDH enzim aktiviteleri 0,63-1,54 µmol. dk./mg, toplam laktat dehidrogenaz enzim aktiviteleri ise 1,51-3,69 µmol. dk./mg arasında belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite sonuçlarına göre *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait suşların % 91'i *A. hydrophila* 106 üzerine, % 87'si *P. aeruginosa* ATCC 29212 üzerine, % 87'sinin *Y. enterocolitica* ATCC 1501 üzerine, % 83'si *S. enteritidis* RSKK 171 üzerine, % 65'i *B. cereus* RSKK 863 suşu üzerine, %57 *M. luteus* NRLL-B 4375 suşu üzerine, % 48'i *S. aureus* ATCC 25923 ve % 43'ü *E. coli* ATCC 11230 suşu üzerine inhibisyon etkisi göstermiştir. Asit üretimleri, EPS üretimleri ve antimikrobiyal aktivite sonuçlarına göre seçilen 4 suşun asit ve safra dirençlilikleri belirlenmiştir. Asitliğe en dirençli olan suş *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 iken, en dirençsiz suş ise *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 22 olarak

belirlenmiştir. Yine bu 4 suşun, %0,3 lük safra tuzuna dirençlilikleri % 28,6- % 35,7 değerleri arasında bulunmuştur. Bu suşlar arasında safra tuzuna karşı en dirençli olanı *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3' dür. Probiyotik olarak önemli özelliklere sahip olan *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 suşu tutuklama çalışmalarında kullanılmıştır. Tutuklanarak +4 °C saklanan hücrelerin canlılıklarında ilk 15 gün bir düşme gözlenmemiştir. 15 günden sonra düşüşler başlamıştır. Tutuklanan hücrelerin asit üretimleri ile tutuklanmayan hücrelerin asit üretimleri arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Fakat EPS üretimlerine bakıldığında tutuklanan hücrelerin tutuklanmayan hücrelere kıyasla daha az EPS ürettikleri belirlenmiştir. Tutuklanan hücrelerde belirgin bir şekilde safra tuzunun değişik konsantrasyonlarına karşı direncin daha fazla olduğu gözlenmiştir. Yine penisilin-G ve nisin gibi öldürücü maddelere karşı tutuklanan hücrelerde çok önemli bir direnç gözlenmiştir. Tutuklanan ve tutuklanmayan hücrelerin *B. cereus* RSKK 863, *P. aeruginosa* ATCC 29212 ve *E. coli* ATCC 11230 test bakterileri üzerine inhibisyon etkilerinde bir fark gözlenmemiştir. Tutuklamanın probiyotik ve starter özellikler üzerine olumlu etkileri olduğu belirlenmiştir.

Bilim kodu : 216

Anahtar Kelimeler : Probiyotikler, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, EPS, laktik asit, asit dirençliliği, safra dirençliliği, antimikrobiyal aktivite, tutuklama

Sayfa Adedi : 99

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Belma ASLİM

DETERMINATION OF SOME PROBIOTIC PROPERTIES OF
Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* STRAINS AND
EFFECT OF IMMOBILIZATION ON THESE PROPERTIES
(M. Sc. Thesis)

Hatice BÖKE

GAZI UNIVERSITY,
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
August 2005

ABSTRACT

In the study, it has been targetted to determine the some probiotic and starter features of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains, isolated from hand-made yoghurt, and the effects of immobilization on these features. It has been determined antimicrobial activity and the production of lactic acid of 23 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains. The amount of lactic acid, determined by enzymatic method, was found between 0.03-0.1 g/L. The enzymatic activity of D-LDH was determined between 0.63-1.54 $\mu\text{mol. dk./mg}$, total lactat dehydrogenaze was determined between 1.51-3.69 $\mu\text{mol. dk./mg}$ of 4 strains that produce low, medium and high amount of lactic acid. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains had an inhibitory effect on the 91% of *A. hydrophila* 106 strain, on the 87% *P. aeruginosa* ATCC 29212 strain, on the 87% *Y. enterocolitica* ATCC 1501 strain, on the 83% *S. enteriditis* RSKK 171 strain, on the 65% *B. cereus* RSKK 863 strain, 57% *M. luteus* NRLL-B 4375 strain, strain, on the 48% *S. aureus* ATCC 25923 strain and on the 43% *E. coli* ATCC 11230 strain. After this point, because of acid and EPS production and antimicrobial effect, 4 strains were selected to use for other studies. It has been determined the resistance against low acidity and bile salts of these 4 strains. It has been determined that the

acidity and bile salts of these 4 strains. It has been determined that the most resistance strain against low acidity is *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 and the least resistance strain is *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 22. The resistance against 0.3 % bile salt was found between 28.6 %-35.7 % and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 was the most resistance strain against bile salt. For immobilization, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 strain that has important probiotic properties was used. During first 15 days, it has not seen a decrease of viability of the immobilized cells which were stored at +4 °C. But after these 15 days, a decrease of viability of the immobilized cells was started to determine. It has not seen any difference between the productions of lactic acid made by immobilized cells and made by free cells. But it has been determined difference between the production of EPS made by immobilized cells and made by free cells. At immobilized cells, it has been determined clear resistance against variety concentration of bile salt. Also, this clear resistance was obtained against penicillin-G and nisin. For both immobilized and free cells, there was not any difference antimicrobial effect against *B. cereus* RSKK 863, *P. aeruginosa* ATCC 29212 and *E. coli* ATCC 11230 strains. It has been determined that immobilization has positive effects on probiotic and starter properties.

Science code : 216

Keywords : Probiotics, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, EPS, lactic acid, resistance against low acidity and bile salt, antimicrobial effect, immobilization

Page Number : 99

Advises : Prof Dr. Belma ASLIM

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren aydınlatıcı değerlendirmeleri ve yakın ilgisiyle sürekli beni destekleyen, tezin yönlendirilmesi ve yürütülmesi sırasında büyük emeği geçen, sayın danışman hocam Prof. Dr. Belma ASLİM' a ve Prof. Dr. Yavuz BEYATLI' ya, laboratuvar çalışmaları sırasında bana destek ve yardımcı olan Araş. Gör. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ' a ve diğer Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışanlarına, tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hep arkamda hissettiğim canım annem Yaşar BOZKURT ve babam Mehmet BOZKURT'a, ayrıca çalışmalarımda bana moral desteği veren ve beni yüreklendiren sevgili eşim Kaan BÖKE' ye, teşekkürümü bir borç bilirim. Bu tez Gazi Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenen 05/2002-65 kodlu proje içerisindedir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. Probiyotik Fermente Süt Ürünleri.....	4
2.1.1. Tanımı, tarihçesi ve özellikleri.....	4
2.1.2. Probiyotik yoğurt.....	7
2.2. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar.....	10
2.3. Probiyotik Mikroorganizma Seçim Kriterleri	11
2.4. Probiyotik Amaçlı Kullanılabilecek <i>Lactobacillus</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri.....	12
2.5. <i>Lactobacillus</i> Cinsi Bakterilerin Metabolik Ürünleri.....	15
2.5.1. Laktik asit	15
2.5.2. EPS (Ekzopolisakkarit).....	18

Sayfa

2.6. Probiyotik Mikroorganizmaların Etki Mekanizması	20
2.7. Probiyotik Mikroorganizmaların İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri	20
2.7.1. Bağırsak sistemi üzerindeki etkileri	20
2.7.2. Mide üzerindeki etkileri	22
2.7.3. Laktoz intolerans üzerindeki etkileri	23
2.7.4. Kolesterol düşürücü etkisi	24
2.7.5. Antikanserinojenik etkisi	25
2.7.6. Antimikrobiyal etkisi.....	26
2.7.7. Bağışıklık sistemine etkisi	27
2.7.8. Vitamin metabolizmasını iyileştirme etkisi	27
2.7.9. Böbrek rahatsızlıklarını iyileştirme etkisi	28
2.7.10. Karaciğer rahatsızlıkları üzerine etkisi	28
2.7.11. Kalp rahatsızlıkları üzerine etkisi	29
2.7.12 . Zehirlenme üzerine etkisi	29
2.7.13. İdrar yolları enfeksiyonu üzerine etkisi	29
2.7.14. Deri üzerine olumlu etkisi	30
2.8. Tutuklama (İmmobilizasyon)	30
2.8.1. Taşıyıcı (Destek Materyali)	31
2.9. Mikroorganizma Tutuklanması	32
2.9.1. Tutuklanmış mikroorganizmaların serbest mikroorganizmalara göre avantajları	33

Sayfa

2.10. Mikroorganizma Tutuklama Yöntemleri	34
2.11. Probiyotik Mikroorganizmaların Tutuklanması	37
3. MATERYAL VE METOD.....	40
3.1. Materyal.....	40
3.1.1. Materyal örnekleri.....	40
3.1.2. Bakterilerinin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları.....	41
3.1.3. Araştırmada kullanılan besi yerleri.....	42
3.2. Metod.....	43
3.2.1. Bakterilerin muhafazası.....	43
3.2.2. Suşların üreme eğrisinin çıkarılması	43
3.2.3. <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> türlerinin antimikrobiyal etkisi	44
3.2.4. <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> suşlarının D (-) laktik asit üretimlerinin tespiti.....	45
3.2.5. D- Laktat dehidrogenaz ve toplam laktat dehidrogenaz enzimlerinin spesifik aktiviteleri.....	45
3.2.6. EPS üretiminin belirlenmesi.....	48
3.2.7. Asit dirençliliğinin belirlenmesi.....	49
3.2.8. Safra tuzlarına dirençliliğin belirlenmesi.....	50
3.2.9. <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> hücrelerinin küresel Ca-Alginat taneciklerine tutuklanması	51
3.2.10. Tutuklama sonrası kürelerin içindeki canlı hücre miktarının tespiti.....	52
3.2.11. Tutuklanmış ve serbest hücrelerin penicilin-G ve nisin dirençliliğinin belirlenmesi.....	52
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	53

Sayfa

4.1. <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Türünün Üreme Eğrisi.....	53
4.2. <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Türüne Ait Suşların Bazı Patojen Mikroorganizmalar Üzerine İnhibisyon Etkisi	53
4.3. <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> türüne Ait Suşların Laktik Asit Üretimleri.....	58
4.4. D-Laktat dehidrogenaz ve Toplam Laktat dehidrogenaz Enzimlerinin Spesifik Aktiviteleri	59
4.5. EPS Üretimi	60
4.6. <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Türüne Ait Bazı Suşların Asit Dirençliliği	60
4.7. <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Türüne Ait Bazı Suşların Safratuzlarına Dirençliliği	61
4.8. Hücrelerinin Küresel Ca-Alginat Taneciklerine Tutuklanması	61
4.9. Tutuklama Sonrası Kürelerin İçindeki Canlı Hücre Miktarı.....	62
4.10. Tutuklanmış ve Serbest <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B3 Hücrelerinin Laktik asit ve EPS Üretimleri.....	63
4.11. Tutuklanmış ve Serbest <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B3 Hücrelerinin Asitlik ve Safratuzlarına Dirençlilikleri	64
4.12. Tutuklanmış ve Serbest <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B3 Hücrelerinin Penicilin-G ve Nisin Dirençlilikleri	66
4.13. Tutuklanmış ve Serbest <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B3 Hücrelerinin Bazı Patojen Mikroorganizmalar Üzerine Etkisi	66
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	69
KAYNAKLAR.....	88
ÖZGEÇMİŞ.....	99

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Ticari probiyotik süt ürünleri ve bunlar hakkında bazı bilgiler	7
Çizelge 2.2. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar.....	11
Çizelge 3.1. Çalışmamızda kullandığımız bakteri kodları	41
Çizelge 4.1. <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> türüne ait suşların genel inhibisyon zon çapları (mm).....	56
Çizelge 4.2. <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> türüne ait suşların ürettiği D(-) laktik asit (g/L) miktarları.....	58
Çizelge 4.3. <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> türüne ait suşların spesifik enzim aktiviteleri.....	59
Çizelge 4.4. Seçilen suşların EPS üretim miktarları.....	60
Çizelge 4.5. Suşların asit dirençliliği.....	60
Çizelge 4.6. Suşların safra dirençliliği.....	61
Çizelge 4.7. Günlere göre küreler içerisindeki canlı hücre sayısı.....	63
Çizelge 4.8. Tutuklanmış ve serbest <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B3 suşuna ait hücrelerin laktik asit ve EPS üretim miktarları.....	64
Çizelge 4.9. Tutuklanmış ve serbest <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B3 hücrelerinin asit dirençlilikleri.....	65
Çizelge 4.10. Tutuklanmış ve serbest <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B3 hücrelerinin safra tuzlarına dirençlilikleri.....	65
Çizelge 4.11. Tutuklanmış ve serbest <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B3 hücrelerinin Penicilin-G ve Nisin dirençlilikleri.....	66
Çizelge 4.12. Tutuklanmış ve serbest <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B3 hücrelerinin genel inhibisyon zon çapları (mm).....	67

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Laktik bakterilerde laktoz ve galaktozun homofermentatif metabolizması.....	16
Şekil 2.2. Hücre tutuklama yöntemleri.....	34
Şekil 4.1. <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B3 suşunun üreme eğrisi	53



RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> türünün morfolojik görüntüsü....	14
Resim 2.2. Kürelerin elektron mikroskop görüntüsü.....	37
Resim 2.3. Alginat matriksi içerisine tutuklanan <i>L. acidophilus</i> 'un elektron mikroskop görüntüsü.....	37
Resim 4.1. <i>B. cereus</i> RSKK 863 suşu üzerine <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B3 suşunun oluşturduğu inhibisyon zonu.....	55
Resim 4.2. Tutuklanmış hücrelerin yer aldığı Ca-Alginat küreler.....	62
Resim 4.3. Tutuklanmış <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B3 hücrelerinin <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 29212 üzerine gösterdiği inhibisyon etkisi.....	67
Resim 4.4. Tutuklanmamış <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B3 hücrelerinin <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 29212 üzerine gösterdiği inhibisyon etkisi.....	68

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

°C

Açıklama

Santigrat derece

nm

Nanometre

µg

Mikrogram

µL

Mikrolitre

µm

Mikrometre

M

Molar

pH

Asitlik Bazlık Birimi

spp

Species (Türleri)

subsp

Subspecies (Alt Tür)

Kısaltmalar

ATCC

American Type Culture Collection

Bkz.

Bakınız

Cfu

Coloni forming unit

Eş

Eşitlik

LAB

Laktik Asit Bakterileri

LDH

Lactat dehidrogenaz

MRS

Man-Rogosa Sharpe

NADH

Nikotin adenin Dinükleotit

PBS

Fosfat tampon çözeltisi

rpm

Devir Sayısı

RSKK

Refik Saydam Merkez Başkanlığı
Kültür Koleksiyonu

TCA

Triklor asetik asit

TÜBİTAK

Türkiye Teknik ve Bilimsel
Araştırma Kurumu



1. GİRİŞ

İnsan vücudu dinamik bir ekosistem olup, trilyonlarca mikroorganizmanın konakçısı durumundadır. Bu ekosistemde bulunan mikroorganizmalar temelde faydalı ve zararlı olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Sağlıklı bir konakçıda bu iki grup dinamik bir denge halinde olup faydalı mikroorganizmalar baskın mikroflorayı oluşturmaktadır. Bağırsak ekosisteminin fizyolojik dengesi hastalık, yaşlılık, antibiyotik veya ilaç kullanımı, diyet alışkanlıklarının değiştirilmesi, iklim koşullarında meydana gelen değişimler ve çevresel toksik maddeler gibi faktörlerden doğrudan veya dolaylı olarak etkilenebilmektedir. Bağırsak sisteminin dengesinde meydana gelen bu düzensizlikler sonucu bağırsak mikroflorasının dengesi bozulur ve faydalı mikroorganizma sayısında düşüşler başlar (1).

Son yıllarda yapılan çalışmalara göre, bu mikroflora dengesizliğinin dışarıdan yapılacak mikroorganizma takviyesi ile aşılabileceği belirtilmiştir. Probiyotik adı verilen bu mikroorganizmalar ürettikleri maddeler yardımıyla gıdaların sindirimine, vitamin üretimine ve zararlı mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların önlenmesine yardımcı olarak doğal floranın dengesini korur. Bu özelliklerinden dolayı son yıllarda faydalı bakteriler, yoğurt gibi fermente süt ürünlerine eklenerek, probiyotik ürün olarak piyasaya sunulmaktadır (2).

Dışarıdan vücuda verilen bu yararlı mikroorganizmaların faydalı olabilmeleri için vücut içerisindeki olumsuz çevre koşullarında canlılıklarını muhafaza edebilmeli ve probiyotik özelliklerini kaybetmemelidirler. Olumsuz çevre şartları sadece vücut içinde değil, mikroorganizmanın eklendiği üründe de olabilmektedir. Sonuçta faydalı mikroorganizma bağırsağa ulaştığında belli bir sayının üzerinde, canlı ve özelliklerini koruyor olmalıdır (1,2).

Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmanın probiyotik özellikleri taşıması veya sonradan bu özellikleri yitirmesi, etikette belirtilen mikroorganizmanın üründe mevcut olmaması, farklı mikroorganizmaların

üründen izole edilmesi, çevresel faktörler, karışık kültür kullanımında yanlış seçim, depolama koşulları gibi nedenlerle üründe istenilen düzeyde canlı mikroorganizmanın bulunmaması; bunlar ve benzeri problemler nedeniyle ticari probiyotik ürünlerde istenilen kaliteye ulaşılamamıştır (3,4)

Yaşanan problemler üreticileri geleneksel yöntemler dışında yeni yöntemler arayışına itmiştir. Probiyotik mikroorganizmaların tutuklanması tekniği bu araştırmalar sonrasında gündeme gelmiştir. Aslında bu yöntem uzun yıllardır enzimler ve hücreler için kullanılmakla beraber probiyotik mikroorganizmalara uygulanması yenidir.

Tutuklama ile probiyotiklerin hidrokolloid küreler içerisine hapsedilmesi bu mikroorganizmaların sindirim sistemi ve fermente gıdalarda canlılıklarının korunması için önerilen bir yöntemdir. Bu sayede koruyucu bir polimer tarafından sarılan mikroorganizmanın düşük asitlik, safra tuzu, bakteriyofaj, kontaminasyon gibi olumsuz etkilere karşı canlılığı korunmuş ve dayanıklılığı artırılmış olmaktadır. Ayrıca bu sayede ürünlerin depolanma süresi de artmaktadır (5).

Çalışmanın amacı;

- El yapımı yoğurtlardan izole edilip, tanımlanan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait suşların laktik asit, antimikrobiyal madde üretimi; düşük asitlik ve safra tuzlarına dirençlilik, ekzopolisakkarit üretimi, toksik maddelere dirençlilik gibi bazı probiyotik ve starter özelliklerinin incelenmesi
- *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait suşlar arasından en iyi probiyotik ve starter özellikleri gösteren suşun seçilerek, alginat matriksine tutuklanması ve tutuklanma sonrası oluşan kürelerin dayanıklılığının tespit edilmesi

- Tutuklanan suşun bazı probiyotik ve starter özelliklerinin tekrar incelenerek tutuklama öncesi ve sonrası kazanılan ve kaybedilen özelliklerin belirlenmesi,
- Tutuklanarak probiyotik ve starter özellikleri korunan ve olumsuz etkilere karşı daha dayanıklı hale getirilen kültürlerin iyi kalitede ve dayanıklı bir probiyotik yoğurt üretiminde önemli olacağı düşünülmüştür.



2-KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bu bölümde yapılan çalışma ile ilgili teorik bilgiler alt başlıklar halinde verilmiştir

2.1. Probiyotik Fermente Süt Ürünleri

2.1.1. Tanımı, tarihçesi ve özellikleri

Beslenme, yaşamın sürdürülmesi ve sağlığın korunması için besin öğelerinin yeterli ve dengeli olarak alınmasıdır. Temelde hayvansal ve bitkisel olarak sınıflandırdığımız besin maddeleri arasında süt ve süt ürünlerinin önemli bir yeri bulunmaktadır (1)

Genel olarak fermente süt ürünleri, sütün başta laktik asit bakterileri olmak üzere belirli mikroorganizmalar tarafından doğal yada suni olarak fermente edilmesi sonucu elde edilen farklı kıvam ve aromaya sahip süt ürünleridir (2). Yoğurt, peynir, tereyağı, yayık altı, ekşi krema fermente süt ürünlerine örnek olarak verilebilir.

Fermente gıdaların metabolizma üzerindeki faydalı etkileri ilk defa 20. yüzyılın başlarında, Nobel Ödülü sahibi, Rus bilim adamı Elie Metchnikoff tarafından öne sürülmüştür. Metchnikoff, Bulgar çiftçilerin fermente süt ürünleri tüketimi sonucu daha sağlıklı ve uzun ömürlü olduklarını, bunun nedeninin ise bu ürünlerde bulunan çubuk şeklindeki bakterilerin (*Lactobacillus spp.*) bağırsaktaki mikroflorayı olumlu yönde etkilemesi ve toksik mikrobiyal aktiviteyi azaltması olduğunu belirtmiştir. Fermente gıdalarda sağlıklı yaşam arasındaki bu bağlantı bugünde geçerliliğini korumaktadır (2,3).

Metchnikoff'un bu buluşundan sonra bilim adamları fermente ürünlerin sağlık üzerine etkileri konusunda araştırmalara hız vermişlerdir. Sonuçta insan ve

hayvanların doğal mikroflorasına ait özellikleri geliştiren, tüketimleri sonucunda ağızda, sindirim sisteminde, üst solunum yollarında yada ürogenital kanallarda yararlı etkileri ile konakçının sağlığını koruyan, buralarda oluşan enfeksiyonların iyileşmesine katkıda bulunan, tek veya karışık mikroorganizma kültürlerini probiyotik olarak adlandırmışlar (3) ve bu bağlamda faydalı ve organizma ile barış içinde olan bu mikroorganizmaları bir araya getirerek probiyotik süt ürünlerini oluşturmuşlardır (4).

Kısaca canlı mikroorganizma içeren ve tüketilmeleri sonucunda ağızda, mide-bağırsak kanallalarında, üst solunum kanallarında ya da ürogenital kanallarda yararlı etkiler yaparak konakçının sağlığında iyileşmeye neden olan ürünlere probiyotik ürünler adı verilmektedir. İnsan beslenmesinde üç grup probiyotik ürün bulunmaktadır. Bunlar bebek mamaları, fermente süt ürünleri ve farmakolojik preparatlardır. Piyasada ekşitilmiş krema, yayıkaltı, yoğurt, peynir, süttozu, dondurulmuş tatlı, dondurma gibi probiyotik bakteri içeren çeşitli süt ürünleri bulunmaktadır. Genel anlamda süt endüstrisinin probiyotikleri fermente süt ürünleridir (5).

Gıdalarda probiyotik kullanımı hem ürün kalitesini artırma, hem de tüketici sağlığını korumaya yöneliktir. Probiyotik gıdaların üretiminde kullanılan probiyotik bakteriler fermentasyon sırasında süte eklenebildiği gibi fermente olmuş ürünlerde ilave edilebilmektedir (5).

Ticari olarak satışa sunulan probiyotik kültürlerin en eskisi *Lactobacillus casei* Shitota suşu olup, 1930 yılında Japonya'da izole edilmiştir. Daha sonraki yıllarda klinik çalışmalarla güvenilir oldukları tespit edilen *L. rhamnosus* GG, *L. Johnsonii* LA1, *L. acidophilus* NCFB 1748, *Bifidobacterium longum* BB536 gibi değişik kaynaklardan izole edilen suşlarda diğer ticari probiyotik kültürler olarak kullanılmaktadır (2).

İyi bir probiyotik üründe aranan bazı şartlar vardır. Bunlar;

1. Probiyotik ürünler, probiyotik olabilecek niteliğe sahip mikroorganizmaları içermelidir.
2. Üründe kullanılan probiyotik mikroorganizma ve ürün çeşidine en uygun üretim, depolama ve piyasaya sunma işlemleri gerçekleştirilmelidir (2).

Özellikle canlılık kaybı ticari probiyotik gıdaların üretiminde karşılaşılan en önemli sorunlardan birisidir. Canlılık kaybının sebebi, probiyotiklerin üretim yöntemleri ve muhafaza koşulları ile ilgilidir. Canlılık kaybının bir diğer etmeni ise ürünün bileşimine katılan mikroorganizma dışındaki mineral, vitamin, koruyucu maddeler, aroma maddeleri vb. gibi katkılardır. Bu maddeler üründeki florayı önemli ölçüde değiştirebilmekte, etikette belirtilen türlerin canlılığını yitirmesine neden olmaktadır (2,6).

Probiyotik mikroorganizmaların fizyolojik etkileri üzerinde yapılan araştırmalar diyare, laktoz intoleransı ve kolon kanserini önleyici etki için gerekli dozun 10^9 - 10^{10} cfu/gün olduğunu göstermiştir (6,7). Uluslararası Sütçülük Federasyonuna göre günlük bu oran 10^7 cfu/g canlı hücre olarak belirlenmiştir. Yani probiyotik ürünler, en az belirtilen oranda canlı bakteri içermelidir. Kısaca probiyotik üretiminde kullanılacak mikroorganizmaların metabolik ve teknolojik özellikleri işlenecek ürünün prosesine uygun olmalı ve son üründeki canlı probiyotik mikroorganizma sayısı istenilen düzeyde kalabilmelidir (8).

Günümüzde yaygın olarak kullanılan bazı ticari probiyotik süt ürünleri ve bunlara ait ticari bilgiler Çizelge 2.1.'de verilmiştir (2).

Çizelge 2.1. Ticari probiyotik süt ürünleri ve bunlar hakkında bazı bilgiler

Ürün adı	Üretici firma	Etkin mikroorganizma	Ürün formu	Ülke
Yakult 65	Yakult Honsha	<i>L. casei</i>	Fermente sütlü içecek	Japonya
Sofuhi	Yakult Honsha	<i>L. casei</i> <i>S. thermophilus</i>	Fermente sütlü içecek	Japonya
Vitagen	Malaysia Dairy Industry	<i>L. acidophilus</i>	Fermente sütlü içecek	Malezya, Singapur
LC1	Nestlé	<i>S. thermophilus</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. acidophilus</i>	Yoğurt, fermente Süt	Türkiye, AB ülkeleri
Bio-Grade	JALNA Dairy Food	<i>L. acidophilus</i> <i>B. bifidum</i> <i>L. casei</i>	Fermente sütlü içecek	Avusturalya
Erivan Acidophilus Yoghurt	Erivan Dairy	<i>L. acidophilus</i>	Fermente sütlü içecek	ABD
CHAMYTO	Nestlé	<i>L. helveticus</i> <i>L. johnsonii</i>	Fermente sütlü içecek	Brezilya

2.1.2. Probiyotik yoğurt

Yoğurt, fermente süt ürünleri arasında en eski geçmişe sahip olanıdır.

