İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ TARAFINDAN ÜRETİLEN ANTİMİKROBİYAL MADDELERİN GIDA PATOJENİ OLAN MAYALAR ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ahu ÜNER

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

OCAK 2012

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ TARAFINDAN ÜRETİLEN ANTİMİKROBİYAL MADDELERİN GIDA PATOJENİ OLAN MAYALAR ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ahu ÜNER
(506071515)

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek HEPERKAN

OCAK 2012

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün **506071515** numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Ahu ÜNER**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı **"LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ TARAFINDAN ÜRETİLEN ANTİMİKROBİYAL MADDELERİN GIDA PATOJENİ OLAN MAYALAR ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ"** başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

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

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

Yrd. Doç. Dr. Filiz ALTAY .....
İstanbul Teknik Üniversitesi

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

ÖNSÖZ

Tez çalışmam ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesi ile bana yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Dilek Heperkan'a teşekkürlerimi sunarım. Laboratuar çalışmamda yardım ve tecrübelerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Funda Karbancıoğlu-Güler ve Levent Dinçer'e teşekkür ederim. Yardımlarından dolayı arkadaşlarım Ceren Daşkaya-Dikmen ve Sibel Ertuğrul'a teşekkür ederim. Her zaman yanımda ve bana destek olan aileme teşekkürlerimi sunarım. Anlayış ve desteğinden ötürü Alper Akbalık'a teşekkür ederim.

Ocak 2012

Ahu Üner

(Moleküler Biyoloji ve Genetik Mezunu)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ..... **v**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
KISALTMALAR ..... **ix**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **xi**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xiii**
ÖZET ..... **xv**
SUMMARY ..... **xvii**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 Laktik Asit Bakterileri 3
2.1.1 *Lactobacillus* cinsi bakteriler 5
2.1.2 Laktik asit bakterilerinin ürettiği antimikrobiyal bileşikler 13
2.1.2.1 Organik asitler 13
2.1.2.2 Hidrojen peroksit 19
2.1.2.3 Bakteriyosinler 19
2.1.2.4 Diğer protein yapılı ve düşük molekül ağırlıklı bileşikler 22
2.2 Mayalar 26
2.2.1 Mayaların genel özellikleri 26
2.2.2 Mayalarda gelişim 27
2.2.3 Gıdalardan izole edilen bazı maya türleri 28
2.2.4 Gıdalarda bozulmaya sebep olan maya türleri 30
2.2.5 Bazı maya türlerinin antifungal kimyasallara hassasiyetleri 34
3. MATERYAL VE METOT **37**
3.1 Materyal 37
3.2 Metot 37
3.2.1 Gram boyama 37
3.2.2 Laktik asit bakterilerinden antimikrobiyal madde eldesi 38
3.2.3 Supernatantların hazırlık işlemleri 39
3.2.4 Supernatantların antimaya etkisinin incelenmesi 40
3.2.5 Spektrofotometrik mikrotitre plaka metoduyla koloni sayımı metodunun karşılaştırılması 40
3.2.6 Supernatant içindeki D-/L-laktik asit konsantrasyonlarının belirlenmesi 42
4. BULGULAR VE TARTIŞMA **43**
4.1 Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Supernatantların Maya Türleri Üzerine Etkisi 43
4.1.1 Laktik asit bakterilerinden elde edilen supernatantların *C. krusei* gelişimi üzerine etkisi 43
4.1.2 Laktik asit bakterilerinden elde edilen supernatantların *C. lusitaniae* gelişimi üzerine etkisi 45

4.1.3 Laktik asit bakterilerinden elde edilen supernatantların *C. parapsilosis* gelişimi üzerine etkisi 47
4.1.4 Laktik asit bakterilerinden elde edilen supernatantların *C. zeylanoides* gelişimi üzerine etkisi 50
4.1.5 Laktik asit bakterilerinden elde edilen supernatantların *D. hansenii* gelişimi üzerine etkisi 50
4.1.6 Laktik asit bakterilerinden elde edilen supernatantın *R. mucilaginosa* gelişimi üzerine etkisi 54
4.2 *L. pentosus*'tan Elde Edilen Toplam Supernatantın Farklı Maya Türleri Üzerine Etkisi 56
4.2.1 *L. pentosus*'tan elde edilen toplam supernatantın *C. krusei* gelişimi üzerine etkisi 56
4.2.2 *L. pentosus*'tan elde edilen toplam supernatantın *C. lusitaniae* gelişimi üzerine etkisi 58
4.2.3 *L. pentosus*'tan elde edilen toplam supernatantın *C. parapsilosis* gelişimi üzerine etkisi 58
4.2.4 *L. pentosus*'tan elde edilen toplam supernatantın *C. zeylanoides* gelişimi üzerine etkisi 60
4.2.5 *L. pentosus*'tan elde edilen toplam supernatantın *D. hansenii* gelişimi üzerine etkisi 61
4.2.6 *L. pentosus*'tan elde edilen toplam supernatantın *R. mucilaginosa* gelişimi üzerine etkisi 63
4.3 Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Supernatantların İncelenmesi 65
4.3.1 Laktik asit bakterilerinden elde edilen supernatantların pH değerleri 65
4.3.2 Laktik asit bakterilerinden elde edilen supernatantların içerdiği D- ve L-laktik asit miktarları 65
4.4 Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Supernatantların Mayalar Üzerine Etkisiyle ilgili Tartışmalar 67
4.4.1 Laktik asit bakterilerinden elde edilen supernatantların mayalar üzerine etkisi 67
4.4.2 Mayaların antimikrobiyal maddelere karşı gösterdikleri hassasiyet 71
4.4.3 Çalışmada uygulanan mikrotitre plaka ve hücre sayımı metotları ile ilgili tartışma 72
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 75
KAYNAKLAR 77

KISALTMALAR

EMP **:** Embden-Meyerhof-Parnas
EPS **:** Eksopolisakkarit
FDA **:** Food and Drug Administration
FDP **:** Fruktoz-1,6-difosfat aldolaz
GC-MS **:** Gas Chromatography-Mass Spectroscopy
GRAS **:** Generally recognized as safe
HPLC **:** High Performance Liquid Chromatography
IBS **:** Irritable Bowel Sendromu
LAB **:** Laktik Asit Bakterisi
LDH **:** Laktat dehidrogenaz
MEA **:** Malt Ekstrakt Agar
MEB **:** Malt Ekstrakt Brot
MRS **:** De Man Rogosa ve Sharpe
OH-PLA **:** Hidroksifenillaktik asit
PLA **:** Fenillaktik asit
QS **:** Quantum satis

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Fermente gıdalarla ilişkili LAB türleri 4
Çizelge 2.2 : *Lactobacillus* türlerinin gruplandırılması 6
Çizelge 2.3 : LAB bakteriyosin sınıflandırması 21
Çizelge 2.4 : Uluslararası numaralandırma sistemindeki bazı gıda katkıları 23
Çizelge 2.5 : Türk Gıda Kodeksine göre laktik asit, asetik asit, CO2 ve etil alkolün bulunabileceği bazı gıdalar…… ….... 24
Çizelge 2.1 : Laktik asit, asetik asit, karbon dioksitin gıdalarda kullanımı ile ilgili kriterler 25
Çizelge 2.7 : Bazı maya türlerinin DL-laktat özellikleri (gelişim agar üzerinde) 26
Çizelge 2.8 : Bazı gıdalar ve maya türleri 34
Çizelge 2.2 : Bazı maya türlerinin flukonazol (FCZ), itrakonazol (ITZ), ve vorikonazol (VCZ)'a karşı MIC50 değerleri 35
Çizelge 2.3 : Bazı maya türlerinin vazokonazole karşı MIC50 ve MIC90 değerleri 35
Çizelge 2.4 : Bazı maya türlerinin FCZ ve ITZ'ye karşı MIC80 değerleri 35
Çizelge 2.5 : Bazı maya türlerinin belirtilen MIC değerlerindeki kümülatif % inaktivasyon değerleri 36
Çizelge 4.1 : Farklı laktik asit bakterilerinden elde edilen supernatantların pH değerleri 65

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3.1 : Maya hücresinin gelişim eğrisi. Gelişim fazları: I, lag; II, hızlanma; III, eksponansiyel; IV, yavaşlama; V, durağan. X, hücre konsantrasyonu; μ, spesifik büyüme hızı; t, süre..... 27
Şekil 3.1 : LAB kültüründen hücre içermeyen supernatant elde edilmesini gösteren protokol 38
Şekil 3.2 : Hücre içermeyen supernatanttan A, B ve C solüsyonlarının elde edilmesini gösteren protokol..... 39
Şekil 3.3 : Mikrotitre plaka metodu ve koloni sayımı metodunun karşılaştırılmasıyla ilgili protokol..... 41
Şekil 4.1 : Beş farklı LAB suşundan elde edilen supernatantların *C. krusei* gelişimi üzerine etkisi. Mikroplaka kuyusunda, *C. krusei* başlangıç konsantrasyonu yaklaşık $1,4\times10^3$ hücre/ml. 0, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde abs. ölçümü..... 44
Şekil 4.2 : Beş farklı LAB suşundan elde edilen supernatantların *C. lusitaniae* gelişimi üzerine etkisi. Mikroplaka kuyusunda, *C. lusitaniae* başlangıç konsantrasyonu yaklaşık 3×10^3 hücre/ml. 0, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde abs. ölçümü..... 46
Şekil 4.3 : Beş farklı LAB suşundan elde edilen supernatantların *C. parapsilosis* gelişimi üzerine etkisi. Mikroplaka kuyusunda, *C. parapsilosis* başlangıç konsantrasyonu yaklaşık 3×10^3 hücre/ml. 0, 24, 48 ve 72. saatlerde abs. ölçümü..... 48
Şekil 4.4 : Beş farklı LAB suşundan elde edilen supernatantların *C. parapsilosis* gelişimi üzerine etkisi. Mikroplaka kuyusunda, *C. parapsilosis* başlangıç konsantrasyonu yaklaşık 5×10^5 hücre/ml. 0, 24, 48 ve 72. saatlerde abs. ölçümü. 49
Şekil 4.5 : Beş farklı LAB suşundan elde edilen supernatantların *C. zeylanoides* gelişimi üzerine etkisi. Mikroplaka kuyusunda, *C. zeylanoides* başlangıç konsantrasyonu yaklaşık $1,3\times10^3$ hücre/ml. 0, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde abs. ölçümü..... 51
Şekil 4.6 : Beş farklı LAB suşundan elde edilen supernatantların *D. hansenii* gelişimi üzerine etkisi. Mikroplaka kuyusunda, *D.hansenii* başlangıç konsantrasyonu yaklaşık 2×10^3 hücre/ml. 0, 24, 48 ve 72. saatlerde abs. ölçümü 52
Şekil 4.7 : Beş farklı LAB suşundan elde edilen supernatantların *D. hansenii* gelişimi üzerine etkisi. Mikroplaka kuyusunda, *D.hansenii* başlangıç konsantrasyonu yaklaşık 2×10^5 hücre/ml. 0, 24, 48 ve 72. saatlerde abs. ölçümü..... 53
Şekil 4.8 : Beş farklı LAB suşundan elde edilen supernatantların *R. mucilaginosa* gelişimi üzerine etkisi. Mikroplaka kuyusunda,

R. mucilaginosa başlangıç konsantrasyonu yaklaşık $3,5\times10^5$ hücre/ml. 0, 9, 24, 48 ve 72. saatlerde abs. ölçümü 55
Şekil 4.9 : *C. krusei* gelişimi üzerine antimaya etki. Koloni sayımı..... 57
Şekil 4.10 : *C. krusei* gelişimi üzerine antimaya etki. Optik yoğunluk 57
Şekil 4.11 : *C. lusitaniae* gelişimi üzerine antimaya etki. Koloni sayımı..... 59
Şekil 4.12 : *C. lusitaniae* gelişimi üzerine antimaya etki. Optik yoğunluk. 59
Şekil 4.13 : *C. parapsilosis* gelişimi üzerine antimaya etki. Koloni sayımı..... 60
Şekil 4.14 : *C. parapsilosis* gelişimi üzerine antimaya etki. Optik yoğunluk 60
Şekil 4.15 : *C. zeylanoides* gelişimi üzerine antimaya etki. Koloni sayımı..... 61
Şekil 4.16 : *C. zeylanoides* gelişimi üzerine antimaya etki. Optik yoğunluk 61
Şekil 4.17 : *D. hansenii* gelişimi üzerine antimaya etki. Koloni sayımı..... 62
Şekil 4.18 : *D. hansenii* gelişimi üzerine antimaya etki. Optik yoğunluk. 62
Şekil 4.19 : *R. mucilaginosa* gelişimi üzerine antimaya etki. Koloni sayımı 63
Şekil 4.20 : *R. mucilaginosa* gelişimi üzerine antimaya etki. Optik yoğunluk..... 63
Şekil 4.21 : *L. pentosus, L. plantarum, L. brevis* 1, 2 ve 3 suşlarının ürettiği D- ve L-laktik asit konsantrasyonlarının enzimatik yöntemle 340 nm dalga boyunda ölçümü..... 66

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ TARAFINDAN ÜRETİLEN ANTİMİKROBİYAL MADDELERİN GIDA PATOJENİ OLAN MAYALAR ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Biyokoruma, zararsız mikroorganizmaların veya metabolitlerinin, yapay kimyasal maddeler yerine kullanılmasıyla gıdalarda güvenliğin sağlanması ve bozulmanın önlenmesidir. Günümüzde tüketicilerin az işlem görmüş gıda ürünlerine talebinde artış olmuştur. Dolayısıyla gıda güvenliğini tehdit eden patojen mikroorganizmaların kontrolü için doğal bir koruma yöntemi olarak laktik asit bakterileri (LAB) ve bunlardan izole edilen antimikrobiyal maddelerin özelliklerine yönelik araştırmalar önem kazanmıştır.

Mayalar gıda ürünlerinde sıklıkla bulunmaktadır. Genellikle düşük pH, yüksek şeker ve tuz konsantrasyonuna sahip gıdalarda mayalar bozulmaya sebep olabilmektedir. *Debaryomyces, Candida* ve *Rhodotorula* bozulmuş gıdalardan izole edilen maya türlerindendir. Ayrıca fırsatçı patojen özellik göstermektedirler.

D- ve L- laktik asit izomerlerinin sentezi türe ve ortam koşullarına göre değişiklik göstermektedir. L izomeri insan metabolizmasında yer alıp, gıda uygulamalarında kullanılmaktadır. İnsan vücuduna zararlı etkileri olan D formunun ise gıdalarda kullanımı sınırlandırılmıştır. Peynir, şarap gibi bazı gıdalarda starter olmayan laktik asit bakterilerinin ürettiği D-laktik asit miktarının fazla olması istenmeyen doku değişikliklerine sebep olmaktadır. Bunun haricinde, D- ve L- laktik asitin mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal özellikleri de stereospesifiktir.

Bu çalışmada, laktik asit bakterilerinden (*Lactobacillus brevis, Lactobacillus pentosus, Lactobacillus plantarum*) elde edilen maddelerin, özellikle fermente et ürünlerinde kalite özelliklerini olumsuz yönde değiştiren ve insan sağlığına zararlı maya türleri (*Candida krusei, Candida lusitaniae, Candida parapsilosis, Candida zeylanoides, Debaryomyces hansenii* ve *Rhodotorula mucilaginosa*) üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Laktik asit bakterileri tarafından sentezlenen antimaya özellikteki bileşiklerin belirlenmesi ve özelliklerinin incelenebilmesi için, öncelikle uygun bir ön tarama metoduna ihtiyaç bulunmaktadır. Çok sayıda örneği birarada test edebilecek, spektrofotometrik ölçüme dayanan mikrotitre plaka metodu bu amaçla kullanılmıştır. Antimaya özelliği en fazla olan suşun *L. pentosus* olduğu, antimaya aktivitenin organik asitlerden kaynaklandığı belirlenmiştir.

Bu çalışmanın sonraki bölümünde, *L. pentosus* suşundan elde edilen supernatantın antimaya özellikleri araştırılmıştır. Bu anlamda, koloni sayım metodu ile spektroskopik ölçüme dayanan mikrotitre plaka metodu kullanılmış ve elde edilen sonuçlar birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Çalışmada uygulanan spektrofotometrik ölçüm tekniği daha kolay, az zaman alan ve madde sarfiyatı daha az olan bir tekniktir. Ancak tek başına maya gelişimi üzerine inaktivasyon etkisini göstermede yanıltıcı sonuç vermiştir. Hücre sayımı tekniğinin daha doğru sonuç verdiği

görülmüştür. Bu çalışma, antimaya özellikli maddelerin patojenler üzerine etkisinin gösterilmesi açısından özgün bir çalışma olup, bilimsel araştırmalara katkı sağlayacaktır.

Bu çalışma ile, belirtilen maya türlerinin *L. pentosus* suşunun supernatantı varlığında gösterdiği hassasiyet de incelenmiştir. *C. lusitaniae, C. zeylanoides* ve *R. mucilaginosa* gelişimi tamamıyla inaktive edilmiştir. *C. krusei, C. parapsilosis* ve *D. hansenii* türlerinin dayanıklılık gösterip ortama adapte olduğu görülmüştür.

Buna ek olarak, farklı LAB türlerinin ürettiği antimaya maddelerin içerdiği D- ve L-laktik asit izomerlerinin konsantrasyonları stereospesifik enzimatik metotla belirlenmiştir.

ANALYSIS OF ANTIMICROBIAL SUBSTANCES PRODUCED BY LACTIC ACID BACTERIA AND DETERMINATION OF THEIR ACTIVITY ON FOODBORN SPOILAGE YEASTS

SUMMARY

Biopreservation is ensuring food safety and prevention of food spoilage using harmless microorganisms or their antimetabolites instead of chemical additives. Nowadays, there has been an increase at demands of consumers for less processed food products. Therefore, to control pathogenic microorganisms which threaten food safety, researches for features of lactic acid bacteria (LAB) and antimicrobial substances isolated from them, as a natural preservation method, has become more important.

LAB are ‘‘generally recognized as safe’’ (GRAS), because of their association with food fermentations and because they have long been used traditionally as food-grade microorganisms.

LAB have inhibitory effect against other microorganisms as a result of the competition for nutrients and decrease in pH. They can produce antimicrobial compounds such as organic acids, hydrogen peroxide, carbon dioxide, bacteriocins and other proteinaceous compounds.

Organic acids such as lactic and acetic acid, are fermentation end products of LAB and they decrease the pH in the environment. Carbohydrates are fermented either by homofermentative and heterofermentative species. Homofermentative LAB can produce only lactic acid and heterofermentative species can produce equimolar amounts of lactic acid, acetic acid/ethanol and carbon dioxid.

Organic acids can reduce the pH and cause acidification in the cytosol, since undissociated forms of organic acids may penetrate through the plasma membrane. After the entrance, organic acid dissociate because of the increase of the pH in the cytosol. They have impact on the cellular activity of the sensitive organisms increasing the lag phase of their cell cycle.

Lactobacillus is a genus of LAB. They are gram positive, facultative anaerobic or aerotolerant, homo/hetero-fermentative and rod-shaped bacteria. *Lactobacillus* species are used as starter cultures in fermented food products. These food products include yogurt, cheese, pickles, wine, beer and also animal feeds. Moreover, some *lactobacillus* strains have probiotic potential and positive health effects on human and animals.

Yeasts often exist in food products and the level of yeast contamination is an important quality criteria in food safety. Generally, yeasts may cause spoilage of the foods that has low pH, high sugar and salt concentration such as fruit juices, wine, pickled mushrooms, fermented cacao, salads with dressing, jam and marmelades.

The spoilage of meat and meat products is mainly associated with bacterial growth. In the recent years, modern food processing and storage techniques were developed and applied successfully against the bacteria responsible for food spoilage especially in meat products. As a result of this, yeast species have the opportunity to grow in these type of products where other microorganisms are not competitive. *Debaryomyces, Candida* and *Rhodotorula* are yeast strains that isolated from spoiled foods including fermented meat products. Also they have opportunistic pathogenic features.

Synthesis of D- and L- lactic acid isomers shows differences according to type of bacteria and environmental conditions. L isomer takes part in human's metabolism and is used in food applications. The usage of D form, which has harmful effects on human metabolism, in food is limited. Extra amount of D- lactic acid produced by non-starter lactic acid bacteria cause unwanted tissue changes on some kind of food like cheese and wine. Except that, antimicrobial properties of D- and L- lactic acid are also stereospecific. For example, D-lactic acid is more effective against *Listeria monocytogenes,* whereas L-lactic acid is more effective at killing *Escherichia coli* cells.

In the study, it is aimed to research the effects of antimetabolites obtained from lactic acid bacteria *(Lactobacillus brevis, Lactobacillus pentosus, Lactobacillus plantarum),* especially on yeast species *(Candida krusei, Candida lusitaniae, Candida parapsilosis, Candida zeylanoides, Debaryomyces hansenii ve Rhodotorula mucilaginosa)* that affect the quality features of fermented meet products negatively. In the first place, an appropriate preliminary method is necessary to determine and examine features of antiyeast compounds that are synthesized by lactic acid bacteria. For that reason, microtiter plate method was used, which is based on spectrophotometric measurements and can test many samples at the same time.

The activity of supernatants from five LAB strains were characterized in three modes. A small amount of cell free culture supernatant was filter sterilized by membrane filtration and stored at +4°C. This part contained organic acids, hydrogen peroxide and proteinaceous substances. The remaining supernatant was neutralized by NaOH to eliminate the antimicrobial effect of organic acids and stored at +4°C after filter sterilization in order to use in the second assay. As the third mode, catalase solution was added to the neutralized supernatant and incubated for 30 minutes to eliminate hydrogen peroxide and test the effect of bacteriocin-like substances on yeast strains. These three solutions were inoculated with yeast samples into the wells of the microtiter plate. Two types of control wells were prepared. The first one was inoculated without supernatant solutions and the second one was prepared without yeast inoculants. The microtiter plates were covered with sterile sealing films so as to minimize evaporation and prevent contamination. Antiyeast activity was detected using microplate reader at 600 nm at appropriate intervals. The results of microtiter plate method were confirmed by streaking samples from the wells on agar plate and observing the yeast cells on agar plates after 48 hours of incubation.

It is determined that the effects of H_2O_2 and bacteriocin-like substances were not significant for all LAB strains. Since the yeasts produce the enzyme catalase, antimicrobial activity of hydrogen peroxide in the supernatant may be inactivated. Among the yeast strains *L. pentosus* has the highest antiyeast property and antiyeast activity is derived mainly from organic acids.

In the next part of the study, antiyeast feature of supernatant obtained from the strain *L. pentosus* was investigated. In this sense, colony counting method and microtiter plate method that based on spectrophotometric measurements were used and the obtained results were compared to each other.

Spectrophotometric method is rather easier, takes less time and has less material consumption. However, it gave misleading results about showing inhibition effects on yeast growth, because the amount of the cells in the sample solution should be higher than a limit concentration. It was seen that colony counting method gives more accurate results although it is labor-intensive, takes much more time and needs more material consumption. Inactivation curve determination is important to provide information about antimicrobial effect on increased lag phase, reduced growth rate during log phase, reduced stationary phase level and lethality on the yeast strains. In a food product total inhibition of microorganisms is not always needed. For example, increased lag phase may be enough to maintain the food safety. The effect of LAB supernatants on growth curves of yeasts was determined by colony counting and spectrophotometric turbidity methods. This study is unique because of showing effects of substances has antimicrobial properties on yeast strains and will contribute to the future studies.

With this study, susceptibility of mentioned yeast species in the presence of cell free *L. pentosus*' supernatant was investigated. Growth of *C. lusitaniae, C. zeylanoides* and *R. mucilaginosa* was completely inhibited. It was seen that *C. krusei, C. parapsilosis* and *D. hansenii* were more resistant and adaptive to environment. Comparing the results of the current study to the studies in the literature, *C. krusei* was determined as a resistant yeast to many antimicrobial drugs. *C. parapsilosis, D. hansenii* and *C. lusitaniae* are less resistant to the chemicals than *C. krusei*. In general, *C. zeylanoides* is susceptible to the antimicrobial drugs. Our findings are consistent with the literature. The cell membrane of *C. krusei* has a different mechanism to control intracellular acidity that makes the yeast resistant to extracellular low pH conditions.

In addition, the concentration of D- and L-lactic acid isomers contained in antiyeast supernatants produced by the LAB species were determined using rapid and simple stereospecific enzymatic method based on the oxidation of D/L-lactate to pyruvate by NAD+ in the presence of the enzymes D/L-lactate dehydrogenase. In the second reaction, pyruvate is catalyzed by alanine aminotransferase. These two coupled reactions lead the way to the formation of NADH molecule which is measured by a spectrophotometer at 340 nm.

The results show that the supernatant of *L. pentosus* has the highest lactic acid content, whereas *L. plantarum* has the lowest. The amount of L-lactic acid in the supernatant of *L. brevis* 2 is very similar to that of *L. pentosus* which shows that D-lactic acid causes the antiyeast activity of *L. pentosus* supernatant. The pH value of the supernatants of *L. pentosus*, *L. plantarum* was measured as 3,77 and 5,48, respectively. On the other hand, the pH levels of *L. brevis* strains were very close to each other (between 4,26 and 4,31). The total lactic acid content of *L. pentosus* supernatant was calculated as 11,88 g/l. The concentration of lactic acid produced by *L. plantarum* was nearly zero. Moreover, *L. brevis* strains' supernatants included lactic acid between 6,23 and 7,41 g/l. According to the results, pH values of the cell free supernatants, the total lactic acid content of the supernatants and antiyeast activities of them are consistent.

1. GİRİŞ

Gıdaların üretimi sırasında mikrobiyal bulaşıyı en aza indirmek, gıdanın işlenmesi, taşınması ve depolanması sırasında mikroorganizmaların gelişimini önlemek amacıyla çeşitli gıda koruma metotları (soğuk depolama, pastörizasyon, paketleme, kimyasalların kullanımı) kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin iyi bir şekilde uygulanmasına rağmen hastalık salgını gibi istenmeyen durumlar oluşabilmektedir (Goktepe, 2006).

Son yıllarda güvenli, aynı zamanda "doğal" gıdaya olan ilgi tüketiciler ve üreticiler arasında artmıştır. Bu durum araştırıcıları yeni antimikrobiyal işlemlerin araştırılmasına ve uygulanmasına yöneltmiştir (Goktepe, 2006). Bunun sonucu olarak oluşan biyokoruma konseptinin içerdiği fikir; gıda ürünlerindeki patojen ve bozulma etkeni mikroorganizmaları inaktive etmek üzere kullanılan kimyasalların yerine, patojen olmayan mikroorganizmaların veya ürettikleri metabolitlerin seçilip kullanılmasıdır. Burada temel amaç, antimikrobiyal özelliği olan bakteriyi kullanarak koruma ve güvenliğin artırılması ve raf ömrünün uzatılmasıdır.

Koruyucu kültürler hedef mikroorganzimayı kontrol altında tutma özelliğine göre özel olarak seçilmektedir. Bu kontrol mekanizması, besin öğeleri için yarışın ve bunun yanında antimikrobiyal özellikteki metabolik ürünlerin oluşumunun sonucudur. Seçilen koruyucu kültürün fermentasyonda kullanımıyla gıdalarda istenilen lezzet ve doku özelliklerinin gelişimi yanında istenmeyen mikroorganzimaların büyümesi de engellenir. Ancak bu işlem fermente olmamış gıdalara da (süt, et ve et ürünleri, meyve ve sebzeler) uygulanabilir (Smid ve Gorris, 2007). Gıdalarda koruyucu kültür olarak en çok kullanılan mikroorganizmalar laktik asit bakterileridir (LAB). LAB, GRAS sınıfı bakterilerdir ve en az 4000 yıldır geleneksel yöntemlerle kullanımının güvenli olduğu bilinmektedir. Çok çeşitli gıdalarda kullanılmakta ve ürettiği metabolik bileşenlere ilgi giderek artmaktadır (Smid ve Gorris, 2007).

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri gram-pozitif, spor oluşturmayan, katalaz negatif, karbonhidrat fermentasyonu neticesinde son ürün olarak laktik asit oluşturan, DNA baz kompozisyonu düşük G+C içeriğine sahip çubuk ve koklardır. Birkaç üyesi dışında hepsi hareketsizdir. Anaerobik ve aerotolerant özellikte olup aside toleranslıdır (Wood ve Holzapfel, 1995; Kleerebezem ve diğ., 2010). Şeker moleküllerini fermente ederek son ürün olarak laktik asit oluşturanlar homofermentatiftir ve "Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) yolunu" kullanır. Fermentasyonu sonucu laktik asit yanında asetik asit, etanol, karbondioksit oluşturanlar ise heterofermentatif LAB olarak gruplandırılır. Bu ikinci grup ise "6-phosphogluconate/phosphoketolase yolunu" kullanır (Axelsson, 2004; Narvhus ve Axelsson, 2003).

Gıda teknolojisi kapsamında bulunan LAB cinsleri, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* olarak sıralanmıştır (Axelsson, 2004). *Oenococcus* türü yalnızca şarapta bulunurken, *Lactococcus*, *Lactobacillus* başta olmak üzere, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* türleri daha çok süt ve süt ürünleriyle ilişkili olup başka gıdalarda da bulunabilir (Björkroth ve Koort, 2011). Çizelge 2.1'de, fermente gıdalarda kullanılan LAB türleri gösterilmiştir.

LAB, çok eski tarihlerden beri insanlar tarafından tüketilen gıdalarda kullanılmakta olup, sağlığa yararlı LAB türleri GRAS "generally recognized as safe" sınıfında yer alır. Ürettikleri antimikrobiyal peptitler sindirim sistemindeki proteazlar tarafından kolaylıkla yıkılabilir olduğundan gastro-intestinal mikrofloraya zararı bulunmaz. Fermentasyon sayesinde gıdaların lezzet ve doku özelliklerini olumlu yönde geliştirir ve biyokoruma potansiyeli sayesinde de patojen mikroorganizmaların gelişimini önleyerek gıdalarda dayanıklılık sağlar, raf ömrünü uzatırlar. Gıdalarda LAB türleri

starter kültür olarak kullanıldığında mikroorganizmanın metabolik aktiviteleri esas alınır; amaç koruyucu kültür olarak kullanmak ise antimikrobiyal etkinin esas olduğunu belirtmek gerekir. LAB koruyucu kültür olarak kullanıldığında, gıda ortamında patojen mikroorganizmalarla besin bileşenleri için yarışır, ortamın pH'ını

Çizelge 2.1: Fermente gıdalarla ilişkili LAB türleri (Phumkhachorn ve diğ., 2010).

Fermente ürünler		**Laktik asit bakterileri**
Süt ürünleri	Sert peynir (iri gözlü)	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*
	Peynir (küçük gözlü)	*L. lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis var. diacetylactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc menesteroides* subsp. *cremoris*
	İsveç ve İtalyan peynirleri	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*
	Tereyağı	*L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis var. diacetylactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Leuc. menesteroides* subsp. *cremoris*
	Yoğurt	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus*
	Fermente, probiyotik süt	*Lb. casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*
	Kefir	*Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefiranofacies*, *Lactobacillus brevis*
Fermente et	Fermente sucuk (AB)	*Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*
	Fermente sucuk (ABD)	*Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*
Fermente sebze	Saurkraut	*Leuc. menesteroides*, *Lb. plantarum*, *P. acidilactici*, *Pediococcus cerevisiae*, *Lb. brevis*
	Turşu	*Leuc. menesteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lb. pentosus*
	Fermente zeytin	*P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Lb. plantarum*
	Fermente sebze	*Lactobacillus fermentum*
Fermente tahıl	Ekşihamur	*Lactobacillus sanfransiscensis*, *Lactobacillus farciminis*, *Lb. fermentum*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus alimentarius*, *Weisella cibaria*
Fermente balık ürünleri		*Lb. alimentarius*, *Carnobacterium piscicola*

düşürür, bakteriyosin veya diğer antagonistik bileşikleri (organik asit, hidrojen peroksit, enzimler gibi) üreterek koruyucu etki gösterir. (Castellano ve diğ., 2008; Limsowtin ve diğ., 2002; Wood ve Holzapfel, 1995).

2.1.1 *Lactobacillus* cinsi bakteriler

Lactobacillus cinsi bakteriler; *Firmicutes* şubesi, *Bacilli* sınıfı, II *Lactobacillales* takımı, ve *Lactobacillaceae* familyası olarak sınıflandırılmıştır (Calasso ve Gobbetti, 2011). LAB cinsleri arasında en fazla üyeyi barındıran *Lactobacillus* çok çeşitli fenotipik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikte türleriyle oldukça heterojen bir gruptur (Axelsson, 2004). Aside toleranslı, anaerobik ve oksijeni tolere edebilen bakterilerdir. Şekeri fermente etmelerine göre üç gruba ayrılırlar: Zorunlu homofermentatif, fakültatif heterofermentatif ve zorunlu heterofermentatif (Axelsson, 2004; Kleerebezem ve diğ., 2010). *Lactobacillus* gruplandırılması Çizelge 2.2'de verilmiştir (Axelsson, 2004). Fakültatif heterofermentatif *Lactobacillus* türleri, EMP yolunu kullanarak heksozları fermente edip neredeyse tamamını L(+)- ve D(-)-laktata dönüştürürler. Glukozun sınırlı olduğu ortamda ise şekerlerin fermentasyonu sonucu laktik asit, asetik asit, etanol ve formik asit oluştururlar ayrıca pentozu da parçalayabilirler. Fakültatif heterofermentatif türler fosfoketolaz ve fruktoz-1,6-difosfat aldolaz (FDP) enzimlerini içerirler. Zorunlu heterofermentatif *Lactobacillus* türleri, 6-fosfoglukonat yolunu kullanarak heksozları laktik asit, CO_2, asetik asit ve/veya etanole fermente ederler. Zorunlu homofermentatif türler FDP enzimini içerirken zorunlu heterofermentatif türler bu enzimi içermezler. (Axelsson, 2004; Calasso ve Gobbetti, 2011).

Lactobacillus, fermente süt, et ve bitkisel gıdalar, insan ve hayvan vajinası, ağız ve gastrointestinal sistem gibi nişlerde sıklıkla bulunur (Mills ve diğ., 2010). *Lactobacillus* içersinde *L. brevis, L. casei,* and *L. plantarum* gibi türler pek çok ortamda üreyebilen türler olduğu gibi, örneğin yoğurtla ilişkili olan *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* gibi bulunduğu ortama göre özelleşmiş türler de mevcuttur (Axelsson, 2004). *L. sanfransisco* ekşi hamur, *L. curvatus* ve *L. sakei* sucuk, *L. kefir* kefir, *L. acidophilus* asidofilus sütü gibi bakteriler gıda fermentasyon teknolojisinde kullanılan türlere ve kullanıldıkları gıdalara örnek olarak verilebilir (Vogel ve Ehrman, 1996).

Çizelge 2.2: *Lactobacillus* türlerinin gruplandırılması (Axelsson, 2004).

	Grup I	**Grup II**	**Grup III**
Özellik	Zorunlu homofermentatif	Fakültatif heterofermentatif	Zorunlu heterofermentatif
Pentoz fermentasyonu	-	+	-
Glukozdan CO_2 sentezi	-	-	+
Glukonattan CO_2 sentezi	-	+	+
FDP adolaz içerir	+	+	-
Fosfoketolaz içerir	-	+	+
	L. acidophilus	*L. casei*	*L. brevis*
	L. delbrückii	*L. curvatus*	*L. buchneri*
	L. helveticus	*L. plantarum*	*L. fermentum*
	L. salivarius	*L. sakei*	*L. reuteri*

Lactobacillus brevis

Grup III zorunlu heterofermentatif gruba dahil olan bu türün hücreleri çubuk şeklinde, kenarları yuvarlak tek veya kısa zincirler halinde bulunur ve 0,7-1.0×2.0-4.0 µm boyutlarındadır. 45°C'de üreme görülmezken, 15°C'de üreme görülmüştür. Optimum üreme sıcaklığı 30°C'dir. %44-47 GC (% mol) içeriğine sahiptir. Süt ürünlerinden, silolardan, hayvanlardan izole edilmiştir (Calasso ve Gobbetti, 2011). Potansiyel bir probiyotiktir. Probiyotik kültür olarak kullanıldığı spesifik bir gıda ürünü yoktur. Oral yolla uygulandığında interferon-α sentezini artırarak bağışıklık sistemini güçlendirici etkisinin olduğu görülmüştür (Kishi ve diğ., 1996).

Bazı peynir çeşitlerinde (Cheddar) starter olmayan laktik asit bakterisi olarak geçer (Angelis ve Gobbetti, 2011). Peynirin olgunlaşma aşaması gibi hazır karbonhidratların kısıtlı olduğu durumlarda çeşitli son ürünler (metilglioksal, laktat, asetat, etanol gibi) sentezlenir. Metilglioksal bileşiğinin aminoasitler ile aktivitesi sonucu furanozlar oluşarak peynirde istenmeyen koku oluşumuna sebebiyet verebilir (Broadbent ve diğ., 2011).

L. brevis suşları yoğurt fermentasyonu için uygun değildir, ancak bu suşların eklenmesinin lezzet ve koruma açısından olumsuz etkisi bulunmamaktadır (Calasso ve Gobbetti, 2011). Fermente olmuş sucuktan izole edilen bir *L. brevis* suşunun IId sınıfına ait Brevicin 27 bakteriyosinini sentezlediği belirlenmiştir (Castellano ve diğ., 2008).

L. brevis türleri çok sayıda karbon kaynağını (glukoz ve ksiloz gibi) eşzamanlı olarak tüketir. Karbonhidratların kullanımında normal hiyerarşik bir kontrole sahip değildir. Buna ek olarak, anaerobik ortamda glukozu fermente edemez, glukoz fermentasyonunu aerobik ortamda gerçekleştirebilir. Heterofermentatif bu suşlar fosfoketolaz yolundaki bir eksiklikten dolayı bir elektron alıcısına ihtiyaç duyar (Axelsson, 2004; Calasso ve Gobbetti, 2011). Anaerobik ortamda, glukoz ile gliserol *L. brevis* tarafından birlikte fermente edildiğinde, gliserolün elektron alıcısı olarak rol oynadığı bilinmektedir (Axelsson, 2004). Bu özellikleri dışında, oksijen varlığında süperoksit, H_2O_2 ya da H_2O üretebilir. Katalaz aktivitesi sayesinde H_2O_2'yi uzaklaştırabilir (Calasso ve Gobbetti, 2011).

Süt ürünlerinden elde edilen *L. plantarum* ve *L. brevis*'in de aralarında bulunduğu LAB türlerinin antifungal ve antimaya özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, mayaların küflere göre daha fazla dayanıklılık gösterdiği görülmüştür. LAB türlerinin %50'si antimaya özelliğine sahip bulunmuştur. *L. brevis* NCDC 02 suşunun supernatantından ısıya ve pH'a dayanıklı, protein yapılı (1-5 kDa) antifungal bir madde izole edilmiştir (Falguni ve diğ., 2010).

Lactobacillus pentosus

Çubuk şeklinde, 1.0-1,2×2.0-5.0 boyutlarında, kenarları düz, üçları yuvarlak hücrelere sahiptir. Hücreler tekli, çiftli veya kısa zincirler halinde bulunabilir. Gram pozitif, hareketsiz, 10-40°C'de gelişebilen, 45°C'de gelişemeyen, fakültatif anaerobik ve fakültatif heterofermentatif özelliktedir. D- ve L-laktik asit üretir. Genomik materyalinde G+C içeriği % 46.1-47.2 mol'dür. Katalaz negatiftir. Mısır silosu, fermente sofralık yeşil zeytin, atık sular, vajina salgısı gibi ortamlardan izole edilmiştir. (Axelsson, 2004; Magnusson, 2003; Zanoni ve diğ., 1987) *L. plantarum* türüne yakın bir türdür. *L. pentosus*'un, D-ksiloz ve gliserolden asit üretebilme özelliği ile *L. plantarum*'dan ayırt edilebilir olduğu belirtilmiştir (Zanoni ve diğ., 1987). Potansiyel probiyotik suşları ve antimikrobiyal özellikleri bulunmaktadır (Liu, 2008; Wynne ve diğ., 2006). Peynir, süt, fermente içecek, fermente tahıl ve sebze gibi çeşitli gıdaların üretiminde rol oynadığı belirtilmiştir (Szabo ve diğ., 2011).

Angelis ve Gobbetti'nin (2011) bir çalışmasında, *L. pentosus*, *L. plantarum* ve *L. paraplantarum* türlerine ait suşlar arasında, 16S rDNA sekans analizine göre, yüksek oranda benzerlik (% 99.7-99.9) tespit edilmiştir.

Sofralık zeytinin fermentasyonu için kullanılan starter kültürlerin fonksiyonelliğinin (bakteriyosin üretimi) araştırılmasının amaçlandığı bir çalışmada, sofralık zeytinden izole edilen birbirine çok yakın türler olan *L. paraplantarum, L. pentosus* ve *L. plantarum,* moleküler analize dayalı GTP_5 rep-PCR metoduyla ayırt edilmiştir. Ayrıca plantoricin bakteriyosinini kodlayan gen bu üç türün çoğu izolatında tespit edilmiştir. Aynı nişi paylaşan türler veya suşlar arasında genetik elemanların transferinin gerçekleştiği, dolayısıyla aynı coğrafik orjine sahip bu türlerin bakteriyosin gen profillerinin aynı olduğu belirtilmiştir (Hurtado ve diğ., 2011).

Okkers ve diğ. (1999), vajinal salgıdan izole ettiği *L. pentosus*'un anti-maya özellik gösteren bir bakteriyosin (pentocin TV35b) ürettiğini ilk olarak tespit etmiştir. Aktivite mekanizması bakterisidal olan pentocin TV35b; *Clostridium sporogenes, Cl. tyrobutyricum, L. curvatus, L. fermentum, L. sake, Listeria innocua, Propionibacterium acidipropionici, Propionibacterium* sp. ve *Candida albicans* türlerini inaktive edebilmektedir. *L. pentosus* suşunun logaritmik büyüme fazının sonlarına doğru pentocin TV35b üretimi maksimum seviyeye ulaşmıştır. Moleküler büyüklüğü yaklaşık 3939 Da'dır. Papain ve proteinaz K enzimleri pentocin TV35b'nin aktivitesini ortadan kaldırmıştır. Sıcaklığa dayanıklılığı 100°C'de, 30 dakika olarak ölçülmüştür. Bu bakteriyosin *C. albicans*'ın gelişim ortamına eklendiğinde ilk 36 saatte pseudohyphae oluşumu stimule edilmiş ve bunu hücre ölümü takip etmiştir.

Wynne ve diğ. (2006), *Candida*'nın gelişimini engelleyen *L. pentosus* suşlarının probiyotik olarak kullanıldığında gastrointestinal hastalıkları tedavi edebileceği, Candidiosis'i engelleyip, Irritable Bowel Sendromu (IBS) semptomlarını hafifleteceğini belirtmiştir. Çalışmada, insan dışkısından izole edilen diğer bakterilerle yapılan kültürde, *L. pentosus* bulunmadığı durumda, tetrasiklin ve benzeri antibiyotiklerin bu bakterileri öldürdüğü ve *Candida*'nın dominant niş olarak kaldığı görülmüştür. Bu sebeplerle, bahsedilen *L. pentosus* suşunun probiyotik potansiyeli üzerinde durulmuştur.

Farklı gıda maddelerinin raf ömrünü uzatmayla ilgili yapılan bir çalışmada, *L. fermentum, P. pentosaceus, L. pentosus, L. paracasei* hücre kültürlerinden supernatant izolasyonu yapılmış ve supernatantın antifungal özellikleri test edilmiştir. İzole edilen supernatantlar 121°C'de, 15 dakika inkübe edildikten sonra gıda ürünlerine (ekmek, domates püresi, peynir dilimleri) eklenmiştir. 4, 20 ve 30°C

sıcaklıklarda fungal (*Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae*) büyüme incelenmiştir. *A. oryzae* türünün, bütün izolatlar tarafından her sıcaklıkta daha kolay inaktive edildiği, özellikle 4°C'de 40 güne kadar inaktivasyon etkisinin devam ettiği görülmüştür. *L. pentosus* izolatı, *A. niger* türünün ekmek yüzeyinde konidia gelişimini 30°C'de 12. güne, 4°C'de ise 29. güne ertelerken, *A. oryzae* türünün ekmek üzerindeki konidia gelişimi ise 30°C'de 19. güne, 4°C'de 35. güne ertelenmiştir (Muhialdin ve diğ., 2011).

Sofralık yeşil zeytinin fermentasyonunda, *in situ* bakteriyosin üretimini artırmaya yönelik olarak yapılan bir çalışmada, zeytinden izole edilen *L. pentosus* suşu optimum koşullardan farklı (suboptimal), ekstrem büyüme koşullarında geliştirilerek bakteriyosin üretimi stimule edilmiştir (Delgado ve diğ., 2005). Bakteri büyümesi yüksek pH ve düşük sıcaklık etkisiyle azalırken, bakteriyosin aktivitesinde artış olduğu görülmüştür. NaCl bakteriyosin üretimini inaktive etmiştir. Buna göre, bakteriyosin üretiminin büyümeyle ilgili olup, biyokütle artışıyla ilgili olmadığına değinilmiştir.