Yoğurt üzerine ilk çalışma 1900'lü yıllarda Metchnikoff tarafından yapılmıştır. 1985 yılında Tamime ve Robinson yoğurtlarda *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. jugurti*, *L. helveticus*, *S. thermophilus* bakterileri ile *Candida krusei*, *Candida mycoderma*, *Geotricum candidum* ve *Saccoromyces* grubuna giren mayaların bulunabileceğini açıklamışlardır. Yine yapılan

araştırmalar sonucu, yoğurt yapımında sadece *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ile *S. thermophilus* bakterilerinin gerekli olduğu; diğerk mikroorganizmaların yoğurdun tat, aroma, yapı ve görünüşlerini bozdukları, kısa zamanda ekşimesine neden oldukları ve raf ömrünü kısalttıkları belirlenmiştir. Bu yüzden bir çok ülkede yoğurtlarda bu iki bakteri dışında mikroorganizma bulunması yasaklanmıştır (9).

Klasik yoğurt, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ile *S. thermophilus* bakterilerinin simbiyotik ilişkileri sonucu oluşur. Yapılan araştırmalar bu iki bakterinin birbirlerinin gelişmesi için gerekli bazı maddeleri meydana getirdikleri ve böyle ortamda daha hızlı çoğaldıklarını ortaya çıkarmıştır. Ayrıca *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* 'un ayrı ayrı kültürlerindeki asitlikten daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Yine *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'un proteinlerden kazeini parçalayarak *S. thermophilus*'un faaliyeti için önemli olan valin, lösin, histidin, sistein amino asitlerini açığa çıkardığını ve *S. thermophilus*' un oluşturduğu süt asidi, formik asit ve yeterli miktarda CO₂ ile *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*' un gelişmesini teşvik ettiğini açıklamışlardır. İnkübasyon sırasında önce *S. thermophilus*, sonra *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* süt asidi oluşturur (9, 10).

Süt, yoğurt starter kültürlerinin etkisiyle sinidirilmesi kolay, vitamince zengin, kalsiyum ve enerji kaynağı mucize bir ürüne dönüştürölür.

Yoğurdun insan beslenmesi üzerine etkisi kısaca şöyledir. Yoğurdun kimyasal kompozisyonu süte benzemekte, ancak yapımı sırasında kurumadde miktarının arttırılması ve bakteriyal fermentasyon sırasında meydana gelen değışmelerden dolayı bazı farklılıklar olmaktadır. Yoğurt süte göre protein açısından daha zengindir. Bu proteinlerin biyolojik değerkleri yüksektir. Esansiyel amino asitler açısından zengin ve hazmı kolaydır. Kaynatma sırasında bazı vitaminlerin kaybı söz konusu olsa bile, yoğurt bakterilerinin faaliyeti sonucu bazı B grubu vitaminler meydana gelmektedir. Ayrıca süt şekeri' ni (Laktoz) parçalayan Laktaz enzimi bazı insanlarda

sağılanmamaktadır Bundan dolayı süt içemeyen Laktoz intoleransı olan kişiler rahatlıkla yoğurdu tüketebilmektedirler (11).

Probiyotik amaçlı üretilen yoğurtlarda, starter kültürlerine ilave olarak, bazı *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleride mayalanma esnasında veya sonrasında ürüne katılmaktadır. Bu şekilde oluşmuş yoğurtlara örnek olarak Proghurt, Biogarde, Bifighurt, Bifidus Yoghurt, Acidophilus Yoghurt ve Bioyoghurt verilebilir (12).

Acidophilus yoghurt Almanya, A.B.D. ve Avusturalya'da üretilmiş bir süt ürünüdür. Bu yoğurdun üretiminde *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* + *S. thermophilus* kültürü ile *L.acidophilus* kültürleri kullanılır. Ürünün hazırlanmasında kullanılacak süt standardize edildikten sonra homojenize edilir ve yüksek sıcaklığına getirilen süte farklı oranlarda *L. acidophilus* kültürü ile yoğurt kültürü katılır. Son ürünün 1 ml.de 20 – 50 milyon arasında *L. acidophilus* bulunur (13).

.Bioyoghurt; *L.acidophilus* ile *S. thermophilus* veya *Lactobacoccus lactis* fermentasyonu ile elde edilen bir süt ürünüdür. *L.acidophilus*'un bu bakterilerle ortak yaşam içinde bulunduğu da bildirilmiştir. Bioyoğurt yapımında süt 85°- 95°C de 15 dakika kadar ısıtılır. 37°- 40°C ye soğutulur. İçinde 2/3 oranında *L. acidophilus*, 1/3 oranında *Lc. lactis* subsp. *lactis* + *S. thermophilus* bulunan kültürden %5 kadar süte katılır. Bioyoğurt üretiminde süte şeker, limon, mandarin, çilek vs. Aroması katılmaktadır. Şeker süt ısıtılmadan önce, aroma maddeleri kültürle beraber süte ilave edilmektedir (13).

Bifighurt, Bifidus süt veya Bifidus yoğurda benzemekte olup, Almanya'da üretilmektedir. Isıtılmış süt 42 °C'de %6 *B.longum* ve *S. thermophilus* içeren starter kültürle fermente edilir. Son ürünün pH'sı 4,7 olup, hafif asidik bir tada sahiptir. Yaklaşık olarak 10⁷ cfu/ml *B.longum* ve daha fazla sayıda ise *S.*

thermophilus içermektedir. üründe %95 düzeyinde L(+) laktik asit bulunmaktadır (14).

L. acidophilus ve *Bifidobakterium* türlerini içeren probiyotik yoğurt tipindeki ürünlerin yapımında, geleneksel yoğurt bakterileri olan *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* kullanılarak tat ve aroma güçlendirilmekte ve duyu kalite iyileştirilmektedir. Ancak bu durumda yoğurt bakterileri tarafından üretilen laktik asit, hidrojen peroksit gibi maddeler nedeniyle, ayrıca ürünlere koruyucu olarak katılan nisin gibi maddelerin gösterdiği antimikrobiyal aktivite nedeniyle ortama sonradan ilave edilen bakteriler ölmekte ve canlılık istenilen düzeyde olamamaktadır (1,12). Bu nedenle son yıllarda yapılan çalışmalarda hem starter hem de probiyotik özellik gösteren suşlar araştırılıp fermente süt ürünlerinde kullanımı denenmekte veya probiyotik mikroorganizmaların ürün içerisinde canlı kalabilmesi ve ortamdan etkilenmemesi için tutuklama adı verilen teknik denenmektedir (15,16).

2.2. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar

Genel olarak probiyotik kapsamına giren mikroorganizmalar bakteriyal mikroorganizmalar veya maya hücreleri olarak iki gruba ayrılır. Bu mikroorganizmalar Çizelge 2.2.'de (17,18) gösterilmiştir. Bunlar arasında *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* dışında tümü insan mikroflorası elemanıdır (19). Probiyotik bir üründe pek çok bakteri türü ve bunların suşları bulunabilir.

Çizelge 2.2. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar

<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus cellebiosus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus johnsonii</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus crispatus</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus cerevisiae</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus cremoris</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Streptococcus intermedius</i> , <i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus diacetilactis</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> , <i>Lactococcus</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i> , <i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium thermophilus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Bacillus lentus</i>
<i>Bacteriodes</i>	<i>Bacteriodes capillouss</i> , <i>Bacteriodes suis</i> , <i>Bacteriodes ruminola</i> , <i>Bacteriodes amylophilus</i>
Diğer bakteriler	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Propionobacterium shermanii</i> , <i>Propionobacterium freudenreich</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>
Küf ve Mayalar	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida torulopsis</i>

2.3. Probiyotik Mikroorganizma Seçim Kriterleri

Probiyotiklerin bulunduğu konakçıdaki diğer mikroorganizmalara karşı güçlü bir etkileri ve konakçıya yararları olduğu kesin olarak kabul edilmiştir. Ancak bir mikroorganizmanın probiyotik olabilmesi için belirli kriterlere sahip olması gerekmektedir. Bu kriterler;

1. İnsanların kullanımına yönelik hazırlanan ürünlerde kullanılan mikroorganizmalar, gelişmiş teknikler kullanılarak tanımlanmış güvenilir suşlar olmalıdır.
2. Mide – bağırsak sisteminde probiyotik etkinin oluşabilmesi için kullanılan suşlar mide asitliğine ve safra tuzlarına karşı dirençli olmalıdır. Bu özellikle ağızdan yapılan uygulamalarda mikroorganizmanın canlı kalması, metabolik aktivitesini devam ettirebilmesi ve tutunabilmesi açısından önemlidir.

3. Patojenlerle yarışmalı rekabet sonucu probiyotik suşların bağırsak epiteline patojenlerden önce tutunabilmesi veya agregasyon oluşturabilmesi gerekmektedir.
4. Kullanılan suş ürün içerisinde uzun süre canlılığını koruyabilmeli, üründe istenmeyen oluşumlara neden olacak maddeler üretmemeli bunun yanı sıra ürettiği bazı metabolitlerle ortamdaki patojen veya kontaminant bakterileri inhibe edebilmeli
5. Kullanılan suşun teknolojik özelliklerinin probiyotik ürün üretimine uygun olması gerekmektedir. Şöyleki: büyük ölçekte üretime uygun, istenmeyen aroma bileşikleri üretmeyen, fajlara karşı dirençli suşlar probiyotik üretiminde başarı ile kullanılabilir. (2,12,20)

2.4. Probiyotik Amaçlı Kullanılabilecek *Lactobacillus* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

Lactobacillus cinsi bakteriler, *Lactobacillaceae* familyasına ait olup Laktik asit bakterileri grubundandır. *Lactobacillus* spp.'ler anaerobik, gram (+) bakterilerdir ve spor oluşturmazlar. Çoğu *Lactobacillus* spp. basil ancak bazı türleri koko-basil şeklindedir. Bu mikroorganizmalar gelişebilmeleri için amino asit, peptit, nükleik asit türevi vitamin, tuz, yağ asidi veya yağ asidi esterleri ile fermente edebilecekleri besin maddelerine ihtiyaç duyarlar (21).

Laktik asit bakterilerinde ribozomlar, 70S veya 50S büyük ve 30S küçük olmak üzere iki alt üniteden oluşur. 30S' lik küçük alt birim 16S rRNA ve 25 farklı protein içerir. Laktik asit bakterilerinin birbirlerinden ayrımında 16S rRNA' nın özelliklerinden yararlanılmaktadır ve 16S rRNA' nın değişen ve değişmeyen kısımlar bulunur. Değişen kısımlar yakın akrabaları, değişmeyen kısımlar ise uzak akrabalıkların tespitinde kullanılmaktadır (22).

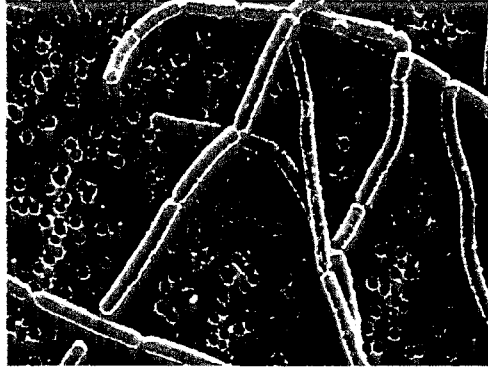
LAB, şekerleri (hekzoslar ve pentozlar) homofermantatif ve heterofermantatif yolla katabolize ederler. Basit şekerlerden olan glikoz homofermantatif LAB tarafından, Fruktöz-Di-Fosfat (FDP) yolu ile laktik aside; heterofermantatif LAB, Hekzos-Mono-Fosfat (HMP) yolu ile, laktik asit, etanol, asetat ve CO₂'e fermente edilir (23).

Lactobacillus spp. suşları 2-53 °C'de (Optimum 30-40°C) gelişirler. Aynı zamanda, bu bakteriler % 1-3 oranında laktik asit oluşturarak pH'yı 3,2-3,5'e kadar düşürürler. Bu nedenle aside dayanıklıdır (24).

Türlerin çoğu mikroaerobiktir. Fakat anaerobik ortamda daha iyi kolonize olurlar. Su ve toprakta hemen hemen hiç rastlanılmayan bu bakterilere, cins ve türe göre değişim göstererek süt ve süt ürünleri çalışma yerlerinde, bitki ve bitki atıklarında, insan ve diğer canlıların sindirim sistemlerinde rastlanabilirler. Teknikte kullanılan *Lactobacillus* türleri hastalıklara sebep olmazlar (10,25). Bununla birlikte bu bakteriler genellikle diş ve ağız, ayrıca akciğer enfeksiyonlarında patojenlerle karışık mikrofloradan, nadiren de idrar yolu, kalp dış zarı ve lokal enfeksiyonlardan da izole edilebilirler (24).

İlk kez 1904 yılında literatürlerde yer alan bu bakteriyi eski kitaplarda *Bacterium bulgaricum*, *Bacillus bulgaricus*, *Thermobacterium bulgaricum*, *Lactobacillus bulgaricus* isimleri ile de rastlamak mümkündür. Daha sonra bu isim değişmiş ve bugün hem *Lactobacillus bulgaricus* hemde *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* şeklinde kullanılmaya başlanmıştır (9).

10-30µ uzunluğunda 0,7-2µ kalınlığında, çubuk şeklinde tek tek veya zincirler şeklinde bulunur. Genç bakteriler genellikle zincir oluşturmaz. Optimum olarak 40-45 °C'de faaliyet gösterirler. 70 °C' nin üzerindeki ısıtılarda ortadan kalkarlar (9). *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türünün morfolojik görüntüsü Resim 2.1.'de verilmiştir (26).



Resim 2.1. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türünün morfolojik görüntüsü

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* türü. fermentasyon sırasında EPS (ekzopolisakkarit), laktik asit, hidrojen peroksit yanında bir miktar etanol, asetaldehit, aseton ve iz halinde asetoin üretir. Bu türün bazı suşları diğer mikroorganizmaların ölümüne neden olan protein yapıda bakteriosin adlı maddeyi de üretirler. Ortaya çıkan bu maddelerin miktarı suşlara göre değişmektedir (10).

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* , *S. thermophilus* ile birlikte yoğurt starter kültürü olarak kullanılır. Kımız ve Kefir gibi fermente süt ürünlerinin karışık kültürlerinde ayrıca yüksek ısıda pişirilen peynirler (Örn: Emmental, Parmesan ve Mozerella) için hazırlanan kültürde yer alır (10).

2.5. *Lactobacillus* Cinsi Bakterilerin Metabolik Ürünleri

Laktobasilluslar, metabolik faaliyetleri sonucu çok çeşitli organik maddeler sentezlerler. Bu metabolitlerin üretimi türden türe farklılık göstermektedir. Üretilen metabolitin yapısı ve miktarı onu üreten bakterinin hangi alanda, ne amaçla kullanılacağını da belirler.

Laktobasilluslar, laktik asit, EPS (ekzopolisakkarit), hidrojen peroksit, asetaldehit, aseton, diasetil, etanol, asetoin gibi maddeler üretir (9).

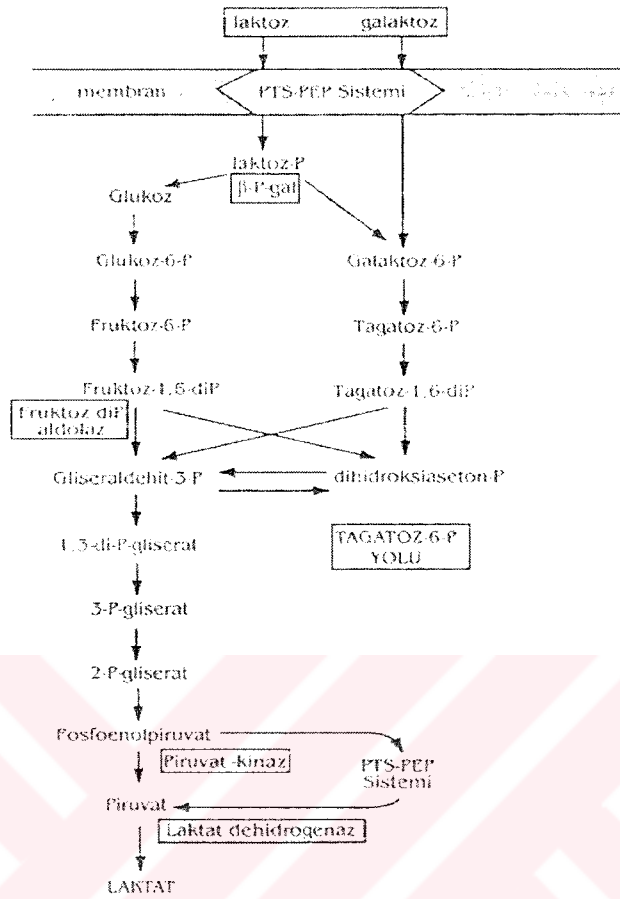
Çalışmada, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türünün tutuklama öncesi ve sonrasında, laktik asit ve EPS gibi starter ve probiyotik açıdan önemli metabolitlerin, üretimlerinin belirlenmesi esas alındığı için bu iki konuya ağırlık verilecektir.

2.5.1. Laktik Asit

Laktik asit bakterilerinin, Laktat Dehidrogenaz (LDH) enzimleri aracılığıyla, metabolizmaları sırasında laktozu parçalayarak oluşturdukları maddedir (27).

LDH enzimi bakteri hücre stoplazmasında bulunur ve bunun etkili olabilmesi NAD/NADH'a bağlıdır. Pirüvik asidin laktik aside dönüşümü boyunca bu koenzim rejenere olur (28). Laktik bakterilerde laktoz ve galaktozun homofermentatif metabolizması Şekil 2.1'de gösterilmiştir (29).

Laktik asidin ikinci karbon (C) atomunun farklı bağlanışına göre çeşitli formları oluşur. Bunlar L (+), D (-) ve DL (±) formlarıdır. Bu oluşumlar türden türe değişiklik gösterirler (31). Bu laktik asit formlarının oluşumunda Laktat dehidrogenaz enziminin türü önemlidir. Mesela *S. thermophilus* da L-Laktat dehidrogenaz enzimi sayesinde pirüvat L (+) laktik aside, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* da D-Laktat dehidrogenaz enzimi sayesinde pirüvat D (-) laktik aside dönüşür. DL (±) laktat formu, laktat rasemaz enzimi varlığında oluşur. Bu enzim L (+) veya D (-) formundaki laktik asidi rasemik karışım oluşuncaya kadar diğer formuna çevrilmesini katalizler (27).



Şekil 2.1. Laktik bakterilerde laktöz ve galaktozun homofermentatif metabolizması

Beslenmede L (+) laktik aside daha fazla önem verilmektedir. Bu izomer insan vücudunda çok çabuk ve artık bırakmadan metabolize olmaktadır. Buna karşın D (-) laktik asit ise yetersiz ve çok yavaş parçalanmaktadır. Bu nedenlerden dolayı WHO organizasyonu yetişkin insanların besinlerinde bulunan D (-) laktik asit oranını kısıtlamış ve günde alınması gereken en yüksek değeri 100 mg/kg vücut ağırlığı olarak belirlemiştir (30).

Laktöz (süt şekeri) fermente süt ürünlerinde kullanılan starter bakteriler tarafından bir ön fermentasyona uğratılır, bunun sonucunda emilimi daha kolay olan laktik asit oluşur. Bu sayede laktöz intoleransı olan kişiler besleyici bu ürünlerin rahatlıkla tüketebilmektedir.

Laktoz diğer şekerlerden farklı olarak fizyolojik üstünlüğe sahiptir. Laktozun yapısındaki galaktozun beyin dokusundaki glikolipitlerin kaynağını teşkil etmesi, serebrosit ve özellikle gençlerde sinir dokusunun sentezinde önemli olması nedeniyle de beslenmede büyük öneme sahiptir. Laktoz , önemli bir enerji kaynağıdır. Gastrointestinal işlevi motive eder ve bağırsaklardaki istenmeyen mikroorganizmaları inhibe ederek bağırsak florasını geliştirici etki yapar. Ayrıca vücudun kalsiyum ve fosfordan daha iyi yararlanmasını sağlar. Oluşan laktik asit, kalsiyum ve fosforun emilimini kolaylaştırır (11).

Laktik asit üretimi, probiyotik ve starter mikroorganizma seçim kriterlerinden biridir. Starter olarak kullanılacak mikroorganizmanın ürettiği aroma maddeleriyle beraber, oluşturulan laktik asidin cinsine ve miktarına göre süt; yoğurt, peynir, ayran gibi fermente ürünlere dönüşür.

Laktik asit ortamda biriktikçe ortamın pH'sı düşer ve proteinlerde parçalanma başlar. Böylece yoğurdun kıvamını oluşturacak pıhtılaşma-jelleşme sağlanır. Ayrıca yoğurdun kendine özgü hafif ekşi tadını oluşturarak aromanın zenginleşmesine yardım eder ve ferahlatıcı bir etkisi vardır (10,11).

Laktik asit gibi metabolitlerin ortamda bulunuşu pH' ı düşürür. Bu, fermente ürünlerin uzun ve ortamdaki patojen ve kontaminant mikroorganizmaların gelişimlerinin inhibe edilmesi için istenen bir durumdur. Düşük pH hücresel metabolizmayı etkileyerek ortamdaki istenmeyen bakterilerin gelişimi yavaşlatır. Laktik asit hücre zarına yapışarak madde taşınımı ve membrana bağlı FoF₁ATPaz aktivitesini inhibe eder ve trans membran potansiyelini bozar (31). Ayrıca pH'nın düşük olması fermente ürünlerin uzun süre tazeliğinin korunarak saklanmasını sağlar.

Aiba ve arkadaşları (1998) eşit oranlarda *Helicobacter. pylori* ve *Lactobacillus salivarius* bakteri karışımını her iki bakterinin de gelişebileceği uygun bir besiyerine inoküle etmişler ve inkübasyon esnasında laktik asit oluşumundan

dolayı, canlı kalan *H. pylori* sayısında giderek artan bir düşüş gözlemişler. 24 saatin sonunda ise hiç canlı bakteri kalmadığı belirlemişler (32).

Benzer bir çalışmada *L. casei subsp. rhamnosus* Lcr35 suşunu ürettiği asidin *Escherichia coli* , *Salmonella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium difficile* gibi insan patojeni olan bakterileri inhibe ettiği belirlenmiş (33).

Laktik asit çok eczacılık, kimya, plastik ve türevleri ve gıda gibi bir çok alanda kullanılmaktadır. Laktik asit ekşi tatta, uçucu olmayan, kokusuzdur (34,35,). Bu özellikler onun kullanım alanını arttırmaktadır. Besin ve içeceklerde aromatik maddeler ile birlikte kullanıldığı zaman hoş bir lezzet vericidir. Ham laktik asit, tekstil endüstrisinde yün boyamasında kullanılır. Ayrıca yapışkan, temizleyici ve cilalama maddelerinde, elektro kaplama ve elektro cilalamada, böcek ve mantarların yok edilmesinde, plastik ve reçinelerde, özel mürekkeplerde de laktik asit kullanılır (35).

2.5.2. EPS (Ekzopolisakkarit)

Bakteriyel polisakkaritlerin varlığı ve rolleri ilk olarak tıbbi incelemelerde ortaya konmuştur. Ancak EPS'lerin varlığı virulent karakterli bakterilere has değildir. Fiziksel ve kimyasal yoldan ortadan kaldırılan polisakkaritlerin bakteri çoğalmasını etkilemeksizin tekrar oluştuğu bildirilmiştir. Polisakkaritler üretici suşlar tarafından karakterize edilemediklerinden enerji kaynağı olarak kullanılamazlar. Bu polimerlere kapsül veya mikrokapsül şeklinde polisakkarit adı verilir. 'Slime' terimi fermente sütlerdeki termofil ve mezofil laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan polimerleri ifade eder (36).

Hücresel lokasyonları, kimyasal ve fiziksel yapı özellikleri ile fonksiyonları esas alınarak mikrobiyal ekzopolisakkaritleri üç ana grup altında toplamak mümkündür. Bunlar; hücre yüzeyine kovalent bağlarla bağlı olan kapsüller polisakkaritler (CPS), hücre duvarının bir bileşeni olan polisakkaritler (LPS)

ve dış çevreye salınan yada hücre yüzeyi ile kovalent olmayan, gevşek bağlarla ilişkilendirilmiş polisakkaritlerdir (LAM) (42;43). CPS ve LPS genellikle üretici bakterilerin patojenitesini belirleyen yapılar olduğundan, tıbbi açıdan büyük önem taşımaktadır. LAM'nin ise gıda endüstrisinde geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. Ancak LAB gibi GRAS (insan ve hayvan tüketiminde güvenilir) mikroorganizmalarda CPS ve LAM, üretiminde rol aldıkları gıdalara arzu edilen özellikleri kazandırmaktadır (37,38,39).

Mikroorganizmaların çevrelerine salgıladıkları EPS, molekülleri hücreleri kurumadan, fagositozdan ve faj etkisinden koruduğu, yüksek oksijen gerilimi sağladığı, antibiyotiklere ve toksik maddelere (toksik metal iyonları, sülfür dioksit, etanol gibi) karşı hücreleri koruma ve yüzey tutunmasında yapıştırıcı işlevine sahip olduğu bilinmektedir (40). Bu polimerlerin bir diğer dikkate değer özelliği gıda sanayinde kıvam arttırıcı olmalarıdır (41,42) EPS'lerin immün sistemi teşvik ettiği, antitümoral ve kolesterol düşürücü aktiviteye sahip olduğuda saptanmıştır (43).

Son yıllarda hem mezofilik hemde termofilik laktik asit bakterilerinin (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus*) heteropolisakkaritlerine duyulan ilgi artmıştır.

EPS üreten LAB suşları yoğurt, peynir, tereyağı, kefir ve geleneksel fermente süt ürünlerinin üretiminde starter kültür suşları olarak kullanılmaktadırlar (44). Starter kültürlerin EPS oluşturma yetenekleri, üretimde kullanıldıkları fermente süt ürünlerinin yapısal, aromatik ve reolojik özellikleri üzerinde belirgin bir şekilde etki etmektedir (45).

EPS, fermente süt ürünlerine yüksek düzeyde vizkozite ve elastisite gibi reolojik özellikler kazandırmaktadır. Vizkozite, süt ürünlerinde uzama yapısı olarak görülen, materyalin deformasyona dayanıklılık özelliğini, elastisite ise ürünün, deformasyon oluşumundan sonra eski haline dönüşebilme yeteneğini ifade etmektedir (46).