Bozadan izole edilen *L. pentosus*'un bakteriyosin üretimine, farklı besiyeri koşullarının etkisinin araştırıldığı bir çalışmada (Todorov ve Dicks, 2007), elde edilen bakteriyosinin *L. casei, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis, Klebsiella pneumoniae, L. curvatus* gelişimini inaktive ettiği belirtilmiştir. Bu bakteriyosinin üretimi için optimum koşulların, de Man Rogosa ve Sharpe (MRS) besiyerinde, 30°C'de ve 24 saat sonra oluştuğu gözlenmiştir. MRS ortamının tripton, glukoz, mannoz, vitamin B_{12}, vitamin C ile takviyesi sonucu bakteriyosin aktivitesinin arttığı, nitrojen kaynağı olarak triptonun bakteriyosin üretiminde etkili bir madde olduğu, MRS besiyerine Vitamin B_1 ya da DL-6,8-thioctic asit eklendiğinde maksimum bakteriyosin aktivitesi oluştuğu incelenmiştir.

Lactobacillus plantarum

Gram-pozitif, hareketsiz, spor oluşturmayan, mikroaerofilik, mezofilik bakterilerdir. 10-30°C'de gelişebilirken 45°C'de gelişemez. Genelde katalaz-negatif olsa da özel durumlarda gerçek katalaz aktivitesi gösteren birkaç suş tespit edilmiştir. DNA'nın G+C içeriği %44-46 moldür. Hücrelerin kenarları düz, uçları yuvarlak biçimli, çubuk şeklinde, 0.9-1.2×3.0-8.0 μm boyutlarındadır. Tek, çift veya kısa zincirler halinde bulunur (Corsetti ve Gobbetti, 2002).

L. plantarum grubuna dahil olan *L. plantarum, L. pentosus* ve *L. paraplantarum* türlerinin fenotipik ve genotipik karakterleri birbirine çok yakındır (Molin, 2003). 16S rDNA gen dizisi analizi bu türler için % 99.7-99.9 benzerlik gösterdiği için, *rec*A genine özgü primerler kullanılarak yapılan analiz, Rep-PCR analizi gibi yöntemlerin tür tanımlaması için kullanılması daha uygundur. Ayrıca kültür ortamından bağımsız, DGGE ve TGGE gibi tekniklerle, süt ürünleri ve peynir gibi gıda ortamlarında *L. plantarum* türünü tanımlamak mümkündür (Corsetti ve Valmorri, 2011).

Silo, salamura sebzeler ve ekşi hamur gibi fermente gıda ortamları ile, inek dışkısı, süt ürünleri, balık ve et ürünleri, insan ağız ve vajinası, sindirim sistemi yolu, hayvanların sindirim sitemleri, bazı böcekler ve atık sular bu bakterinin bulunabileceği ortamlardır. *L. plantarum*'un genomunun büyük olması ve farklı karbonhidratları kullanabilmesi, bu kadar çeşitli ortamlara adaptasyon kabiliyetini açıklamaktadır (Corsetti ve Gobbetti, 2002; Molin, 2003).

Fakültatif heterofermentatif *Lactobacillus* grubundadır. EMP yolu ile heksozları fermente ederek neredeyse tamamen laktik asite dönüştürür. Pentozları ise 6-phosphogluconate/phosphoketolase yoluyla laktik asit ve asetik asite çevirir. Hem L- hem de D-laktik asit üretebilir (Corsetti ve Valmorri, 2011).

Organik asitlerin yanında, bakteriyosin, fenillaktik asit, peptitler ve yağ asitleri gibi antimikrobiyal maddeler sentezleyen *L. plantarum* gıda biyokorumasıyla ilişkili bir türdür.

Ürettiği bakteriyosinlerden plantarisinler, I ve II olarak sınıflandırılmıştır. Plantarisin I sınıfına dahil olan C ve W; plantarisin IIa'da C19 ve 423 ve pediosin AcH; plantarisin IIb sınıfına dahil olan EF, JK, S ve NC8; plantarisin IIc sınıfında ise 1.25β örnekleri bulunmaktadır. Plantarisinlerin üretimi, pH ve sıcaklığa bağlıdır. En yüksek verim genellikle kültürün nötral pH ve 30°C inkübasyonunda elde edilmiştir. Bakteriyosin üreten suşlar bitkisel ve hayvansal kaynaklardan (tahıllar, ekşi hamur, şarap, et ve süt ürünleri gibi) elde edilmiştir. Örnek olarak süt ürünlerinden, plantarisin C ve TF711 ile pediosin AcH bakteriyosinleri izole edilmiştir (Corsetti ve Valmorri, 2011; Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

L. plantarum, bakteriyosin olmayan antimikrobiyal özellikte proteinler de sentezlemektedir. Örnek olarak, *L. plantarum* MiLAB14 suşu antifungal aktivite

gösteren çeşitli peptit ve yağ asitleri üretmektedir. Bunun haricinde, *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *A. niger* türleri üzerine etkili antifungal özellikte fenillaktik asit (PLA) ve 4-hidroksifenillaktik asit (OH-PLA) bileşiklerini üreten *L. plantarum* suşları ekşi hamurdan izole edilmiştir (Magnusson ve diğ., 2003).

Çalışılan bir *L. plantarum* suşunda, eksopolisakkaritlerin (EPS) biyosenteziyle ilgili glikoziltransferaz geni bulunmuştur. EPS genellikle *L. plantarum* türünde eksponansiyel büyüme fazı boyunca sentezlenir ve maksimum seviyesine durağan fazın başlarında ulaşır. Bazı *L. plantarum* suşları farklı moleküler kütle ve şeker kompozisyonu içeren birden fazla tipte EPS üretebilmektedir. Karbon kaynağı ve sıcaklık gibi etkenlerin EPS biyosentezini büyük ölçüde etkilediği, genellikle laktozun karbon kaynağı olarak; glukoz, galaktoz, fruktoz ve sukrozdan daha etkili olduğu yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (Corsetti ve Valmorri, 2011).

Voulgari ve diğ. (2010), geleneksel Yunan peynir ve yoğurdundan izole ettikleri fakültatif heterofermentatif (*L. plantarum, L. paraplantarum, L. pentosus, L. rhamnosus* ve *L. paracasei* subsp. *paracasei*) ve zorunlu heterofermentatif (*L. brevis, L. buchneri* ve *L. fermentum*) LAB türlerinin antibakteriyal, antifungal ve antimaya etkisi olduğunu göstermiştir. Bu bakterilerin *D. hansenii* mayası ve *Penicillium candidum* küfü üzerine değişen derecelerde inaktivasyon etkisi bulunurken, hiçbir türün *S. cerevisiae* türü üzerine etkisi bulunmamıştır. Deneyin devamında, fakültatif heterofermentatif LAB suşlarının supernatantları izole edilmiştir. Makalede, supernatantın inhibisyon aktivitesinin incelenmesine, yalnız *Penicillium* için devam edildiği görülmektedir. LAB'ların supernatantları nötralize edilip, katalaz uygulandığında antifungal aktivitesinde düşüş olmuştur, ancak aktivite tamamıyla yok olmamıştır. Bu durum protein yapılı bileşiklerin varlığına işaret etmektedir. Ardından supernatant pepsin, tripsin, alfa-kimotripsin ve proteinaz K ile muamele edilmiş ve antifungal aktivite kaybolmuştur. Bu suşların, antifungal özellikli, protein yapılı biileşikler sentezlediği sonucuna varılmıştır.

Farklı bitkisel ortamlardan ve tavuk barsağından izole edilen *L. plantarum, Lactobacillus coryniformis, Lactobacillus salivarius* ve *L. sakei* türleri antifungal ve antimaya özellikler taşımaktadır (Magnusson ve diğ., 2003). Bu türlerin suşlarının *R. mucilaginosa* maya türüne karşı antagonistik aktiviteye sahip olduğu çift katlı agar kaplama yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. *Pichia anomala* ve *Kluyveromyces marxianus* maya türlerine karşı etki gözlenmemiştir. LAB izolatlarının

supernatantları HPLC yöntemi ile farklı fraksiyonlara ayrılmıştır. Fraksiyonlar, antimikrobiyal özellikteki cyclic dipeptitlerin yanında farklı antifungal ve antimaya maddeleri de içermektedir. Antifungal etki yalnızca laktik asit ve asetik asit üretiminden kaynaklanmamaktadır. LAB suşlarının sentezlediği çok çeşitli maddeler küf ve mayalara karşı sinerjistik bir aktivite göstermektedir.

Ström ve diğ. (2002), çimen silosundan izole ettikleri *L. plantarum* MiLAB 393 suşunun, gıda ve yem kaynaklı küf (*A. fumigatus, A. nidulans, Fusarium sporotrichioides, P. commune*) ve maya (*C. albicans, D. hansenii, K. marxianus, P. anomala, R. mucilaginosa, S. cerevisiae*) türlerini inhibe edici etkisi olduğunu çift katlı agar kaplama metodu ile test etmiştir. *A. fumigatus* ve *F. sporotrichioides* en hassas küf türleri, *K. marxianus* en hassas maya türüdür. *Z. bailii* maya türüne karşı etki görülmemiştir. LAB suşunun izole edilen supernatantında antifungal ve antimaya özellikte 3-fenillaktik asit (L ve D formları, 9/1 oranında), cycle(L-Phe-L-Pro) ve cycle(L-Phe-*trans*-4-OH-L-Pro) bileşiklerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Cycle(L-Phe-L-Pro) ve 3-phenyllactic acid kombinasyonunun zayıf sinerjistik antifungal etkisi olduğu görülmüştür. Ayrıca mikrotitre metodunda antimikrobiyal maddeler spor ve hücreler ile daha çok temas halinde olduğu için, antimikrobiyal maddelerin agar içinde difüzyonla ilerlediği çift katlı agar kaplama yönteminden daha hassas olduğu üzerinde durulmuştur. Cyclic dipeptitlerin antifungal etkisinin ikincil bir etki olabileceğine değinilmiştir.

Tayland'ta bitki kaynaklı fermente içeceklerde bozulmaya sebep olan maya türleri (*Saccharomyces* sp. *Candida* sp. *Pichia* sp. *Hansenula* sp. *Rhodotorula* sp. *Endomycopsis* sp. *Schizosaccharomyces* sp. *Candida neoformans*) üzerine yapılan çalışmada, çift katlı agar kaplama metodu kullanılarak, yine fermente gıda ve içeceklerden izole edilmiş LAB türlerinin antimaya aktivitesi ölçülmüştür. Bu maya türlerinden sebze ve meyve kaynaklı olmayan *Schizosaccharomyces* sp. and *C. neoformans* türleri haricinde diğer türlere karşı aktivite görülmüştür. En güçlü antimaya aktivitesini gösteren LAB türleri *L. plantarum* (DW1, 3, 4) olarak belirlenmiş ve bu türlerin starter kültür potansiyeli taşıdığına değinilmiştir (Prachyakij ve diğ., 2007).

Kantachote ve diğ.'nin yaptığı çalışmada (2010), *L. plantarum* DW3 suşunun ürettiği antimaya maddelerin ve suşun probiyotik özellikleri araştırılmıştır. Bu suşun ürettiği antimaya metabolitler, fermente içeceklerde kontaminasyona sebep olan *R.*

mucilaginosa DKA gelişimini inhibe etmiştir. Bakteriden izole edilen supernatant proteaz, amilaz, lipaz ve katalaz enzimleriyle muamele edilmiş; antimaya aktivitesinin değişmediği görülmüştür. Buna göre, antimaya özellikteki madde protein, karbonhidrat veya lipit yapılı değildir. Ayrıca H_2O_2 de antimaya özellikli maddelerin arasında bulunmamaktadır. Bu durumun, statik kültürde geliştirilen, LAB'ın, yeterince oksijenle temas etmemesinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Çalışmanın devamında HPLC ve GC-MS teknikleri kullanılarak supernatantın içerdiği maddeler belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, bakterinin organik asitlerin yanında fenillaktik asit ürettiği, buna ek olarak henüz bilinmeyen çeşitli antimikrobiyal maddeler de sentezlediği açıklanmıştır. Bakterinin probiyotik özellikleri ve koruyuculuğu ile ilgili yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların sonucu olarak, *L. plantarum* DW3, gıda kaynaklı patojenlere ve gıdaları kontamine eden mayalara karşı etkili starter kültür olarak kullanılabilir özelliktedir.

Yapılan bir çalışmada, antifungal ve antimaya özellikleri araştırılan LAB türleri arasında bulunan *L. plantarum* suşu, pastane ürünlerinde bulaşıya sebep olan *Endomyces fibulinger* maya türüne karşı antimaya etkisi göstermiştir. Sonuçlara göre, en fazla laktik asit üretimi *L. plantarum* C21-41 suşuna aittir. Yapılan ölçümlerde bu suşun asetik, formik, sitrik asit üretmediği; fenillaktik asit ve hidroksi-fenillaktik asit bileşiklerini ürettiği tespit edilmiştir (Valerio ve diğ., 2009).

2.1.2. Laktik asit bakterilerinin ürettiği antimikrobiyal bileşikler

LAB'ın fermentasyon ile ürettiği antimikrobiyal maddelerin gıda koruması için kullanılması çok eski çağlardan beri uygulanan bir yöntemdir. LAB, yarış halinde olduğu mikroorganizmalara karşı üstünlük sağlamak için bulunduğu ortamı değiştirmek istemektedir. Gıda ortamında bulunan karbonhidratları fermentasyon yoluyla moleküler kütlesi küçük organik bileşiklere dönüştürür. Organik asitler (laktik asit ve asetik asit), diasetil, hidrojen peroksit, reuterin ve bakteriyosinler olarak gruplandırılan bu bileşikler de gıda güvenliğini etkileyen ve raf ömrünü kısaltan, bozulma etkeni mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Ouwehand ve Vesterlund, 2004; Wood ve Holzapfel, 1995).

2.1.2.1 Organik asitler

LAB, heksozlardan homofermentasyon yoluyla laktik asit; heterofermentasyon yoluyla ise eşmolar miktarda laktik asit, asetik asit/etanol ve CO_2 sentezlemektedir.

Zayıf asitler olan laktik asit ve asetik asit ortamın pH'ını düşürerek bozulma etkeni ve patojen mikroorganizmaların gelişimini sınırlandırmaktadır (Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

Zayıf asitlerin düşük pH değerlerinde daha güçlü antimikrobiyal etki gösterdiği bilinmektedir (Theron ve Lues, 2011). Çözünürlük sabiti daha yüksek olan asetik asit (pKa 4.75) ve eser miktarda sentezlenen propionik asit (pKa 4.87) ortam belli bir pH değerindeyken, laktik asite (pKa 3.08) göre daha güçlü antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Dolayısıyla propionik asit ve asetik asit maya, küf ve bakterilere karşı daha etkilidir (Schnürer ve Magnusson, 2005).

Laktik asit ortamın pH'ını düşürmekte ve hücre zarının geçirgenliğini artırmaktadır. Böylelikle diğer antimikrobiyal maddelerin aktivitesini güçlendirmektedir. Bunun yanında, laktik ve asetik asitin çözünmemiş formu, hidrofobik özelliği nedeniyle, hücre zarından geçerek hücre içine nüfuz etmektedir. Hücre içinde çözünmesi ve sitoplazmadaki pH düşüşü sonucu hücre ölümü meydana gelmektedir (Dalié ve diğ., 2010; Ouwehand ve Vesterlund, 2004; Schnürer ve Magnusson, 2005).

Laktik asit

Zayıf bir organik asit olan ve suda çözünebilir özellikteki laktik asit, gıda endüstrisinde lezzet ve aroma verici, asitlendirici, pH düzenleyici ve koruyucu olarak kullanılmaktadır. FDA tarafından GRAS sınıfında değerlendirilmektedir. Gıdalarda doğal olarak bulunduğu gibi gıdaların fermentasyonu sırasında mikroorganizmalar tarafından da sentezlenmektedir. Turşu, zeytin, et ve peynir bu gıdalara örnek olarak verilebilir (Narayanan ve diğ., 2004; Theron ve Lues, 2011).

Laktik asitin D(-), L(+) ve DL izomerleri bulunmaktadır (Akın, 1997). (DL laktik asit, optik olarak inaktiftir.) Şekerlerin fermentasyonu sırasında farklı LAB türleri laktik asidin D(-) ve L(+) konfigürasyonundan birini sentezleyebildiği gibi, her ikisini de aynı/farklı oranlarda sentezleyebilmektedir. Bazı LAB türleri (*L. sake, L. curvatus* ve *L. casei* ssp. *pseudoplantarum*) L-LDH enzimiyle L(+)-laktat üretmekte ve bu izomerin belli bir konsantrasyona ulaşması racemase enzimini aktive etmektedir. Bunun sonucu, dengeye ulaşana kadar L(+)-laktat, D(-)-laktat formuna dönüştürülmektedir. (Liu, 2003; Narayanan ve diğ., 2004). L(+)-laktik asit bakterinin erken büyüme evresinde görülürken, D(-)-laktik asit geç büyüme evresinde durağan faza doğru görülmektedir (Axelsson, 2004). Peynirden izole edilen bazı

Lactobacillus türlerindeki NAD+ molekülüne bağlı L(+)- ve D(-)-laktat dehidrogenaz enzimleri de rasemik oluşturmaktadır. NAD+ molekülüne bağlı L-LDH enzimi L(+)-laktatı pirüvata çevirirken, D-LDH oluşan pirüvatı D(-)-laktata çevirmektedir. Bunun tersi durum da geçerlidir.

Laktik asitin izomerlerinin oluşumunda mikroorganizma türü, kültürün yaşı, besiyeri ortamının bileşimi, inkübasyon sıcaklığı ve süresi, pH, depolama sıcaklığı ve süresi gibi faktörlerin etkili olduğu belirtilmiştir (Akın, 1997; Bogaert ve Naidu, 2000). Kore'ye özgü bir fermente gıda ürünü olan kimchi üretimi için probiyotik özellikli, fonksiyonal *L. sakei* türleri araştırılmıştır. Racemase enzimine sahip *L. sakei* türünün DL-laktat sentezlediği bilinmektedir. MRS brot besiyeri ortamına asetat eklendiğinde, yalnızca L(+) formu sentezlenmiştir. Bu durum racemase enzimi aktivitesinin engellendiğini göstermektedir (Lee ve diğ., 2011). Besiyeri bileşiminin stereospesifiteye etkisiyle ilgili başka bir örnek glikoz limitasyonudur. Ortamda bulunan glikozun kısıtlı olduğu durumda, *L. casei* bakterisi asetat, format ve etanolün yanında D(-)-laktat üretimini de artırmıştır (Liu, 2003). Liu, bazı durumlarda (düşük pH gibi) LAB'ların kendi ürettiği laktik asitin bir kısmını metabolize ettiğini ya da laktik asit pirüvatını başka bir metabolite (örneğin eksopolisakkarit) dönüştürdüğünü belirtmiştir. Oksijenin bulunduğu ve glikozun kısıtlı olduğu fermentasyon ortamında, pH'ın azalmasıyla *L. plantarum*'un asetat ve L(+)-laktat üretimi azalmış, D(-)-laktat üretimi artmıştır.

Peynirde starter olmayan bazı *Lactobacillus* türlerinin starter LAB'ın oluşturduğu L(+)-laktatı, D(-)-laktata dönüştürdüğü görülmüştür. Laktoz fermentasyonu veya rasemikleşmeyle oluşan D(-)-laktat, kalsiyum laktat (çözünürlüğü az olan bir tuz) formunda çökerek peynir yüzeyinde istenmeyen bir yapı oluşturmaktadır.

Şarap fermentasyonunda ise, L-malattan L(+)-laktat oluşumu istenilen bir durumdur. D(-)-laktat şarabın stabilitesini olumsuz etkilemektedir. Şaraptaki bazı *L. plantarum* ve *L. brevis* türlerinin rasemikleşmesiyle L(+)-laktat yanında D(-)-laktat da oluştuğu tespit edilmiştir. Bu durum, tek bir rasemik enziminden kaynaklanabileceği gibi, L-LDH ve D-LDH enzimlerinin varlığıyla da ilgili olabilir. D-laktat oluşumu şarapta LAB türlerinden kaynaklanan bir bozulma göstergesidir. Bozulmaya sebep olan LAB'dan kaynaklanabileceği gibi, şarapta normalde bulunan ve fermentasyonu sağlayan LAB türlerinin amino asit yıkımından da kaynaklanabilmektedir. Elma sirkesinde depolama sırasında L(+)-laktat miktarında azalma ve D(-)-laktatta ise artış

tespit edilmiştir. Bu tip istenmeyen durumlar, bozulma etkeni *Lactobacillus* türleriyle ilgili olabileceği gibi elma sirkesi-LAB türlerinin şeker fermentasyonundan da kaynaklanabilmektedir. Ancak sebebin rasemikleşme olabileceğinin gözardı edilmemesi gerektiği de vurgulanmıştır (Liu, 2003).

Yukarda da bahsedildiği üzere, gıda uygulamalarında L(+) formu tercih edilmektedir. FDA'nın açıklamasına göre, L(+)-laktik asit GRAS sınıfındadır. L(+) izomeri ve L-laktat dehidrogenaz enzimi, insan metabolizmasında yer almaktadır. L(+) izomerinin bilinen toksik bir etkisi yoktur. Dünya sağlık örgütünün verilerine göre, hazır bebek gıdalarında pH ayarlama ajanı olarak kullanılabilecek maksimum miktar 0,2 g/100g hazır gıdadır. Yüksek dozda D(-)-laktik asitin insan için zararlı olabileceği belirtilmiştir. DL-laktik asit veya D(-)-laktik asit ile asitlendirilerek formüle edilmiş prematüre bebek gıdaları, metabolik asidoza sebep olmuştur. Bu bebeklerde gelişim bozukluğu da görülmüştür. Bu sebeple D(-) izomerinin bebek gıdalarında kullanımına izin verilmemektedir. Yetişkinlerde ise günlük en yüksek alımı 100 mg/kg vücut ağırlığı olarak tavsiye edilmiştir (Jehanno ve diğ, 1992; Wang ve diğ., 2010). Jin ve diğ. (2009), fermente gıdalarla alınabilecek günlük maksimum D(-)-laktik asit miktarının 3,16 mmol olduğu tahmin etmişlerdir.

Laktik asitin antimikrobiyal etkisi de izomerlerine bağlı olarak değişmektedir. L(+) formu *Escherichia coli* türüne karşı D(-) formuna oranla daha fazla etkiliyken, D(-) laktik asit *Listeria monocytogenes* türüne karşı daha etkilidir. İki izomerin hücre zarından geçişi arasında bir fark görülmediği, ayrıca bakteri suşlarının kendi ürettikleri izomere karşı daha az hassasiyetleri olduğu belirtilmiştir (Theron ve Lues, 2011).

Fenillaktik asit

Bir organik asit olan fenillaktik asit, LAB'ın fenilalanin metabolizmasının yan ürünüdür. Güçlü antimaya, antifungal ve antibakteriyal özelliklere sahip olduğu için gıda teknolojisinde antimikrobiyal ajan olarak kullanılma potansiyeli bulunmaktadır (Mu ve diğ., 2009). Bir kaynakta, pastane ürünlerinde küf ve maya gelişimini engellemek için kullanımının propionik asite kıyasla daha çok istenilebilir olduğu belirtilmiştir (Theron ve Lues, 2011). Çeşitli LAB türleri tarafından sentezlendiği tespit edilmiş, fakat en uygun türün *L. plantarum* olduğuna değinilmiştir. Yapılan çalışmalardan birinde, antifungal ve antimaya özellikli *L. plantarum* 21B ve MiLAB

393 suşları tarafından sentezlendiği belirlenmiştir (Rodriguez ve diğ., 2012; Ström ve diğ., 2002). *L. plantarum* MiLAB 393 suşu *Candida, Debaryomyces, Kluyveromyces, Rhodotorula, Saccharomyces, Phichia* maya türlerinin gelişimini engellemiştir (Yang ve Chang, 2010). Ayrıca *L. coryniformis* Si3, *Pediococcus pentosaceus* ve *L. sakei* suşlarının da kültür ortamında bu organik aside rastlanmıştır. Fenillaktik asitin diğer antimikrobiyal maddelerle sinerjistik bir etkide bulunduğuna da değinilmiştir (Magnusson ve diğ., 2003; Schnürer ve Magnusson, 2005). *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* SM20 ve *Propionibacterium jensenii* SM11 bakterilerinin birlikte geliştirildiği kültür ortamından izole edilen hücre içermeyen supernatant solüsyonları, *Candida pulcherrima* and *R. mucilaginosa* türlerine karşı güçlü antimaya aktivitesi göstermiştir. Antimaya aktivitesini ölçmek için mikroplaka metodu kullanılmıştır. Kromotografi ve kütle spektrometrisi yardımıyla, propionik, asetik, laktik asit ile 2-pirrolidon 5-karboksilik asit, 3-fenillaktik asit, hidroksifenil-laktik asit ve sussinik asit bileşikleri supernatant solüsyonları içinde tespit edilmiştir (Rodriguez ve diğ., 2012; Schwenninger ve diğ., 2008). *L. plantarum* DW3 ürettiği metabolitler, fermente içeceklerde en fazla kontaminasyona sebep olan *R. mucilaginosa* ve bunun yanında *Issatchenkia ocidentalis* DKB, *Pichia membranifaciens* DKC, *Pichia anomala* maya türleri üzerine inaktivasyon etkisi gösterdiği "mikrotitre plaka kuyu" metodu ile belirlenmiştir. Antimaya özellikli metabolitin fenillaktik asit olduğu GC-MS tekniğiyle tespit edilirken, 5 mg/ml fenillaktik asitin *R. mucilaginosa*'yı %90 oranında inaktif ettiği ölçülmüştür (Kantachote ve diğ., 2010). Başka bir çalışmada, *Endomyces fibulinger* maya türüne karşı antimaya etkisi gösteren *L. plantarum* C21-41 suşunun laktik asit yanında, fenillaktik asit ve hidroksi-fenillaktik asit bileşiklerini ürettiği tespit edilmiştir (Valerio ve diğ., 2009).

Asetik asit

Asetik asit, heterofermentatif LAB türlerinin glikoz metabolizması sonucu açığa çıkan ürünlerden biridir. Maya, küf ve bakterilere karşı güçlü inaktivasyon özelliğine sahiptir. Düşük pH değerlerinde etkilidir. Laktik asit ile kıyaslanacak olursa asetik asitin antimikrobiyal aktivitesi daha güçlüdür. Asetik asitin çözünürlük sabiti (pKa 4.75) laktik asite göre daha yüksektir. Dolayısıyla belirli bir pH değerinde, çözünmemiş formda bulunan asetik asit miktarı daha fazla olmaktadır (Ouwehand ve Vesterlund, 2004). Ancak laktik asit bulunduğu ortamın pH'ını düşürdüğü için

asetik asitin etkinliğini artırmaktadır. Hücre membranından kolayca geçerek, hücre içi pH'ı düşürmektedir. Asetik asit GRAS statüsündedir, gıda katkısı ve koruyucusu olarak kullanımı yaygındır. Güçlü bir lezzet profiline sahiptir. Asetik asit, et ürünlerinde kontaminasyonu engellemek için kullanılmaktadır. Örneğin karkas üzerine sprey şeklinde uygulanmaktadır. Düşük pH'lı gıdalarda ve içeceklerde mayalar tarafından bozulmayı önlemek için yüksek konsantrasyonlarda kullanılmaktadır. *S. cerevisiae* gelişimini (pH 4.5) tamamıyla inaktive etmek için 80-150 mM asetik asit kullanılmıştır. Aynı pKa değerinde olan sorbattan 1-3 mM kullanılması aynı etkiyi göstermiştir. *Z. baili*'nin inaktive edilmesi için gerekli organik asit konsantrasyonu yasal limitin üstüne çıkabilmektedir. Ayrıca sirke %5 oranında asetik asit içermektedir, (Theron ve Lues, 2011).

Propionik asit

Heterofermentatif LAB türleri tarafından çok az bir miktarda sentezlenebilmektedir. Çözünürlük sabiti (pKa 4,87) laktik asit ve asetik asitten daha yüksektir. Daha güçlü antimikrobiyal özellik göstermektedir. Antimikrobiyal özelliğinden dolayı gıdalarda yenebilir kaplama veya film olarak kullanılmaktadır. Hayvan yemlerine eklenerek karkasta kontaminasyonu düşürdüğüne dair kaynaklar mevcuttur (Theron and Lues, 2011).

Hidroksi yağ asitleri

Hidroksillenmiş yağ asitlerinin etki alanı çok geniştir. Özellikle küf ve mayalara karşı güçlü inaktive edici özelliktedir. Propionik, butirik ve valerik asit gibi bileşiklerle sinerjistik etki göstermektedir. Bakterinin ürettiği hidroksillenmiş yağ asiti konsantrasyonuyla bakterinin gelişiminin orantılı arttığı görülmüştür, bu durum, ortamdaki hidroksi-yağ asiti salınımının hücre lizizinden bağımsız olduğunu göstermektedir (Dalié ve diğ., 2010; Schnürer ve Magnusson, 2005). Leylak çiçeğinden izole edilen ve *Kluyveromyces, Phichia* ve *Rhodotorula* türlerine karşı etkili olan *L. plantarum* MiLAB 14 suşunun, hidroksi-yağ asitlerini (3-hidroksidekanoik asit, 3-hidroksi-5-cis-dodekenoik asit, 3-hidroksidodekanoik asit, 3-hidroksitetradekanoik asit) sentezlediği belirlenmiştir (Yang ve Chang, 2010).

2.1.2.2 Hidrojen peroksit

LAB, oksijen varlığında flavoprotein oksidaz enzimiyle hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturur. LAB'da katalaz enzimi bulunmadığı için H_2O_2 molekülü ortamda birikmekte ve hedef hücrenin lipid membranı ve hücresel proteinlerini oksitlemektedir. Böylece bakteri, maya, küf ve virüslere karşı antagonistik bir etki oluşturmaktadır (Dalié ve diğ., 2010; Schnürer ve Magnusson, 2005). H_2O_2 molekülünün öldürücü olmayan dozlarda antimikrobiyal etkide bulunması, sütte bulunan laktoperoksidaz enzimi varlığında tiyosiyanat bileşiği ile reaksiyona girmesi sonucu oluşmaktadır. Sütte LAB gelişmesiyle H_2O_2 ortama salınır ve bu reaksiyon sonucu hipotiyosiyanat ile ara moleküller meydana gelir. Bu moleküller de diğer mikroorganizmaları inaktive etmektedir (Daeschel, 1989). Bu sistemin *C. albicans* maya türü üzerine inaktivasyon etkisi bilinmektedir (Naidu ve Clemens, 2000). Ayrıca MRS besiyeri ortamında yeast ekstraktın içerdiği katalaz enzimi hidrojen peroksidi parçalayacağı için hidrojen peroksit ile ilişkili antimikrobiyal aktivite ölçüm testleri için farklı bir besiyeri kullanılması önerilmektedir. Bunun dışında küflerin hidrojen peroksiti parçalayan enzimlerinin bulunduğu bilinmektedir (Schnürer ve Magnusson, 2005).

Bir çalışmada, *L. plantarum*, *L. casei* subsp. *casei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. curvatus* ve *L. casei* türlerinin meyve suyu brot ortamında ürettiği organik asit, H_2O_2 miktarları araştırılmıştır. Ana fermentasyon ürünü olan laktik asit organik asitler arasında en yüksek düzeydedir. 0.25–1.77 mg/l aralığında değişen miktarlarda H_2O_2 üreten LAB türleri arasındaki iki *L. plantarum* suşundan biri oldukça düşük miktarda H_2O_2 üretmiştir (Zalan ve diğ., 2011). Oksijen varlığında sentezlenen H_2O_2 LAB'da katalaz enzimi bulunmadığı için bir süre sonra ortamda birikmektedir. Maya, küf ve bakterilere karşı güçlü antimikrobiyal özelliği bulunmaktadır. Fakat ortamda bulunan diğer organik bileşiklerle reaksiyona girdiği için etkisi uzun sürmemektedir. Üretilen hidrojen peroksit miktarı tek başına antimaya aktivitesi için düşük olsa da diğer metabolitlerle sinejistik bir etki oluşturabilmektedir (Zalan ve diğ., 2011).

2.1.2.3 Bakteriyosinler

Hücre sitoplazmasındaki ribozomlar tarafından sentezlenen, hassas mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki gösteren peptit yapılı moleküller genellikle bakteriyosin olarak adlandırılır. Protein yapılı olduğu için proteaz

enzimine karşı hassas yapıdadır. Bakteriyosinler potansiyel gıda koruma ajanlarıdır. İnsanda gastrointestinal sistemde enzimler tarafından parçalanır. Tripsin, α-kimotripsin, pepsin enzimlerinin bakteriyosini hidrolize etmesi özelliğine dayanarak protein yapısı tayin edilmekte ve yeni bakteriyosinler karakterize edilmektedir. Farklı sıcaklıklarda ısıl işlem uygulanarak yüksek sıcaklık değerlerine gösterdikleri stabilite ve farklı pH değerlerindeki aktiviteleri de bakteriyosinin karakterizasyonunda önemlidir (Daeschel, 1989; Schnürer ve Magnusson, 2005). Çoğu bakteriyosinin gen dizisi plasmid üzerinde taşınmakta, bazı türlerde ise kromozom üzerinde bulunmaktadır (Naidu ve Clemens, 2000). Bakteriyosinin sentezlendiği genin regülasyonunun temelinde kısıtlı besin kaynağı için yarıştığı mikroorganizmaları inhibe etmek yer almaktadır. Bu durum da doğal seleksiyon ile ilişkilidir (Skaugen ve diğ., 2003).

Bakteriyosin geninin transkripsiyon ve translasyonundan sorumlu özel bir peptit olan Pheromone (Phe) molekülü bulunmaktadır. Bakteriyosin üretiminin indüklenmesini, "quorum sensing" ile bağlantılı olarak açıklayan çalışmalar bulunmaktadır. Buna göre, Phe molekülünün sentezi, hücre yoğunluğunun bir ölçüsüdür. Phe ortamda belli bir konsantrasyona ulaştığında, kendi kendini uyaran bir döngü başlatılmakta, böylelikle bakteriyosin sentezinden sorumlu genlerin transkripsiyonu oluşmaktadır. Bu döngünün başlatılmasında başka indüksiyon faktörlerinin de etkili olabileceğine değinilmektedir. Ayrıca LAB'ın kendi ürettiği antimikrobiyal maddelere karşı kendini koruma (immun) sistemi bulunmaktadır (Skaugen ve diğ., 2003).

LAB tarafından sentezlenen bakteriyosinler dört ana sınıfa ayrılmaktadır: Birinci sınıf katyonik, ikinci sınıf küçük, ısıya dayanıklı ve üçüncü sınıf amfifilik özellikteki bakteriyosinleri, dördüncü sınıf ise kompleks peptitleri kapsamaktadır. Çizelge 2.3'te bakteriyosinlerin sınıflandırılması gösterilmektedir.

Birinci sınıf bakteriyosinler lantibiyotiklerdir. Küçük molekül ağırlığına sahip (< 5 kDa), ısıl stabilitesi yüksektir. A ve B alt sınıflarını içerir. **Tip A** pozitif yüklüdür. Hedef hücrenin membranında porlar oluşturur. Büyüklüleri farklılık gösteren bu porlar, hedef hücre içinde bulunan aminoasit, nükleotit ve diğer maddelerin uzaklaşmasına ve hücre ölümüne sebep olmaktadır. İyi karakterize edilmiş olan nisin molekülü bu gruptadır. Nisin, gram pozitif bakterilere karşı etkiliyken, gram negatif bakteriler, mayalar ve küflere karşı etkili değildir. GRAS statüsündedir. Pentasiklik yapıdadır, 34 aminoasit grubu içermektedir (Smid and Gorris, 2007). **Tip B**

lantibiyotikler negatif yüklü, globüler yapıdadır. Bu moleküller LAB tarafından sentezlenmez (Hill ve diğ., 2002; Skaugen ve diğ., 2003).

İkinci sınıf bakteriyosinler en geniş grubu oluşturur. Küçük molekül ağırlığına sahip (<10 kDa), ısıl stabilitesi yüksektir. Lantiyonin içermez ve modifiye edilmemiştir. **IIa** alt sınıfı pediyosin benzeri moleküllerdir. Güçlü anti-listeriyal aktivitesi olduğu tanımlanmıştır. Sekans dizilimleri iyi korunmuş peptitlerdir. N-terminalinde Try-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys amino asit dizilimini içerirler. **IIb** alt sınıfı iki peptitli yapıdaki bakteriyosinlerdir. Pediyosin, plantarisin, laktokoksin bu sınıfa dahildir (Molloy ve diğ., 2011; Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

Üçüncü sınıf bakteriyosinler büyük molekül ağırlığına sahip (> 30 kDa), ısıl stabilitesi düşük protein yapılı bileşiklerdir. Helvetisin bu gruba üyedir. Sınıf I ve Sınıf II'deki peptitlerden farklı olarak antimikrobiyal aktiviteleri hücre membranını hedef almaz. Sınıf III bakteriyosinler hedef hücrede bazı temel proteinleri inhibe ederek antimikrobiyal etki göstermektedir (Naidu ve Clemens, 2000). Bu üç sınıfın haricinde, kompleks protein yapısında ve aktivasyonları için karbonhidrat ve lipit moleküllerini içeren bakteriyosinler **dördüncü sınıf** olarak gösterilmektedir. Ancak bu sınıf henüz yeterli düzeyde tanımlanmamıştır (Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

Çizelge 2.3: LAB bakteriyosin sınıflandırması (Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

Sınıf	**Alt sınıf**	**Özellikler**
Sınıf I (lantibiyotikler)	**A(1)**	Uzun, katyonik, membran aktif, + veya – yüklü
	A(2)	Uzun, katyonik, membran aktif, - yüklü
	B	Globüler, enzim aktivitesi inhibisyonu
Sınıf II		Küçük (<10kDa), ısıya dayanıklı, lantiyonin yok, membran aktif
	IIa	Antilisterial, N-terminali korunmuş
	IIb	İki peptitli
	IIc	Diğer peptit bakteriyosinler
Sınıf III		Büyük (>30kDa), ısıya dayanıksız
Sınıf IV		Kompleks proteinler, karbondioksit, lipit içerir

LAB tarafından sentezlenen bakteriyosinler genelde yakın ilişkide olduğu türlere karşı etkilidir. Fungal ve maya gelişimine etkisi tanımlanmış olan çalışmalar daha azdır (Schnürer ve Magnusson, 2005).

2.1.2.4 Diğer protein yapılı ve düşük molekül ağırlıklı bileşikler

Reuterin (3-hidroksipropanal), anaerobik koşullarda heterofermentatif türlerin (*Lactobacillus reuteri, L. brevis, Lactobacillus buchneri, Lactobacillus collinoides* ve *Lactobacillus coryniformis*) gliserolü fermente etmesiyle oluşmaktadır (Dalié ve diğ., 2010). Oluşan molekül anaerobik ve aerobik ortamda aktivite gösterebilmektedir (El-Ziney ve diğ., 2000). Düşük molekül ağırlıklı, protein yapıda olmayan, yüksek çözünürlüklü, nötral pH'a sahip bu molekül, bakteri, maya, küf ve protozoaya karşı aktive göstermektedir. *C. albicans, Torulopsis glabrata, S. cerevisiae ve Saccharomycopsis fibuligera* türü mayaları inhibe ettiği bilinmektedir (Daeschel, 1989; El-Ziney ve diğ., 2000; Schnürer ve Magnusson, 2005; Yang ve Chang, 2010). Hücrenin RNase aktivitesine etkide bulunmaktadır (Dalie ve diğ., 2010). *L. brevis* ve *L. buchneri* gibi LAB türleri glukozu fermente ederken gliserol molekülünü elektron alıcısı olarak kullanmaktadır. Tek başına gliserolde gelişememektedir. Glukoz bulunan ortamda da gliserol olmadan yetersiz gelişim göstermektedir (El-Ziney ve diğ., 2000).

Diasetil (2,3-butanedione), metabolik bir son üründür. LAB'ın bazı türleri tarafından üretilir. Tereyağına özgü lezzet ve aroma özelliğine sahiptir. GRAS sınıfındadır. Keskin tereyağı kokusu verdiği için gıdalarda antifungal olarak kullanımı kısıtlıdır. Belirli gıdalarda yıkama suyuna katılarak sanitasyon amaçlı kullanılabilir (Ouwehand ve Vesterlund, 2004; Ray ve Liewen, 2004; Shelef ve Seiter, 2005). Ortam asitliğinin diasetilin antimikrobiyal aktivitesine direkt olarak etkisi görülmüştür. Yapılan bir çalışmada, pH 7'den düşük değerlerde diasetil aktivitesinin arttığı görülmüştür. 200 ppm diasetil miktarının mayalara karşı, 300 ppm'in ise küflere karşı öldürücü olduğu tespit edilmiştir. LAB'ın diğer (LAB olmayan Gram-pozitif ve Gram-negatif) bakterilere göre daha dayanıklı olduğu görülmüştür (Ouwehand ve Vesterlund, 2004; Ray ve Liewen, 2004). Diasetil molekülünün Gram-negatif bakterilerde arginin aminoasidine bağlanarak, ilgili proteinlerin kullanımını kısıtladığı belirtilmiştir. Gram-pozitif bakterilerde ise benzer bağlanma proteinleri bulunmadığı için ve daha fazla aminoasit çeşidi içerdiğinden daha dayanıklı olabileceğine değinilmiştir (Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

Voulgari ve diğ. (2010) tarafından yayınlanan bir çalışmada, geleneksel peynir ve yoğurt ürünlerinden izole edilen fakültatif heterofermentatif (*L. plantarum, L. paraplantarum, L. pentosus, L. rhamnosus, L. paracasei* subsp. *paracasei*) ve

zorunlu heterofermentatif (*L. brevis, L. buchneri, L. fermentum*) starter olmayan LAB türlerinin küf ve mayalar üzerine antimikrobiyal özellikleri incelenmiştir. Bu suşlar, *Penicillium candidum* küfü ve *D. hansenii* mayasına karşı değişen derecelerde inaktivasyon etkisi göstermiştir. Ayrıca hücre dışı antifungal maddelerin proteolitik enzimlere karşı hassasiyet göstermesi sonucu, inhibe edici aktivitenin protein yapılı maddelerden kaynaklandığı ileri sürülmüştür.

Patojenik maya *Candida tropicalis* ve Gram-negatif bakterilere karşı inaktivasyon gösteren *L. plantarum* TN635 suşundan protein yapılı BacTN635 (molekül ağırlığı yaklaşık 4 kDa) bileşiği elde edilmiştir. Bu bileşiğin bakterisidal ve antimaya özellikli olduğu tespit edilmiştir (Smaoui ve diğ., 2010). Çalışmada, BacTN635 *C. tropicalis* kültür ortamına eksponansiyel fazın başlarında eklenmiştir. Hücre sayımı ve absorbans okuma yöntemi ile etki gözlenmiştir. BacTN635 eklenmiş ve eklenmemiş maya kültürünün absorbans ölçümleri birbirine çok yakınken, hücre sayımı metodu BacTN635 varlığında hücre sayısının azaldığını göstermiştir.

Laktik asit, asetik asit, karbon dioksit ve nisin heterofermentatif laktik asit bakterilerinin ürettiği metabolitler arasında yer almaktadır. Bu maddelerin gıdalardaki kullanımlarıyla ilgili olarak özellikle T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nün internet sitesinde bilgi taraması yapılmıştır. Elde edilen bilgiler Çizelge 2.4 ve Çizelge 2.5'te derlenmiştir. Çizelge 2.4, bu maddelerin uluslararası numaralandırma sistemindeki numaraları ve teknolojik kullanım konularını göstermektedir. Çizelge 2.5, laktik asit, asetik asit, CO_2 ve etil alkolün bulunabileceği bazı gıdalar, maksimum miktarları, ilgili tebliğin numarası ve adını göstermektedir.

Çizelge 2.4: Uluslararası numaralandırma sist. bazı gıda katkıları (CAC, 1989).

	Gıda katkısının adı	**Teknolojik kullanım**
270	Laktik asit, L-, D- ve DL-	Asit düzenleyici
234	Nisin	Koruyucu
260	Asetik asit	Asit düzenleyici ve koruyucu
290	Karbon dioksit	Karbonat ajanı Paketleme gazı Koruyucu İtici gaz

Türk gıda kodeksinin fermente sütler tebliğinde (Anon, 2009), fermente süt ürünlerinin titrasyon asitliğinin laktik asit cinsinden minimum ve maksimum değerleri belirtilmiştir. [Fermente süt (en az 0,3), yoğurt (en az 0,6; en fazla 1,5), asidofiluslu süt (en az 0,6), ayran (en az 0,5; en fazla 1,0), kefir (en az 0,6), kımız (en az 0,7)]. Ayrıca kımızda etanolün hacim/ağırlık yüzdesi en az 0,5 olmalıdır. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği Ek13-A'ya göre laktik asit, aroma maddelerinin üretiminde taşıyıcı, çözücü ve katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bira tebliğinde (Anon, 2006) işleme yardımcısı olarak laktik asit kullanılabilirken, karbondioksit ağırlıkça en az % 3 olmalıdır. Krema ve kaymak tebliğine (Anon, 2003) göre, kremanın ve köpük kremanın titrasyon asitliği laktik asit cinsinden sırasıyla % 0.225 ve % 0.025'den fazla olmamalıdır. Fermente ve ekşitilmiş kremaların titrasyon asitliğinin ise laktik asit cinsinden %0.225'den az, %0.67'den fazla olamadığı belirtilmektedir.

Çizelge 2.5: Türk Gıda Kodeksine göre laktik asit, asetik asit, CO_2 ve etil alkolün bulunabileceği bazı gıdalar.