LAB'deki EPS üretiminin stabil olmaması büyük problem olarak bildirilirken, bunun sebebi olarak, mezofilik LAB'lerinde EPS üretiminin plazmidlerce kodlanması gösterilmektedir. Ancak bazı araştırmacılar termofilik laktik asit bakterilerinde EPS üretiminin plazmid DNA'larca kodlanmadığı bildirilmiştir (36,41,47).

2.6. Probiyotik mikroorganizmaların etki mekanizması

Probiyotiklerin etki mekanizmasına yönelik çalışmalar, bağırsak florasının düzensizliğiyle ortaya çıkan gastrointestinal sistemdeki bozukluklara dayanarak yapılmaya başlanmıştır (48).

Probiyotiklerin etki mekanizmaları için özellikle üç mekanizma önerilmektedir.

- 1) Patojen ve zararlı bakterilerin sayılarını azaltmak
 - a. Antimikrobiyal bileşikler üretmeleri
 - b. Besin elementleri için rekabet etmeleri
 - c. Kolonizasyon bölgeleri için rekabet etmeleri
- 2) Mikrobiyal metabolizmayı (enzimatik aktiviteyi) değiştirmek
 - a. Sindirim sistemini teşvik eden enzimlerin üretimi (örneğin; laktoz)
 - b. Amonyak, amin veya toksik enzimlerin üretiminin azalması
 - c. Bağırsak duvarının fonksiyonlarının iyileştirilmesi
- 3) Bağışıklık sistemini iyileştirmek
 - a. Antikor düzeyinin artması
 - b. Makrofaj aktivitesinin artması (49).

2.7. Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine etkileri

2.7.1. Bağırsak sistemi üzerindeki etkileri

Bağırsak florasını oluşturan bakteriler denge halindedirler. Yiyeceklere alınan saprofit ve patojen bakteriler bağırsağa kadar gelip bu dengeyi bozamazlar. Yiyeceklerle alınan bakterilerin büyük çoğunluğu midedeki HCl asidinin etkisi ile ölürler. Şayet bunlardan bazıları oniki parmak bağırsağına gelmiş ise, burada desoksikolit asit tarafından yok edilir. Çünkü desoksikolit asit kuvvetli bakterisit etkiye sahiptir. Bu asit kolit asidin bakteriler tarafından indirgenmesi ile meydana gelmiştir. Yapılan çalışmalar, desoksikolit asidin süt emen yavruların bağırsağında bulunmadığını, yavru süttten kesildikten sonra meydana geldiğini göstermiştir (13).

Sağlıklı bireylerin bağırsak sistemindeki bakteriler arasında belirli bir denge mevcuttur. Fizyolojik bakteriler metabolizmada gelişerek ortamdaki bu dengenin korunmasını sağlarlar (50). Probiyotik bakterilerin bağırsak yüzeyine tutunarak istenmeyen bakterilerin tutunmasını engellemeleri ve ürettikleri antimikrobiyal maddelerle (asitler, bakteriyosinler, reuterin gibi) çoğalmalarını kontrol altına alırlar (51).

Çevre koşullarının genellikle yetersiz olduğu gelişmekte olan ülkelerde bebek ve çocuklarda diyare ataklarına rastlanır. Bu diyare ataklarının çoğu hafif geçer, ama bazıları yaşamı tehdit edecek kadar ağırdır. Bu bölgelerde , diyare ile seyreden hastalıkların büyük çoğunluğundan enterotoksijenik *E.coli* ve *Rotavirüs* birlikte sorumludur. Endüstrileşmiş ülkelerde ise bebekler ve çocuklarda diyare ataklarına daha az rastlanmaktadır. Ancak en sık görülen sorumlu etken yine *Rotavirüs*'dür. Fermente süt ürünlerinin *Rotavirüs* diyareli çocuklarda diyarenin süresini yarı yarıya azalttığı bildirilmiştir (2, 52,53,54). Diğer bir diyare çeşidide antibiyotik kullanımına bağlı oluşan diyaredir. Antibiyotiğe bağlı diyare de; bağırsak mikroflorasındaki bir kısım faydalı mikroorganizmanın ölmesi sonucu zararlı mikroorganizmalar baskın hale gelir. Bu nedenle antibiyotik tedavisinin genellikle sindirim sistemi sisteminde bazı yan etkilere neden olduğu, antibiyotik alan hastaların %<20 sinde diyare olduğu bildirilmektedir. Bunun yanısıra antibiyotik kullanımı sonrası hastada antibiyotiğe bağlı diyarenin oluşup oluşmayacağı önceden bilinmemektedir.

Antibiyotik kaynaklı diyarenin önlenmesi için birçok probiyotik kullanılmıştır. Bunlardan bazıları *Saccharomyces*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Streptococcus* dır. Bu uygulamalar sonucunda diyare süresinin kısaldığı ve hatta bazı suşların kullanılmasıyla önlendiği belirlenmiştir (2, 55).

L. acidophilus (La-5), *Bifidobakterium bifidum* (Bb-12), *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* karışımının, yüksek risk taşıyan ülkelerde bile yolculuk ishalini önleyebildiği görülmüştür. Yukarıdaki kültürlerin karışımından oluşan kapsülden günde 3 kez alınmasının, Mısır'da görülen yolculuk ishaline karşı % 39,4 oranında koruma sağladığı kanıtlanmıştır (50).

Diğer bir bağırsak rahatsızlığı da kabızlıktır. Araştırmalar *Acidophilus*'lu sütün kronik kabızlığı etkileyerek bağırsak transport yeteneğini arttırdığı bildirmektedir. Yaşlı ve yatalak hastalarda alt karın kaslarının zayıflığı çok ciddi sorunlara yol açabilmekte ve tedavi olarak müshil uygulaması da bağırsakların elzem elektrolitleri de içerecek şekilde tamamen boşalmasına neden olmaktadır. Kabızlık çeken yaşları 54-92 arasında değişen kadın ve erkek müshil kullanımı gereksiniminin azaldığı gözlenmiştir (7).

2.7.2. Mide üzerindeki etkileri

Midenin mikrobiyal içeriğinin yoğunluğu bir gram yaş ağırlıkta yaklaşık 10^4 – 10^7 organizmadır. Bu flora; gıdalar, burun faranjiti ve tükürük salgısı tarafından sürekli temin edilir. Metschnikoff'tan sonra birçok araştırmacı probiyotik içeren yoğurdun mide ve bağırsak rahatsızlıkları üzerine etkilerini incelemişlerdir (56). Mide hastalıklarının tedavisinde yoğurdun yararlı etkisi, sindirimi kolay protein içermesi ve aynı zamanda tampon yeteneğine sahip olması ile ilgilidir (57,58).

Araştırmalar, gerek yoğurdun oluşu, gerekse saklanması sırasında serbest duruma geçen amino asitlerin çoğaldığını saptamışlardır. Yoğurdun

asetaldehit ve çok az miktarda propron, sirke, tereyağ, kapron, kapril, kaprin ve izovalorik asit açığa çıkmaktadır. Bu açıklamalar, yoğurt bakterilerinin proteinleri pepton ve amino asitlerine, süt yağını da yağ asitlerine kadar parçaladıklarını göstermektedir. Bu parçalanmalar yoğurdun hazmını kolaylaştırmaktadır. Zira hazım organizmalarında yapılacak işlerin önemli bir kısmı yoğurdun oluşu sırasında meydana gelmektedir. Bu konuda araştırmalar, 1 saat içinde yoğurdun % 90'ının sütün ise % 30'unun hazmedildiğini, 3 saat içinde hazmedilen süte eşit miktardaki yoğurdun hazmı için bir saatin gerekli olduğunu ortaya çıkarmıştır (56).

Ülser ve gastrit gibi durumlarda taze, düşük asitli yoğurtlar çok faydalıdır. Bu gibi hastalar sütü hazmedemedikleri halde yoğurttan iyi bir şekilde yararlanırlar. Yoğurt ülserin üzerinde bir tabaka oluşturarak hidroklorik asit etkisini azaltmaktadır. Yoğurtta fermentasyon esnasında üretilen antibiyotik ve antikanserojenik bileşenlerin mide kanseri tedavisinde de etkili olduğu belirtilmiştir (57,59).

Son zamanlarda kronik gastrit , mide ve onikiparmak bağırsağı ülseri hatta mide kanserinin önemli etkenlerinden birinin *Helicobacter pylori* adlı bakteri olduğu belirlenmiştir..Bakteri salgıladığı üreaz enzimi ile çevresinde alkali bir ortam yaratarak mide asitinden, katalaz enzimiyle de nötrofillerden salınan reaktif metabolitlerin toksik etkisinden korunmaktadır. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda bazı laktik asit bakterilerinin *H. pylori*’ye antogonistik etki yaptığı rapor edilmiştir. Özellikle *Lactobacillus* cinsi türlerinde üretilen laktik asit ve bakteriosin gibi metabolitlere bağlı olarak *H. pylori*’nin üreaz aktivitesinin önemli derecede azaldığı belirlenmiştir (2,52,60,61).

2.7.3. Laktoz intolerans üzerindeki etkileri

Sütün başlıca karbonhidratı olan laktoz ya da süt şekeri yalnız sütte bulunur. Laktoz, glukoz ve galaktoz gibi iki monasakkaritin birleşmesinden meydana gelmiş bir disakkarittir. İnce bağırsakta β - galaktozidat denen laktoz enzimi ile

kendisini oluşturan bu şekerlere parçalanmaktadırlar. Laktoz enzimi sentezlenmediği zaman, laktoz bağırsaklarda parçalanmaz ve kalın bağırsağa geçerek burada bulunan mikroorganizmaların etkisiyle parçalanır. Bu durum sindirim bozukluklarına, diyare, karın ağrısı ve kramplara ve hatta gaz oluşmasına neden olmakta ve literatürde “Laktoz intoleransı”, “Laktoz malabsorbsiyonu” ya da “Laktoz eksikliği” gibi tanımlarla belirtilmektedir (1).

Fermente süt ürünlerinde laktozun inkübasyon sırasında fermente olması ve starter olarak kullanılan bakteriler tarafından enzimin sentezlenmesi bu problemin büyük ölçüde ortadan kalkmasına neden olmaktadır (5).

Laktoz enziminin *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* gibi yoğurt bakterilerinde bulunduğu ortaya konulmuştur. *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*’dan yaklaşık 3 misli daha fazla laktoz içermektedir. Yoğurttaki laktoz aktivitesi inkübasyon sırasında artarak, 4 saat sonra maksimum düzeye yükselmektedir. Laktoz miktarının önemli bir kısmı bakteri hücreleri tarafından bağlanmaktadır. Ancak yoğurt kültürü yapay sindirim sistemi koşullarında inkübe edildiğinde enzimin serbest hale geçtiği ve aktivitesinin yükseldiği görülmektedir (62).

Bebekler, çocuklar ve gençler uygun bir kemik büyüme ve gelişmesi için kalsiyuma ihtiyaç duyarlar. Kalsiyumca zengin olan süt ve süt mamüllerinin laktoz intolerans kişiler tarafından sınırlı olarak kullanımı bu minerallerin alımını da kısıtlayacaktır. Yoğurt kalsiyumca zengin olup, az miktarda doğal laktoz içermektedir. Ayrıca fermentasyon sırasında yoğurt kültürü tarafından oluşturulan laktozu da bulundurmaktadır (57)

2.7.4. Kolesterol düşürücü etkisi

Metabolizmada önemli rol oynayan kolesterolün vücut tarafından sentezlendiği bilinmektedir. Ancak kandaki kolesterol miktarının yükselmesi organizmada bazı rahatsızlıklara yol açmakta ve kalp hastalığına teşvik eden temel faktörlerden birinin yüksek kolesterol olduğu düşünülmektedir. Bunun

için diyetle yer alan bazı fermente süt ürünlerinin kolesterolü düşürmede önemli bir etkisi bulunduğu kabul edilmektedir (52).

Probiyotik bakteriler ile üretilen fermente süt ürünlerinin veya bu bakterilerinin canlı hücrelerinin yenmesi, insanlarda düşük kolesterol düzeyinin oluşması, olası dört faktörden kaynaklanabilir.

- Beta- galaktosidaz enziminin fermente süt ürünlerinde bulunması
- Bazı bağırsak bakterilerinin yiyeceklerle alınan kolesterolü metabolize etme yeteneğinde olması. Böylece kana geçmesinin azalmasına neden olur.
- Bakterilerin bağırsaklarda kolesterol prekürsörlerini veya kolesterolü azaltır.
- Bazı laktobasillerin safra tuzlarını parçalamasıyla safra tuzlarının karaciğer tarafından emilmesi engellenir. Böylece safra tuzu absorbe edemeyen karaciğerin, safra tuzu sentezlemek için fazla miktarda serum kolesterolünü kullanması sonucunda serumda kolesterol miktarını azaltır (51).

Kan kolesterolünü düşürmede fermente süt ürünlerinin payı konusundaki çalışmalar dikkate değer bir önem taşımaktadır (57).

Bir araştırmada, Afrika'da bol miktarda fermente süt içeren ve et yiyen Maasai Tribesmen halkının, serumlarında düşük düzeyde kolesterol ve çok düşük oranda kalp damar hastalığı saptanmıştır. Bunun nedeni insanların günde 4-5 litre fermente süt içmeleri ile bağdaştırılmıştır (57).

2.7.5. Antikanserinojenik etkisi

İnsanlarda görülen kanserlerin nedeni %80-90 oranında çevresel faktörlerden kaynaklanmaktadır. Karsinojen maddeler vücut dışında üretilmekte ve ön

karsinojen maddeler olarak alındıktan sonra kanser etmeni bileşiklere dönüşmektedir. Bağırsak sisteminde bulunan karsinojenlerin inaktivasyonunda, yayılmasında ve özellikle nitrozaminlerin ve safra sterollerin kanser etmeni maddelere dönüşmesinde önemli rol oynarlar. Probiyotiklerin kanser oluşumunu riskini azalttığı birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur (52). Örneğin Aso ve Akanzan (1992), çalışmalarında 10^{10} cfu/g düzeyinde *Lactobacillus casei* toz preparatından bir yıl boyunca günde üç defa tüketen insanlarda mesane kanseri tedavi sürecinin hızlandırıldığını tespit etmişlerdir (63). Bir başka çalışmada ise *L. acidophilus* tüketiminin kalınbağırsak kanserini önlediği tespit edilmiştir. Bu çalışmaya 21 adet sağlıklı bireylerden gönüllüler katılmış ve *L. acidophilus* kültürü süt veya yoğurda katılarak deneklere verilmiştir. Araştırmacılar bir aylık uygulama periyodundan sonra dışkıdaki prokarsinojenleri karsinojene dönüştüren bakteriyel enzim konsantrasyonunda önemli azalmalar olduğunu bildirmişlerdir (2,52,64).

2.7.6. Antimikrobiyal etkisi

Fermente süt ürünlerinin antimikrobiyal özellikler taşıdığı eskiden beri bilinmektedir. Bu özellikler başlıca laktik asite bağlanmaktadır. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkisi; laktik asit, H_2O_2 ve antibiyotik benzeri maddeler üretmelerinden kaynaklanmaktadır. Laktik asit ortam pH'sını düşürerek diğer bakteriler için uygun olmayan bir durum yaratır. *L. acidophilus* tarafından üretilen H_2O_2 'in bağırsak patojenlerine karşı oluşturulan antogonistik etkide rol oynadığı belirlenmiştir (655). Bir çok LAB'sinin çeşitli gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı etkili olan mikrobiyal bileşikler ürettiği bilinmektedir (7). Bu bileşiklere, bakteriosin adı verilmektedir.

Antimikrobiyal maddeler oluşturarak engelleme yanısıra *L. johnsoii* La1 suşunun istenmeyen mikroorganizmaların etkilerini (bağırsak çeperlerine tutulmalarını engelleyerek) kompetitif baskılama yoluyla azalttığı

belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar LC1'in bağırsaklarda zararlı bakterilerle rekabet ederek, onlardan önce bağırsak hücrelerine tutunduğunu ve böylece rahatsızlıklarını önlediğini göstermiştir. Bu sonuçlar sindirim sisteminde görülen *E.coli* ve *Salmonella spp.* gibi patojenlerin yol açtıkları hastalıklardan bu tür probiyotik ürünlerin tüketilmesi ile korunmanın mümkün olduğunu düşündürmektedir (57).

2.7.7. Bağışıklık sistemine etkisi

Probiyotik bakterilerin endojen savunma mekanizmasının arttırdığı ileri sürülmektedir. Probiyotiklerin barsaklarda özgül olmayan savunma bariyerini uyarıcı etkisi, artan intestinal permeabiliteyi normale dönüştürmesi ve barsak mikroflorasını değiştirmesi ile açıklanmaktadır. Ayrıca bu etkinin intestinal immünoglobulin A (IgA) yanıtını arttırması ve intestinal inflamatuvar yanıtı hafifletmesi ile ilgili olabileceği belirtilmektedir. Probiyotiklerin bu etkinliklerini fagositik aktivite, sitokin salınımı, doğal öldürücü hücre aktivitesi, immünoglobulin aktivitesi (Ig A, IgG, IgM), T ve B hücre fonksiyonunu arttırarak gösterdiği ileri sürülmektedir (2,52).

Probiyotiklerin bu aktivitesinin alerjik duyarlılığı olan bireyler içinde önemli olduğu vurgulanmıştır. Yapılan çalışmalarda probiyotik bakterilerin sağlıklı ve alerjik bireylerde farklı fagositik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Sağlıklı bireylerde immün sistemi uyarıcı etki, alerjik bireylerde inflamatuvar yanıtı azaltıcı etki yapmaktadır. Bu veriler gastroenterit, besin alerjisi ve inflamatuvar barsak hastalıkları gibi barsak mukoza bariyerindeki bozukluklarda probiyotiklerin kullanılabileceğini göstermektedir (2,52,66).

2.7.8. Vitamin metabolizmasını iyileştirme etkisi

Fermentasyon süresince laktik asit bakterileri özellikle hızlı gelişme dönemlerinde büyümeleri için vitamine gereksinim duyarlar ve B₆, B₁₂ ve C vitaminini tüketirler (62). Ancak probiyotik bakteriler bağırsak florasında

yeterli sayıda bulunduklarında vitamin sentezledikleri de belirtilmiştir. Bu bakterilerin ürettiği vitaminlerin en önemlileri, tiamin (B₁), riboflavin (B₂), pridoksin (B₆) ve naftokin (K)'dır.

Bununla birlikte Bifidobakterler arasında yer alan *B.bifidum* 'un, özellikle B₆ vitaminin sentezlenmesinde çok önemli rolü olduğu ve bu bakterinin söz konusu faaliyeti sonucunda, intestinal floradaki B₆ vitaminin artış oranının %400 civarına ulaştığı tespit edilmiştir (51,67).

2.7.9. Böbrek Rahatsızlıklarını İyileştirme Etkisi

Böbrek fonksiyonundaki aksaklıklar metabolik anormalliklere örneğin amonyak ve aminlerin de bir artışa neden olmaktadır. Böbrek sirozu hastalarına uzun bir periyot bifidüs süt verildiği zaman bifidobakterlerin sayısının artmasıyla kanda amonyak, dışkıda fenol ve üre miktarının önemli derecede azaldığı ve bu hastaların kilo aldığı gözlemlenmiştir.

Bifidobakterlerin böbrek rahatsızlıklarını iyileştirme ve kan amonyak düzeyini azaltma nedenleri şunlardır ;

1. Bifidobakterler tarafından amonyağın bir nitrojen kaynağı olarak kullanılması,
2. Amonyak ve amin üreten bakterilerin gelişimini önlemesi,
3. Bifidobakterler tarafından üretilen organik asitlerle bağırsak pH'sının düşmesiyle iyonik koşulların oluşması ve amonyağın proton olarak absorbe edilemeyen NH₄⁺ (amonyum) forma dönüşmesi ve böylece kandaki amonyak düzeyinin azalması,
4. Bifidobakterlerin alifatik aminler, hidrojen sülfid veya nitritler oluşturmamasıdır (12).

2.7.10. Karaciğer rahatsızlıkları üzerine etkisi

Probiyotik mikroorganizmaların karaciğer rahatsızlıkları üzerine etkisi bilinmektedir. Özellikle laktobasiller uzun süre canlı kalabilmekte ve böylece *Salmonella* türlerinin sayısını azaltmaktadır (68).

Barsaklarda azotlu bileşiklerin amino asit deaminasyonu ve bakteriyel hidrolizi ile oluşan amonyağın, hepatik ensefalopati patogeneğinde önemli rol oynadığı kabul edilmektedir. *Lactobacillus acidophilus* ve neomisin ile tedavi edilen hastalarda sadece neomisin ile tedavi edilen hastalara kıyasla fekal üreaz aktivitesinin daha fazla azaldığı belirlenmiştir. Fekal üreaz aktivitesinin azalması; serum amonyak düzeyini düşürerek hastanın klinik durumunun düzelmesine yol açmaktadır (52).

2.7.11. Kalp rahatsızlıkları üzerine etkisi

Yoğurdun kalp rahatsızlıklarına etkisi konusunda da bazı çalışmalar yürütülmektedir. Yalnız bu konuda henüz bilimsel bir yayına rastlanamamıştır. Fakat A.B.D. tıp kongresinde yapılan tebliğde yoğurdun vücuda giren ve kana karışan tüm zararlı maddeleri temizlemesi ve kandaki kolesterolü dengelemesi nedeniyle kalp hastalıklarını önleyen bir ilaç olabileceği belirtilmiştir (56).

2.7.12 Zehirlenme üzerine etkisi

Bazı iz elementlerden ileri gelen zehirlenme olaylarında hastaya süt içirmenin veya yoğurt yedirmenin yararlı olduğu bilimsel olarak açıklanmıştır. Süt proteinleri Cu ve Fe gibi maddelerle kompleksler oluşturmakta dolayısıyla bu maddelerin kana geçmesini önleyerek zehirlenmeye engel olmaktadır (56).

2.7.13. İdrar yolları enfeksiyonu üzerine etkisi

İdrar yolları enfeksiyonlarına *Lactobacillus* türlerinin olumlu etkisi yapılan çeşitli araştırmalarla belirlenmiştir.

Vaginada *L. acidophilus* gelişerek asidik pH'yı korur. Bakteriyel enfeksiyon sırasında vaginal mikroflora değişir. Orta yaşlı kadınlar arasında idrar yolları enfeksiyonunu meydana getiren mikroorganizmalar *E. coli* , *Pseudomonas spp.* ve *Candida albicans* olarak bilinmektedir. Araştırmalar sonucu çeşitli laktobasillerin in vitro ortamda vagina epitel hücrelere bağlanabildiğini ve bağlamada suşlar arasında fark görülmediğini belirtmişlerdir (57).

İdrar yolları patojenlerine engel olmada; tüm canlı *Lactobacillus* hücre duvarlarına ait analizler, bu mikroorganizmaların idrar yolları epitel hücrelerine bağlanmasından lipoteikoik asidin sorumlu olduğunu göstermiştir. Hastalık durumunda patojen bakteri suşları belli reseptör yerlerine bağlanmaktadır. Epitelyumu kaplayan laktobasiller ise patojenlerin reseptörlere ulaşmasını önler. Bu da; idrar yollarına ait normal floranın patojenlere karşı korunmasını sağlar (57).

2.7.14. Deri üzerine olumlu etkisi

Yine yoğurdun yanıklar ve derideki bazı yaraları tedavi ettiğini belirten araştırmalar, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *L. acidophilus* kültürlerinin liyofilize edilmiş şekli olan ve “Latinex” adı altında ilaç olarak satılan preparatın, ekzama ve oral enfeksiyonlar için başarı ile kullanıldığını açıklamışlardır (56,69).

2.8. Tutuklama (İmmobilizasyon)

Tutuklama; suda çözünen ve çözeltide serbest hareket edebilen enzim moleküllerinin suda çözünmeyen reaktif polimerik destek materyaller kullanılarak hareketlerinin sınırlandırılmasına denir (70).

Tutuklanmış enzimlerde, enzimin hareketleri sınırlandırılmış ve belli bir desteğe veya polimerik matriks’de alıkonularak tekrar tekrar katalitik aktivite

göstermesi amaçlanmıştır. Tutuklama sadece enzimlere değil ayrıca hücresel organellere, mikrobiyal hücrelere, bitki hücrelerine ve hayvan hücrelerine v.b. uygulanabilir (70,71).

Tutuklanmış enzimlerin ilk endüstriyel uygulaması 1969 yılında Chibata tarafından gerçekleştirilmiştir ve yine ilk olarak hücre tutuklaması Chibata ve çalışma arkadaşlarınca 1973 yılında yüksek seviyede aspartaz aktivitesine sahip *E. coli* 'yi poliakrilamit jelinde hapsetmişlerdir (70).

Son 20-30 yılda enzim tutuklamasının yanında mikroorganizma tutuklaması da önem kazanmıştır. Substrat, mikroorganizmanın içerdiği enzimlerden biri için spesifik ise saf bir enzimin tutuklanması yerine bunu içeren mikroorganizmanın tutuklanması ve saflaştırılmasına gerek kalmayacağından ekonomik açıdan büyük yarar sağlamaktadır. Özellikle son ürün elde edebilmek için birden fazla enzimden yararlanılıyor ve problem yaratmıyor ise enzim yerine mikroorganizmanın tutuklanması çok ekonomiktir (70).

2.8.1. Taşıyıcı (Destek Materyali)

Tutuklamada doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcı materyal, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir. Tutuklamada kullanılan taşıyıcılarda (destek materyallerde) çeşitli özellikler aranır.

Bunlar;

1. Hidrofilik karakter.
2. Suda çözünmeme.
3. Gözenekli (poröz) yapı.
4. Mekanik stabilite ve uygun parçacık formu.
5. Kimyasal veya termal kararlılık.
6. Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcılar yumuşak koşullarda tepkime verebilen gruplar taşımali.
7. Mikroorganizmalara karşı dirençlilik.

8. Ucuzluk, zehirsizlik ve rejenere olabilmelidir (70,71).

Özellikle hücreleri tutuklamak için seçilen polimerde aşağıdaki özellikler aranır.

1. Jel oluşturacak polimer çözeltisi hücre süspansiyonu ile kolayca karışabilmelidir.
2. Hücrelerin canlılığını korumak için, zehirleyici maddelerin bulunmadığı ılımlı bir ortamda jel oluşturulmalıdır.
3. Jel, fermentasyon şartlarında mekanik kararlılığını korumalı ve toksik olmamalıdır.
4. Toplam maliyeti düşük olmalıdır.
5. Gözenek çapı, substratın içeri girmesine, ürünlerin dışarı çıkmasına yetecek kadar geniş ve hücrelerin destek içinde kalmasını sağlayacak kadar dar olmalıdır (71).