Tebliğ no	**Tebliğ adı**	**Madde**	**Gıda türü**	**Maks. m.**
2006/56	Meyve suyu ve benzeri ürünler tebliği	Laktik asit	Meyve suyu ve püresi	0,5 g/l
		Etil alkol	Meyve suyu ve püresi	3 g/l
		Karbon dioksit	Meyve suyu vb.	-
2001/22	Yenilebilir kazein ve kazeinat tebliği	İnsan sağlığına zarar vermeyen LAB	Asit kazein	-
		Laktik asit	Asit kazein	-
		Asetik asit	Asit kazein	-
98/24	Alkolsüz içecekler tebliği	Etil alkol	Alkolsüz içecek	5.0 g/l
		Laktik asit	Alkolsüz içecek	0.6 g/l
2008/24	Sofralık zeytin tebliği	Laktik asit	Sofralık zeytin	-
2008/67	Şarap tebliği	Karbon dioksit	Doğrudan insan tüketimine yönelik; şarap, doğal köpüren şarap, suni köpüren şarap, doğal yarı köpüren şarap, suni yarı köpüren şarap, likör şarapları ve belirli bölgelerde üretilen kalite şarapları üretiminde kullanılan fermantasyon halindeki üzüm şırasına	Şarap içerisindeki maks. miktar 2 g/L

Köpük krema ve köpüren kremaların üretiminde karbondioksit kullanılmasına izin verilen gazlar arasında yer almaktadır. Şarap tebliğinde (Anon, 2008b), uçar asit miktarının asetik asit cinsinden, kısmen fermente olmuş üzüm şırası için 18 meq/l, beyaz ve pembe/roze şaraplar için 18 meq/l, kırmızı şaraplar için 20 meq/l'den fazla olamayacağı belirtilmiştir. Yumurta ve yumurta ürünleri tebliğine göre (Anon, 2007), yumurta ürünlerinin üretiminde kullanılacak olan hammaddenin kuru maddesindeki laktik asit miktarı 1000 mg/kg'ı aşmamalıdır. Fermente ürünlerde bu değer fermantasyon işleminden önce kaydedilen değer olmalıdır.

Türk Gıda Kodeksinin, Avrupa Birliği'ne uyum çerçevesinde hazırlanan "Renklendirici ve tatlandırıcılar dışındaki gıda maddeleri tebliği" (Anon, 2008a); asetik asit, laktik asit ve karbondioksit gibi gıdalarda kısıtlı miktarda kullanılabilen katkı maddeleriyle ilgili kriterler ve kullanımına izin verilen maksimum miktarları içermektedir. Çizelge 2.6, bu tebliğdeki Ek2 baz alınarak hazırlanmıştır.

Çizelge 2.6: Laktik asit, asetik asit, karbon dioksitin gıdalarda kullanımı ile ilgili kriterler.

Gıda maddesi	Katkı maddesi	Maks. miktar
Nektarlar	Laktik asit	5 g/l
Ekstra reçel ve ekstra jöle	Laktik asit	QS
Reçel, jöle ve marmelat, geleneksel reçel, geleneksel marmelat ve düşük kalorili ürünler de dahil olmak üzere benzer sürülebilir meyve ürünleri	Laktik asit	QS
Teneke ve cam konserve meyve ve sebzeler	Laktik asit, asetik asit	
Emülsifiye edilmemiş hayvansal ve bitkisel katı ve sıvı yağlar (sızma yağlar ve zeytinyağı hariç) özellikle pişirme ve/veya kızartma amaçlı olanlar veya sos, et suyu (gravy) hazırlamada kullanılacaklar	Laktik asit	QS
Mozzarella ve lor	Laktik asit, asetik asit	QS
Konserve meyve ve sebzeler	Laktik asit, asetik asit	QS
Ekmek (sadece buğday unu, su, maya veya kabartıcı ve tuzdan oluşan)	Laktik asit, asetik asit	
Yaş makarna	Laktik asit	QS
Bira	Laktik asit	QS
Şarap dışındaki yarı mamul maddeler	Karbon dioksit	2 g/l
Bebek mamaları	Sadece L(+)laktik asit	QS
Devam mamaları, devam formülleri	Sadece L(+)laktik asit	QS
Bebek ve küçük çocuk ek besinler	Sadece L(+)laktik asit, asetik asit	QS (pH ayarlaması için)

QS (Quantum satis): Herhangi bir maksimum seviyenin belirtilmediğini ifade eder.

2.2 Mayalar

2.2.1 Mayaların genel özellikleri

Mayalar, tek hücreli, eşeysiz olarak genellikle tomurcuklanma ile üreyen, küremsi, eliptik ya da silindirik şekilli mikroorganizmalardır (Deak, 2008). Hareketsiz ve çekirdekli bu hücrelerin eşeyli üremesi askospor oluşumu ile gerçekleşmektedir (Dekker, 2004). Mayalar doğada (toprak, su, hava, bitki ve hayvanlar) yaygın olarak bulunmaktadır. İşlenmiş veya işlenmemiş toprak, pek çok maya türünü barındırmakta ve gıda kontaminasyonunda kaynak sayılacak bir depo durumundadır (Deak ve Beuchat, 1996).

Mayalar enzimatik aktiviteleri sonucu fiziksel, kimyasal ve duyusal özellikleri etkileyerek gıdalarda bozulmaya sebep olurlar. Ancak mayaların şekerleri kullanarak anaerobik yolla etil alkol ve CO_2 üretmesi de gıda sanayinde (alkollü içecekler, ekmek, peynir yapımı gibi) kullanılan önemli bir ürün olmasını sağlamaktadır (Deak ve Beuchat, 1996). Mayalardaki diğer bir metabolizma şekli, aerobik ortamda çok çeşitli besin öğelerini asimile ederek enerji elde etmesi ve biyokütlesini artırmasıdır (Deak, 2008). Çizelge 2.7, bazı maya türlerinin DL-laktat metabolizmasıyla ilgili bilgi vermektedir. Mayalar fermentasyon, asimilasyon, lipolitik ve proteolitik reaksiyonlar sonucu gıdalarda istenmeyen lezzet ve doku bozukluklarına sebep olmaktadırlar (Gadaga ve diğ., 2001).

Çizelge 2.7: Bazı maya türlerinin DL-laktat özellikleri (gelişim agar üzerinde) (Fadda ve diğ, 2010; Lachance ve diğ., 2011; Narvhus ve Gadaga, 2003; Sampaio, 2011; Suzuki ve diğ, 2011).

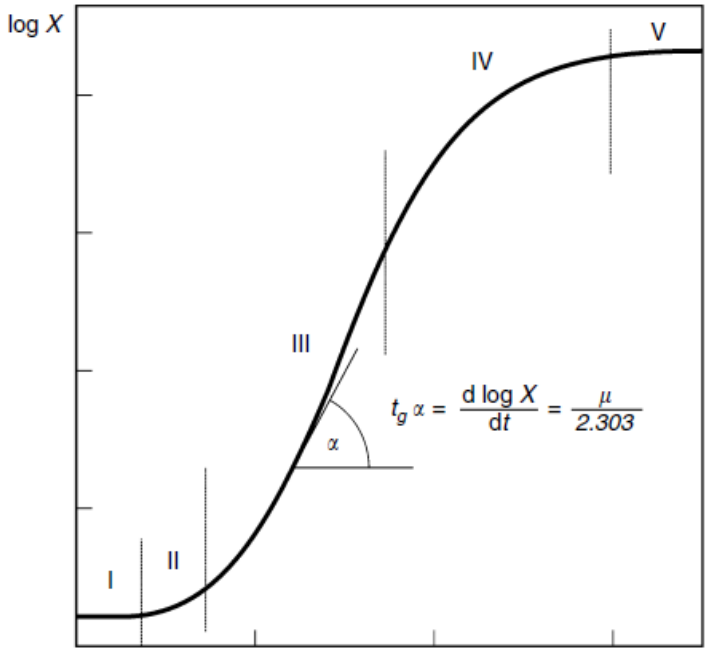
Tür	DL-laktat
C. krusei	A
C. lusitaniae	-
C. parapsilosis	-
C. zeylanoides	-
D. hansenii	AV
R. mucilaginosa	AV

A: assimilation, V: variable results.

2.2.2 Mayalarda gelişim

Mayaların büyüme hızı bakterilere göre genellikle daha yavaş, küflerden ise daha hızlıdır. Ancak asidik ve yüksek şeker konsantrasyonu içeren gıda ortamlarında gelişme özelliğiyle mayalar, bakterilere karşı avantaj sağlamaktadır. Sıcaklık, ortamın kimyasal kompozisyonu, pH, su aktivitesi, oksijen ve gelişim üzerinde etkili olan maddelerin varlığı gibi çevresel faktörler mayaların spesifik büyüme hızını etkilemektedir (Deak ve Beuchat, 1996).

Tomurcuklanmayla büyüyen mayalarda, canlı hücre sayısı veya kütledeki zamanla artış, büyüme hızı (μ) veya jenerasyon süresi (t_g) ile ifade edilmektedir (Şekil 2.1). Kültüre dayalı metot ve mikroskobik metotla canlı hücre sayısı belirlenirken, direkt olmayan hücre yoğunluğuyla ilişkili bulanıklık okunması ve kuru kütle metotlarıyla ölçümler yapılabilmektedir. Aerobik sıvı ortamlarda mayalar genellikle Şekil 2.1'deki gibi bir büyüme eğrisine sahiptir. Büyüme hızları fazlara göre değişiklik göstermekte olup, en hızlı gelişim eksponansiyel fazdadır. Bu fazda büyüme hızı hücre sayısıyla orantılıdır.



Şekil 2.1: Maya hücresinin gelişim eğrisi. Gelişim fazları: I, lag; II, hızlanma; III, eksponansiyel; IV, yavaşlama; V, durağan. X, hücre konsantrasyonu; μ, spesifik büyüme hızı; t, süre (Deak, 2008).

Büyümenin son fazında ise ölen hücre sayısı, yeni oluşan hücre sayısından daha fazladır. Gıdalarda çevre koşulları mayaların tolare edemeyeceği en yakın dereceye ayarlanarak mayalarda ölüm hızlandırılmaktadır. Bu durum gıdaları korumak için uygulanan inaktivasyon metotlarının temelini oluşturmaktadır. Mayaların büyüme ortamındaki bileşenlerden birinin tükenmesi durumunda, hücre bölünmesi durdurularak, durağan faza geçilir. Hücre karbonhidrat depolamış, hücre duvarı kalınlaşmış ve çeşitli streslere dayanıklılığı artmıştır. Mayalar bu koşullara karşı oldukça dayanıklı mikroorganizmalardır ve uzun süre bu şekilde yaşayabilmektedirler. Tükenen bileşenin ortama eklenmesiyle yeniden gelişim döngüsüne girebilmektedir (Deak, 2008).

2.2.3 Gıdalardan izole edilen bazı maya türleri

Candida krusei (Teleomorph *Pichia kudriavzevii*)

Gıda kaynaklı olup insanlarda hastalık yapan türlerdendir. İnsanda candidemia hastalığına en çok sebebiyet veren beş *Candida* türünden biridir. (Diğer dördü *C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* maya türleridir) (White ve diğ., 2010). Fluconazole ve koruyuculara karşı dayanıklı olduğu tespit edilmiştir (Cooper, 2011). Aside toleranslıdır. Asidik gıdalarda fermentasyon yoluyla bozulmaya ve yüzeyde biyofilm oluşumuna sebep olmaktadır (Fleet, 2011).

Candida lusitaniae (Teleomorph *Clavispora lusitaniae*)

Hayvanların normal mikroflorasında bulunduğu belirtilmiştir. Klinik örneklerde nadiren rastlanmıştır. *C. lusitaniae* türünün, bağışıklık sistemi zayıflamış bireylerde hastalığa sebep olmaktadır. Amphotericin B'ye karşı dayanıklılık gösteren bazı suşları bulunmaktadır (Bariola ve Saccente, 2008; Cooper, 2011; Favel ve diğ., 2003).

Candida parapsilosis

Candidemia'ya en çok sebep olan türler arasındadır. Yapışkan sümüksü bir tabaka oluşturarak çevreden veya hastane ortamından bağışıklık sistemi zayıflamış hasta bireylere bulaşabilmektedir. Kültür ortamında uzun ve dallanmış psödohipler oluşturur, bu yapının oluşumu suşlar arasında farklılık gösterebilmektedir (Cooper, 2011).

Candida zeylanoides

Klinik numunelerde nadir olarak görülmüştür. Fırsatçı patojen olabilmektedir. Bazı deniz canlılarından izole edilmiştir. Hayvan kaynaklı gıdalarda, özellikle soğuk depolanmış tavuk etinde tespit edimiştir. Ayrıca krem peynirde rastlanmıştır (Lachance ve diğ., 2011).

***Debaryomyces hansenii* (Anamorph *Candida famata*)**

Düşük su aktivitesine ve yüksek şeker konsantrasyonuna sahip gıdalarda yaygın olarak bulunmaktadır. Meyve suları, şekerli ürünler, şarap, bira, pastane ürünleri, süt ürünleri, işlenmiş ve işlenmemiş et ürünleri bu gıdalara örnek olarak verilebilir. Gıdalarda genellikle bozukluğa sebep olmamaktadır. Peynirin olgunlaşmasına katkı sağladığı belirtilmiştir. Laktik asidi asimile ederek peynirde pH'ın yükselmesine ve diğer mikroorganizmaların gelişimine olanak vermektedir. Kurutulmuş et ürünlerinden izole edilmiştir. *D. hansenii* et ürünlerinde lipolitik ve proteolitik aktivite göstermektedir. Etin duyusal özelliklerini olumlu etkilediği belirtilmiştir. Ancak bu maya türünün gıdalarda aşırı üremesi istenmeyen aroma, lezzet, gaz ve doku oluşumuna sebep olmuştur (Cordoba ve diğ., 2010). Yüksek miktarda (kuru ağırlığının % 70'ine kadar) lipit depolayan maya türlerindendir. Bu sebeple çeşitli biyoteknolojik (ör. biyoyakıt üretimi) alanlarda kullanılmaktadır. Ozmotoleranttır ve yüksek ozmolariteye sahip tuzlu, şekerli ve fermente gıdalarda gelişebilmektedir. Öldürücü özellikte toksinler sentezlemesiyle istenmeyen maya türlerinin gelişimini engellemektedir. Bu özellikleriyle endüstriyel fermentasyonda avantaj sağlamaktadır (Johnson ve Echavarri-Erasun, 2011). Optimum gelişim sıcaklığı 20-25°C'dir. Buzdolabı koşullarında ve 0°C'nin altındaki sıcaklıklarda geliştiği görülmüştür. 10°C sıcaklıkta, pH 4-6 ve a_w 0.99'a kadar olan değerlerde gelişmiştir. İnsanlarda hastalığa sebep olduğu nadiren görülmüştür (Cordoba ve diğ., 2010).

Rhodotorula mucilaginosa

Basidiomycota şubesi, Pucciniomycotina alt şubesi, Microbotryomycetes sınıfı ve Sporidiobolales takımına dahildir (Libkind ve Sampaio, 2010). Kırmızı-pembe koloniler oluşturan, proteolitik, lipolitik ve pektinolitik aktiviteye sahip, oksidatif türlerdir (Fleet, 2011). Doğada çok çeşitli habitatlarda (toprak, göl, nehir) bulunmaktadır. *Rhodotorula* türleri arasında *R. mucilaginosa* gıdalarda en çok

rastlanan türdür. Süt, et, meyve, sebze ve pastane ürünlerinin yüzeylerine bulaşabilmektedir (Fleet, 2011; Libkind ve Sampaio, 2010). Bağışıklık sistemi zayıf olan insanlarda hastalıklara sebep olabilmektedir (Libkind ve Sampaio, 2010).

2.2.4 Gıdalarda bozulmaya sebep olan maya türleri

Taze meyve ve sebzeler besin öğeleri açısından zengin, yüksek nem içeriğine sahip canlı dokuları içermektedir. Sebzelerden farklı olarak, meyvelerde pH değerleri (pH 3-5) daha düşüktür. Dolayısıyla meyveler, maya ve küflerin gelişimi için daha uygun ekolojik bir ortam sunmaktadır. Sebzelerde ise öncelikle bakterilerin gelişimi bozulmaya sebebiyet vermektedir. Mayalar çoğu meyve ve sebzenin doğal mikroflorasında bulunmaktadır. Türlerin dağılımı ürünün çeşidine, çevresel koşullara, hasat koşulları ve depolama koşullarına göre değişiklik göstermektedir. Meyvelerdeki bozulma mayaların fermentasyonu sonucu oluşmaktadır (Deak, 2008).

Meyve suları, düşük pH değerlerinde, nitrojenli bileşik miktarı yüksek ortamlardır. Bu sebeple, mayalar tarafından bozulmaya müsait içeceklerdir. Karbonatlı soft içeceklerde maya gelişimi kötü koku, bulanıklık ve tortu oluşumuna yol açar. Fermentasyon sonucu oluşan karbondioksit gazı, içeceğin bulunduğu kutunun şişmesine sebep olur. Bu tür soft içeceklerde bulaşının genellikle üretim ortamından kaynaklandığı tespit edilmiştir. Virgina, USA'da soda ve dolum makinelerinden alınan numunelerde mikrobiyal kontaminasyon analiz edilmiştir. Baskın olarak bulunan bakteri türlerinin yanında *C. lusitaniae* ve *C. parapsilosis*, tanımlanan maya türleri arasında yer almaktadır (Deak ve Beuchat, 1996; White ve diğ., 2010).

Alkollü içecekler çok çeşitlidir. Şarap, bira gibi içeceklerin üretiminde mayalar önemli bir rol oynamaktadır. Mayaların fermentasyonuyla oluşan metabolitler son ürünün lezzet ve aroma oluşumunu etkilediği için, bu gıdalarda faydalı ve bozulmaya sebep olan türlerin ayrımını yapmak zordur. Şarapta maya içeriği, üretimin farklı aşamalarına göre araştırılmıştır. Tarlada olgunlaşan üzümün maya içeriği, şıranın fermentasyonu sırasında, şarap üretim tesisinde, şişelenmiş şarapta gelişen maya populasyonlarının değişimleri incelenmiştir. Üretimde kullanılan üzümün hijyen kalitesi, bozulmada güçlü bir etkendir. Genellikle *Z. bailii, Saccharomyces cerevisiae, S. ludwigii* suşları en zararlı, *C. parapsilosis, C. krusei* ve *C. stellata* ise ikinci derecede zararlı türlerdendir (Deak ve Beuchat, 1996; Loureira ve Malfeito-Ferreira, 2003). Şarapta fermentasyon sonrası bozulmaya sebep olan türler arasında

yer alan *C. zeylanoides*, depolama tanklarında bulunan şarap üzerinde film oluşturmuştur (Deak ve Beuchat, 1996). Şarapta olduğu gibi bira üretiminde de mayalar fermentasyon amacıyla kullanılmaktadır. Bunun dışında, istenmeyen mayaların bulaşısı da olabilmektedir. Birada yaklaşık olarak pH 4 olması, şıranın kaynatılma işlemi ve katkı maddelerinin bulunması çoğu bakterinin gelişimini önlemektedir. Birada bozulma sadece bazı LAB ve maya türleriyle ilişkilidir. Bunlar da bulanıklık ve istenmeyen lezzet oluşumuna neden olmaktadır. *D. hansenii*, biranın bozulmasında rol alan maya türleri arasında yer almaktadır.

Yüksek şeker içeren gıdaların stabilitesi; su aktivitesi, pH, sıcaklık ve koruyucu maddelerin bulunmasına bağlıdır. Kurutulmuş sebze, tahıl unu, makarna, süt tozu gibi gıdalar genelde %25'ten az nem ve 0.60'tan düşük a_w değerlerine sahiptir. Bu gıdalar kuru kaldıkları sürece mikrobiyal gelişim görülmez. Bal, şurup, reçel, jöle, marmelat, kurutulmuş meyve, meyve suyu konsantresi gibi gıdalarda ise 0.60-0.85 a_w ve %15-20 nem değerleri görülmektedir. Oda sıcaklığında uzun süre saklandıklarında bu gıdalar fungal çürümeye maruz kalmaktadır. Bozulma stres koşullarına dayanıklı mayalardan kaynaklanabilmektedir. Reçelden izole edilen *D. hansenii, R. mucilaginosa* bu türlere örnektir.

Meyvelerden farklı olarak sebzelerde gelişen mikroorganizma çeşitliliği daha fazladır. Bunu etkileyen iç faktörler; yüksek nem içeriği, zengin besin ortamı ve nötrale yakın pH değerleridir. Sebzelerin bozulmasında mayaların rolü, bakteri ve küflerden sonra gelmektedir. Fakat ortam koşulları uygunsa, örneğin laktik asit fermentasyonu gerçekleşmesi gibi durumlarda, maya gelişimi hızlanmaktadır. Sebzelerde maya populasyonu 10^3-10^6 g^{-1} değerlerinde değişim gösterir. *Basidiomycetous*, genelde sebzelerdeki dominant mayalardır. *R. mucilaginosa*, taze mısırda bulunan türler arasındadır. Son yıllarda tüketicinin az işlenmiş gıdalara talebinin artmasıyla sebzelerde maya kaynaklı bozulmada artış olmuştur. *C. parapsilosis*, paketlenmiş yenmeye hazır havuçtan depolama aşamasında izole edilmiş türlerden biridir. Sebzelerin toprağa yakın yetişmesi de kontaminasyon sebeplerindendir. Genelde, sebzelerin hasadı sırasında meydana gelen mekanik hasarlar mikroorganizmaların girişini kolaylaştırır. İşleme ortamında ise kesici aletler bulaşının kaynağını oluşturmaktadır. Salatalık, lahana, zeytin gibi gıdalar fermentasyonla korunabilmektedir. LAB'ın sentezlediği organik asitler pH'ı düşürerek mayaların gelişimi için uygun ortam hazırlamaktadır. Fermente sebzelerde

mayalar son ürünün organoleptik özelliklerini geliştirmektedir. Ancak bozulmalara da sebep olmaktadır. Bozulma, dokuların enzimatik yıkımla yumuşaması, fermentasyon sonucu gaz çıkışı ve kabarma şeklindedir. Lahana turşusunda pembe leke oluşumuna *Rhodotorula* türleri sebebiyet vermektedir. Zeytin ve salatalık turşusunda yumuşamaya sebep olan mayalar *Saccharomyces, Debaryomyces, Pichia, Candida* ve *Rhodotorula* türleridir (Arroyo-Lopez ve diğ., 2008; Fleet, 2011). Salamura gıdalarda LAB fermentasyonu sonucu oluşan organik asitler oksidatif mayalar tarafından kullanılır. Bu durum diğer mikroorganizmalar tarafından bozulmayı kolaylaştırır.

Mayonez, salata sosu, marine edilmiş balık, sebze gibi asitle korunan gıdalarda, temel bozulma kaynağı LAB ve mayalardır. Meze ürünlerinin hazırlanmasında mayonez ve salata sosu kullanıldığında kontaminasyon riski artmaktadır. Mayonez içeren bozulmuş salatadan izole edilen türler arasında *C. parapsilosis, D. hansenii, R. mucilaginosa* türleri bulunmaktadır (Fleet, 2011).

Tahıl ürünlerinde bozulma ve büyük ekonomik kayıplar daha çok küflerden kaynaklanır. Mayalar mikrobiyal populasyonun küçük bir kısmını oluşturmasına rağmen tüm tahıllarda (yulaf, arpa, buğday, mısır, çavdar) bulunur. Tahıllarda *Candida, Cryptococcus, Pichia, Hanseniaspora, Rhodotorula, Sporobolomyces, Saccharomyces* ve *Trichosporon* türleri tespit edilmiştir (Deak ve Beuchat, 1996).

Ticari pastane ürünleriyle ilişkili mayalar arasında bozulma sebebi olanlar genelde *Saccharomyces* ve *Zygosaccharomyces* türleridir. Tahıl unu mikroflorasının %1'ini mayalar oluşturur, bu gıdalarda bakteri ve küfler dominant organizmalardır. Sonbahar ve kış aylarında undaki küf populasyonu genelde en yüksek seviyedeyken, ilkbahar aylarında maya populasyonunun seviyesinin yükseldiği belirtilmiştir. *C. zeylanoides* unda tespit edilmiş türler arasındadır. Bu mayaların öğütme makinesinden bulaştığı belirtilmiştir. Pastane ürünlerinde, un ve hamur kaynaklı mikroorganzimalar ısıl işlem sırasında inaktive edilmektedir. Bu ürünlerin mikrobiyal bozulması fırınlama işleminden sonra, kontaminasyonla ortaya çıkar. Dilimlenmiş ekmek kontaminasyona açıktır. Ekmeğin içerden bozulmasına genelde Bacillus ya da küfler sebep olmaktadır. Ekmeğin mayalar tarafından bozulması kireçimsi bir görüntü oluşumuna sebep olur. Bu tip bozulmada *Endomyces fibuliger, pichia burtonii* ve *Zygosaccharomyces bailii* etkiliyken, *C. parapsilosis* türü de görülmüştür (Deak, 2008).

Süt ürünlerinin fermentasyonunda mayalar önemli bir yer tutar. Fakat mayalar süt ürünlerinde bozulmaya da sebep olabilmektedir. Süt ürünlerinin maya türleri için özel bir ortam oluşturmasının sebepleri, mayaların laktoz fermentasyonu ve asimilasyonu yapabilmeleri, laktik asit ve sitrik asiti asimile edebilmeleri, protein ve lipitleri parçalayabilen enzimler üretebilmeleri, düşük pH ve sıcaklık değerlerinde gelişebilmeleri olarak sıralanabilmektedir (Jacques ve Casaregola, 2008). *D. hansenii*, süt ürünlerinden en çok izole edilen türlerdendir. Çiğ sütün işlenmesindeki hijyen koşulları, sütte bulunan maya populasyonlarını etkilemektedir. Soğuğa dayanıklı türler arasındaki *D. hansenii* buzdolabı koşullarında saklanan sütten izole edilmiş türler arasındadır. Pastörize edilmiş süt ürünlerinde ise maya kontaminasyonu ısıl işlemden sonra oluşmaktadır. *D. hansenii* yine burdan izole edilen türler arasında yer almaktadır. Yoğurda katılan meyve ve tatlandırıcılar maya kontaminasyon riskini arttıran sebeplerdir. *D. hansenii* türünü takiben *S. cerevisiae, R. mucilaginosa, C. parapsilosis, C. zeylanoides, C. versatilis, C. rugosa, Issatchenkia orientalis* (Anamorph *C. krusei*), *Clavispora lusitaniae* (Anamorph *Candida lusitaniae*) bozulmuş yoğurttan en çok izole edilen türler arasındadır. 0.89 su aktivitesinde, 200 mg L^{-1} sorbik asit eklendiğinde mayaların inhibe olduğu görülmüştür (Deak, 2008). Peynirin olgunlaşmasında mayaların faydalı olduğu kabul edilse de aşırı gelişmeleri duyusal özellikleri olumsuz yönde etkilemektedir. Peynir işleme ünitelerinden bulaşan mayalar bozulma nedeni olabilmektedir. *D. hansenii* bozulmuş peynirde en çok görülen tür iken, *C. zeylanoides* ve patojenik *C. albicans* da izole edilmiş türler arasında yer almaktadır (Jacques ve Casaregola, 2008).

Et, tavuk, balık ve deniz ürünlerinde mikrobiyal gelişim, a_w ve pH'ın optimum olmasının yanında zengin besin içeriğiyle ilişkilendirilmektedir. Günümüzde yeni işleme ve depolama tekniklerinin geliştirilmesi et ürünlerinde yaygın olarak bulunan bakteri populasyonlarını azaltmış, mayaların daha fazla gelişimine ve bozulmanın kaynağını oluşturmasına fırsat vermiştir (Nielsen, 2008). Et ürünlerinde kontaminasyon, kesimhanede etin işlendiği bölümler, hava, ekipmanlar, soğuk depo odaları, paketleme üniteleri gibi ortamlardan gerçekleşmektedir. *Rhodotorula, Candida* ve *Debaryomyces* türleri sıklıkla izole edilen türler arasında yer almaktadır. Norveç'te kurutulmuş et ürünlerinde, is uygulanmış ürünlerin yüzeyinde maya populasyonunun gelişimi önemli ölçüde azalmıştır (Asefa ve diğ., 2009). Çizelge 2.7'de bazı maya türleri ve izole edildikleri gıda ürünleri yer almaktadır.

Çizelge 2.8: Bazı gıdalar ve maya türleri (Deak, 2008; Deak ve Beuchat, 1996).

C. krusei	Şarap, ekmek hamuru
C. lusitaniae	Yöresel fermente süt ürünleri
C. parapsilosis	**Meyveler:** işlenmiş meyve, tropik meyveler **İçecekler:** şişelenmiş içecekler, şarap şırası, şarap **Sebzeler:** mısır, havuç **Fermente ve asitli gıdalar:** turşu, fermente kakao, salata, oryantal gıdalar, mantar turşusu, mayonez içeren salata **Pastane ürünleri:** ekmek **Süt ürünleri:** peynir, peynir suyu, yoğurt ve meyve karışımları, tereyağı **Et, tavuk ve deniz ürünleri:** sığır ve tavuk eti, balık, sucuk, kabuklu deniz ürünleri
C. zeylanoides	**Meyveler:** üzüm, vişne **İçecekler:** şarap **Pastane ürünleri:** buğday ve yulaf unu **Süt ürünleri:** peynir, çiğ süt, yoğurt, bazı yöresel peynirler, tereyağı **Et, tavuk ve deniz ürünleri:** sığır, kuzu, domuz, tavuk ve hindi eti, sığır ve kuzu kıyması, kuzu filetosu, balık, deniz ürünleri, taze sucuk, dondurulmuş ve kurutulmuş et ürünleri, vakum paketli sosis
D. hansenii	**Meyveler:** elma, armut, üzüm, narenciye, tropik meyveler, nar **Meyve suları ve soft içecekler:** meyve suları, alkolsüz içecekler **Alkollü içecekler:** bira, malt, pirinç birası, şarap, şarap şırası, şarap fabrikası **Sebzeler:** domates **Fermente ve asitli gıdalar:** turşu, zeytin, paketlenmiş sebze salatası, mayonezli salata, kakao, soya ürünleri **Tahıllar:** mısır, arpa **Pastane ürünleri:** ekmek mayası, hamuru, ekmek, **Şeker oranı yüksek ürünler:** reçel, işlenmemiş şeker, işlenmiş şeker, şurup, şeker kamışı **Süt ürünleri:** süt, yoğurt, peynir, dondurma **Et, tavuk ve deniz ürünleri:** sığır, domuz, tavuk eti, sucuk, balık ve kabuklu deniz ürünleri
R. mucilaginosa	**Meyveler:** elma, çilek, vişne, greyfurt, tropikal meyveler, portakal **Tahıllar:** mısır, arpa **Alkollü içecekler:** şarap ve şarap evi **Fermente ve asitli gıdalar:** mayonezli salata ve çeşitli salatalar **Şeker oranı yüksek ürünler:** reçel **Süt ürünleri:** yoğurt **Et, tavuk ve deniz ürünleri:** sığır ve domuz eti, sucuk, balık, kabuklu deniz ürünleri

2.2.5 Bazı maya türlerinin antifungal kimyasallara hassasiyetleri

Brezilya'da yapılan bir çalışmaya göre, hastaların dolaşım sisteminden izole edilen farklı *Candida* türlerinin antifungal flukonazol (FCZ), itrakonazol (ITZ), and vorikonazol (VCZ)'a karşı hassasiyeti, brot mikrodilüsyon metoduyla test edilmiştir. *C. parapsilosis* ve *C. krusei*'nin MIC_{50} değerleri (µg/ml) Çizelge 2.9'da verilmiştir (Matta ve diğ., 2007).

Çizelge 2.7 : Bazı maya türlerinin flukonazol (FCZ), itrakonazol (ITZ), ve vorikonazol (VCZ)'a karşı MIC_{50} değerleri (Matta ve diğ., 2007).

Tür	**(MIC_{50}) (µg/ml)**		
	FCZ	**ITZ**	**VCZ**
C. parapsilosis	0,5	0,03	0,03
C. krusei	16	0,25	0,25

İtalya'da çeşitli kliniklerden toplanan, insan vücudundan izole edilmiş *Candida* türlerinin VCZ'ye hassasiyeti araştırılmıştır. Brot mikrodilüsyon metoduyla belirlenen *C. parapsilosis*, *C. krusei* ve *C. lusitaniae* türlerinin MIC_{50} ve MIC_{90} değerleri (µg/ml) Çizelge 2.10'da gösterilmiştir (Morace ve Polonelli, 2005).

Çizelge 2.8: Bazı maya türlerinin vazokonazole karşı MIC_{50} ve MIC_{90} değerleri (Morace ve Polonelli, 2005).

Tür	**VCZ**	
	MIC_{50} (µg/ml)	**MIC_{90}**
C. parapsilosis	0,015	0,03
C. krusei	0,25	0,5
C. lusitaniae	0,008	0,015

Brezilya'da tropikal kaynak suyundan izole edilen çok sayıda maya türünün, brot mikrodilüsyon metodu kullanılarak hassasiyet testi gerçekleştirilmiştir. Piracicaba nehrinden elde edilen *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *D. hansenii* ve *R. mucilaginosa* türlerinin FCZ ve ITZ'ye karşı MIC_{80} değerleri (µg/ml) Çizelge 2.11'de verilmiştir (Medeiros ve diğ., 2008). Çizelge 2.12, ABD'de bulunan bazı sağlık merkezlerinde, candidemia hastalarının kanından elde edilen maya türlerinden *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. famata* ve *C. zeylanoides*'in belirtilen MIC değerlerindeki % inaktivasyon değerlerini göstermektedir (Pfaller ve diğ., 2004).

Çizelge 2.9: Bazı maya türlerinin FCZ ve ITZ'ye karşı MIC_{80} değerleri (Medeiros ve diğ., 2008).

Tür	**MIC_{80} (µg/ml)**	
	FCZ	**ITZ**
C. krusei	64	0,5
C. parapsilosis	1-4	0,5-1
D. hansenii	1-4	1-4
R. mucilaginosa	64	1-4

Verilere göre *C. krusei* fluconazole dayanıklı bir türdür. Ayrıca amfoterisin B için MIC değeri 0,5 mg/ml olarak ölçülmüştür (Okungbowa ve diğ., 2009). *R. mucilaginosa* ise fluconazole karşı dayanıklılık gösterirken (>256 µg/ml), amphotericin B (0.023 µg/ml)'ye karşı hassastır (Bockelmann ve diğ., 2008). *C. lusitaniae*'ye karşı, amfoterisin B fungisidal etki gösterirken; flukonazol ve vorikonazol fungistatik etki göstermektedir (Ernst ve diğ., 2002). *D. hansenii*'nin amfoterisin B'ye karşı MIC ölçümü 0,25 µg/ml bulunmuştur (Wong ve diğ., 1982).

Çizelge 2.10: Bazı maya türlerinin belirtilen MIC değerlerindeki kümülatif % inaktivasyon değerleri (Pfaller ve diğ., 2004).

	Tür	**Belirtilen MIC (µg/ml) değerlerindeki kümülatif % inaktivasyon**											
		0,06	**0,12**	**0,25**	**0,5**	**1**	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**	**128**
FCZ	*C. krusei*	0	0	0	0	0	0	1	3	14	60	95	99
	C. lusitaniae		4	37	68	85	91	94	96	98	99	100	
	C. famata		0	11	28	44	50	72	83	100			
	C. zeylanoides		20	20	40	60	80	80	100				

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Tulum peyniri örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinden (*L. brevis* 1, *L. brevis* 2 ve *L. brevis* 3 suşları, *L. pentosus* ve *L. plantarum* türlerinden birer suş olmak üzere toplam beş örnek seçilmiştir. Bu kültürler De Man Rogosa ve Sharpe (MRS) yatık agar (Merck, Darmstadt, Almanya) tüplerinde +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Sucuk örneklerinden izole edilen altı farklı maya türü (*C. famata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. zeylanoides*, *R. mucilaginosa*) seçilmiş ve bu çalışmada, LAB'ın antimikrobiyal etkisini test etmek üzere kullanılmıştır. Maya kültürleri, Malt Ekstrakt Agar (MEA) yatık agar (Merck, Darmstadt, Almanya) tüplerinde +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2 Metot

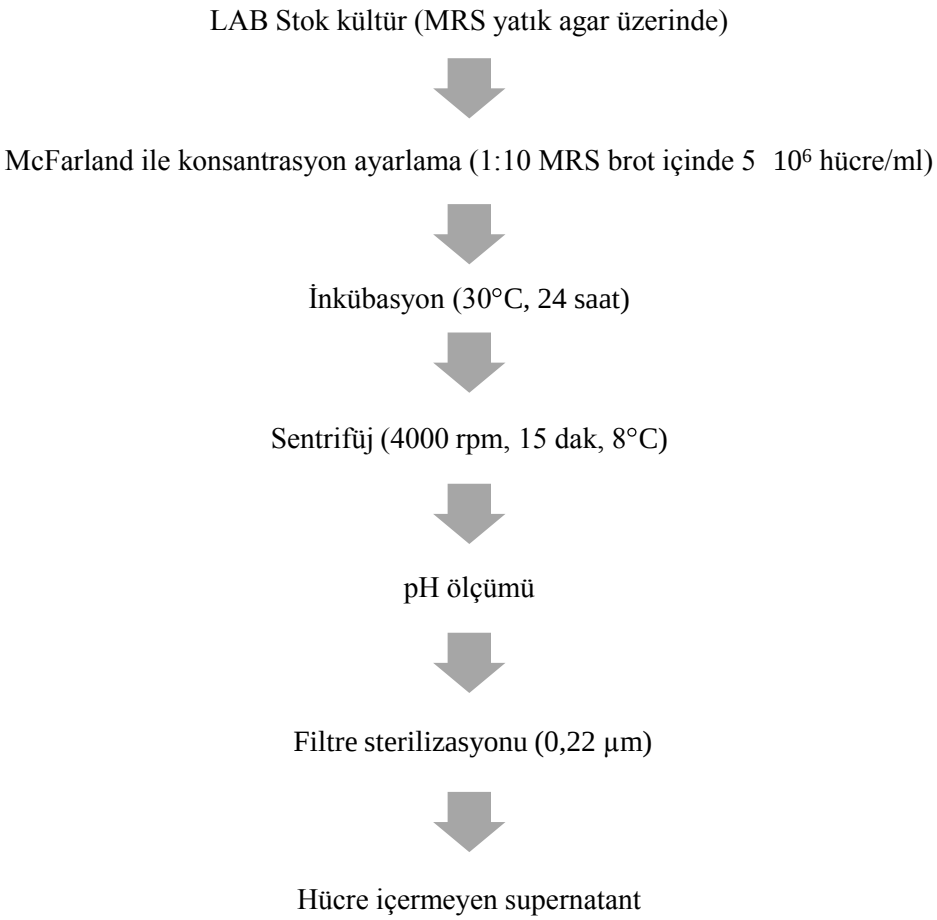
3.2.1 Gram boyama

MRS agar üzerine ekilip 30°C'de, 24 saat süre geliştirilmiş saf laktik asit bakterisi kültüründen hazırlanan preparatlar üzerine kristal violet damlatılmış ve bir dakika bekletilmiştir. Boya saf su ile akıtılmıştır. Boyanın etkisini artırmak için üzerine iyot çözeltisi damlatılmıştır. Alkol ile yıkandıktan sonra karşıt boya olarak karbol fuksin ile muamele edilip 30 saniye kadar bekletilmiş ve sonra yıkanmıştır. Preparatlara immersiyon yağı damlatılarak mikroskop altında incelenmiştir. Mor renkte gözlenen hücreler gram pozitiftir.

MEA üzerine ekilip 25°C'de, 48 saat geliştirilmiş saf maya kültüründen hazırlanan preparatlar, yukarıda anlatılan şekilde gram boyama yöntemine tabi tutulmuş ve maya hücreleri mikroskop altında incelenmiştir.

3.2.2. Laktik asit bakterilerinden antimikrobiyal madde eldesi

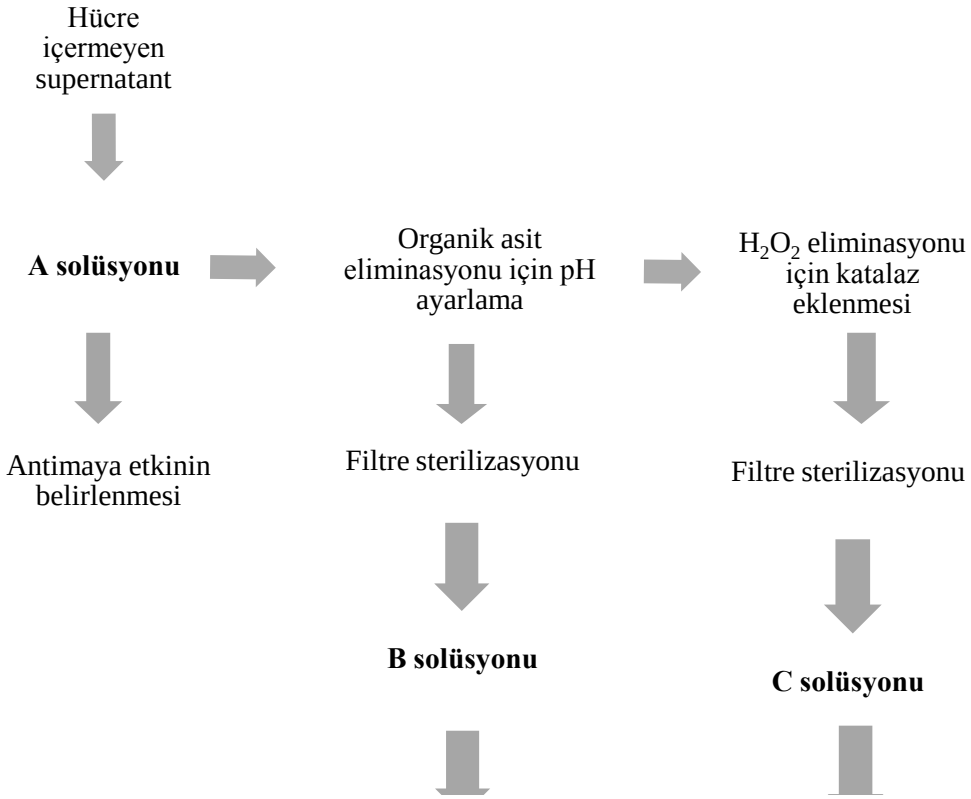
LAB türleri MRS yatık agar tüpleri içine ekilerek 30°C'de 24 saat süreyle geliştirildi. Yatık agarda gelişen LAB kültürlerinden öze yardımıyla örnekler alındı. McFarland standartları kullanılarak seyreltik MRS sıvı besiyerinde hücre konsantrasyonu 5×10^6 hücre/ml olarak ayarlandı. 30°C'de 24 saat süre ile geliştirildi. Kültür solüsyonları 4000 rpm ve 8°C'de 15 dakika sentrifüj edildi. Üst faz (supernatant) alındı, pH-metre (Hanna HI 9321 Microprocessor) ile pH değerleri ölçüldü. 0,22 μm por çapında steril membran filtreden (Whatman FP 30/ 0,2 CA-S, Dassel, Almanya) geçirilip, steril halde +4°C'de saklandı. LAB (*L. pentosus, L. plantarum, L. brevis* 2, 1 ve 3) türlerinden izole edilen supernatantlar sırasıyla S1, S2, S3, S4 ve S5 olarak işaretlendi. Şekil 3.1'de, LAB antimikrobiyal madde eldesinin basamakları gösterilmiştir.



Şekil 3.1: LAB kültüründen hücre içermeyen supernatant elde edilmesini gösteren protokol.

3.2.3 Supernatantların hazırlık işlemleri

Supernatantın bir bölümü steril bir tüp içine ayrıldı. Bu ayrılan bölüm "A" harfiyle işaretlendi (Şekil 3.2). Supernatantın kalanı öncelikle 1N NaOH kullanılarak pH 6'ya ayarlandı. Elde edilen solüsyon membran filtre ile steril edildi, bir kısmı steril bir tüp içine ayrıldı ve bu tüp "B" harfiyle işaretlendi. Kalan solüsyon ikinci bir işleme tabi tutuldu. Bunun için önceden steril distile suyla seyreltilerek katalaz enzimi solüsyonu hazırlandı. Katalaz enzimi solüsyonu kalan supernatanta eklendi, iyice karıştırıldı ve yarım saat oda sıcaklığında bekletildi. Membran filtre ile steril edilen solüsyon "C" harfiyle işaretlendi. A, B ve C solüsyonları cam tüplerde +4°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.2: Hücre içermeyen supernatanttan A, B ve C solüsyonlarının elde edilmesini gösteren protokol.

3.2.4 Supernatantların antimaya etkisinin incelenmesi

6 farklı maya kültürü Malt Ekstrakt Agar (MEA) içeren yatık besiyerlerinde 25°C'de, 48 saat süreyle geliştirildi. Bir öze yardımıyla besiyerinden bir miktar örnek fizyolojik su içersine alındı. McFarland standart solüsyonları yardımıyla, %10 konsantrasyonlu Malt Ekstrakt Brot (MEB) içeren tüplerde maya konsantrasyonu

5×10^3 hücre/ml olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan maya kültürleri 25°C'de, 48 saat süreyle geliştirildi.

Steril ortamda, mikropipet yardımıyla MEB besiyeri, A, B ve C solüsyonu, birinci maya kültürü (*C. krusei*) mikrotitre plaka kuyularına ilave edildi. Bu deney üç paralel şeklinde hazırlandı.

Yukarıda anlatılan prosedür diğer maya örnekleri (*C. lusitaniae, C. parapsilosis, C. zeylanoides, D. hansenii* ve *R. mucilaginosa*) için de hazırlandı.