Bu özellikleri içeren destek polimerlerine şu örnekleri verebiliriz Carrageenan, Kırmızı alglerin hücre duvarlarından elde edilen başka bir polisakkarittir. Hücre tutuklanmasında yeni yeni kullanılmaya başlanan bir polimerdir (70). Alginatlar, alginat türevleri ve alginik asit, kahverengi alglerden elde edilen bir karbonhidrattır. Hücre tutuklanmasında çok sık kullanılır. Ucuz ve kullanımı kolaydır. Asitliğe çok dirençli değildir (8,75). Xanthan, Xanthan gum bir heteropolimer olup, bitki patojeni olan (ilk defa Rutabaga bitkisinden izole edilmiş) *Xanthomonas campestris* tarafından üretilmektedir. (70). Bu polimerler tek başlarına kullanılabileceği gibi gellan-xanthan, alginat-nişasta gibi karışımlarla da kullanılmaktadır. Bu karışımlarla polimerin yüksek asitlik veya bazlık gibi olumsuz ortamlarda bozunmadan kalabilme süresinin artırılması hedeflenmektedir (6).

2.9. Mikroorganizma Tutuklanması

Pratikte ve endüstriyel uygulamalarda çeşitli üstünlükler göstermesi nedeniyle mikroorganizmaların ya belirli tutucularda tutularak ya da

taşıyıcıların kafes yapıları içerisinde tutuklanarak veya çevreleri yarı geçirgen film tabakası ile çevrilerek kullanılmaları düşünülmüş ve bununla ilgili olarak son yıllarda yeni teknikler geliştirilmiştir (72).

2.9.1. Tutuklanmış mikroorganizmaların serbest mikroorganizmalara göre avantajları

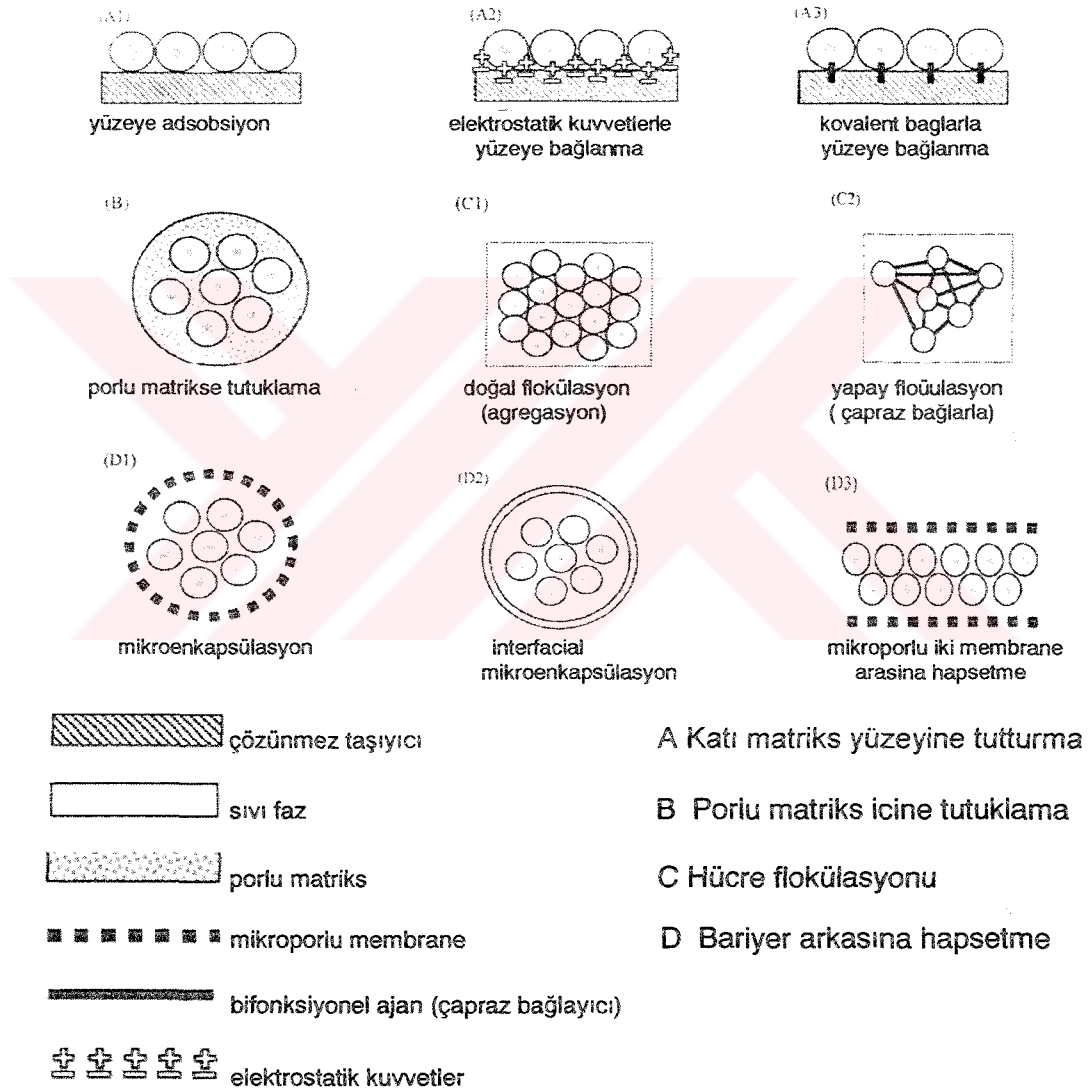
Mikroorganizmalar aracılığıyla yapılan dönüşümlerden besin, kimya, tıp ve benzeri endüstri kollarından geniş ölçüde faydaniılmaktadır. Ancak serbest mikroorganizma sistemlerine göre, tutuklanmış mikroorganizmaların kullanılmasının büyük avantajlar sağladığı gözlenmiştir. Bu avantajlar aşağıdaki gibi sıralanabilir.

1. Tutuklanmış mikroorganizmalarda enzimler kendi doğal ortamlarında korundukları için daha kararlıdır.
2. Tutuklanmış mikroorganizma sistemlerinde kontaminasyon görülmez. Bu da dönüşümün artmasını sağlar ve ortamda başka ürünlerin oluşmasını önler.
3. Mikroorganizmalar tek bir süzme işlemi ile geri kazanılarak ve rejenere edilerek tekrar kullanılabilir.
4. Sürekli sistemlerde çalışma olanağı sağlar. Sürekli üretim serbest mikroorganizma sistemlerine göre daha verimli bir şekilde gerçekleştirilebilir.
5. Enzimleri mikroorganizmalardan izole etme ve saflaştırma işlemlerine gerek yoktur.
6. Mikroorganizmalar stresli koşullarda daha uzun süre canlılıklarını ve metabolik aktivitelerini koruyabilirler.

Tutuklanmış mikroorganizmaların bu avantajlarının yanında bazı dezavantajları da vardır. Serbest mikroorganizmada kullanılan sistemlere göre difüzyon ve kütle aktarımı sorunları daha fazladır (70,72)

2.10. Mikroorganizma Tutuklama Yöntemleri

Enzim tutuklanması için bir hayli metot vardır. Hücrelerin hassas yapılarından dolayı enzim tutuklanmasında kullanılan metotların tamamı hücreler için kullanılmaz (75). Hücrelerin tutuklanmasında kullanılan metodlar Şekil 2.2'de gösterilmiştir. (73).



Şekil 2.2. Hücre tutuklama yöntemleri

Hücre tutuklama yöntemleri

1. Adsorbsiyon ve kovalent bağlanma

Bir yüzey ile mikroorganizmaların etkileşmesi sonucu hücrelerin bu yüzeye bağlanması doğada çok yaygın bir olaydır. Doğal olarak oluşan mikrobiyal filmlerin kalınlığı, tek tabakadan milimetreler mertebesinde veya daha kalın filmlere kadar çıkabilir. Bu proses elektrostatik etkileşimin sonucu olarak ,adsorbsiyon yoluyla veya kovalent bağlanma yoluyla gerçekleşir. Bu yöntemin hücre tutuklamasında pek yok uygulamaları vardır (74).

2. Tutuklama {Entrapment}

Gözenekli bir matris içine hücrelerin hapsedilmesi yaygın olarak kullanılan bir tutuklama yöntemidir. Bu uygulamada iki yöntem vardır.

a- Önce hücreler mevcut matrisin içine difüzyonla hareket ederler. Burada hapsedilen hücreler üremeye başlar ve hücrelerin hareketi diğer hücreler tarafından engellenir. Kieselgur, seramikler, paslanmaz çelik, gözenekli köpükler gibi matrisler bu amaç için kullanılmaktadır.

b- Hücrelerin hapsedilmesinde kullanılan matrisler, hücrelerin çevresinde oluşturulabilir. Mikroorganizmaların üç boyutlu polimerik ağ içinde hapsedilmesi çok popüler bir yöntemdir. Hücre etrafında polimer ile bir örgü oluşturulur. Oluşan örgünün gözenekleri, hücre molekülünden küçük, substrat ve ürün moleküllerinden büyüktür. Bu yüzden hücreler bağ ile bağlı olmadıkları halde dışarı çıkamazlar adeta bu oluklarda hapsedilirler hücrenin hareketi kısıtlanır; ancak substratın içeri girişi ve ürünün dışarı çıkışı mümkündür. Çeşitli enzim ve hatta mikroorganizmalarda bu şekilde tutuklanabilmektedirler. Bu amaç için en çok kullanılan matrisler poliakrilamid, K-karragen, agar, alginat, epoksi reçineleri gibi maddelerdir (70,71,74).

3. Gözenekli bir bariyer arkasına hapsetme

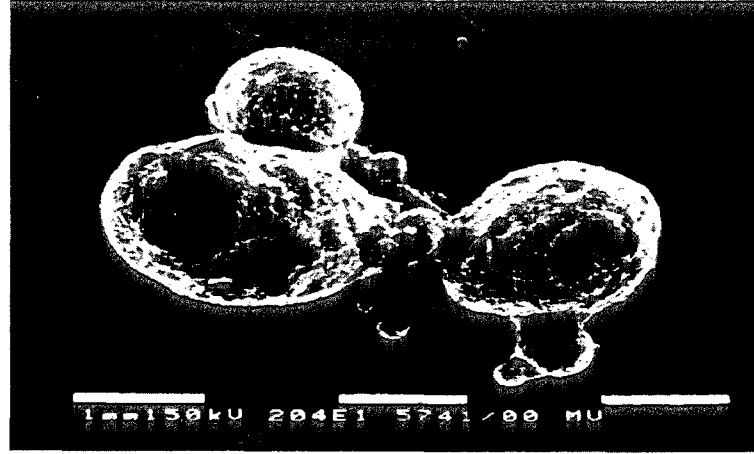
Bu kategoride, tutuklanacak hücreler, ya önceden oluşturulan ya da yerinde bir bariyerin arkasına hapsedilir. Hücreleri hapsetmek için kullanılan bariyerler iki karışmayan sıvının sıvı-sıvı arayüzeyi veya substratların hücreye ulaşmasına izin veren yarı geçirgen sıvı membran olabilir. Hücreler ve makromoleküller bu membranın içinde tutulur. Yarı geçirgen membranlar son yıllarda hücre tutuklamasında yaygın olarak üzerinde durulan yöntemlerdendir.

Ultrafiltrasyon ve mikrofiltrasyon membranlar çeşitli mikrobiyal, hayvan ve bitki hücrelerini tutuklamada kullanılmaktadır. Bu yöntem aynı zamanda mikroenkapsülasyon olarak adlandırılır. Mikrokapsülleme yönteminde, Mikrokapsüller içlerindeki maddeleri dışarı geçirmemekte ancak substratın içeri girişi ve ürünün dışarı çıkışı çok kolay olmaktadır (74).

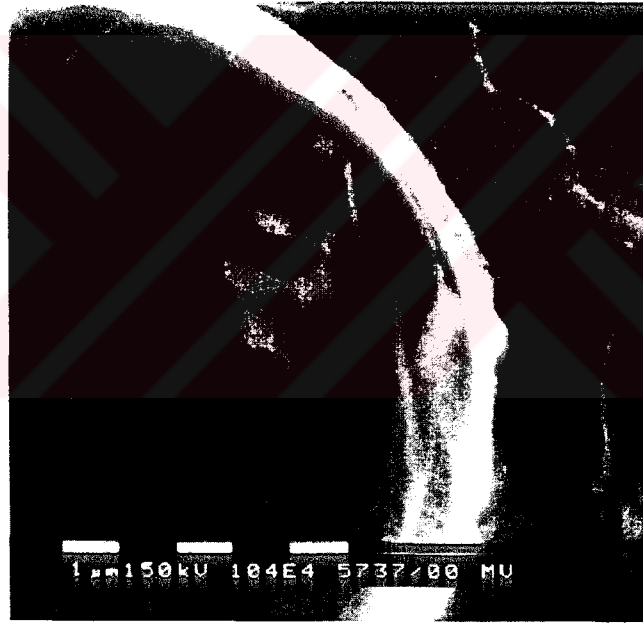
4. Flokülasyon

Dördüncü grup hücre tutuklama yöntemi flokülasyon veya yığılmadır. Bu yöntem matriks kullanılmaksızın gerçekleşen bir yöntemdir. Bu yöntemde kullanılabilecek hücreler, doğal olarak pellet oluşturan küfler, bitki hücreleri, mayalar ve bakterilerdir. Bazen yapay ajanlar kullanılarak flok oluşumu ve yığılma kolaylaştırılabilir (74).

Kürelerin ve alginat matriksi içerisine tutuklanan *L. acidophilus*'un elektron mikroskop görüntüsü sırasıyla Resim 2.3. ve Resim 2.4. verilmiştir (15).



Resim 2.3. Kürelerin elektron mikroskop görüntüsü



Resim 2.4. Alginat matriksi içerisine tutuklanan *L. acidophilus*'un elektron mikroskop görüntüsü

2.11. Probiyotik Mikroorganizmaların Tutuklanması

İnsanoğlunun bilinçli kullanımı yeni bir olay olmamasına rağmen tutuklanmış hücreler doğada çok yaygındır. Mikroorganizmaların bir yüzeye tutunması, mikrobiyal ekolojide çok önemli rol oynamaktadır. Enzimlerle başlayan tutuklama çalışmaları hücrelerde uygulanmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır.

tutuklama çalışmaları hücrelerde uygulanmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Endüstriyel uygulamalar başlangıçta, tek enzim gerektiren proseslerde inaktive edilmiş hücrelerle yapılmış fakat daha sonra tutuklanmış hücre teknolojisinde bilgi birikiminin artmasıyla çok enzim gerektiren canlı hücrelerin kullanıldığı prosesler uygulanmaya başlanmıştır (72).

İlk hücre tutuklama çalışmalarında amaç, hücrenin ürettiği enzimlerden veya ürünlerden faydalanmaya yöneliktir. Endüstriyel boyutta fazla miktarda ürünün ve enzimin üretilmesi için hücreler tutuklanıyor ve tekrar tekrar kullanılabilirdi. Tutuklamada kullanılan metod ve destek materyalinin, tutuklanmış hücrenin ürün verimine etkisinin bulunmasından sonra değişik destek materyalleri ve metodlar uygulanmaya başlandı (71).

Son 20 yılda probiyotik mikroorganizmaların tutuklanması popüler hale gelmiştir. Bilindiği gibi probiyotikler insan sağlığına olumlu etkileri olan mikroorganizma grubundan oluşmaktadır ve bir çok probiyotik gıda da sağlık amaçlı tüketime sunulmaktadır. Probiyotik mikroorganizmaların tutuklanma nedenlerine bakıldığında, probiyotiklerde meydana gelen yüksek oranda hücre kaybının en büyük etken olduğu görülmektedir (6).

Probiyotik mikroorganizmalar ulaşmaları gereken yer olan bağırsağa gelmeden önce ürün içerisinde ve daha sonra insan vücudunda mide asitliği , safra tuzları gibi olumsuz etkilerle karşılaşmaktadırlar. Bu süreçte birçok mikroorganizma ölmekte veya probiyotik özelliklerini yitirmektedir. Araştırmacılar bu olumsuz şartlardan hücrenin tutuklanarak korunabilineceğini öne sürmüşler ve bu konuda çalışmalara hız vermişlerdir (6,15,75).

Yapılan çalışmalara baktığımızda ilk literatür kayıtlarına 1980'li yıllarda rastlamaktayız. Fakat asıl patlama son 10 yıl içerisinde olmuştur. Çeşitli metodlar kullanılarak farklı destek materyallere tutuklanan probiyotik hücrelerin olumsuz şartlardan korunduğu ve tutuklama sonrası probiyotik

özelliklerini kaybetmedikleri yeni yapılan çalışmalarla günyüzüne çıkmaktadır (6,15,16).

Starter ve probiyotik mikroorganizmaların tutuklanarak üstün kalitede probiyotik ürünlerin üretilmesi için çalışmalar hızla devam etmektedir.



3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Materyal örnekleri

Çalışmada kullanılan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşları Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür stoklarından temin edilmiştir. Bu suşların 23 adedinin izolasyonları, 101T129 nolu TBAG projesi kapsamında geleneksel yöntemler ile mayalanmış yoğurtlar Ankara'ya yakın köylerden toplanmıştır. Yine aynı proje kapsamında çalışılan 2 adet suş Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümü Prof. Dr. Nezihe Tunail'den temin edilmistir. Suşların identifikasyonu API 50 CHL kiti kullanılarak, ayrıca 16S rRNA sekans analizlerine göre yapılmıştır. Suşların tanımlanması da TBAG projesi (101T129) kapsamında yapılmıştır.

İzolasyonu ve identifikasyonu yapılan bu bakterilerin bakteri kodları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Test bakterileri olarak kullanılan patojen türler *Escherichia coli* ATCC 11230, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* NRLL-B 4375, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212, *Bacillus cereus* RSKK 863, *Salmonella enteriditis* RSKK 171 ve *Yersinia enterocolitica* ATCC 1501 Gazi Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarından temin edilmiştir. Yine test bakterisi olarak kullanılan *Aeromonas hydrophila* 106 G.Ü.F.E.F. Mikrobiyoloji Laboratuvarı Yrd. Doç. Dr. Nihal Yücel 'den temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmamızda kullandığımız bakteri kodları

No	Bakteri
1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 18
2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 22
3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> A11
4	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> A12
5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> A13
6	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> AK11
7	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> EB7
8	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> F11
9	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> F12
10	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> G11
11	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> G12
12	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> H11
13	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> H12
14	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> M11
15	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> M12
16	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> N11
17	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> N12
18	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> P12
19	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> W11
20	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> W12
21	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B2
22	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B3
23	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> C7L

3.1.2. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları

Çalışmada kullanılan tüm test bakterileri uygun sıvı besiyeri ve sıcaklıkta 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait suşlar için MRS Broth ve agarı, *A. hydrophila*, *S. enteritidis*, *Y. enterocolitica*, *M. luteus*, *B.cereus*, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* türleri için Nutrient Broth ve agarı kullanılmıştır.

Çalışmalarda kullanılan metoda göre *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait suşların gelişme eğrileri göz önüne alınarak 16-18 saatlik (logaritmik faz), 20 saatlik (durgun faz) veya 24 saatlik (geç durgun faz) kültürleri kullanılmıştır. Ayrıca bazı çalışmalarda 42 °C'de MRS Broth'da anaerobik (jar ve CO₂ kiti kullanılarak) koşullarda 20 saatlik ikinci defa aktifleştirilmiş kültürler kullanılmıştır (76,77)

3.1.3. Araştırmada kullanılan besiyerleri

MRS (Man Rogosa and Sharpe) Sıvı Besiortamı

<u>Maddeler</u>	<u>g/L</u>
Peptone	10,0
Beef Extract	10,0
Yeast Extract	5,0
Glucose	20,0
Tween 80	1,08 mL
K ₂ HPO ₄	2,0
Sodium Acetate.3 H ₂ O	5,0
Tri Amonium Citrate	2,0
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,2
MnSO ₄ .4 H ₂ O	0,05

Maddeler 1000 mL distile suya ilave edilmiştir. Besiortamının pH'sı 0,01 N HCl ve 0,01 N NaOH'le 6,2±0,2'ye ayarlanmıştır. Amaca uygun olacak şekilde besiortamına %1,5 oranında agar ilave edilip katı besiyeri hazırlanmıştır. Besiortamı 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir (76).

Nutrient Sıvı Besiortamı

<u>Maddeler</u>	<u>g/L</u>
Beef Extract	1,0
Yeast Extract	2,0

Peptone	5,0
Sodium Chloride	5,0

Maddeier 1000 mL distile suya ilave edilmiştir. Besiortamının pH'sı 0,01 N HCl ve 0,01 N NaOH'le $6,8\pm0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Amaca uygun olacak şekilde besiortamına %1,5 oranında agar ilave edilip katı besiyeri hazırlanmıştır. Besiortamı 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir (78).

3.2. Metod

3.2.1. Bakterilerin muhafazası

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* türüne ait suşların muhafazası için eppendorf tüplerine 0,3 mL gliserol (Merck) konularak, 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir. Bakteriler uygun sıvı besiortamında aktiveleştirilmiştir. Aktifleştirilen kültürlerden 0,6 mL gliserol içeren steril eppendorflara ilave edilerek, -20°C'de muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar iki ayda bir yenilenmiştir (79).

Patojen suşların muhafazası için Nutrient Agar besiyeri kullanılmıştır. Tüplere besiyerinden 7 ml konularak, otoklavda steril edilmiştir. Oda sıcaklığında yatık olarak soğutulan besiyerine aktif kültürlerden çizgi ekim yapılarak, uygun sıcaklıktaki etüvierde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Üreme görülen tüpler +4 °C'de saklanmıştır

3.2.2. Suşların üreme eğrisinin çıkarılması

Çalışmalarda logaritmik veya durgun fazda yer alan kültürler kullanılacağından dolayı denemelerden önce bakterimizin üreme eğrisi çıkarılmıştır.

Üreme eğrisi, Pereira ve ark'larının (2001) metoduna göre yapılmıştır (80). MRS sıvı besiyerinde 42 °C'de, ikinci defa aktiveleştirilen kültürlerden alınan örneklerin, belirli aralıklarla spektrofotometrede (Jenway 6105 u.v/vis.) optikal dansiteleri (OD) okunmuştur. OD okumasına 2. saatte başlanmış, son okuma ise 22. saatte yapılmıştır. Elde edilen OD değerlerinden yararlanılarak üreme eğrisi oluşturulmuştur.

3.2.3. *L. delbrueckii* subsp.*bulgaricus* türlerinin antimikrobiyal etkisi

Bu çalışma tutuklanmış ve serbest hücreler üzerinde yapılmıştır. *L. delbrueckii* subsp. *ulgaricus* türüne ait suşların anaerobik (jar ve CO₂ kiti kullanılarak) koşullarda 20 saatlik ikinci defa aktiveleştirilmiş kültürler kullanılmıştır. Aktif kültürler 5000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan berrak kısım (süpernatant) steril şartlar altında 0,45 µm'lik disposable filtre ile mikrofiltrasyon yolu ile sterilize edilmiştir.

Çalışmada test bakterileri olarak *E. coli* ATCC 11230, *S. aureus* ATCC 25923, *A. hydrophila* 106, *M. luteus* NRLL-B 4375, *P. aeruginosa* ATCC 29212, *B. cereus* RSKK 863, *Y. enterocolitica* ATCC 1501, *S. enteriditis* RSKK 171 kullanılmıştır.

Test bakterileri Nutrient sıvı besiyerinde uygun inkübasyon sıcaklıklarında 24 saat inkübe edilerek aktiveleştirilmiştir. Aktif kültürlerden (50 µL) steril petri kaplarına aktarılmıştır. Daha önceden hazırlanan ve 50°C'ye kadar soğutulan steril 20 mL Nutrient katı besiyeri plaklara aktarılmıştır. Besiyerini ile test bakterilerinin homojen bir şekilde karışımı sağlanmış ve besiyerinin donması için buzdolabında 2 saat süre ile bekletilmiştir. Donan katı besiyeri üzerinde 0,6 cm çapındaki steril çubukla kuyular açılmıştır. Kuyuların tabanları steril agarla sıvanmıştır. Kuyulara, *L. delbrueckii* subsp.*bulgaricus* türüne ait suşların mikrofiltrasyonla sterilize edilen berrak kısımlarından 100 µL ilave edilmiştir. Petri kapları uygun inkübasyon sıcaklıklarında 24 saat

inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyu çevresinde oluşan zonların çapı kumpas ile ölçülmüştür (81).

3.2.4. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarının D(-) Laktik asit üretimlerinin tespiti

Bu çalışma tutuklanmış ve serbest hücreler üzerinde yapılmıştır. Çalışmada kullanılan *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* türüne ait aktif suşlar 5 mL'lik MRS Broth besi ortamına %1 oranında inoküle edilerek, 42 °C'de 20 saat inkübasyona bırakılmıştır. Serbest aktif kültürler 5000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan berrak kısımdaki (süpernatant) laktik asit miktarı D-Lactic acid/ L-Lactic acid (Boehringer Mannheim/R-Biopharm) kiti kullanılarak g/L olarak belirlenmiştir. Tutuklanmış hücrelerde, 5 mL'lik MRS Broth besi ortamına 50 küre eklenmiş ve 42 °C'de 20 saat inkübasyona bırakılmıştır. Berrak kısım (süpernatant) daki laktik asit miktarı D-Lactic acid/ L-Lactic acid (Boehringer Mannheim/R-Biopharm) kiti kullanılarak g/L olarak belirlenmiştir.

3.2.5. D-Laktat dehidrogenaz ve toplam laktat dehidrogenaz enzimlerinin spesifik aktiviteleri

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* türüne ait suşların laktik asit üretimleri belirlenerek, yüksek, orta ve düşük düzeyde üretim gerçekleştiren 3 suş seçilmiştir ve bu suşların D-Laktat dehidrogenaz (D-LDH) ve toplam laktat dehidrogenaz (T-LDH) enzimlerinin spesifik aktiviteleri belirlenmiştir (82).

D-Laktat dehidrogenaz enziminin spesifik aktivitesi

- Aktif bakteri kültürü 50 mL MRS Broth besiyerine %1 oranında aşılanmış ve 16 saat (logaritmik faz) boyunca 42 °C 'de inkübasyona bırakılmıştır.
- 15 dk 5000 rpm' de santrifüj yapılarak 50 mL MRS Broth besiyerinde üreyen tüm hücreler toplanmıştır.