Hazırlanmış mikrotitre plaka kuyularının üstü steril bantlarla kapatıldı. Mikrotitre plakalar 25°C'de inkübe edildi. Beş ayrı LAB suşuna ait supernatantlardan (S1, S2, S3, S4 ve S5) hazırlanan "A", "B" ve "C" solüsyonlarının anti-maya etkisini test etmek için, mikrotitre plaka okuyucusu ile 600 nm dalga boyunda, belirli saat aralıklarında spektrofotometrik ölçümler yapıldı. Bu test sonuçlarını doğrulamak için MEA petrilerine ekimler yapıldı.

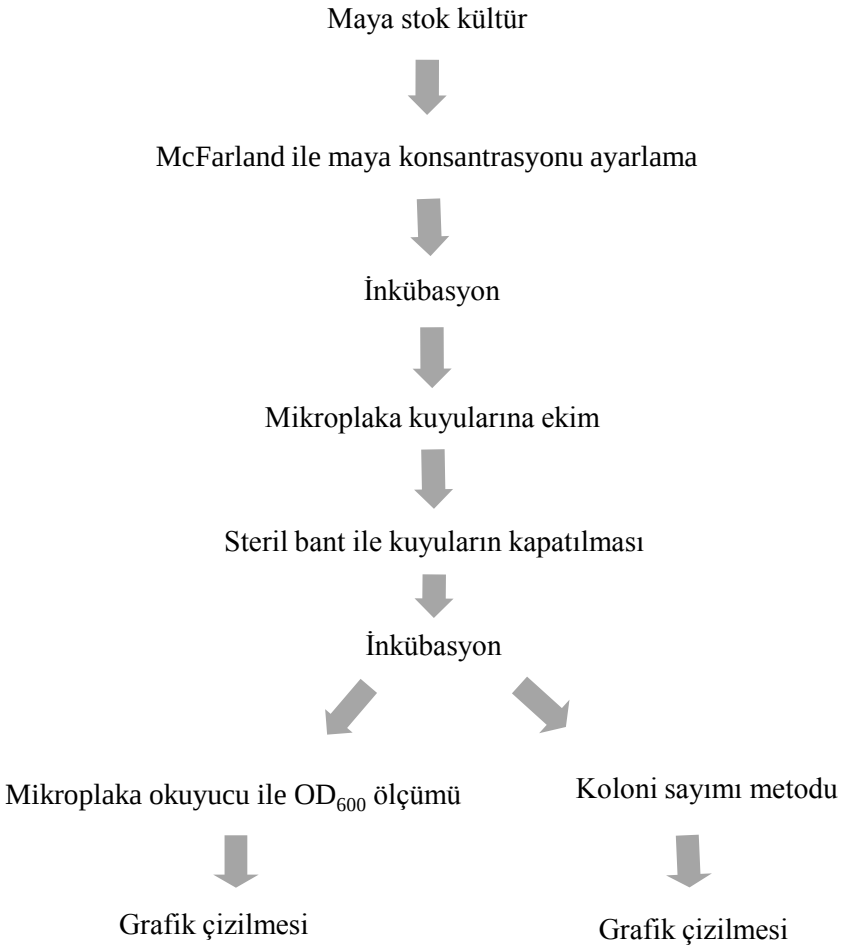
3.2.5 Mikroplaka ölçüm metoduyla koloni sayım metodunun karşılaştırılması

A, B ve C solüsyonlarının anti-maya etkisini test eden bir önceki deneysel çalışmada anti-maya etkisi S1-A solüsyonunda net bir şekilde görüldüğü için çalışmanın devamına bu solüsyonla devam edildi. S1-A solüsyonunun altı farklı maya kültürü üzerine etkisini görmek için spektrofotometrik ölçüme dayanan metot ile koloni sayımı metodu yapıldı. Elde edilen sonuçlar ile herbir mayanın büyüme eğrisi grafiği çıkarıldı ve antimikrobiyal maddelerin maya türleri üzerine etkisi hazırlanan grafiklerde incelendi. Şekil 3.3, bu deneyin protokolünü kabaca göstermektedir.

Bunun için öncelikle taze maya kültürleri hazırlandı. Mayalar MEA yatık tüplerde, 25°C'de 48 saat geliştirildi. Gelişen kültürlerden öze yardımıyla örnekler alınarak McFarland standart solüsonları yardımıyla maya hücre konsantrasyonları %10'luk MEB içersinde ayarlandı. Bu tüpler 25°C'de 48 saat süreyle geliştirildi. Daha sonra, bu tüpler içersinden örnekler alınarak mikrotitre plaka kuyuları içine ekimler yapıldı.

Hazırlanan mikrotitre plakaların ağzı steril bant ile kapatıldı. Plakalar 25°C'de, 70 saat süreyle geliştirildi. 0, 8, 21, 32, 45, 56 ve 70. saatlerde mikrotitre plaka okuyucusu ile 600 nm dalga boyunda ölçümler yapıldı. Bu ölçüm sonuçlarına göre grafikler hazırlandı. Her okuma saatinde, herbir maya türü için kuyulardan örnek alındı. Steril fizyolojik su kullanılarak seyreltme işlemi yapıldı. Seyreltme

işleminden sonra, daha önceden hazırlanmış MEA petri kaplarına ekimler iki paralel olacak şekilde yapıldı. Petri kapları 25°C'de 48 saat bekletildi ve koloni sayımları yapıldı. Örnek alma, seyreltme ve petri kaplarına ekim işlemleri her spektrofotometrik okuma saatinden sonra tekrarlandı. İnkübasyondan sonra koloni sayımları yapıldı ve grafikler hazırlandı. Grafikler için Microsoft Excel Programı kullanıldı. Elde edilen grafiklere göre mayaların büyüme eğrileri ve anti-maya özelliğindeki maddelerin maya üzerine etkileri incelendi.



Şekil 3.3: Mikrotitre plaka metodu ve koloni sayımı metodunun karşılaştırılmasıyla ilgili protokol.

3.2.6 Supernatant içindeki D-/L-laktik asit konsantrasyonlarının belirlenmesi

Farklı laktik asit bakterisi türlerinden elde edilen supernatantın içerdiği D- ve L-laktik asit konsantrasyonunu ölçmek için stereospesifik enzimatik kitler (Boehringer Mannheim, R-Biopharm AG, Almanya) kullanıldı. Deneyler kit prosedüründe anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

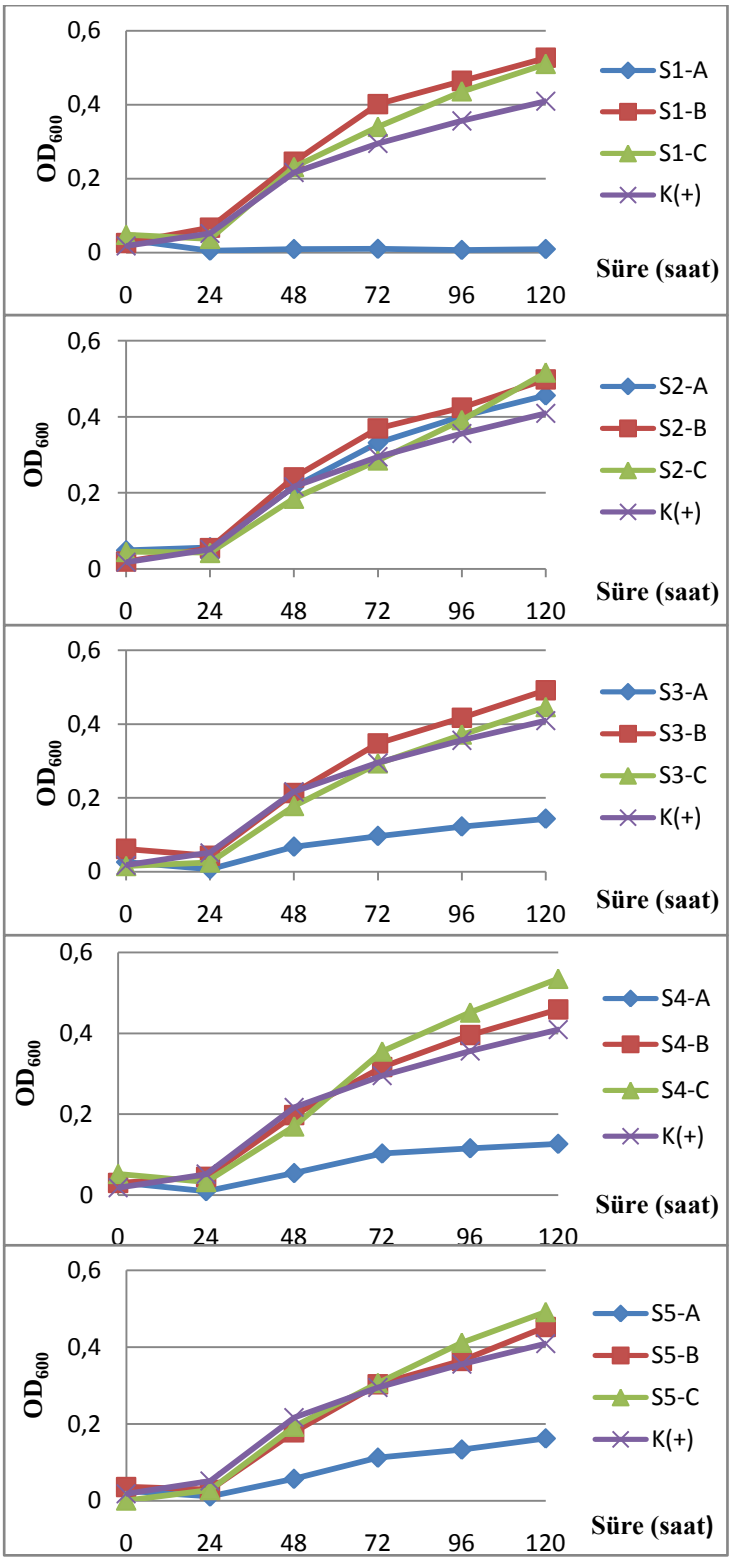
4.1 Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Supernatantların Maya Türleri Üzerine Etkisi

Bu çalışmada *L. pentosus, L. plantarum, L. brevis* 1, 2 ve 3 suşlarından izole edilen supernatantın içerdiği metabolitlerin farklı maya türlerinin gelişimi üzerine etkisi incelenmiştir. LAB'ın sentezlediği farklı metabolitlerin antimaya özelliklerini test edebilmek için supernatant üç farklı bölümde incelenmiştir. Birinci bölüm (A), supernatanttaki metabolitlerin (organik asitler, hidrojen peroksit, protein yapılı bileşikler ve diğer maddeler) toplam etkisini test etmeyi amaçlamaktadır. İkinci bölüm (B) olan nötralize edilmiş (pH 6.00) supernatant; hidrojen peroksit, protein yapılı bileşikler ve diğer metabolitleri içermektedir. Üçüncü bölüm (C) ise, nötralize edilmiş ve H_2O_2'nin etkisini elimine etmek için içine katalaz solüsyonu eklenmiştir. Bu bölüm protein yapılı ve diğer bileşikleri içermektedir.

Şekillerde, *L. pentosus, L. plantarum, L. brevis* 2, 1 ve 3 suşlarına ait supernatantlar sırasıyla S1, S2, S3, S4 ve S5 olarak sembolize edilmiştir. Örneğin S1-A, *L. pentosus*'tan elde edilen supernatantın toplam haldeki etkisini; S3-C, *L. brevis* 2'den elde edilen supernatantın, nötralize edilmiş ve supernatant eklenmiş halini sembolize etmektedir. Kontrol amacıyla supernatant eklenmemiş maya kültürünün gelişimi ise K(+) olarak ifade edilmektedir. Mayaların gelişimi mikroplaka okuyucusunda, 600 nm dalga boyunda belli aralıklarla ölçülmüştür. Sonuçlar üç farklı ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

4.1.1 Laktik asit bakterilerinden elde edilen supernatantların *C. krusei* gelişimi üzerine etkisi

Şekil 4.1'de, farklı supernatant bölümlerinin *C. krusei* gelişimi üzerine antimaya etkileri gösterilmiştir. Mikroplaka kuyuları içinde maya hücrelerinin başlangıç konsantrasyonu yaklaşık olarak $1{,}4\times10^3$ hücre/ml olarak ayarlanmıştır.



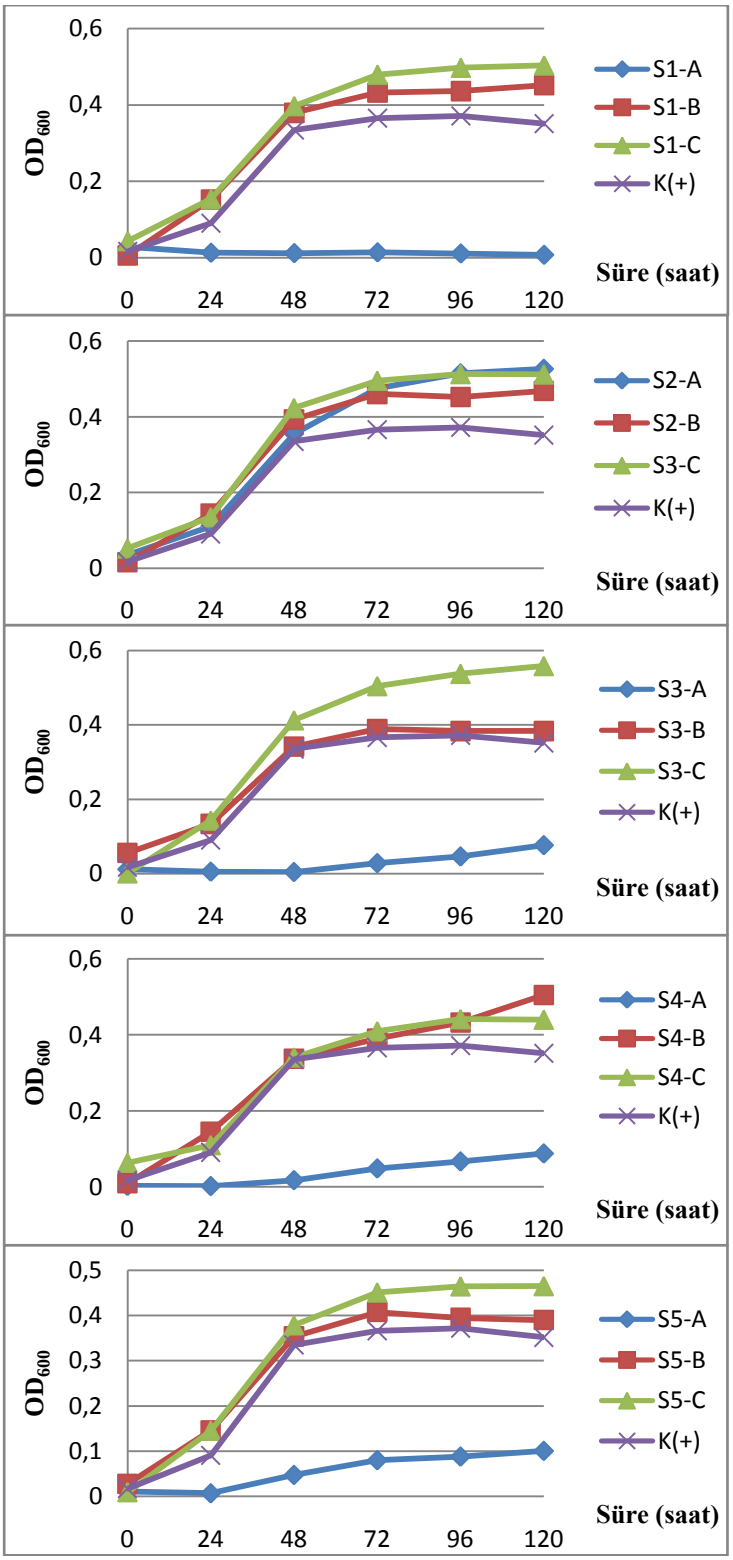
Şekil 2.1: Beş farklı LAB suşundan elde edilen supernatantların *C. krusei* gelişimi üzerine etkisi. Mikroplaka kuyusunda, *C. krusei* başlangıç konsantrasyonu yaklaşık $1{,}4\times10^3$ hücre/ml. 0, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde abs. ölçümü.

Ölçümler 0'dan 120. saate kadar 24 saat aralıklarla gerçekleştirilmiştir. A grubu supernatantların (S2-A hariç) kontrol ile kıyaslandığında, gösterdiği antimikrobiyal

etkinin yoğun olduğu görülmektedir. S1-A etkisi 24. saatte sıfıra yaklaşmış ve inkübasyon süresince yükselmemiştir. Bu durum, maya gelişiminin tamamen inaktive edildiğini göstermektedir. S3-A, S4-A ve S5-A etkileri de 24. saatte sıfıra yakın değerleri gösterirken, sonraki ölçümlerde artış göstermiştir. Ancak maya gelişimi kontrol grubunun yine de çok altında değerlerde izlemektedir. Buna göre, S3-A, S4-A ve S5-A supernatant solüsyonlarının maya gelişimi üzerine önemli ölçüde etkisi bulunmaktadır. Kontrol ile kıyaslandığında, *C. krusei* gelişiminde lag fazının uzadığı, büyüme seviyesinin ise önemli ölçüde azaldığı görülmektedir. B ve C grubuna ait kuyularda maya gelişiminin olduğu ve hatta kontrol kuyusundaki maya gelişimi değerinin biraz üstüne çıktığı görülmektedir. Örneğin 72, 96 ve 120. saatlerde, K(+) OD_{600} değeri 0,295; 0,356 ve 0,409 ölçülürken; B ve C kuyularının OD_{600} değerleri, bu ölçüm saatleri için, büyük çoğunlukla belirtilen değerlerin üstünde çıkmıştır. Kontrol gelişim eğrisinin üzerinde çıkan değerler değerlendirmeye alınmamıştır.

4.1.2 Laktik asit bakterilerinden elde edilen supernatantların *C. lusitaniae* gelişimi üzerine etkisi

Laktik asit bakterilerinden izole edilen A, B ve C grubu supernatantların antimaya etkileri Şekil 4.2'de verilmiştir. Maya gelişimi 0-120. saat aralığında 24 saatte bir ölçülmüştür. Mikroplaka kuyusunda *C. lusitaniae* başlangıç konsantrasyonu yaklaşık 3×10^3 hücre/ml'dir. S1-A supernatantı *C. lusitaniae* gelişimini 24 saat içinde sıfıra yakın değerlere düşürmüştür ve 120 saat boyunca gelişim olmamıştır. S1-A'nın *C. lusitaniae* gelişimi üzerine güçlü antimaya etki gösterdiği görülmektedir. S3-A, S4-A ve S5-A gruplarında antimikrobiyal etki altındaki gelişim eğrileri kontrol grubunun çok altında değerlerdedir. Örneğin 72. saatte S3-A, S4-A ve S5-A gruplarında maya gelişimi OD_{600} değerleri 0,028; 0,048 ve 0,080 olarak ölçülürken, K(+) için aynı saat ölçümü 0,366 bulunmuştur. S2-A, S2-B ve S2-C gruplarında değerler yüksek bulunmuştur, hatta K(+) değerinin üstünde değerlere ulaşmıştır. Şekil 4.2 incelendiğinde, A grubunda (S2-A hariç) organik asitlerin sebep olduğu animaya etkisi açıkça görülmektedir.

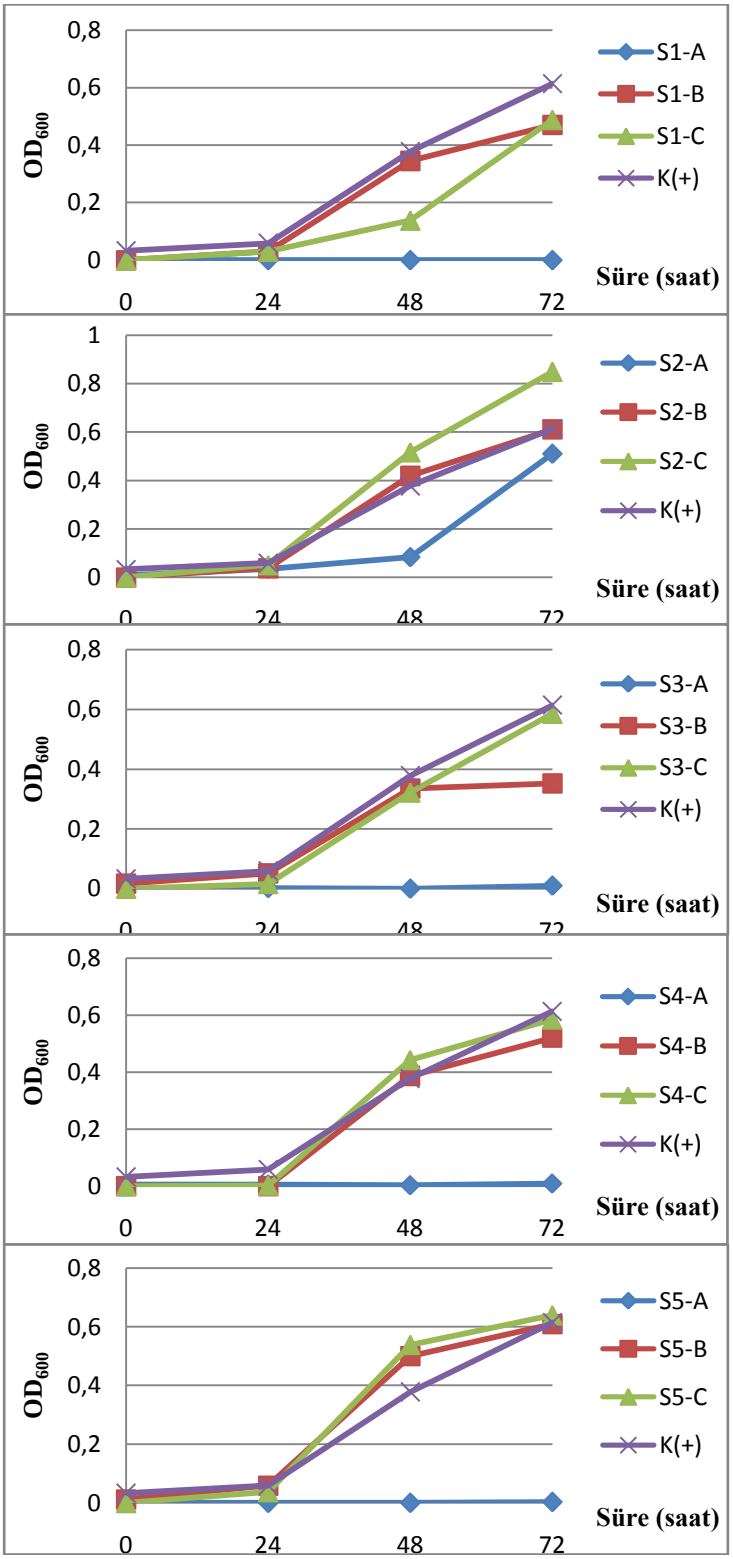


Şekil 4.2: Beş farklı LAB suşundan elde edilen supernatantların *C. lusitaniae* gelişimi üzerine etkisi. Mikroplaka kuyusunda, *C.lusitaniae* başlangıç konsantrasyonu yaklaşık 3×10^3 hücre/ml. 0, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde abs. ölçümü.