- Toplanan hücreler 0,1 M Na-fosfat tamponu (pH 6,5) ile 3 kez yıkanmıştır. (Bu işlem 5000 rpm'de +4 °C'de 10 dk lık santrifüj yapılarak gerçekleştirilmiştir).
- Yıkanan pelletler 50 mL'lik santrifüj tüpü içerisinde, 4 mL 0,1 M Na-fosfat tamponu (pH 6,5) ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir
- 10 g glass beads (Sigma) eklenmiş ve 10 dk hızlıca karıştırılmıştır.
- Buz içerisinde örnek 10 dk bekletmiştir.
- Örnek, tekrar 10 dk daha hızlıca sallanmış ve 10 000 rpm'de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Elde edilen berrak kısma SHE (serbest hücre ekstraktı) adı verilmiştir.
- SHE'nin toplam protein konsantrasyonu Bradford Protein kiti (Ambresco) kullanılarak tespit edilmiştir.
- Enzimlerin spesifik aktiviteleri ise yine Wahlefeld'e (1983) göre belirlenmiştir (83).

Belirlenecek aktivite için 0,025 mL β -NAD (6,5 mM), 0,600 mL HEPES D-laktat (52 mM) maddelerinden oluşan bir karışım hazırlanmıştır. Bu karışıma 0,025 mL SHE eklenerek körve karşı her 15 sn de 339 nm'de spektrofotometrik olarak optik yoğunlukları (OD) okunmuştur. Okunan OD değerlerine göre spesifik aktivite, Bölüm 3.2.6.2. de verilen Eş. 3.1 formülüne göre hesaplanmış ve değerler $\mu\text{mol. dk./mg}$ olarak verilmiştir.

Bu çalışmada kullandığımız körv, 0,025 mL β -NAD (6,5 mM), 0,600 mL HEPES D-laktat (52 mM) ve 0,025 mL SHE karışımının 100° C 'de 10 dk kaynatılması sonucu oluşmuştur.

Toplam laktat dehidrogenaz enziminin spesifik aktivitesi

- Daha önce belirttiğimiz şekilde hazırlanan SHE bu çalışmada da kullanılmıştır.

- Belirlenecek aktivite için 0,625 mL HEPES-pirüvat(1,6 mM), 0,125 mL HEPES-NADH (0,2mM) maddelerinden oluşan bir karışım hazırlanmıştır. Bu karışıma 0,0125 mL SHE eklenerek körve karşı her 15 sn 339nm'de spektrofotometrik okuma yapılmıştır.
- Körvümüz 0,625 mL HEPES-pirüvat (1,6 mM), 0,125 mL HEPES-NADH (0,2mM), 0,0125 mL SHE karışımının 100° C 'de 10 dk kaynatılması sonucu oluşmuştur.

OD (optikal yoğunluk) değerleri okunan enzimlerin spesifik aktiviteleri "Eş. 3.1" kullanılarak hesaplanmıştır (87).

$$\text{Spesifik Aktivite} = [(A2-A1) \times V] / [E \times d \times (t2-t1) \times v \times p] \quad \text{Eş. 3.1}$$

A1: ilk optikal yoğunluk (sn)

A2: İlk optikal yoğunluktan 15 sn sonraki okunan ikinci optikal yoğunluk (sn)

V: Son hacim (mL)

E: 339 nm de NADH yıkım katsayısı

D: Işık yolu (cm)

t1: İlk optikal yoğunluğun okunduğu zaman (sn)

t2: İkinci optikal yoğunluğun okunduğu zaman (sn)

V: Kullanılan SHE hacmi (mL)

P: SHE'nin protein miktarı (mg/mL)

D-Laktat dehidrogenaz ve toplam laktat dehidrogenaz enzimlerinin spesifik aktivitelerinin tayininde kullanılan çözeltiler

HEPES-D-Laktat (52 mM, pH:7,5)

HEPES	108,33 mM
D-Laktat	56,33 mM
KCL	168 mM
NaN ₃	1 mg/mL

β -NAD

β -NAD	169 mM
--------------	--------

HEPES-Pirüvat (1,6 mM, pH: 7,2)

HEPES	81,3 mM
Pirüvat	9,76 mM
NaCl	203,3 mM
NaN ₃	1 mg/mL

HEPES-NADH (0,2mM, pH:7,2)

HEPES	81,3 mM
NADH	0,244 mM
NaCl	203,3 mM
NaN ₃	1 mg/mL

Hazırlanan tüm çözeltiler +4 °C'de saklanmıştır (82).

3.2.6. EPS üretiminin belirlenmesi

Lactobacillus spp. suşlarında EPS üretim miktarlarının belirlenmesinde Valerie et al. (1999) ve Dubois et. al.'ın (1956) metodu kullanılmıştır (83,84). Bu çalışma tutuklanmış ve serbest hücreler ile yapılmıştır.

- Örnekler 100 °C'de 10-15 dk kaynatıldıktan sonra oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutulmuştur.
- 1 mL örnek üzerine % 85'lik TCA (% 0,17= 1,7µL) ilave edilmiştir.
- Örnekler 13 000 rpm' de 25 dk santrifüj edilmiştir.

- Santrifüj sonrası oluşan berrak kısım başka bir ependrof tüpüne alınmış ve üzerine alabildiği kadar eşit hacimde (yaklaşık 1mL) etanol eklenmiştir. Örnekler 13 000 rpm' de 25 dk santrifüj edilmiştir.
- Berrak kısım ayrıldıktan sonra geriye kalan pelletin üzerine ikinci kez etanol (1000 µL) eklenmiş ve pelletin etanol içinde çözülmesi sağlanmıştır.
- Örnekler 13 000 rpm' de 25 dk santrifüj edilmiştir.
- Bu örneklerin üzerine 0,5 mL fenol ilave edilmiştir.
- Hızlı bir şekilde örneklerin üzerine 5 mL saf sülfirik asit eklenmiştir.
- Örnekler 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra, iyice karıştırılmıştır.
- Örnekler tekrar 25-30 °C'de 15-20 dk bekletilmiştir.
- 490 nm dalga boyundaki spektrofotometrede (Jenway 6105 u.v/vis.) örneklerin optik yoğunlukları okunmuştur.

EPS üretim miktarlarını belirlemek için 5-100 mg/L arasında değişen oranlarda glikoz kullanılarak standart bir eğri çıkarılmıştır. Bu standarda göre örneklerin EPS miktarları mg/L olarak belirlenmiştir.

3.2.7. Asit dirençliliğinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşları arasından EPS ve laktik asit üretimi yüksek ve düşük olan bazı suşlar seçilmiştir. Seçilen bu suşların tutuklanmış ve serbest hücrelerinin asit dirençlilikleri belirlenmiştir. Suşların asit dirençlilikleri Haller et al.'ın (2001) metoduna göre tespit edilmiştir (85). Serbest hücreler için aşağıda belirtilen metot kullanılmıştır.

20 saatlik durgun fazdaki aktif kültürler 5000 rpm' de 15 dk santrifüj edilmiş ve pelletler 3 kez Phosphate Buffer Saline (PBS) (NaCl: 9 g/L, Na₂HPO₄.2H₂O: 9 g/L, KH₂PO₄: 1,5 g/L, pH:6,2) ile yıkanmıştır. PBS'in pH'sı 1,0-3,0 olacak şekilde ayarlanıp, steril edilmiştir. 900 µL'lik pH'sı ayarlanmış PBS' lerin üzerine 100 µL bakteri süspansiyonundan ilave edilmiştir. 42 °C'de

1 saat inkübasyona bırakılan bu karışımdan 100 µL alınarak, 10⁻¹- 10⁻⁸ arasında dilüsyonlar yapılmış ve MRS agar yüzeyine ekilmiştir. 42 °C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılan petrilerin yüzeyindeki canlı mikroorganizma sayısı log₁₀ cfu/mL olarak tespit edilmiştir.

Tutuklanmış hücrelerde ise 50 tane küre ve 50 tane parçalanmış küre 5mL lik 'pH' sı 1,0-3,0 arasında değişen PBS ile karıştırılmış ve 42 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. 1 saat sonra parçalanmamış küreler parçalanarak her iki gruptan 100 µL alınmış ve seyreltmeleri (10⁰ -10³) yapılarak, MRS agar yüzeyine ekilmiştir. 42 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonrası petri yüzeyindeki canlı mikroorganizma sayısı log₁₀ cfu/mL olarak tespit edilmiştir. % inhibisyon değerleri Eş 3.2.'de verilen şekilde hesaplanmıştır (86).

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{\text{cfu ml}^{-1} \text{ kontrol} - \text{cfu ml}^{-1} \text{ final}}{\text{cfu ml}^{-1} \text{ kontrol}} \times 100 \quad \text{Eş 3.2.}$$

3.2.8. Safra tuzlarına dirençliliğin belirlenmesi

Bu çalışmada daha önce seçilen suşlar kullanılmıştır. Safra tuzlarına dirençliliğin belirlenmesi Erkkilä ve Petäjä 'dan (2000) alınan metodun modifikasyonu kullanılmıştır (87). Bu çalışma tutuklanmış ve serbest hücreler üzerinde yapılmıştır. Serbest hücrelerde aşağıda belirtilen metod kullanılmıştır.

20 saatlik bakteri hücreleri santrifüj (5000 rpm'de 15 dk) yardımıyla toplanmıştır ve üç kez fosfat tamponu (PBS , pH 6,2) ile yıkanmıştır. Bakteri hücreleri PBS içerisinde çözülmüş ve bu bakteri süspansiyonu 42 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Standardize edilmiş safra asitlerinin karışımı olan ox-bile (Sigma) bu çalışmada kullanılmıştır. 100 µL bakteri süspansiyonu 900µl % 0,15 veya % 0,3 safra ile karıştırılmış ve 42 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. 2 saat sonra 100 µL karışımdan alınmış ve

dilüsyonlar (10^{-1} - 10^{-8}) yapılarak MRS agar yüzeyine ekilmiştir. 42 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonrası petri yüzeyindeki canlı mikroorganizma sayısı tespit edilmiştir.

Tutuklanmış hücrelerde, 50 tane küre ve 50 tane parçalanmış küre 5mL' lik % 0,15 ve% 0,3 'lük safra ile karıştırılmış ve 42 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. 2 saat sonra parçalanmamış küreler parçalanarak, her iki gruptan 100 µl alınmış ve dilüsyonlar (10^0 - 10^3) yapılarak MRS agar yüzeyine ekilmiştir. 42 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonrası petri yüzeyindeki canlı mikroorganizma sayısı $\log_{10}$ cfu/mL olarak tespit edilmiştir.

3.2.9. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* hücrelerinin küresel Ca-Alginat taneciklerine tutuklanması

L. delbrueckii subsp *bulgaricus* türüne ait aktif kültürler 500 mL'lik MRS Broth besiyerinde 42 °C'de 20 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler santrifüj (5000 rpm de 15 dk) yardımıyla toplanmış ve 3 kez PBS (pH 6,2) ile yıkanmıştır. Pellet 50 mL serum fizyolojik içinde karıştırılmıştır. Bu süspansiyon ile 50 mL % 3,6' lık steril Na-Alginat (Fluka) homojen hale gelinceye kadar magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırmıştır.

Oluşan bakteri hücresi-alginat karışımı peristaltik pompa yardımıyla 1 mL'lik cam pipet ucundan 0.4 M CaCl_2 çözeltisi içerisine damla damla damlatılır. Tutuklanmış hücre içeren Ca-Alginat küresinin tam olarak olgunlaşması (Ca^{+2} ve Na^+ iyonlarının tam olarak yer değiştirmeleri için) 2 saat buzdolabında +4 °C' da 0,4 M steril CaCl_2 çözeltisi içinde bekletilerek sağlanmıştır. Na-Alginat-hücre karışımı CaCl_2 çözeltisine damlatıldığı zaman; kalsiyum iyonları sodyum iyonları ile yer değiştirmekte ve Ca-Alginat jeli oluşturmaktadır. Bu şekilde bakteri hücreleri de Ca-Alginat jeli içine hapis olmaktadır. Oluşan kürelerin çapı kumpas yardımıyla ölçülmüştür.(15,88,89).

3.2.10. Tutuklama sonrası kürelerin içindeki canlı hücre miktarının tespiti

Tutuklama sonrası oluşan küreler içerisindeki, canlı hücrelerin belirlenmesi için Sultana ve ark'larının (2000) metodu kullanılmıştır (15). 50 tane küre 5 mL'lik PBS (pH 6,2) içerisinde magnetik karıştırıcı yardımıyla çözülmüştür. 100 µl karışımdan seyreltmeler (10^0 - 10^3) yapılarak MRS agar yüzeyine ekilmiş ve 42 °C'de 24 saatlik (geç durgun faz) inkübasyon sonrası petri yüzeyindeki canlı mikroorganizma sayısı cfu/mL olarak tespit edilmiştir.

3.2.11. Tutuklanmış ve serbest hücrelerin Penicilin-G ve Nisin dirençliliğinin belirlenmesi

Bu çalışmada Champagne'den (1992) alınan metod, üzerinde düzenlemeler yapılarak kullanılmıştır (89). Çalışmada kullanılacak penicilin-G (Sigma) 'den 100 unit/mL olacak şekilde saf suda çözülerek stok hazırlanmıştır. Nisin (Sigma) ise 0,01N HCl içeren saf su içerisinde 300 ppm olacak şekilde hesaplanarak istenilen miktarda nisin çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti kullanılmadan önce 0,45 µm'lik disposable filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

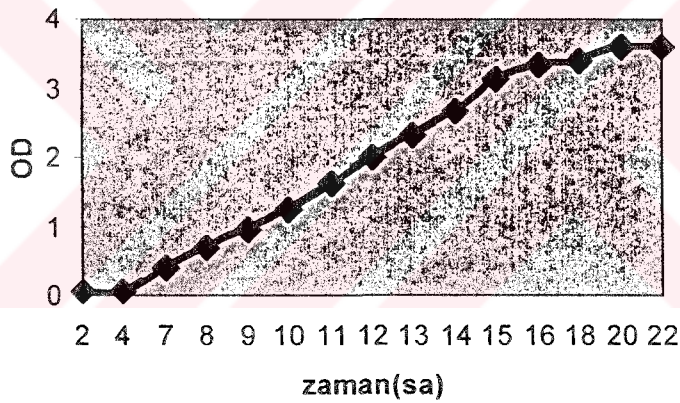
50 tane küre içerisindeki tutuklanmış ve serbest bakteri hücreleri 5 mL'lik 0,5 unit penicilin-G veya 300 ppm nisin içeren ve içermeyen MRS Broth besiyerinde 42 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Tutuklanmış hücreler 5 mL'lik PBS (pH 6,2) içerisinde magnetik karıştırıcı yardımıyla çözülmüştür. Serbest ve tutuklanmış , penicilin-G veya 300 ppm nisin içeren ve içermeyen MRS Broth besiyerinde inkübasyona bırakılan tüm örneklerden 100 µl alınıp, seyreltmeler (10^0 - 10^3) yapılarak MRS agar yüzeyine ekilmiş ve 42 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonrası petri yüzeyindeki canlı mikroorganizma sayısı cfu/mL olarak tespit edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Türünün Üreme Eğrisi

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* türünün üreme eğrisi Bölüm 3.2.2' de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1' de sunulmuştur.

Şekil 4.1' de görüldüğü gibi, ilk 4 saatten sonra belirgin bir şekilde üremede artışın başladığı tespit edilmiştir. 14. saatten sonra logaritmik artış fazına, 20. saatte ise durgun faza girmiştir. Üreme eğrisine göre belirlenen logaritmik artış (16-18. saatler), durgun fazın (20. saat) ve geç durgun fazın (24. saat) olduğu süreler çalışmadaki denemelerde esas alınmıştır.



Şekil 4.1. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 suşunun üreme eğrisi

4.2. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Türüne Ait Suşların Bazı Patojen Mikroorganizmalar Üzerine İnhibisyon Etkisi

Suşların genel inhibisyon aktivitesinin tespiti Bölüm 3.2.3' de verildiği gibi yapılmıştır. Test bakterileri olarak seçilen *E. coli* ATCC 11230, *S. aureus* ATCC 25923, *A. hydrophila* 106, *M. luteus* NRLL-B 4375, *P. aeruginosa* ATCC 29212, *B. cereus* RSKK 863, *Y. enterocolitica* ATCC 1501, *S.*

enteriditis RSKK 171 üzerinde gösterdikleri genel inhibisyon etkileri Çizelge 4.1' de verilmiştir.

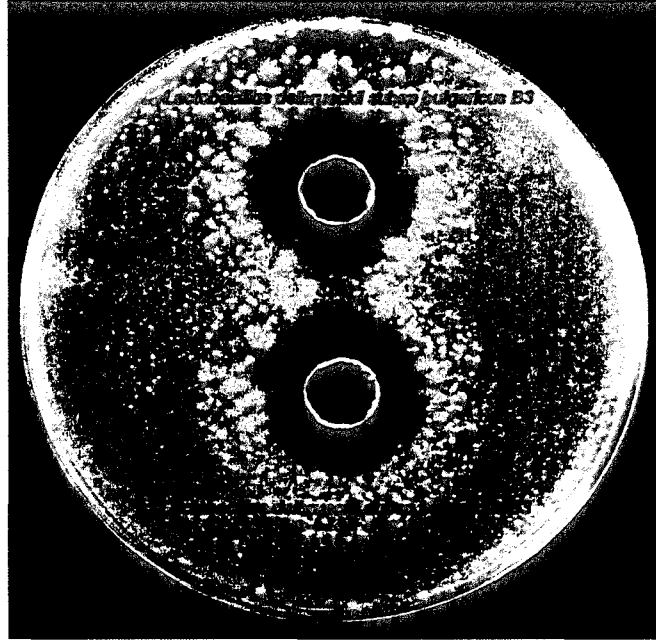
L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* suşlarının % 91'inin *A. hydrophila* 106 üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. En yüksek inhibisyon etkisi ise; 10,0 mm zon çapı oluşturan *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 18 suşunda gözlenmiştir.

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* suşlarının % 86'sının *Y. enterocolitica* ATCC 1501 suşuna karşı inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenirken, bu etki en yüksek, 10,4 mm inhibisyon zon çapı ile *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* A13 suşunda tespit edilmiştir.

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* suşlarının % 86'sı *P. aeruginosa* ATCC 29212 üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. En yüksek inhibisyon etkisi 10,1 mm zon çapı oluşturan *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 suşunda gözlenmiştir.

S. enteriditis RSKK 171 suşu üzerine, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarının % 82'sinin inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Bu suşlardan maksimum inhibisyon etkisini *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* G11 suşu 7,6 mm zon çapı ile göstermiştir.

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* suşlarının % 65'i *B. cereus* RSKK 863 suşu üzerine inhibisyon etki göstermişlerdir. En yüksek inhibisyon etkisi gösteren *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* A11 suşunun oluşturduğu inhibisyon zonunun çapı 9,2 mm olarak gözlenmiştir. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 suşunu *B. cereus* RSKK 863 suşu üzerine gösterdiği inhibisyon etkisi Resim 4.1 'de gösterilmiştir.



Resim 4.1. *B. cereus* RSKK 863 suşu üzerine *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 suşunun oluşturduğu inhibisyon zonu.

M. luteus NRLL-B 4375 suşu üzerine % 56 oranında *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarının inhibisyon etkisi tespit edilmiştir. En yüksek inhibisyon zon çapı (20,0 mm) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 suşunda gözlenmiştir.

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* suşlarının % 47'si *S. aureus* ATCC 25923 suşuna karşı inhibisyon etkisi gösterirken, en yüksek inhibisyon etkisi 20,5 mm inhibisyon zon çapı ile *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* N11 suşunda tespit edilmiştir.

E. coli ATCC 11230 suşu üzerine *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarının % 43'ü inhibisyon etkisi göstermiştir. En yüksek inhibisyon zon çapı (9,8 mm) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 18 suşunda belirlenmiştir.

Çizelge 4.1 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait suşların genel inhibisyon zon çapları (mm)

	Son kültür pH'si	<i>Aeromonas hydrophila</i> 106	<i>Salmonella enteritidis</i> RSKK 171	<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 1501	<i>Micrococcus luteus</i> NRL B- 4375	<i>Bacillus cereus</i> RSKK 863	<i>Escherichia. coli</i> ATCC 11230	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 29212	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC .25923
18	3,95	10,0 ± 0,0	4,9 ± 0,1	4,9 ± 0,9	-	4,8 ± 0,0	9,8 ± 0,2	8,1 ± 0,9	3,7 ± 0,5
22	4,56	-	-	-	-	-	-	-	-
A11	3,36	3,7 ± 1,5	4,8 ± 0,1	6,6 ± 0,1	-	9,2 ± 0,8	9,0 ± 0,0	8,4 ± 0,4	5,0 ± 1,4
A12	3,42	3,4 ± 0,6	3,3 ± 0,3	6,4 ± 0,4	-	7,9 ± 0,3	-	6,7 ± 0,7	-
A13	3,38	2,9 ± 0,3	3,6 ± 0,0	10,4 ± 0,4	-	7,0 ± 0,4	9,4 ± 0,6	7,3 ± 2,3	-
AK11	3,75	7,2 ± 1,2	3,2 ± 0,0	8,9 ± 0,1	3,6 ± 0,0	-	-	4,4 ± 0,0	-
EB7	3,56	6,4 ± 0,0	3,2 ± 0,8	5,8 ± 0,6	13,9 ± 0,5	4,6 ± 0,6	-	6,0 ± 0,0	4,4 ± 0,4
F11	3,81	6,6 ± 0,0	4,1 ± 0,7	-	11,1 ± 2,3	-	-	4,4 ± 0,0	6,2 ± 0,0
F12	3,72	6,6 ± 0,6	-	6,2 ± 0,6	-	-	-	-	-
G11	3,62	4,7 ± 0,3	7,6 ± 0,6	6,8 ± 0,0	-	8,2 ± 0,8	5,0 ± 0,0	7,2 ± 0,8	-
G12	3,75	4,0 ± 0,6	3,0 ± 0,8	5,9 ± 0,7	9,7 ± 0,1	5,4 ± 0,8	-	5,2 ± 0,0	-

Çizelge 4.1 devamı

	Son kültür pH'si*	<i>Aeromonas hydrophila</i> 106	<i>Salmonella enteritidis</i> RSKK 171	<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 1501	<i>Micrococcus luteus</i> NRLL B- 4375	<i>Bacillus cereus</i> RSKK 863	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11230	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 29212	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC .25923
H11	4,00	-	2,0 ± 0,0	6,8 ± 0,0	9,2 ± 0,6	-	5,7 ± 0,5	8,7 ± 2,3	11,5 ± 0,5
H12	3,62	8,4 ± 0,8	3,9 ± 0,5	6,0 ± 0,0	14,6 ± 0,0	3,4 ± 0,0	6,2 ± 0,0	5,6 ± 0,4	-
M11	3,94	6,8 ± 0,8	-	5,4 ± 0,0	10,7 ± 0,7	-	-	7,4 ± 0,0	-
M12	3,36	9,9 ± 0,1	6,8 ± 0,2	5,4 ± 0,6	11,2 ± 0,8	5,3 ± 0,9	3,4 ± 0,6	8,0 ± 0,8	-
N11	3,56	8,1 ± 1,9	4,7 ± 0,3	9,5 ± 1,1	-	4,9 ± 0,7	-	6,7 ± 0,7	20,5 ± 0,9
N12	3,77	6,7 ± 0,3	-	5,6 ± 0,8	-	4,4 ± 0,4	-	6,4 ± 0,0	6,4 ± 0,0
P12	3,86	6,6 ± 0,0	3,8 ± 0,8	-	-	-	-	-	-
W11	3,71	8,6 ± 1,0	2,8 ± 0,0	5,9 ± 0,3	6,6 ± 0,4	3,7 ± 0,1	7,8 ± 0,0	6,4 ± 0,0	6,0 ± 0,0
W12	4,83	6,7 ± 0,3	4,4 ± 0,4	7,4 ± 0,2	8,9 ± 0,3	-	-	4,6 ± 0,6	-
B2	3,40	7,2 ± 1,2	4,3 ± 1,1	6,5 ± 0,5	13,5 ± 0,5	6,2 ± 0,2	-	6,4 ± 0,4	6,0 ± 0,0
C7L	3,58	8,8 ± 0,8	3,7 ± 0,9	6,8 ± 0,4	9,0 ± 0,0	5,9 ± 0,7	3,0 ± 0,0	8,9 ± 0,5	5,2 ± 0,2
B3	3,58	4,4 ± 0,0	6,0 ± 0,0	6,5 ± 0,5	20,0 ± 0,0	4,8 ± 0,4	3,8 ± 0,0	10,1 ± 0,5	4,3 ± 0,3

-; İnhibisyon yoktur

* pH sonuçları çalışmaların ortalama değerleridir.

4.3. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Türüne Ait Suşların Laktik Asit Üretimleri

Kullandığımız 23 adet *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşunun, logaritmik fazın sonuna kadar geliştirilen (20 saat) kültürlerinin ürettiği D (-) laktik asit miktarları enzimatik olarak tespit edilmiş, sonuçlar Çizelge 4.2' de verilmiştir.

Çizelge 4.2. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait suşların ürettiği D(-) laktik asit (g/L) miktarları

Suşlar	D(-) Laktik asit (g/L)
18	0,041±0,005
22	0,030±0,009
A11	0,030±0,003
A12	0,040±0,009
A13	0,100±0,040
AK11	0,038±0,008
B2	0,057±0,009
B3	0,080±0,007
C7L	0,032±0,006
EB7	0,030±0,007
F11	0,043±0,008
F12	0,043±0,007
G11	0,057±0,007
G12	0,033±0,006
H11	0,043±0,007
H12	0,050±0,009
M11	0,031±0,009
M12	0,040±0,004
N11	0,031±0,002
N12	0,032±0,009
P12	0,040±0,003
W11	0,050±0,001
W12	0,033±0,002

Yapılan ölçümler sonrası *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait suşların ürettiği D(-) laktik asit üretim miktarları 0,1-0,03 g/L arasında tespit edilmiştir. En yüksek miktarda D (-) laktik asit üretimi *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* A13 (0,1 g/L) ve B3 (0,08 g/L) suşlarında, en düşük D (-) laktik asit üretimi ise *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 22, A11 ve EB7 suşlarında belirlenmiştir.

4.4. D-Laktat dehidrogenaz ve Toplam Laktat dehidrogenaz Enzimlerinin Spesifik Aktiviteleri

Önceden laktik asit üretimleri belirlenen suşlar arasından, asit üretimi yüksek, orta ve düşük olan 4 tane suş seçilmiştir. Seçilen suşların D-Laktat dehidrogenaz (D-LDH) ve toplam laktat dehidrogenaz (T-LDH) enzimlerinin spesifik aktiviteleri Çizelge 4.3' de verilmiştir. D-LDH aktivitesi ve T-LDH aktivitesi arasında doğrusal bir korelasyon olduğu dikkati çekmiştir. D-LDH aktivitesi (1,54 $\mu\text{mol. dk./mg}$) yüksek olan *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* A13 suşunun T-LDH aktivitesinin de (3,69 $\mu\text{mol. dk./mg}$) yüksek olduğu belirlenmiştir. Suşların belirlenen spesifik enzim aktivitelerinin D (-) laktik asit üretimlerini doğruladığı da tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait suşların spesifik enzim aktiviteleri

Suşlar	D-LDH spesifik aktivitesi * ($\mu\text{mol. dk./mg}$)	T-LDH spesifik aktivitesi * ($\mu\text{mol. dk./mg}$)
A13	1,54	3,69
B3	1,03	2,46
M12	0,91	2,18
G12	0,63	1,51

(* Sonuçlar paralelli çalışmaların ortalama değerleridir).

4.5. EPS Üretimi

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* türüne ait suşların EPS üretimleri Bölüm 3.2.6' de anlatılan şekilde, 101T129 nolu TÜBİTAK destekli proje kapsamında belirlenmiştir. Elimizdeki bu veriler kullanılarak, bundan sonraki çalışmalarımızda kullanılmak üzere bu proje kapsamında izolasyon ve tanımlaması yapılan toplam 23 suş arasından EPS ve laktik asit üretimleri

göz önüne alınarak 4 adet suş seçilmiştir. Bu suşlardan 2 tanesi yüksek diğer 2 tanesi düşük oranda EPS ve laktik asit üretmektedir. Seçilen suşlar ve bunların ürettiği EPS miktarları Çizelge 4.4' de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Seçilen suşların EPS üretim miktarları

Suşlar	EPS üretim miktarı (mg/L)
B3	211± 1,0
G12	175± 0,0
A13	27± 0,0
22	21± 4,5

4.6. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Türüne Ait Bazı Suşların Asit Dirençliliği

Seçilen 4 suşun asit dirençlilikleri Bölüm 3.2.7' de belirtilen şekilde tespit edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.5' de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Suşların asit dirençliliği

pH	Canlı hücre sayısı (log ₁₀ CFU /ml)			
	B3	G12	A13	22
Kontrol (6,2)	8,6	8,1	6,4	9,1
3,0	8,0	7,8	4,7	6,6
2,5	5,0	3,5	3,7	0,0
2,0	4,2	2,3	0,0	0,0
1,5	0,0	0,0	0,0	0,0
1,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Çizelge 4.5.'de görüldüğü gibi düşen pH değeriyle beraber canlılıkta da bir düşüş gözlenmiştir. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* G12 suşlarında ölüm pH 1,5'da başlarken, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* A13'de ölümün pH 2,0' de başladığı gözlenmiştir. Bu suşlar

arasında, asitliğe en dirençsiz olan *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 22 suşudur. pH 1,0 ve 1,5' da tüm suşlara ait hücrelerin öldüğü belirlenmiştir.

4.7. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Türüne Ait Bazı Suşların Safra Tuzlarına Dirençliliği

Seçilen 4 suşun % 0,15 ve % 0,3'lük safra tuzu konsantrasyonlarında belirlenen safra dirençliliği Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Suşların safra dirençliliği

Safra tuzu miktarı	Canlı hücre sayısı (log ₁₀ CFU /ml)			
	B3	G12	A13	22
Kontrol *	7,0	6,0	6,7	7,0
% 0,15	2,7	2,2	2,0	2,3
% 0,3	2,5	2,0	1,6	2,0

(* Kontrol grubu safra tuzu içermemektedir).

% 0,3 safra tuzu içeren ortamda, 2 saatlik inkübasyon sonrası *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3'de canlılık oranı % 35,7; *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* G12'de % 33,3; *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* A13' de % 23,9 ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 22'de % 28,6 olarak belirlenmiştir. % 0,15 safra tuzu içeren ortamda canlılık oranları ise % 30,0-39,0 değerleri arasında belirlenmiştir. Bu suşlar arasında safra tuzlarına karşı en dirençli olanı *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3' dür.

4.8. Hücrelerinin Küresel Ca-Alginat Taneciklerine Tutuklanması

Tutuklama çalışmasında kullanılmak üzere 23 adet *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşları arasından, EPS ve laktik asit üretimi yüksek, asit ve safra tuzlarına karşı dirençli, birçok patojen mikroorganizmalar üzerine güçlü

inhibisyon etkisi olan üstün bir suş seçilmiştir. Bu suş *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3' dür.

Tutuklama işlemi Bölüm 3.2.9' da anlatılan şekiide yapılmıştır. Tutuklama sonrası, 3,7 mm çapında sert küreler oluşmuştur. Bu küreler, Resim 4.2' de gösterilmiştir.



Resim 4.2. Tutuklanmış hücrelerin yer aldığı Ca-Alginat küreler

4.9. Tutuklama Sonrası Kürelerin İçindeki Canlı Hücre Miktarı

Tutuklama sonrası +4 °C'de saklanan kürelerin içindeki canlı hücre miktarı, Bölüm 3.2.10.'da anlatılan yöntemle tespit edilmiştir. 1-5. ve 15. günlerde kürelerin içerisindeki canlı hücre sayısı Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Çizelge 4.7 Günlere göre küreler içerisindeki canlı hücre sayısı

Günler	Kürelerin içerisinde bulunan canlı hücre sayısı*
1. Gün	$2,6 \pm 0,1 \times 10^5$
2. Gün	$2,6 \pm 0,1 \times 10^5$
3. Gün	$2,6 \pm 0,1 \times 10^5$
4. Gün	$2,5 \pm 0,1 \times 10^5$
5. Gün	$2,5 \pm 0,1 \times 10^5$
15. Gün	$5,0 \pm 0,1 \times 10^4$

(50 küre içerisinde yer alan canlı hücre sayısı)

Çizelge 4.7.'de görüldüğü gibi hücreler tutuklandıktan sonra ilk 5 gün canlı hücre sayılarında ciddi bir düşüş gözlenmemiştir. Ancak 15. günde yapılan sayımlarda düşüşün başladığı tespit edilmiştir. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 suşunun 15 gün süre ile tutuklanmış olarak canlılığını koruyabileceğini söyleyebiliriz.

1 ay süre ile +4 °C'de saklanan kürelerin sertliklerini rahatlıkla korudukları, 1 aydan sonra yavaş yavaş bozulmaların başladığı belirlenmiştir. Kürelerin bakteriyi dış etkilere koruyan sert yapılarını, 1 ay süre ile rahatlıkla koruyabildiklerini de söyleyebiliriz.

4.10. Tutuklanmış ve Serbest *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 Hücrelerinin Laktik asit ve EPS Üretimleri

Tutuklanmış ve serbest *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 suşuna ait hücrelerin laktik asit ve EPS üretim sonuçları Çizelge 4.8' de verilmiştir. Tutuklanan *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'da, her bir küre, $5,3 \pm 0,1 \times 10^3$ hücre içermektedir.

Çizelge 4.8. Tutuklanmış ve serbest *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 suşuna ait hücrelerin laktik asit ve EPS üretim miktarları

	Ortamin pH'sı	D-Laktik asit Üretimi(g/L)	EPS (mg/L)
Tutuklanmış hücre*	3.85	0.039	79±3,0
Serbest hücre*	3.80	0.044	105±7,0

(* Verilen değerler 50 küre içindir).

Çizelge 4.8.'de görüldüğü gibi tutuklanmış hücrelerde laktik asit üretimi, serbest hücrelerin üretimine kıyasla daha az olduğu belirlenmiştir. Fakat bu üretim miktarları arasında çok ciddi bir fark tespit edilememiştir. Bu sonuçlara göre tutuklanmış hücrelerinde serbest hücrelerin ürettiği düzeyde asit üretebileceği söylenebilir.

Tutuklanmış ve serbest hücrelerin EPS üretimlerine baktığımızda laktik asit üretiminin aksine arada önemli bir fark olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.8.).

4.11. Tutuklanmış ve Serbest *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 Hücrelerinin Asitlik ve Safra Tuzlarına Dirençlilikleri

Tutuklanmış ve serbest *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 hücrelerinin asit dirençlilikleri Bölüm 3.2.7.'de ve safra tuzlarına dirençlilikleri Bölüm 3.2.8.'de belirtilen şekilde belirlenmiştir. Asit dirençlilik sonuçları Çizelge 4.9 'da, safra tuzlarına dirençlilik sonuçları Çizelge 4.10.'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. Tutuklanmış ve serbest *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 hücrelerinin asit dirençlilikleri

	Kontrol (pH 6,2)	pH 3,0	pH 2,5	pH 2,0	pH 1,5
Tutuklanmış hücre*	$5,0 \pm 0,5 \times 10^3$	$3,0 \pm 0,1 \times 10^3$	$0,9 \pm 0,1 \times 10^3$	-	-
Serbest hücre*	$5,0 \pm 0,7 \times 10^3$	$2,7 \pm 0,1 \times 10^3$	$0,8 \pm 0,1 \times 10^3$	-	-

(* Verilen değerler 50 küre içerisindeki canlı hücre sayısıdır).

Tutuklanmış hücreler asitliğe karşı toleransın serbest hücrelere kıyasla biraz daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Fakat hem tutuklanmış hemde serbest hücrelerin pH 2,0 ve 1,5 gibi çok kuvvetli asitlikte canlı hücrelere rastlanılmamıştır.

Çizelge 4.10. Tutuklanmış ve serbest *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 hücrelerinin safra tuzlarına dirençlilikleri

	Kontrol*	%0,15	%0,3
Tutuklanmış hücre	$5,0 \pm 0,2 \times 10^3$	$0,9 \pm 0,1 \times 10^2$	$0,8 \pm 0,1 \times 10^2$
Serbest hücre	$5,5 \pm 0,5 \times 10^3$	-	-

(* Kontrol safra tuzu içermemektedir).

Safra dirençliliğine bakıldığında karşımıza daha farklı bir sonuç çıkmıştır. Safra tuzları ile muamele sonrasında serbest hücrelerde herhangi bir canlılık belirlenememiştir. Bu durumun tam tersine %0,15 ve %0,3 safra konsantrasyonlarında, tutuklanmış hücrelerde hayatta kalan hücrelere rastlanmıştır.

4.12. Tutuklanmış ve Serbest *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 Hücrelerinin Penicilin-G ve Nisin Dirençlilikleri

Tutuklanmış ve serbest *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 hücrelerinin Penicilin-G ve Nisin dirençlilik sonuçları Çizelge 4.11 'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Tutuklanmış ve serbest *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 hücrelerinin Penicilin-G ve Nisin dirençlilikleri

	Kontrol*	Penicilin-G (0,5 unit)	Nisin (300 ppm)
Tutuklanmış hücre	$5,0 \pm 0,5 \times 10^3$	$0,1 \pm 0,1 \times 10^3$	$3,1 \pm 0,1 \times 10^3$
Serbest hücre	$5,5 \pm 0,7 \times 10^3$	-	-

(* Kontrol Penicillin-G ve Nisin içermemektedir).

Serbest hücrelerde, Penicilin-G ve Nisin'le muamele sonrası canlı hücreye rastlanamamıştır. Tutuklanmış hücrelerin yüksek konsantrasyondaki bu öldürücü maddelere karşı dirençli olduğu gözlenmiştir.

4.13. Tutuklanmış ve Serbest *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 Hücrelerinin Bazı Patojen Mikroorganizmalar Üzerine Etkisi

Tutuklanmış ve serbest *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 hücrelerinin bazı patojen mikroorganizmalar üzerine etkisi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.12.'de gösterilmiştir.

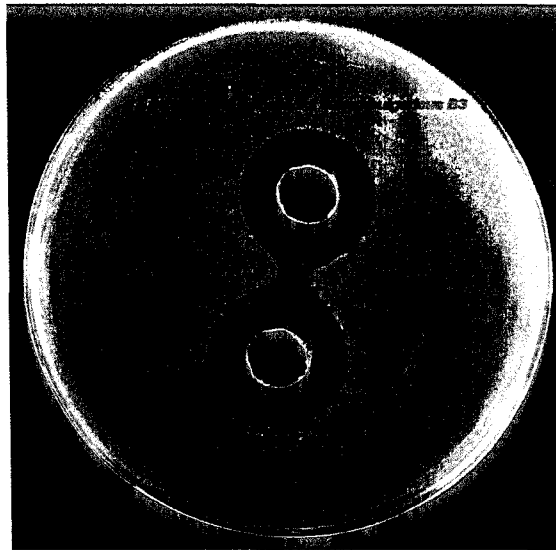
Asit üretim miktarları birbirlerine yakın olan tutuklanmış ve serbest *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 hücrelerinin, genel inhibisyon zon çapları da aynı değerler arasında ölçülmüştür (Çizelge 4.12.).

Çizelge 4.12. Tutuklanmış ve serbest *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 hücrelerinin genel inhibisyon zon çapları (mm)

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>
Tutuklanmış hücre	5,0±0,5	4,6±0,4	3,5±0,5
Serbest hücre	5,0±0,5	4,5±0,5	3,5±0,5

Genel inhibisyon çalışmamızda *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 suşunun *P. aeruginosa*'ya karşı güçlü, *B. cereus*'a orta derecede ve *E. coli*'ye karşı düşük inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. Tutuklama çalışmasında ise tüm patojenler yerine bu 3 patojen seçilerek kullanılmıştır.

Genel olarak tutuklanmış ve serbest hücrelerin *E. coli*'ye karşı daha duyarlı, *P. aeruginosa*'ya karşı daha dirençli olduğu gözlenmiştir. Tutuklama sonrası antimikrobiyal aktivitede herhangi bir değişikliğin olmadığı gözlenmiştir. Tutuklanmış ve serbest *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 hücrelerinin *P. aeruginosa* ATCC 29212 üzerine gösterdikleri inhibisyon etkisi Resim 4.3. ve Resim 4.4.'de gösterilmiştir.



Resim 4.3. Tutuklanmış *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 hücrelerinin *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212 üzerine gösterdiği inhibisyon etkisi



Resim 4.4. Tutuklanmamış *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 hücrelerinin *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212 üzerine gösterdiği inhibisyon etkisi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsanlık tarihinin belli bir sürecinde kullanılmaya başlanan süt, zaman içinde saklanma şekillerine ve ortamına bağlı olarak fermente olmuştur. Ve böylece ilk fermentasyon süt ürünleri oluşmuştur. Bu ürünler de bilinçsiz olarak bazı hastalıklara karşı korunmada kullanılmaya başlanmıştır. Genel olarak insan vücudunun belli bölgelerinde, özellikle sindirim sisteminde, kişinin sağlıklı dengeler içinde yaşamasını sağlayan ve konakla son derece iyi ilişkiler içinde varlığını sürdüren mikroorganizma toplulukları yer almaktadır (84). Bu bağlamda faydalı ve organizma ile barış içinde olan mikroorganizmalar bir araya getirilerek “probiyotik” olarak adlandırılan ürünler oluşturulmuştur (2). Probiyotikler bulunduğu canlıda simbiyotik bir ilişki içinde olan ve doğal florayı destekleyen ürünler olarak düşünülmektedir. Bu canlıların tedavide kullanımı ve etki mekanizmalarının bilimsel olarak açıklanması ilk defa bu yüzyılın başında çalışılmıştır (85,90). Alınan olumlu sonuçlar, probiyotik ürünlerin ticari boyutta üretimine ve toplumun tüketimine sunulmasına neden olmuştur (47).

Son yıllarda toplumun probiyotik ürünler hakkında bilinçlenmesiyle beraber ticari probiyotik ürün çeşitliliğinde de artış gözlenmektedir. Fakat probiyotik olarak satılan ticari suşlar tek başlarına, antimikrobiyal aktivite, asitlik ve safra tuzlarına karşı direnç gibi istenilen özelliklerin hepsini birden sağlayamadığı, bununla beraber probiyotik olarak satılan ürünlerin genellikle etiketinde belirtilen sayı ve türde mikroorganizmayı içermediği belirlenmektedir. Hatta bazı ürünlerde kontaminasyon nedeniyle insan tüketimi amacıyla kullanılmayan türlere dahi rastlanılmaktadır (2). Bu standartların sağlanmaması hem yoğurt kalitesini olumsuz etkilediği gibi hem de probiyotik olarak kullanılan kültürün istenilen özellikleri sağlamasını engellemektedir.

Yaptığımız çalışmada köy yoğurtlarından izole edilmiş biyokimyasal ve moleküler tanımlanması yapılmış, 23 adet *Lactobacillus delbrueckii* subsp.

bulgaricus suşu kullanılmıştır. Suşlarımızın probiyotik ve starter amaçlı kullanılabilirlikleri, bazı özelliklerine göre araştırılmıştır.

Probiyotik amaçlı kullanılan bakterilerde aranan önemli özelliklerden biri antimikrobiyal aktivitedir. Probiyotik mikroorganizmalar tarafından üretilen başta laktik asit olmak üzere, asetik asit, asetaldehit, hidrojen peroksit ve bakteriyosin gibi birçok metabolitler mide-bağırsak sisteminde yer alan patojenleri inhibe etmektedir (2,91).

Çalışmada, suşlarımızın insan mide-bağırsak sisteminde enfeksiyon yapan; *A. hydrophila* 106, *P. aeruginosa* ATCC 29212, *Y. enterocolitica* ATCC 1501, *S. enteritidis* RSKK 171, *B. cereus* RSKK 863, *M. luteus* NRLL-B 4375, *S. aureus* ATCC 25923 ve *E. coli* ATCC 11230 mikroorganizmaları üzerine inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Suşların test mikroorganizmaları üzerine değişik oranlarda inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.1.).

Genel inhibisyon çalışmasında suşlarımızın ürettiği laktik asidin ve varsa bakteriosinin test bakterileri üzerine inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Bakterilerimiz arasında bakteriosin üreten herhangi bir suşa rastlanmamıştır. Suşlarımızın ürettiği metabolitlerden gelen etkilerin, bakteriosin dışında, ürettikleri metabolitlerden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* türüne ait suşlar 8 test bakterisi içinde en çok inhibisyon etkisini %91 oranı ile *A. hydrophila* 106 suşu, % 87 oranı ile *Y. enterocolitica* ATCC 1501 ve *P. aeruginosa* ATCC 29212 üzerine göstermektedirler. Bu test bakteri G (-) olarak sınıflandırılmaktadırlar. Servin (2004) Laktik asit bakterileri tarafından üretilen laktik asidin gram negatif bakterilerin dış zarında geçirgenliğe neden olduğunu böylece konukçu tarafından üretilen diğer antimikrobiyal maddelerin girişine izin vererek patojenlerin bu antimikrobiyal maddelere karşı duyarlılığını arttırdığını bildirmiştir (92). G (-) olduğu halde suşlarımıza yüksek oranda dirençlilik

gösteren *E. coli* ATCC 11230 suşunun referans suş olması ve kolay üremesi nedeniyle bir çok araştırmada kullanılması sonucu antimikrobiyal maddelere direnç kazandığını düşünmekteyiz.

Bir çok araştırmacı laktik asit bakterilerinin kullandığımız 8 test bakteri üzerine inhibisyon etkisi olduğunu belirtmişlerdir (93-100). Yoğurt bakterileri ve diğer laktik asit bakterilerinin çeşitli patojen ve kontaminant bakterilere karşı antimikrobiyal etkisinin nedenleri; (1) Laktik asitle pH'nın düşürülmesi, (2) diğer mikroorganizmaların besin maddelerinin kısıtlanması, (3) patojen bakterilerin bağırsak duvarına tutunmasının önlenmesi, (4) besinlerin alımında bakteriler arasında bir yarışın bulunması, (5) antimikrobiyal madde üretmesi ve (6) faaliyetlerini durdurmada etkili olan metabolizma ürünlerinin oluşturulması olarak açıklanmıştır (29).

Genel olarak sonuçlarımıza baktığımızda yüksek oranda D (-) laktik üreten suşların (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* A13, G11, H12, W11, B2, B3) test bakterilerinin birçoğu üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği, yine düşük oranda D (-) laktik üreten suşların (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 22, M11, N12, W12) test bakterilerinin sadece birkaçı üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum laktik asidin patojen veya kontaminant mikroorganizmalar üzerine inhibisyon etkisi olduğunu göstermektedir (31, 101). Bunun yanı sıra D (-) laktik asit üretimi düşük fakat birçok test bakterisi üzerine inhibisyon etkisi gösteren ve ürettiği ortamın pH 'sı asidik olan suşlara (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* A11, EB7, M12, N11, C7L) da rastlanmıştır. Araştırmacılar bazı *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait suşların D (-) laktik asit dışında, düşük oranda da olsa bir miktar L (+) laktik asit ürettiğini belirtmişlerdir (101). Bu durumda bu suşların L (+) laktik asit ürettiğini düşünmekteyiz. Yine bazı suşlarımızın (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 18, F11, G12, H11) düşük oranda D (-) laktik üretmesine rağmen test organizmalarının bir çoğu üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği tesbit edilmiştir. Bu suşlarımızın ürettiği diğer metabolitlerin (bakteriyosin hariç) inhibisyonda etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Yapılan bazı çalışmalarda antimikrobiyal aktivite ile laktik asit üretimi arasında herhangi bir korelasyon bulunamamıştır. Yani laktik asit üreten suşların herhangi bir inhibisyon etkisi belirlenememiştir (99). Ayrıca sadece birkaç patojen üzerine inhibisyon etkisi gösteren bazı suşların diğer patojenlere karşı inhibisyon etkisi belirlenememiştir (99). Bütün bu çalışmalarla beraber bizim sonuçlarımızda tek başına laktik asit üretiminin inhibisyon etkisi olabileceği gibi, bu inhibisyon etkisinin birkaç metabolik ürünün sinerjik etkisinden de kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Süt endüstrisinde starter kültürlerin başlıca görevi arzulanan değişimleri başlatmasıdır. Starter kültürler bu görevini, esas itibariyle laktozdan asit oluşturarak yerine getirirler. Asit üretiminin; pıhtı oluşumu, peynir ve yoğurt yapımında suyun ayrılması, yapının oluşumu, lezzet oluşumunun başlatılması, patojenlere karşı ürünün korunması ve ürünün dayanma süresinin artırılması üzerinde olumlu etkisi vardır (10).

Çalışmada yoğurt starterlarından olan *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait suşların 20 saatlik kültürlerinin enzimatik olarak belirlenen D (-) laktik asit miktarı; 0,03-0,1 g/L değerleri arasında bulunmuştur.

Beyatlı ve Tunail (1991) yoğurtdan izole ettikleri *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait suşların toplam laktik asit üretimlerini 2,27-10,35 mg/mL değerleri arasında (102), Ragout ve ark.'ları (1989) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 suşunun değişik besiyerlerindeki D (-) laktik asit üretimlerini 0,48-0,59 g/L arasında bulmuşlardır (101). Her iki çalışmada *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait suşlar kullanılmıştır fakat toplam laktik asit üretiminin D (-) laktik asit üretiminden daha fazla olduğunu görmekteyiz. Bu durum bize *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türünün sadece D (-) laktik asit değil aynı zamanda başka asit türlerini ürettiğini düşündürmektedir.

Genel olarak sonuçlarımızla yapılan çalışmaları kıyasladığımızda, kullandığımız suşların yüksek oranda laktik asit üretmediğini görmekteyiz. Bu durum sanılanın aksine olumsuz bir özellik değildir ve starter seçiminde önemli bir kriterdir. Bilindiği gibi LAB'leri, laktik asiti ya D (-) yada L (+) formunda veya her iki formda rasemik (DL) olarak oluştururlar. L (+) laktik asit insanda intermediar ürün olarak oluşturulur ve daha sonra parçalanarak enerji kaynağı olarak kullanılır. Böylece insan vücudunda kalıntısız ve hızlı bir şekilde parçalanır. Buna karşın D (-) laktik asit çok yavaş parçalanır. Vücutta oluşturulmaz ve kullanımı için belkide organizma spesifik bir enzim bulundurmaz. Sadece spesifik olmayan α hidroksi aseto oksidaz ile çok yavaş parçalanır. Bebeklerde D (-) laktik asidin belli şartlarda hastalık belirtilerine neden olduğu belirtilmektedir. Bu nedenlerden dolayı Alman Araştırma Komitesinin Yabancı Maddeler Komisyonu, küçük çocuk gıdalarının D (-) laktik asit içermemesini önermektedir Yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı fermente üründe D (-) laktik asit miktarının fazla olması istenmemektedir (30).

Tüm dünyada yaygın olarak tüketilen yoğurt da, D (-) ve L (+) laktik asit oranı 70:30 dan 30:70'e kadar değişebilmektedir. İnkübasyon sırasında önce *S. thermophilus*, sonra *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* süt asidi oluşturmaktadır. Böylece ortamdaki D (-) ve L (+) laktik asit oranı dengelenmektedir. Fakat depolama sürecinde yoğurdun D (-) laktik asit miktarının yükseldiği değişik araştırmacılar tarafından gözlenmiş ve sonradan asitleşmeye dayalı olarak toplam laktik asit miktarındaki artışın D (-) laktik asit miktarındaki artışla ilişkili olduğu belirtilmiştir (9,30). Bu sebeplerden dolayı çalışmamızda yoğurt starteri seçiminde, suşun ürün kalitesi açısından bir miktar D (-) laktik asit üretmesini ve bu üretim miktarını sabit düzeyde korumasını hedeflerken, bu üretim miktarının kontrolsüz bir şekilde yüksek oranda olmamasını da hedeflemekteyiz.

Aynı şartlarda çalışılmasına rağmen, 23 suşun D (-) laktik asit üretiminde farklı sonuçlar bulunmuştur. Ayrıca yapılan araştırmalar laktik asit üretim

miktarının bakteri türüne ve hatta suşuna göre değiştiğini ve bunun değişik nedenleri olduğunu bildirmişlerdir. Liu (2003) laktik asit üretiminin pirüvat kaynaklı olduğunu ve başlangıçta kullanılan şeker türünün laktik asit üretim miktarının etkilediğini belirtmiştir. Ayrıca pH, oksijen miktarı, su aktivitesi, sınırlı substrat, sıcaklık ve tuz gibi etmenlerin bakterinin gelişim sürecini, dolayısıyla fermentasyon sonrası oluşacak ürün miktarını değiştirdiğini belirtmiştir (27). Benzer bir çalışmada bazı LAB'lerinin besiyerinde sukroz bulunduğunda toplam laktik asit üretiminin az glukoz bulunduğunda ise daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir (103). Laktik asit üretiminde kullanılan farklı yöntemlerin hassasiyetinin ve kullanılan besiyerinin içeriğinin laktik asit üretimi üzerine önemli etkisinin olduğunu düşünmekteyiz.

Laktik asit, laktat dehidrogenaz (LDH) enziminin pirüvatı laktik asite dönüştürmesi ile oluşur. Bu enzim 2 çeşittir ve ürün olarak sonuçta D (-) veya L (+) laktik asit oluşmaktadır. Laktik asit üretimleri düşük, orta ve yüksek seviyede olan 4 suş seçilerek bu suşların D-LDH ve toplam laktat dehidrogenaz enzimlerinin spesifik aktiviteleri belirlenmiştir (Bkz: Çizelge 4.3).

Suşlarımızın D-LDH spesifik aktivitesi 0,63-1,54 $\mu\text{mol. dk./mg}$, toplam laktat dehidrogenaz enzimlerinin spesifik aktivitesi 1,51-3,69 $\mu\text{mol. dk./mg}$ değerleri arasında belirlenmiştir. Ragout ve ark.'ları (1989) MRS besi ortamında *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 suşunun % 33 oranında L (+) laktik asit ürettiğini tespit etmişlerdir. Aslında *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türünün ürettiği laktik asit D (-) formundadır fakat düşük oranda da olsa bir miktar L (+) laktik asit ürettiği yapılan bu çalışma ile belirlenmiştir (101). Sonuçlara bakıldığında, suşların D-LDH ve toplam laktat dehidrogenaz enzimlerinin spesifik aktiviteleri arasındaki farkın, farklı oranlarda içerilen L-LDH enziminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla beraber bizim çalışmamızda yüksek D-LDH spesifik enzim aktivitesine sahip *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* A13 (1,54 $\mu\text{mol.dk/mg}$) suşunun D (-) laktik asit (0,100 g/L)

üretiminin de yüksek olduğu belirlenmiştir. Yani suşların D (-) laktik asit üretim miktarları ile D-laktat dehidrogenaz enzim aktiviteleri paralellik göstermektedir. Bu sonuçlarımızı destekleyen bir çalışma Garrigues ve ark.'ları tarafından 2001 yılında yapılmıştır. Bu çalışmada araştırmacılar, *Lactococcus lactis* NCDO 2118 doğal suşuna *ldh* geni aktararak mutant 2 farklı suş elde etmişlerdir. Laktik asit üretimi 100mM (9,0 g/L) olan mutant JIM 5711 suşunun laktat dehidrogenaz enziminin spesifik aktivitesi 1200 μ mol. dk./mg olarak belirlemişler ve bu mutant suşların laktat dehidrogenaz aktivitelerinde gözledikleri artışa paralel laktik asit üretimlerinde de önemli bir artış tespit etmişlerdir (104). Sonuçta laktik asit üretim miktarı fazla olan suşun laktat dehidrogenaz enziminin spesifik aktivitesinde fazla olduğu belirlenmiştir.

Bir mikroorganizmanın probiyotik özelliklerini gösterebilmesi için intestinal sistemde ve endüstriyel prosesler altında canlı kalması gerekmektedir. Ağız yolu ile alınan probiyotikler intestinal bölgelere ulaşmadan önce midenin gastrik asit ortamı ile karşı karşıya kalmaktadırlar. Bu nedenle probiyotik mikroorganizma seçiminde ilk aranması gereken özellik suşların asit dirençliliğidir. Mide pH'sı 1,5 dan düşük olabildiği gibi gıda alınımı sonrası pH 6 ya kadar çıkmaktadır. Midenin genel olarak pH aralığı ise 2,5-3,5 dur (105). Probiyotik mikroorganizmaların asit toleransının belirlenmesi için genel bir kural yoktur fakat pH 1,0-5,0 aralığı bu tip çalışmalarda kullanılmaktadır (106). Probiyotik seçiminde kullanılan diğer bir kriter ise suşların safra asitlerine dirençlilik özelliğidir. Safra asitleri karaciğerde kolestrolde sentezlenmektedir. Konjuge formda ince bağırsağa salınan safra asitleri kalın bağırsakta mikrobiyal aktivite sonucu kimyasal değişime uğramaktadır. Safra asitleri aslında lipitleri parçalayıcı özelliktedir ve bundan dolayı bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkiye sahiptir (87,107). Bununla beraber insan kullanımı için kullanılacak probiyotiklerin seçiminde %0,15 ve %0,3 konsantrasyonlarında safra tuzunun kullanılması önerilmektedir (106). Özellikle %0,3 safra tuzu konsantrasyonunun insandaki safra

konsantrasyonuna yakın bir değerde olmasından dolayı, direnci belirlemek için yapılan taramalarda kritik değer olduğu belirtilmiştir (87).

Bu çalışmaya başlamadan önce EPS ve laktik asit üretimleri belirlenmiş 23 suş arasından, nitelikli ve probiyotik özellikleri kuvvetli olan 4 suş, bu aşamadan sonra kullanılmak üzere seçilmiştir.

Bu suşlar *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 [EPS (211 mg/L) ve laktik asit (0,08 g/L) yüksek], *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* G12 [EPS (175mg/L) yüksek, laktik asit (0,033g/L) düşük], *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* A13 [EPS (27mg/L) düşük laktik asit (0,1g/L) yüksek] ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 22 [EPS (21 mg/L)ve laktik asit (0,030g/L) düşük] 'dir.

Çalışmada seçilen suşların mide asitliğine yakın değişik pH' lara (1,0-3,0) dayanıklılıkları ölçülmüştür. Sonuçta, pH 3,0' e tüm suşlarımızın yüksek oranda (% 72,5-96,3) dirençlilik gösterdiği belirlenmiştir. Xanthopoulos ve ark'ları (2000) bebek dışkılarından izole ettikleri farklı türler (*L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*) içeren 20 adet LAB'sinin probiyotik özelliklerine bakmışlardır. Bu çalışmada pH 3,0' de inkübasyona bırakılan izolatların, inkübasyon sonrası % 0,1-73,3 oranlarında canlılıklarını korudukları belirlenmiştir (86). Ayrıca bizim suşlarımızın pH 3,0 asitliğine karşı *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. reuteri* ve *L. rhamnosus* türlerinden daha dirençli olduğu gözlenmiştir. Bizim bulduğumuz sonuçlara benzer sonuçlar Prasad ve ark.'larınca (1998) bulunmuştur. Bu çalışmada süt ürünleri, insan kaynaklı ve halen probiyotik ürünlerde kullanılan, değişik türlerde 7 adet LAB'sinin pH 3,0' de 0-3 saat süresince canlılıklarına bakılmıştır. Sonuçda LAB'lerinin pH 3,0' de % 92,6-100 oranında canlı kaldıkları belirlenmiştir (107). Genel olarak sonuçlara baktığımızda suşlarımızın pH 3,0' e yüksek oranda dirençli olduğunu görmekteyiz.

Asitlik çalışmalarında sıklıkla kullanılan diğer bir pH değeri 2,0' dir. Suşlarımızdan sadece *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 ve G12' nin pH 2,0

dirençliliği (%49-%28) belirlenebilmiştir. pH 1,5 ve pH 1,0 gibi çok düşük asitlikte ise hiç bir suşumuzda canlılığa rastlanamamıştır. Kim ve ark'ları (1999) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* suşlarının belli pH larda canlılıklarını incelemişler ve sonuçta tüm suşların pH 2,0' de tamamen öldüklerini belirtmişlerdir (108). Haller ve ark'ları (2001) çeşitli kaynaklardan izole edilen laktik asit bakterileri üzerinde yaptıkları çalışmada, genel olarak bakterilerin pH 2,0' ye dirençlilikleri %0-%93 arasında, pH 1,5' e dirençlilikleri %0-% 50 arasında bulunmuştur. *L. sakei* türüne ait suşlarda pH 2,0 ve pH 1,5' da hiç canlılığa rastlanmamıştır. Aynı çalışmada türlerin ve hatta suşların asitliğe karşı farklı oranlarda ki bu direnci bakterinin üreme fazından kaynaklandığı vurgulanmıştır (89). Erken logaritmik fazda bakterilerin asitlik gibi öldürücü etkilere daha az dayanıklı oldukları fakat durgun fazda bu direncin arttığı ifade edilmiştir. Bu durum bize, asitliğe direncin türlere, bu türlerin suşlarına ve hatta üreme fazlarına göre değişkenlik gösterdiğini düşündürmektedir.

Genel olarak *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türünün asit dirençliliği ile ilgili çok çalışma bulunmamakla beraber bu konu özellikle diğer LAB türleri üzerinde yoğunlukla çalışılmıştır. Yapılan çalışmalar bize asitliğe direnç konusunda türümüzün diğer birçok LAB türlerinden daha dirençli olduğunu göstermektedir.

pH 2,0' ye dirençli *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 ve G12 aynı zamanda yüksek oranda EPS üreten suşlarımızdır. Bazı araştırmacılar EPS'nin bakteriyi faj atakları, osmotik stress, antibiyotik ve toksik maddelere karşı koruduğunu ileri sürmüşlerdir (46). Bu sonuçlar bize EPS'nin bakteriyi düşük asitliğin öldürücü etkisinden koruduğunu da düşündürmektedir. Logaritmik üreme fazında bakterilen asitliğe daha duyarlı olmasının nedeni bu fazda EPS'nin de az üretilmiş olmasından kaynaklanabileceği de düşünülmektedir.

Çalışmada diğer önemli bir özellik olan safra dirençliliği belirlenmiştir. Araştırmacılar probiyotik bakteri seçiminde yapılacak denemelerde

kullanılacak safra tuzu konsantrasyonunun %0,15-%0,3 arasında olması gerektiğini belirtmişlerdir (109). %0,15 oranındaki safra tuzu suşlarımızı % 61-70 ve %0,3 safra tuzu %64-76 oranları arasında inhibe etmiştir. Yapılan bir araştırmada %0,15 oranında safra tuzunun; *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* suşlarını %34,2-67,4 oranında, *Lactobacillus rhamnosus* suşlarını %42,7-83,9 oranında, *Lactobacillus acidophilus* suşlarını %82,1-85,6 oranında, *Lactobacillus gasseri* suşlarını %63,5-78,1 oranında ve *Lactobacillus reuteri* suşlarını %48,9-89,7 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir (106). Papamanoli ve ark'ları (2003) %0,3 safra konsantrasyonunun *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* ve *Lactobacillus plantarum* türlerine ait suşların üzerine inhibisyon etkisini belirlemişler ve sonuçta *L. sakei* suşları %100, *L. curvatus* suşları %42 ve *L. plantarum* suşları %0 oranında inhibe edilmiştir (110). Bu sonuçlara baktığımızda, suşlarımızın safra tuzlarına karşı *L. acidophilus*, *L. gasseri* ve *L. sakei* türlerinden daha dirençli olduğunu görmekteyiz.

Suşlarımızdan EPS üretimi fazla olan *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 ve G12' nin, asitlikte olduğu gibi, her iki safra tuzu konsantrasyonuna karşı diğer suşlarımıza kıyasla daha dirençli olduğunu görmekteyiz. Bu durum EPS'nin toksik maddelere karşı bakteri için bir bariyer görevi yaptığını düşündürmektedir.

Genel olarak safra dirençliliği konusunda suşlarımız canlılıklarını koruduklarını fakat daha yüksek oranda canlılığın korunması için tutuklama gibi yöntemlerin uygulanabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca tüm bu sonuçlar safra dirençliliğin suşdan suşa değişebilen bir özellik olduğunu göstermektedir. Bunun nedeni olarak bazı araştırmacılar, bakterinin bünyesinde bulunan ve safra tuzlarını parçalayan özel bir enzimin varlığını göstermişlerdir (87). Bile salt hidrolaz (safra tuzu hidrolaz enzimi) adlı bu enzim, bakteriler için toksik etkiye sahip olan safra tuzlarını parçalayarak, safra tuzlarının işlevini ortadan kaldırmaktadır. Bu enzime sahip bakterilerde safra tuzlarına karşı dirençin arttığı belirlenmiştir (110).

Probiyotiklerin insan sağlığı üzerine olumlu etkileri hemen hemen tüm araştırmacılar tarafından kabul edilmektedir. Fakat bu bakterilerin olumlu etkileri, etkin oldukları alan olan bağırsağa, canlı ve belli bir sayının üzerinde ulaşmaları ile mümkün olmaktadır. Uluslararası Sütçülük Federasyonu bakterinin olumlu etkilerinin gözlenebilmesi için alınan probiyotik bakterinin canlı olması ve en az 10^7 cfu/g miktarında olması gerektiğini bildirmişlerdir. Bununla beraber yapılan çalışmalar probiyotik ürünlerin istenilen miktarda ve canlı mikroorganizma içermediğini göstermiştir (15).

Araştırmacılar sonuçta bakterilerin olumsuz çevre şartları altında canlılığının korunması için farklı metodlar kullanmaya başlamışlardır (16). Tutuklama metodları da bu bağlamda kullanılmış ve olumlu sonuçlar göstermiştir (15,16).

Çalışmada; EPS ve laktik asit üretimi, asit ve safra dirençliliği belirlenmiş 4 suş arasından probiyotik olabilecek nitelikteki *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 suşu, tutuklama çalışmasında kullanılmak üzere seçilmiştir. Tutuklama işleminde polimer olarak alginat kullanılmıştır. Ucuzluğu, kullanım kolaylığı, doğal elde edilişı, asidik ortamlara dirençliliği ve canlı için toksik olmaması nedeniyle bu madde bir çok araştırmacı tarafından tercih edilmiştir. Ayrıca araştırmacılar tutuklama işlemi için farklı oranlarda alginat ve CaCl_2 konsantrasyonları ve küre çapları kullanmışlardır (6,15).

Çalışmamızda, tutuklama işlemi için %1,8 'lik alginat kullanılmış ve kürelerin tam sertleşmesi için 2 saat 0,4 M CaCl_2 çözeltisi içerisinde bekletilmiştir. Bizim çalışmamızı destekleyen bir çalışma Chandramouli ve ark.'ları (2004) tarafından yapılmıştır. Sonuçda, alginata tutuklama yaparken kullanılan CaCl_2 konsantrasyonunun farklı olması veya kürelerin sertleşmesi için değişik bekletme sürelerinin kullanılması gibi faktörlerin tutuklanmış bakterinin olumsuz çevre koşullarına dirençi üzerine herhangi bir etkisi olmadığı bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar artan küre çapı (200-1000µm) ve artan

alginat konsantrasyonunun (%0,75-%1,8) tutuklanmış bakterilerin kötü şartlarda canlılığını koruduğunu bildirmişlerdir. Bunun nedeni ise artan alginat konsantrasyonuyla beraber Ca^{++} iyonları ile çapraz bağ yapacak Na miktarı artmakta, buda oluşan polimerin daha sıkı olmasına neden olmaktadır. % 2 ve üzeri konsantrasyonlarda alginat kullanıldığı zaman ise artan viskoziteden dolayı istenilen küre şekli oluşmamaktadır (16).

Alginat içerisine hapsedilmiş hücrelerin hangi zamana kadar canlılıklarını koruyacakları, bu kürelerin fermente ürünlerde kullanımı açısından önemlidir. Depola süresi, taşıma şartları gibi uzun süreçler sonunda kültürlerin canlılıklarını korumaları, probiyotik özelliklerini korumaları açısından da önemlidir (111). Bu nedenle tutuklama sonrası bakterinin uzun süre canlılığını koruyacak tutuklama materyalleri tercih edilmektedir. Ayrıca uzun süre canlılığını koruyabilen starter veya probiyotik kültürlerin bazı metabolitleri de uzun süreli üretmesi istenmeyebilir. Örneğin yoğurtların kısa sürede (asitlik gelişimi) ekşimesi sıklıkla görülen bir kusur olduğundan işletmeler çoğunlukla inkübasyona erken son vererek bu bozukluğun önüne geçmeyi ummaktadırlar. Fakat bu şekilde inkübasyona son verildiğinde istenilen bazı ürünler oluşmamakta ve asitlik artışı da çoğunlukla önlenememektedir (112). Bundan dolayı tutuklamada kontrollü salınım yapabilen materyaller önerilebilir.

Çalışmada alginat içine tutuklanmış kürelerin 1-5 ve 15. günlerdeki canlılık miktarı belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.7.) İlk 5 gün içerisinde canlılık miktarında herhangi bir düşüş gözlenmemiş fakat 15. gün canlı hücre sayısında bir düşüş olduğu gözlenmiştir. Sultana ve ark'ları (2000) alginata tutuklanmış *L. acidophilus* 2401 ve *Bifidobacterium infantis* 1912 suşlarının yoğurt içerisindeki canlılıklarına bakmışlardır (15). Bizim sonuçlarımıza benzer şekilde ilk 2 hafta canlılıkta bir düşüş gözlememiş, 2 haftadan sonra düşüşler gözlemeye başlamışlardır. Sheu ve Marshall (1993) dondurma içerisine eklenen *L. bulgaricus* türüne ait tutuklanmış hücrelerin tutuklanmamış hücrelere kıyasla canlılıklarını %40 oranında muhafaza ettiklerini

bildirmişlerdir (75). Aynı çalışmada kalsiyum alginatın sağladığı bu mükemmel korumanın oluşan jel yapısından veya polimer ile hücre duvarı arasındaki etkileşimden veya her iki nedenden kaynaklandığı vurgulanmıştır (75).

Tüm bu araştırmalar bize, tutuklanmış hücrelerin depolama koşullarına daha dayaklı olduğunu ve en az 2 hafta boyunca tüm hücrelerin canlılıklarını muhafaza ettiklerini göstermiştir. Ayrıca sonuçlarımıza baktığımızda canlılığın %40'dan daha fazla oranda muhafaza edildiği ve tutuklama sayesinde hücrelerimizin uzun süre canlı kaldığını görmekteyiz.

Probiyotik ve starter özellikler her bakteride aynı anda bulunmayabilir. Fakat bugün fermente ürünlerin üretiminde kullanılacak starterların, aynı zamanda probiyotik özelliklere sahip olmasında istenmektedir. Böylece tek bir suş veya birkaç suşun karışımı ile tüketicinin istediği tat ve görünüşte sağlıklı ürünler topluma sunulabilecektir.

LAB'lerinin EPS ve laktik asit üretimleri, bakterilere hem probiyotik hem de starter özelliği kazandırmaktadır. Starter kültürlerin, laktik asit üretimi ile süt fermentasyona uğramakta, proteinler parçalanmak ve süt proteinleri ince bir pıhtı halinde çökerek sindirim kolaylaşmaktadır. Ayrıca yoğurda keskin, ekşi ve hoşça giden bir tat kazandırarak yoğurt aromasının oluşumuna katkıda bulunmaktadır (113,114). Probiyotik özellik olarak laktik asit, ürünün pH'sını düşürerek patojen ve kontaminant mikroorganizmalara karşı doğal bir korucu vazifesi yapmakta ve ürünün kalitesini muhafaza etmektedir. EPS üretimi fermente ürünün daha kıvamlı ve düzgün olmasını etkiler. Probiyotik özellik olarak EPS'nin; bakteriyi sıvı kaybına, makrofajlara, fagositoza, bakteriofajlara, antibiyotik ve toksik bileşiklere karşı koruduğu, ayrıca metal iyonlarının hücreye alımında görevli olduğu bilinmektedir. EPS' nin diğer bir önemli özelliği ise bakterinin yüzey tutunmasında yapıştırıcı (slime) işleve sahip olması ile bulunduğu ortama tutunma ve biyofilm oluşturmada etkili olmasıdır. Bütün bu özellikler, EPS üreten bakteriye bulunduğu ortamda

stabil olarak kalabilme ve dominant olarak kolonize olma özelliği sağlamaktır. Ayrıca EPS' lerin immün sistemi teşvik ettiği antitümoral ve kolesterol düşürücü etkiye sahip olduğu da saptanmıştır. (115).

Yukarıda açıklanan önemlerinden dolayı çalışmada tutuklanan hücrelerin asit ve EPS üretimleri belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.8.) ve serbest hücrelerin asit ve EPS üretimleri ile mukayese edilmiştir. Tutuklanmış hücrelerde asit ve EPS üretimi, serbest hücrelerin üretimine kıyaslandığında laktik asit üretiminde bir düşme olduğu ancak bu düşmenin dikkate değer düzeyde olmadığı belirlenmiştir. Fermente ürünlerde her ne kadar ürünün oluşumunda asitliğin önemli rolünün olduğu bildirilmiş olunmasına rağmen kısa sürede pH'nın yüksek oranda düşmeside istenilen bir durum değildir (112). Yüksek orandaki asit üründe ekşi hatta acı tadın oluşmasına neden olarak istenmeyen kalitede de ürün oluşmasına neden olacağı gibi, düşen ani pH fermente üründe bulunan starter veya probiyotik kültürlerin gelişimini de olumsuz etkileyecektir. Tutuklanmış kültürlerin kullanılması asit salınımını yavaşlatacağından hem ürün kalitesi, hemde probiyotik ve starter kültürün maksimum düzeyde gelişmesi açısından da olumlu etkisi olacağı düşünülmektedir.

EPS üretiminde ki düşmen laktik asit üretimininkinden biraz daha fazla olmakla birlikte yine bu düşüşünde önemli olmadığı söylenebilir. Probiyotik ve starter kültürlerin önemli özelliklerinden olan EPS ve laktik asit üretiminin serbest hücrelere göre tutuklanmış hücrelerde önemli düzeyde etkilenmemiş olması, tutuklanmış kültürlerin bu açıdanda güvenle kullanılabileceğinin göstergesidir. Bu konu ile ilgili yapılan araştırmalar, tutuklanmış hücrelerin polimer duvarlarından dolayı besi ortamından alması gereken maddeleri, tutuklanmamış hücrelere kıyasla daha geç aldığını, bundan dolayı üretilen metabolitlerin dışarıya salınımının daha geç olduğunu bildirmişlerdir. Örneğin yapılan bir çalışmada tutuklanmamış hücrelerde besi ortamının pH'sı 6 saat sonunda 5 olurken, tutuklanmış hücrelerde bu durum 30 saat sonunda

olmaktadır (15,116). Bizim çalışmamızda da tutuklanmış hücrelerin inkübasyon sonu pH'sı 3,85 iken serbest hücrelerde pH 3,80 olarak belirlenmiştir. Ayrıca hücrede farklı yerlerde bir çok EPS mevcuttur. Bunlar bakteri yüzeyine kovalent bağlarla bağlı olan kapsüller polisakkaritler, hücre duvarının bir bileşeni olan polisakkaritler ve dış çevreye salınan yada alınan hücre yüzeyi ile kovalent olmayan zayıf bağlarla bağlanmış polisakkaritlerdir ve bunların birbirlerinden ayrımı her zaman kolay değildir. (85,86). Bu EPS tiplerinden bazıları hücre duvarı etrafında onu saran bir şekilde bulunduğundan dolayı, tutuklanmış kültürlerde tutuklama meteryalinden dışarıya istenilen miktarda geçememiş olacağından deneysel metotlarla tam belirlenemeyeceği düşünülmektedir.

Probiyotik mikroorganizmaların midedeki düşük asitliğe ve safra tuzlarına dirençli olması istenmektedir. Bu nedenle, araştırmacılar bu tip çalışmalarda asit ve safra dirençliliğinin belirlenmesinin önemli olacağını vurgulamaktadır. (15, 16, 75, 111).

Çalışmada *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 suşunun tutuklanmış hücrelerinde asitliğe karşı toleransın tutuklanmamış hücrelere kıyasla daha fazla olduğu gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.9.). Fakat hem tutuklanmış hemde tutuklanmamış hücrelerde pH 2.0 ve pH 1,5' da canlı hücrelere rastlanamamıştır. Benzer bir çalışma Chandramouli ve ark.'ları tarafından 2004 yılında yapılmıştır. Sonuçta tutuklanmış hücrelerin pH 2,0 'e kıyasla pH 3,0 de canlılıklarını daha çok korudukları bildirilmiştir (16). Krasaekoopt ve ark'ları (2004) 1-3 µm boyutlarında olan bakterilen 17 nm por çaplı alginat matriksi içerisinde çok iyi tutuklandığını fakat tutuklama sonrası ortamda fazla miktarda bulunan monovalent Ca^{++} iyonlarının, oluşmuş jel yapısının zayıflamasına neden olduğunu ve özellikle çok düşük pH larda alginat jelinin moleküler yapısının yavaş yavaş bozularak, koruyucu özelliğinin ortadan kalktığı vurgulanmıştır. Jel yapısının kuvvetlendirilmesi amacıyla araştırmacılar alginatın tek başına değil farklı maddelerle belli oranlarda karıştırılarak kullanımı üzerinde çalışmaktadırlar (6).

Ayrıca çalışmamız 50 küre üzerinden yürütülmüş ve bu bağlamda az hücre kullanılmıştır. Az sayıda kullanılan bu hücrelerin tamamının pH 2,0' de ölmesi olağan bir sonuçtur. Başlangıçtaki 4 suş üzerinde yapılan, tutuklanacak iyi kalitede suş taraması çalışması ile değil, tutuklama çalışmasını sadece kendi içinde mukayese etmekteyiz.

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* B3 suşunun tutuklanmış hücrelerinin safra tuzunu %0,15 ve %0,3 konsantrasyonlarında serbest hücrelere göre daha dirençli oldukları gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.10.). Bu konu ile ilgili yapılan bir çalışmada safra tuzlarına karşı tutuklanmış hücrelerin daha dirençli olduğu bildirilmiştir. Hatta tutuklanmamış hücrelerde canlılık kaybının, tutuklanmış hücrelerdeki kayıptan 2 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (16). Bu durumdan tutuklamanın probiyotik mikroorganizmaların canlılıklarını korumaları için güvenli bir yöntem olduğu sonucu çıkarılabilir.

Çok sayıda hastalığın tedavisinde kullanılan antibiyotikler süt hayvancılığında da çeşitli enfeksiyonel hastalıklar ve özellikle mastitis tedavisinde uzun süredir kullanılmaktadır (89). Uygulanan antibiyotiklerin türü ve dozuna göre süte geçtikleri bilinmektedir. Süte geçen antibiyotiklerden penicillin 0,01 I.U. olduğunda, tetracycline ise 1,00 I.U. olduğunda yoğurt starterlerinin gelişimini inhibe eder. Sütteki antibiyotik kalıntıları yoğurt, peynir, tereyağı gibi süt ürünlerinin üretiminde sorunlar ortaya çıkarır. Düşük konsantrasyonlardaki antibiyotiğe duyarlı olan starter suşların gelişimi inhibe olacağından istenilen kalitede ürünün oluşması engellenmiş olur (117).

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından üretilen protein yapısında antimikrobiyal bileşikler olup duyarlı mikroorganizmalara karşı bakterisidal veya bakteriyostatik etki göstermektedirler. Nisin, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* türüne ait bazı suşlar tarafından üretilen ve gıda koruyucusu olarak kullanılmasına izin verilmiş tek bakteriyosindir (29). Süt endüstrisinde gıda koruyucusu olarak kullanılan nisin düşük konsantrasyonlarda kullanılmazsa

ürün içerisindeki starter veya probiyotik mikroorganizmaları öldürmekte ve ürünün kalitesini düşürmektedir (118).

Çalışmada tutuklanmış hücrelerin penisilin ve nisin gibi antimikrobiyal maddelere dirençleri belirlenmiştir. Genel olarak *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türünün 0,02-0,1 I.U. değerleri üzerinde ki penisilin konsantrasyonuna ve patojen mikroorganizmaların ise 0,04-2,5 µg/L değerleri üzerinde ki nisin konsantrasyonuna duyarlı olduğu bildirilmiştir (29). Yaptığımız çalışma sonucunda tutuklanmış hücrelerin yüksek konsantrasyondaki penisilin (0,5 I.U.) ve nisin (300ppm)' e dirençli oldukları tespit edilmiştir. Champagne (1993) tutuklanmış *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CRA-1 suşuna ait hücrelerin penisiline (0,5 I.U.) daha dirençli olduğunu tespit etmiştir (89).

Tutuklama sonrası hücrelerin ürettiği antimikrobiyal maddelerin etkinliği *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212, *Bacillus cereus* RSKK 863 ve *E.coli* ATCC 11230 patojenleri üzerinde denenmiştir (Bkz. Çizelge 4.12.) ve suşlarımızın bu patojenler üzerinde oluşturdıkları inhibisyon zon çaplarında kayda değer bir değişiklik görülmemiştir. Bu durum hücrelerin tutuklanma sonrası antimikrobiyal madde üretimlerinde bir değişiklik olmadığını ve tutuklanmış hücreler tarafından üretilen antimikrobiyal etkili tüm metabolitlerin alginat duvarından sıvı ortama geçtiğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, probiyotik ve starter mikroorganizmaların tutuklanması son yıllarda önem kazanmış bir işlemdir. Rekombinant DNA teknolojisi ile genetik olarak değiştirilmiş bitki, hayvan ve mikroorganizmaların güvenilirliği bugün hala dünyada hararetli tartışmaların nedeni olmaktadır. Genetiği ile oynanmış bu üstün ürünlerin gelecekte nasıl bir etkiye neden olacağı bugünden kestirilememektedir. Birçok Avrupa ülkesi ve Amerika'da ürünlerin genetik olarak müdahale edilip edilmediği etiketinde belirtilmekte ve tüketici bu durumdan haberdar edilmektedir. Bilinçlenen tüketici doğal olarak yetişmiş ürünleri tercih etmektedir. Bütün bu sıkıntılardan dolayı araştırmacılar,

genetik müdahaleye gitmeksizin, ürün kalitesinde artışın nasıl sağlanacağı ile ilgili araştırmalara hız vermişlerdir.

Fermente süt ürünlerin insan sağlığı üzerine olumlu etkileri uzun yıllardır bilinmektedir. Bu olumlu etkilerin, fermente ürünlerin oluşumunda yer alan bakteriler ve bu bakterilerin ürettiği metabolitlerden kaynaklandığı yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkmıştır. Bugün fermente süt ürünleri teknolojisinde kullanmak üzere üstün suş arayışı başlamıştır. Doğal mikroorganizmalar izole edilerek probiyotik ve starter özellikleri araştırılmaktadır. Çoğu zaman seçilen suşların tamamı aynı anda tüm istenilen özelliklere sahip olmamaktadır. Örneğin insanda izole edilen suşların starter özellikleri istenilen nitelikte olmamakta ya da fermente süt ürünlerinden izole edilen suşlar tüm probiyotik özelliklere sahip olamamakta veya bütün özelliklere sahip olmasına rağmen uzun süreli ve stabil bir üretim için kullanımı mümkün olmamaktadır. Bu nedenden dolayı mikroorganizmaların tutuklanarak koruyucu bir bariyer içerisine hapsedilmesi gündeme gelmiştir.

El yapımı yoğurtlardan izole edilen 23 *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* suşları arasından starter ve probiyotik özelliklere sahip bir üstün suş seçilmiştir. Laktik asit ve EPS üretimi yüksek, asit ve safra tuzlarına dirençli, patojen mikroorganizmalar üzerine etkili olan bu suş *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* B3 'dur. Seçilen bu suşun tutuklama sonrası starter ve probiyotik özelliklerini koruduğu ayrıca tutuklamadan dolayı olumsuz çevre şartlarına karşı direncinin arttığı gözlenmiştir. Bütün bu avantajlara ve bizim sonuçlarımıza göre, probiyotik veya starter olarak kullanılacak kültürlerin tutuklanmış olarak kullanılmasını önerebiliriz. Yine yapılan bu araştırma sonucunda starter olarak veya probiyotik olarak önemli olabilecek bazı metabolitleri yüksek oranda üretmesi ve bu özellikleri tutuklanmış halde de koruması bakımından *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* B3 suşu kaliteli, sağlığa faydalı ve stabil bir fermente süt ürününün üretiminde hem starter hemde probiyotik olarak kullanılabilir. Bu suşun tutuklanmış hücrelerinin aynı zamanda nisin, penicilin,

safra tuzu ve düşük pH'ya karşı daha dirençli olması diğer bir avantajıdır. Bu suşun, gıda kalitesi açısından yapılacak küçük çaplı denemeler sonucunda gıda üretiminde kullanılması önerilebilir.



KAYNAKLAR

1. Yılsay T.Ö., Kurdal E., "Probiyotik süt ürünlerinin beslenme ve sağlık üzerindeki etkisi", **VI. Süt ve Süt rnleri Sempozyumu (Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri)**, Tekirdağ, 279-294 (2000).
2. akır, İ. "Lactobacillus ve Bifidobacterlerde bazı probiyotik özelliklerin incelenmesi ", Doktora Tezi, **Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 4-7, 7-12, 12-14, 14-16,16-19, 35-39 (2003).
3. Klaenhammer, R.T., Kullen, J.M., "Selection and design of properties" **Int. J. of Food Microbiol.**, 50: 45-57 (1999).
4. Vural, T., "Probiyotikler", **XXVIII.Türk Mikrobiyoloji Kongresi zet Kitabı**, Antalya, 33-34 (1998).
5. zer, D., Akın, M.S., "Probiyotik fermente st ürünleri ve prebiyotikler", **VI. St ve St rnleri Sempozyumu (St Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri)**, Tekirdağ, 273-286 (2000).
6. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H., " Evaluatin of encapsulation techniques of probiyotics for yoghurt", **Int. Dairy J.**, 33: 3-13 (2003).
7. Sanders, M., " Probiotics", **Food Technol.**, 53: 67-77 (1999)
8. Ouwehand, A.C., Salminen, S.J., "The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria ", **Int. Dairy J.**,8: 749-758 (1998)
9. Yaygın, H., " Yoğurt yapımında saf kültür kullanımı ve nemi", **III. Milli Süt ve Süt rnleri Sempozyumu**, İstanbul, 83-87 (1995)
10. Tekinşen, O.C., Atasever, M., "Süt rnleri üretiminde starter kültür, 150 ", **Selçuk . Vet. Fak. Yayınları**, Konya,18-80 (1994).
11. ağlar. A., akmakı, S., " Yoğurdun insan sağlığı ve beslenmesindeki rolü ve nemi", **III.Milli Süt ve Süt rnleri Sempozyumu**, İstanbul, 205-217 (1995)
12. Akalın, S., Gn, S., Senderya, S., "Probiyotik süt ürünleri ve prebiyotikler", **VI. Süt ve Süt rnleri Sempozyumu (Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri)**, Tekirdağ, 29-36 (2000).
13. Yaygın, H., "Yoğurt Teknolojisi, 75", **Akdeniz Üniv. Yayınları**, Antalya, 164-173 (1999).

14. Özbaş, Y., "Bifidobakterler ve *Lactobacillus acidophilus* : özellikleri, diyetetik amaçlar için kullanımları, yararlı etkileri ve ürün uygulamaları", *Gıda Tekn. Dergisi*, 18(4), 247-251 (1993).
15. Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., Kailasapathy, K., " Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-chitosan and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt, *Int. J. Food Microbiol.*, 62: 47-55 (2000).
16. Chandramouli, V., Kailasapathy, K. Peiris, P., Jones, M., "An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions". *J. Microbiological Methods*, 56: 27-35 (2004).
17. Çelen, E., Hız, I., Vural, T., "Probiyotikler", *Güncel Gastroenteroloji Dergisi*, 403-408 (1999).
18. Soomro. A.H., Masud. T., Andvvar. K., "Role Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health – A Review", *Pakistan J. Nutrition*, 1(1) : 20-24 (2002).
19. Güvener, Z., "Probiyotikler", *Flora*, 4(3) : 156-162 (1999).
20. Karahan, Z.C., Güvener, E., "Probiotics", *J. Infections Diseases and Clinical Microbiol.*, 4(3): 156-162 (1999).
21. Yetişmeyen, A., "Süt Teknolojisi, 1214", *A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları*, Ankara, 229 (1995).
22. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Holt, J.G., "Bergey' s Manual of Systemic Bact., Volume 2", *Willims & Wilkins.*, London, 1208-1304 (1986).
23. Hofvendahl, K., Hahn-Hägerdal, B., "Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources", *Enzyme Microbiol. Technol.*, 26: 87-107 (2000).
24. Arda, M., "Genel Bakteriyoloji", *A.Ü. Vet. Fak. Yay. No: 402*, Ankara, 250-256 (1985).
25. Tunail, N., Köşker, Ö., "Süt Mikrobiyolojisi, 1116", *A. Ü. Ziraat Fak. Yayınları*, Ankara, 113 (1989).

26. Internet: The microscopy facility Online. <http://bioweb.usu.edu/microscopy/lactobacillus%20bulgaricus.jpg> (2003).
27. Liu, S.Q., "Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations" *I. J. Food Microbiol.*, 83:115-131 (2003).
28. Le Bras G., "Crystallization of D-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus bulgaricus*", *J. Mol. Biol.*, 235: 370-371 (1994).
29. Kılıç, S., "Süt endüstrisinde laktik asit bakterileri, 542 ", *Ege Ü. Ziraat Fak. Yay.*, İzmir, 274-329 (2001).
30. Oysun, G., "Fermente süt ürünlerinde L(+) ve D(-) laktik asit düzeyleri ve önemi", *III. Milli Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu*, İstanbul. 278-285 (1995)
31. Mishra, C., Lambert, J., "Production of anti-microbial substances by probiotics", *Asia Pasific J. Clin. Nutr.*, 5: 20-24 (1996).
32. Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A., Takagi, A., Koga, Y., "Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral lactic administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model" *The American J. Gastroenterology*, 96 (11): 2097-2101 (1998).
33. Forestier, C., De Champs, C., Vatoux, C., Joly, B., "Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties". *Res. Microbiol.*, 152: 167-173 (2001).
34. Çetin, E.T., "Endüstriyel Mikrobiyoloji", *İ. Tıp. Fak. Vakfı Yayınları*, İstanbul, 418 (1983).
35. Bulut, Ş., "Rhizopus oryzae'den laktik asit üretimi", Yüksek Lisans Tezi, *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Elazığ, 17-19 (2002).
36. De Vuyst, I., Degeest, B., "Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria", *FEMS Microbiol. Reviews*, 23: 153-177 (1999).
37. Leigh, J.A., Walker, G.C., "Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function", *Trends in Genetics*, 10: 63-67 (1994).

38. Whitfield, C., Amor, P.A., Koplín, R., "Modulation of the surface architecture of gram-negative bacteria by the action of surface polymer: lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length", *Mol. Microbiol.*, 23: 629-638 (1997).
39. Sutherland, I.W., "Polysaccharases for microbial exopolysaccharides", *Carbohydrate Polymers*, 38: 319-328 (1999).
40. Cerning, J., "Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria". *FEMS Microbiol. Reviews*, 87: 113-130 (1990).
41. Cerning, J., Marshall, V.M.E., "Exopolysaccharides produced by the dairy lactic acid bacteria." *Recent Results and Developments in Microbiol.*, 3: 195-209 (1999).
42. Bouzar, Cerning, J., Desmazeaud, M., "Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants", *J. Dairy Sci.*, 79: 205-211 (1996).
43. Hosono, A., Lee, J., Amentoni, A., Natsume, M., Hirayama, M., Adachi, T., Kaminogawa, S., "Characterization of a water-soluble polysaccharides fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M 101-4.", *Biosci. Biochem.*, 61: 312-316 (1997).
44. Roginski, H., "Fermented milks: products from Northern Europe", *Encyclopedia of Food Microbiol.*, 791-798 (1999)
45. Duboc, P., Mollet, B., "Applications of exopolysaccharides in the dairy industry", *Int. Dairy J.*, 11: 759-768 (2001).
46. Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon, R., "An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria", *Int. Dairy J.*, 12(2-3): 163-171 (2002).
47. Van Kranenburg, R., Marugg, J. D., Van Swam, I. I., Willem, N. J., De Vos, W. M., "Molecular characterization of the plasmid-encoded *eps* gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*", *Molecular Microbiol.*, 24(2): 367-397 (1997).
48. Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., Lee, K., Y., "Probiotics: How should they be defined? ", *Trends in Food Sci. & Technol.*, 10: 107-110 (1999).

49. Yıldırım, Z., Yıldırım, M., "Probiyotik özellik gösteren Bifidobakteriler", **VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu (Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri)**, Tekirdağ, 266-271 (2000)
50. Karahisar, N., "Probiyotik ürünler ve insan sağlığı üzerine etkileri", **Gıda Dergisi**, 5(4):15-18 (1999).
51. Erkmen, O., "Probiyotik bakterilerin önemi", **Gıda Bilimi ve Tek.** 5(1): 26-32 (2000).
52. Yücesan, S., "Probiyotikler ve sağlık üzerine etkileri", **Türk Diyetisyenler Derneği Bülteni**, 2: 1-13 (2002).
53. Hove, H., Norgaard, H., Mortensen. P.B., "Lactic acid bacteria and the human gastrontestinal tract", **Eur.J. Clin. Nutr.**, 53 : 339-50 (1999).
54. Rolfe, R.D., "The role of probiotic cultures in control of gastrointestinal health", **J. Nutrition**, 130: 3965-4025 (2000)
55. Marteu, P.R., Cellier, C.J., "Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics", **Am. J. Clin. Nutr.**, 73: 430-436 (2001)
56. Yaygın, H., "Yoğurdun beslenme değeri ve sağlıkla ilgili özellikleri", **Gıda Dergisi**, 6 (5): 17-22. (1981)
57. Gönç, S., Akçiçek, E., Enfiyeci, A.S., "Yoğurdun terapistik etkisi", **E. Üniv. Ziraat Fak. Dergisi**, 27 (2): 245-260 (1990).
58. Toklu, G.Ş., "Fermente süt ürünleri ve probiyotiklerin sağlık açısından değerlendirilmesi", **Gıda Mühendisliği Dergisi**, 3(7): 23-24 (2000).
59. Arıcı, M., "Probiyotik süt ürünleri", **Hı-Tech**, 2: 106-109 (2001).
60. Lorca, G., Wadstrom, T., Vandez, G., Ljungh, A., "*Lactobacillus acidophilus* autolysins inhibit *Helicobacter pylori* in vitro", **Current Microbiol.**, 42: 39-44 (2001)
61. Kim, T., Hur, J., Yu, M., Cheigh, C., Kim, K., "Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteiocins of Lactic acid bacteria", **J. of Food Protect.**, 66:1, 3-12 (2003)
62. Renner, E., Saldamlı, İ., "Beslenme açısından fermente süt ürünleri", **Gıda Dergisi**, 8 (6): 297-308. (1983)

63. Aso, Y., Akazan, H., "Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer", *Urol. Intl.*, 49: 125-129 (1992).
64. Wollowski, I., Rechkemmer, G., Pool-Zobel, B., "Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer ", *Am. J. Clin. Nutr.*, 73: 455-5 (2001).
65. Collins, E.B., K. Aramaki,," Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*", *J. Dairy Sci.* 63(3) : 353-357 (1980)
66. Isolauri, E., Sutas, Y., Kankaapaa, P., "Probiotics: effects on immunity", *Am. J. Clin. Nutr.*,73: 444-50 (2001).
67. Kavas, G., "Bifidobakterlerin metabolizma üzerindeki etkileri, yararları, fermente süt ürünleri ile kullanımı", *Gıda Dergisi*, 6(2): 78-83. (2000).
68. Karahan, A.G., Çakmakçı, M.L.,. "Probiyotikler", *Gıda Dergisi*, 21(4): 297-302. (1996).
69. Kırdar, S., "Süt teknolojisinde *L.acidophilus*'un yeri ve önemi", *VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu (Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri)*, Tekirdağ, 287-293 (2000).
70. Demirel, G., "Tutuklanmış *Aspergillus niger* kullanılarak sitrik asit üretimi ve sitrik asit üretimi üzerine çeşitli etkilerin incelenmesi",*Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 19-29 (2003).
71. Telefoncu, A., "Enzim immobilizasyonu, Enzimoloji", Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, *Ege Üniversitesi Basımevi*, İzmir, 193-248 (1999).
72. Dingil, N., "Serbest ve immobilize *Aspergillus niger*'in ürettiği sitrik asit veriminin oksijen taşıyıcılar kullanılarak artırılması", *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 9-15 (2002).
73. Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, R., Koutinas, A.A., " Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review", *Food Microbiol.*, 21: 377-397 (2004)
74. Kutay, H., " Ekmek mayası (*Saccharomyces cerevisia*) 'nın çeşitli metodlar ile immobilizasyonu", *Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Gebze, 11-17 (2001).

75. Sheu, T.Y., Marshall, R.T., Microencapsulation of Lactobacilli in calcium alginate gels. *J. Dairy Sci.*, 54: 557-561 (1993)
76. Man, J.C., Ragosa, M., Sharpe, M. E., "A medium for the cultivation of *Lactobacilli*", *J. Appl. Bact.*, 23: 130-138 (1960).
77. Ronald, M., Lawrence, A. and Park, C., "Handbook of Microbiology, 2th Edition", **CRC Press**, New York, 966-1573 (1997)
78. Cruikshank, R., "Med. Microbiol., 11th ed.", **Livingstone**, London. 40-52 (1972).
79. Çetin, E. T., "Endüstriyel Mikrobiyoloji", *İ. Tıp. Fak. Vakfı Yayınları*, İstanbul, 418 (1983).
80. Pereira, C.I., Barreto Crespo, M.T., San Romao, M.V., "Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*", *Int. J. Food Microbiol.*, 68: 211-216 (2001).
81. Reinheimer, J. A., Demkow, M. R., Condioti, M. C., "Inhibition of coliform bacteria by lactic cultures", *Australian J. Dairy Technol.*, May; 5-9 (1990).
82. Wahlefeld, A.W., "Methods of Enzymatic Analysis, 3rd ed" **Verlag Chemie**, Weinheim, 126 (1983).
83. Valerie, M.M., Rawson, H.L., "Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt", *Int. J. Food Sci. Tec.*, 34: 137-143 (1999).
84. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., "Colorimetric method for determination of sugars and related substances", *Anal. Chem.*, 28 (3): 350-352 (1956).
85. Haller, D., Colbus, H., Ganzle, M. G., Scherenbacher, P., Bode, C., Hammes, W. P., "Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro-intestinal ecosystem: A comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin", *Syst. and Applied Microbiol.*, 24: 218-226 (2001)

86. Xanthopoulos, V., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., "Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts", ***Food Microbiol.***, 17: 205-215 (2000)
87. Erkkilä, S., Petäjä, E., " Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use", ***Meat Sci.***, 55: 297-300 (2000)
88. Göksungur, Y., Güvenç, U., " Production of lactic acid from beet molasses by calcium alginate immobilized *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202", ***J. Chem. Technol. Biotechnol.***, 74:131-136 (1999)
89. Champagne, P.C., "Effect of penicillin on free or immobilized Lactococci: Milk acidification and residual antibiotic level", ***J. Food Safety***, 12: 327-339 (1992)
90. Galland, T., Barrie S., "Intestinal dysbiosis and the causes of disease". ***J. Advancemet Med.***, 6: 67-82 (1993).
91. Buts, J.P., "Mechanism of Action of Biotherapeutic Agents". Bioteherapetutic Agents and Infectious Diseases, ***Humana – Pres INC***, 27-46 (1999).
92. Servin, A.L., "Antogonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens" , ***FEMS Microbiol. Rev.***, 28: 405-440 (2004).
93. Nikoskelainen, S., Salminen, S, Bylund, G, Ouwehand, A.C. "Characterization of the properties of human- and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish", ***Appl. Environ. Microbiol.***, 67(6): 2430–2435 (2001)
94. Chateau, N., Castellanos, I., Deschamps. A. M., "Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of commercial probiotics consortium", ***J. Appl. Microbiol.***, 74 : 36-40 (1993)
95. Vereecken, K.M , Devlieghere, F. , Bockstaele, A., Debevere, J., Van Impe, J.F., "A model for lactic acid-induced inhibition of *Yersinia enterocolitica* in mono- and coculture with *Lactobacillus sakei*", ***Food Microbiol.***, 20 :701–713 (2003)
96. Jacobsen, C.N., Rosenfeldt Nielsen, V., Hayford, A.E. Molier, P L., Michaelsen, K.F., Pærregaard, A., Sandstro M,B., Tvede, M, Jakobsen, M., "Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the

- colonization ability of five selected strains in humans", *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(11): 4949-4956 (1999)
97. Çon, A. H. ve Gökalp, H.Y., "Production of bacteriocin-like metabolites by lactic acid cultures isolated from sucuk samples", *Meat Sci.*, 55: 89-96 (2000)
 98. Nousiainen, J., Javanainen, P., Setälä, S., Wright, A.T., "Lactic acid bacteria as animal probiotics" *Lactic Acid Bacteria 3rd*, ed. Salminen, S., Wright, A.T., Ouwehand, A., *Marcel Dekker*, New York, 555-556 (2004)
 99. Yüksekdağ, Z.N., Beyatlı, Y. and Aslim, B., "Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural product", *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 37: 663-667 (2004)
 100. Carrasco, M.S., Scarinci, H.E., Simonetta, A.C., "Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from Argentinian dairy products", *Aust. J. Dairy Technol.*, 57(1) : 15-19 (2002)
 101. Ragout, A., Perce de Ruiz Holgado, A., Oliver, G., Sineriz, F., "Presence of an L (+) -lactate dehydrogenase in cells of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*", *Biochimie*, 71: 639-644 (1989)
 102. Beyatlı, Y., Tunali, N., "Yoğurtlardan izole edilen kimi bakterilerin starter olarak seçilme olanakları" , *J. Biol. Fac. Sci. Arts Gazi Univ.*, 2: 343-363 (1991).
 103. Bonestroo M.H., Kusters, B.J.M., de Wit, J.C., Rombouts, F. M., "Glucose and sucrose fermenting capacity of homofermentative lactic acid bacteria used as fermented salads", *Int. J. Food. Microbiol.*, 5: 365-376 (1992).
 104. Garrigues, C., Goupil-feuillerat, N., Coccagn-Bousquet, M., Renault, P., Lindley, N. D., Loubiere, P., "Glucose metabolism and regulation of glycolysis in *Lactococcus lactis* strains with decreased lactate dehydrogenase activity", *Metabolic Engineering*, 3: 211-217 (2001)
 105. Holzapfel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huis in't Veld J.H.J., " Overview of gut flora and probiotics", *Int J Food Microbiol.*, 41: 85-101 (1998).
 106. Huang, Y., Adams, M. C., " In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria", *Int. J. Food Microbiol.*, 91: 253-260 (2004)

107. Prasad, J., Gill, H., Smart, J., Gopal, P.K., "Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics", *Int. Dairy J.*, 8 : 993-1002 (1998)
108. Kim, W., Ren, J., Dunn, W. "Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stress", *FEMS Microbiol. Lett.*, 171: 57-65 (1999)
109. Goldin BR, Gorbach SL., "Probiotics for human", In: Fuller, R. (Ed.), Probiotics the Scientific Basis.: **Chapman & Hall**,. London, 355-376. (1992)
110. Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzenetaki, E., Kotzekidou, P., "Characterization of lactic acid bacteria isolated from Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties", *Meat Sci.*,65: 859-867 (2003)
111. Sun, W. and Griffiths, M., "Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads", *Int. J. Food Microbiol.*, 61: 17-25 (2000)
112. Atamer, M., Sezgin, E., " İnkübasyon sonu asitliğinin yoğurt kalitesi üzerine etkisi", *Gıda*, 12(4): 213-220
113. Beyatlı, Y. ve Aslım, B., "Köy ve kasaba yoğurtlarından izole edilen *Streptococcus thermophilus* suşlarının metabolik ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi", *Kükem Dergisi*, 20(1): 1-8 (1997).
114. Aslım, B. ve Beyatlı, Y., "Köy ve kasaba yoğurtlarından izole edilen *Lactobacillus bulgaricus* suşlarının metabolik ve antimikrobiyal aktiviteleri üzerine bir araştırma", *Gıda*, 22(6): 441-447 (1997).
115. Loolijesteijn, P.J., Trapet, L., de Vries, E., Abee, T. and Hugenholtz, J. "Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*", *Int. J. Of Food Mic.*, 64: 71-80 (2001).
116. Larisch, B.C., Poncelet, D., Champagne, C.P., Neufeld, R.J., "Microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*", *J. Microencapsul.*, 11 (2) :189-193 (1994)
117. Erdoğan A.,Gürses,M. ve Sert,S., "Agar-Disk Plak yöntemiyle sütte penisilin G kalıntısının tespit edilmesi", *Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri*, Tekirdağ, 374-377 (2000)

118. Yıldırım, Z. ve Yıldırım, M., "Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin genel karakteristikleri", ***Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri***, Tekirdağ, 247-253 (2000)



ÖZGEÇMİŞ

1980'de Afyon'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 1998 yılında girdiği Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2002 yılında mezun oldu. Aynı yıl Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Yüksek Lisans çalışmalarına başladı.