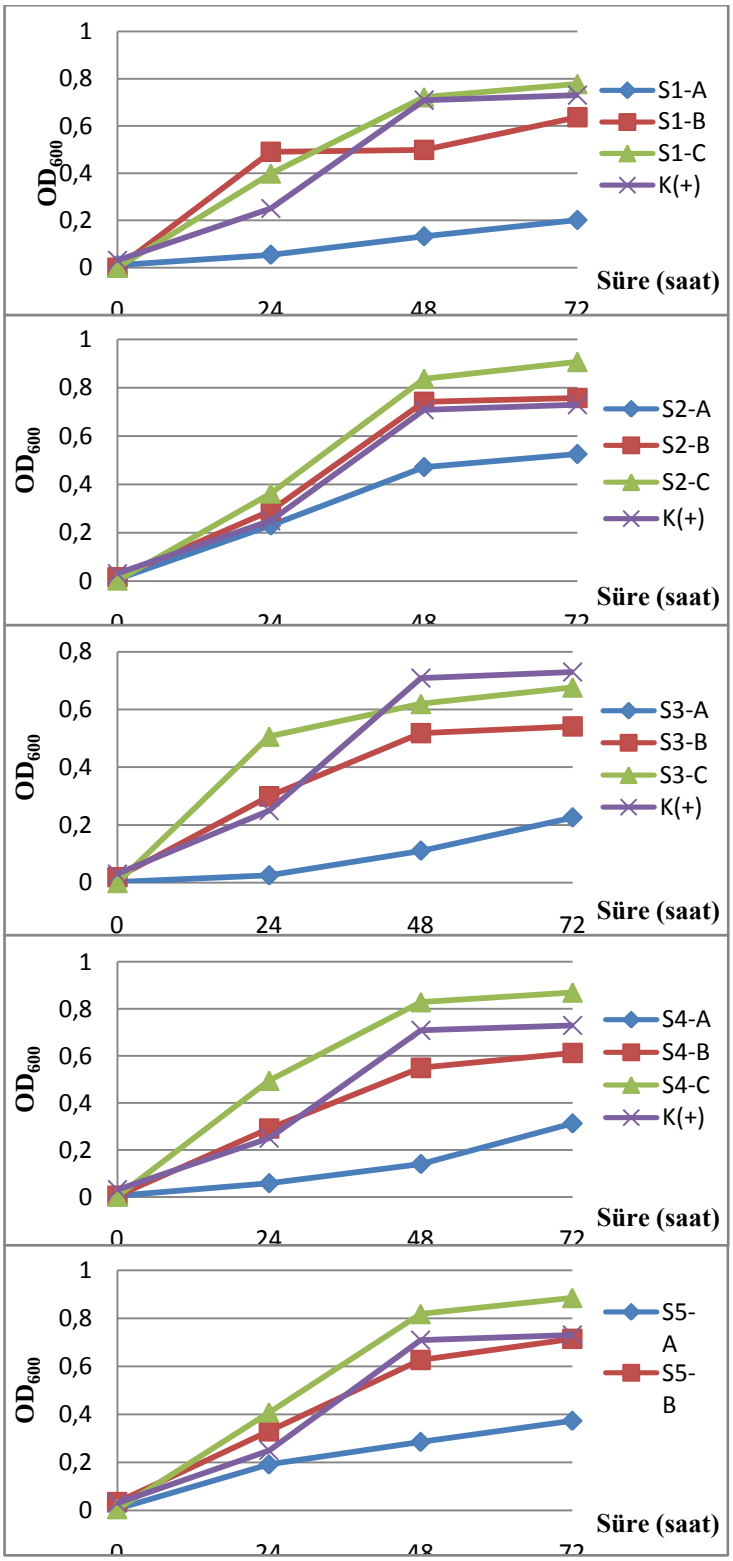
4.1.3 Laktik asit bakterilerinden elde edilen supernatantların *C. parapsilosis* gelişimi üzerine etkisi

Laktik asit bakterilerinden izole edilen supernatantların *C. parapsilosis*'in iki farklı başlangıç konsantrasyonu (yaklaşık 3×10^3 ve 5×10^5 hücre/ml) üzerine antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. Sonuçlar sırasıyla Şekil 4.3 ve Sekil 4.4'te verilmiştir. Ölçümler 0-72. saat aralığında yapılmıştır. Şekil 4.3 incelendiğinde, S1-A'nın inaktivasyon eğrisinde yükselme görülmemektedir. S1-A supernatantı başlangıç konsantrasyonu düşük tutulduğunda maya kültürü üzerinde güçlü bir etki göstermektedir. Bunun yanında, S3-A, S4-A ve S5-A'da da 72 saat boyunca inaktivasyon eğrisinde gelişim gözlenmemektedir. Bu durum, *C. parapsilosis* ekimindeki başlangıç konsantrasyonu 3×10^3 hücre/ml olduğunda, *L. brevis* suşları toplam supernatantının içerdiği antimikrobiyal maddenin etkili olduğunu göstermektedir. S2-A kuyusunda OD_{600} ölçümü 48. saatte 0,083 gibi düşük bir değerdeyken 72. saatte 0,510'a yükselmiştir. K(+)'in 48 ve 72. saat OD_{600} ölçüm değerleri sırasıyla 0,378 ve 0,614'tür. İnaktivasyon eğrisi incelendiğinde S2-A etkisinin olduğu ve maya gelişim seviyesinde azalmayla sonuçlandığı görülmektedir. 72. saat sonuçlarına bakıldığında, C grubu maya gelişimi B grubundan fazla olmuştur. Bu eğriler kontrol eğrilerinin üzerinde değerlerde olduğundan değerlendirme yapılmamaktadır.

Mikroplaka kuyusuna *C. parapsilosis* 5×10^5 hücre/ml başlangıç konsantrasyonunda ekildiğinde oluşan antimaya etkisi sonuçları Şekil 4.4'te incelenmiştir. *C. parapsilosis*'in 72. saatte K(+) kuyusundaki absorbans değeri Şekil 4.3'te 0,614; Şekil 4.4'te ise 0,730'dur. Başlangıç konsantrasyonu artırıldığında maya gelişim seviyesinde bir yükselme olduğu görülmektedir. S1-A'nın 72. saatteki absorbans değerine (0,202) bakıldığında, antimikrobiyal metabolitlerinin toplam etkisinin 5×10^5 hücre/ml başlangıç konsantrasyonundaki *C. parapsilosis* inaktivasyonu için yeterli olmadığı görülmektedir. S1-A, S2-A, S3-A, S4-A ve S5-A absorbans değerleri K(+) değerinin altındadır. Bu değerler 72. saat için sırasıyla, 0,202; 0,526; 0,226; 0,313 ve 0,373 olarak belirlenmiştir. İnaktivasyon eğrilerinde 72 saatte ulaşılan değerlere göre, işlem görmemiş supernatantların antimaya etkisi güçlüden zayıfa doğru sıralandığında, S1-A (*L. pentosus*), S3-A *(L. brevis 2*), S4-A (*L. brevis 1*), S5-A (*L. brevis 3*) ve S2-A (*L. plantarum*) şeklindedir.



Şekil 4.3: Beş farklı LAB suşundan elde edilen supernatantların *C. parapsilosis* gelişimi üzerine etkisi. Mikroplaka kuyusunda, *C. parapsilosis* başlangıç konsantrasyonu yaklaşık 3×10^3 hücre/ml. 0, 24, 48 ve 72. saatlerde abs. ölçümü.



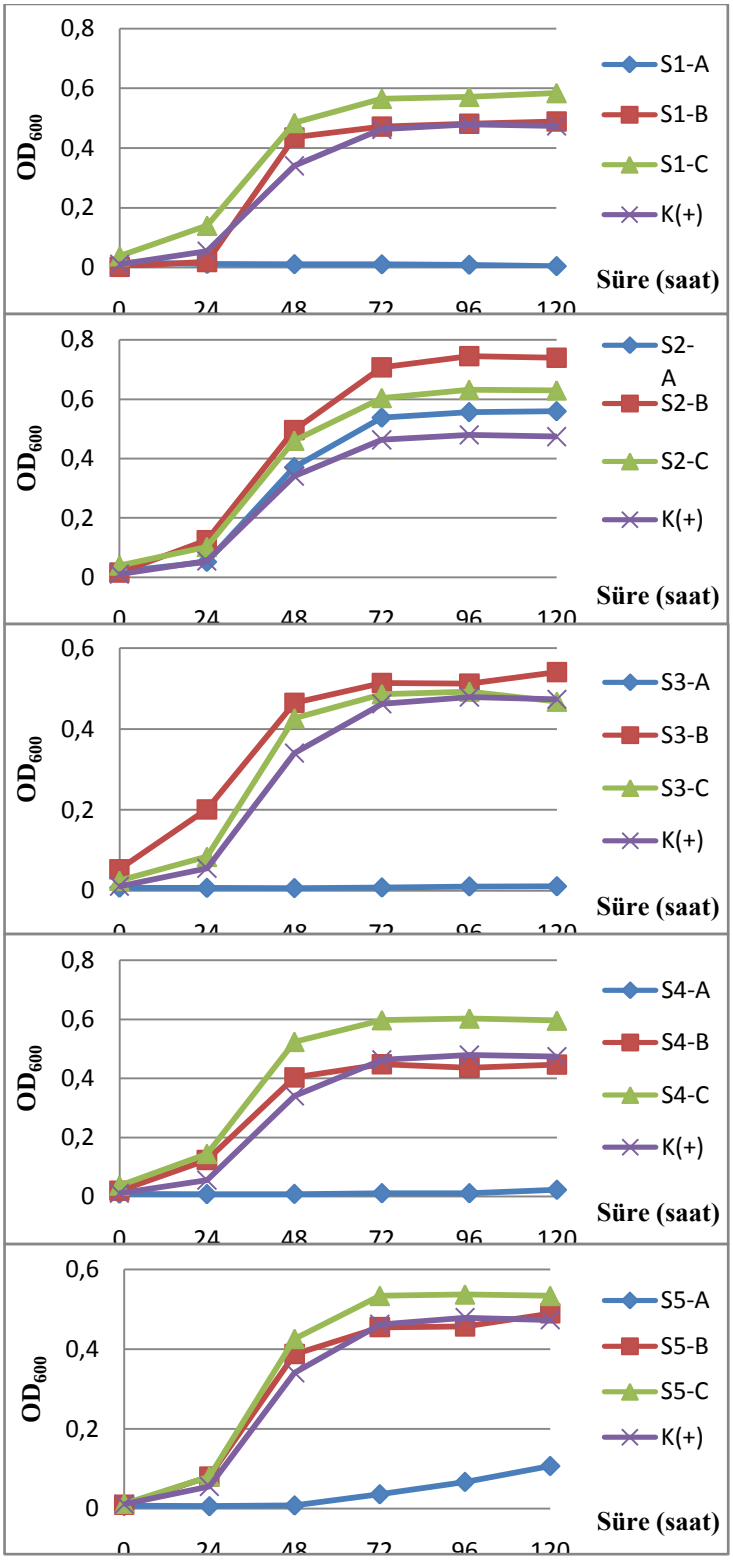
Şekil 4.4: Beş farklı LAB suşundan elde edilen supernatantların *C. parapsilosis* gelişimi üzerine etkisi. Mikroplaka kuyusunda, *C. parapsilosis* başlangıç konsantrasyonu yaklaşık 5×10^5 hücre/ml. 0, 24, 48 ve 72. saatlerde abs. ölçümü.

4.1.4 Laktik asit bakterilerinden elde edilen supernatantların *C. zeylanoides* gelişimi üzerine etkisi

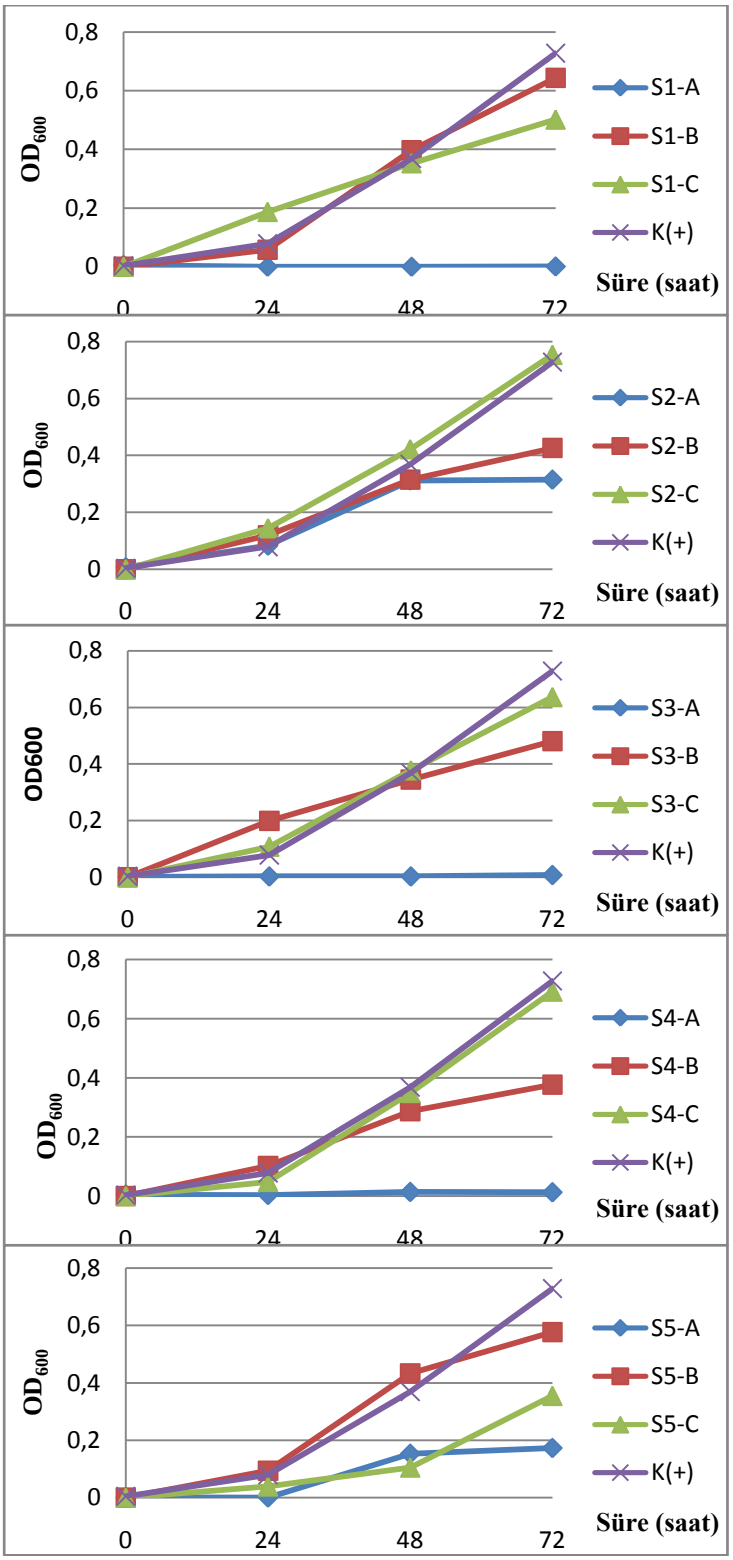
LAB supernatantlarının *C. zeylanoides* üzerine antimaya etkisini incelemek için 0-120 saat aralığında 24 saatte bir ölçümler yapılmıştır. Mikroplaka kuyularında *C. zeylanoides* başlangıç hücre konsantrasyonu yaklaşık $1,3\times10^3$ hücre/ml'dir. Şekil 4.5'te, S1-A, S3-A ve S4-A inaktivasyon eğrilerinde gelişim görülmemiştir. *L. pentosus, L. brevis* 2 ve *L. brevis* 1 suşlarına ait toplam supernatantların *C. zeylanoides* gelişimi üzerine etkisi güçlüdür. Bu etki büyük ölçüde organik asitlerden kaynaklanmaktadır. S5-A'da inaktivasyon eğrisinin 48. saate kadar sıfır değerinde olduğu, kontrol eğrisiyle kıyaslandığında gelişim düzeyinin önemli ölçüde düştüğü ve 120. saatte absorbans değerinin ancak 0,107'ye ulaştığı görülmüştür. K(+)'nın 72, 96 ve 120. saatlerde OD_{600} ölçümleri sırasıyla 0,4625; 0,4790 ve 0,4735'dur. Gelişimin 72. saate durağan faz içersinde olduğu görülmektedir. S2-A kuyusunda toplam supernatantın antimaya etkisi görülmemektedir. B ve C gruplarındaki maya gelişimleri kontrol maya gelişiminden yüksek çıkmıştır. Bu sebeple B ve C gruplarına ait inaktivasyon eğrileri değerlendirmeye alınmamıştır.

4.1.5 Laktik asit bakterilerinden elde edilen supernatantların *D. hansenii* gelişimi üzerine etkisi

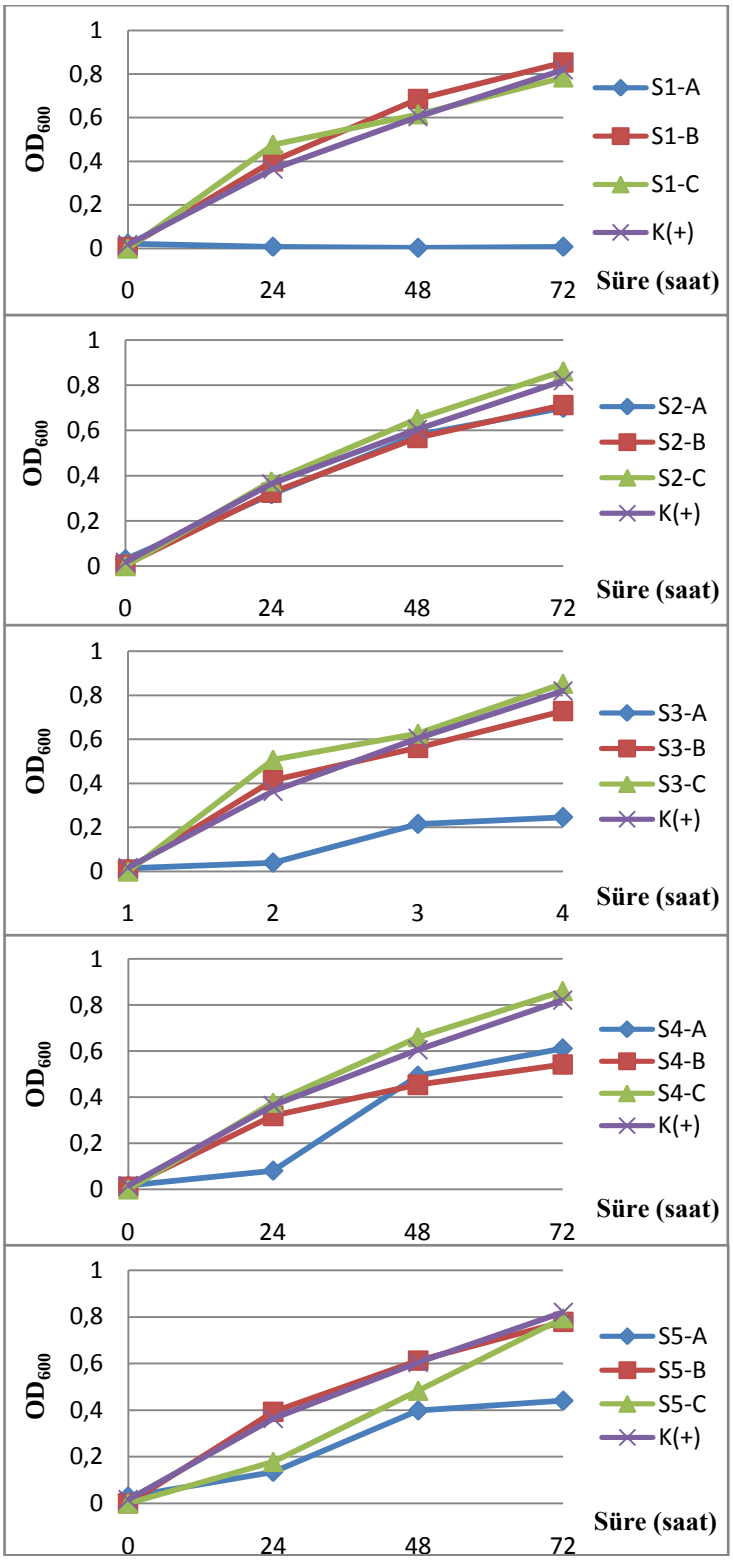
Şekil 4.6 ve Şekil 4.7, laktik asit bakterilerinden izole edilen supernatantların *D. hansenii* üzerine antimaya etkisini göstermektedir. 0-72 saat aralığında 24 saatte bir mikroplaka okuyucuda ölçümler yapılmıştır. Şekil 4.6, mikroplaka kuyusunda yaklaşık 2×10^3 hücre/ml başlangıç konsantrasyonu ile yapılan deneyin, Şekil 4.7 ise 2×10^5 hücre/ml başlangıç konsantrasyonlu deneyin OD_{600} ölçüm sonuçlarını vermektedir. Şekil 4.6 ve 4.7'de 72. saat için K(+) absorbans değerleri sırasıyla 0,728 ve 0,820'dir. S1-A için her iki şekilde de absorbans ölçümleri sıfıra çok yakındır. Şekil 4.6'da S3-A ve S4-A'da absorbans ölçüm sonuçları sıfıra yakın değerlerdir. S5-A'da ise 48. saatten sonra maya gelişimi görülmektedir. B ve C grubunun (S5-C hariç) K(+) ile kıyaslayınca *D. hansenii* üzerine belirgin bir antimikrabiyal etkisi görülmemektedir. S5-C kuyusuna ait absorbans ölçümü 72. saatta 0,355'tir. Şekil 4.7'de OD_{600} sonuçları başlangıç konsantrasyonu daha yüksek olduğu için Şekil 4.6'ya göre daha yüksek değerler vermiştir. Şekil 4.7'de S3-A, S4-A ve S5-A toplam supernatantlarındaki antimaya etkinin daha zayıf kaldığı gösterilmektedir.



Şekil 4.5: Beş farklı LAB suşundan elde edilen supernatantların *C. zeylanoides* gelişimi üzerine etkisi. Mikroplaka kuyusunda, *C. zeylanoides* başlangıç konsantrasyonu yaklaşık $1,3\times10^3$ hücre/ml. 0, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde abs. ölçümü.



Şekil 4.6: Beş farklı LAB suşundan elde edilen supernatantların *D. hansenii* gelişimi üzerine etkisi. Mikroplaka kuyusunda, *D. hansenii* başlangıç konsantrasyonu yaklaşık 2×10^3 hücre/ml. 0, 24, 48 ve 72. saatlerde abs. ölçümü.

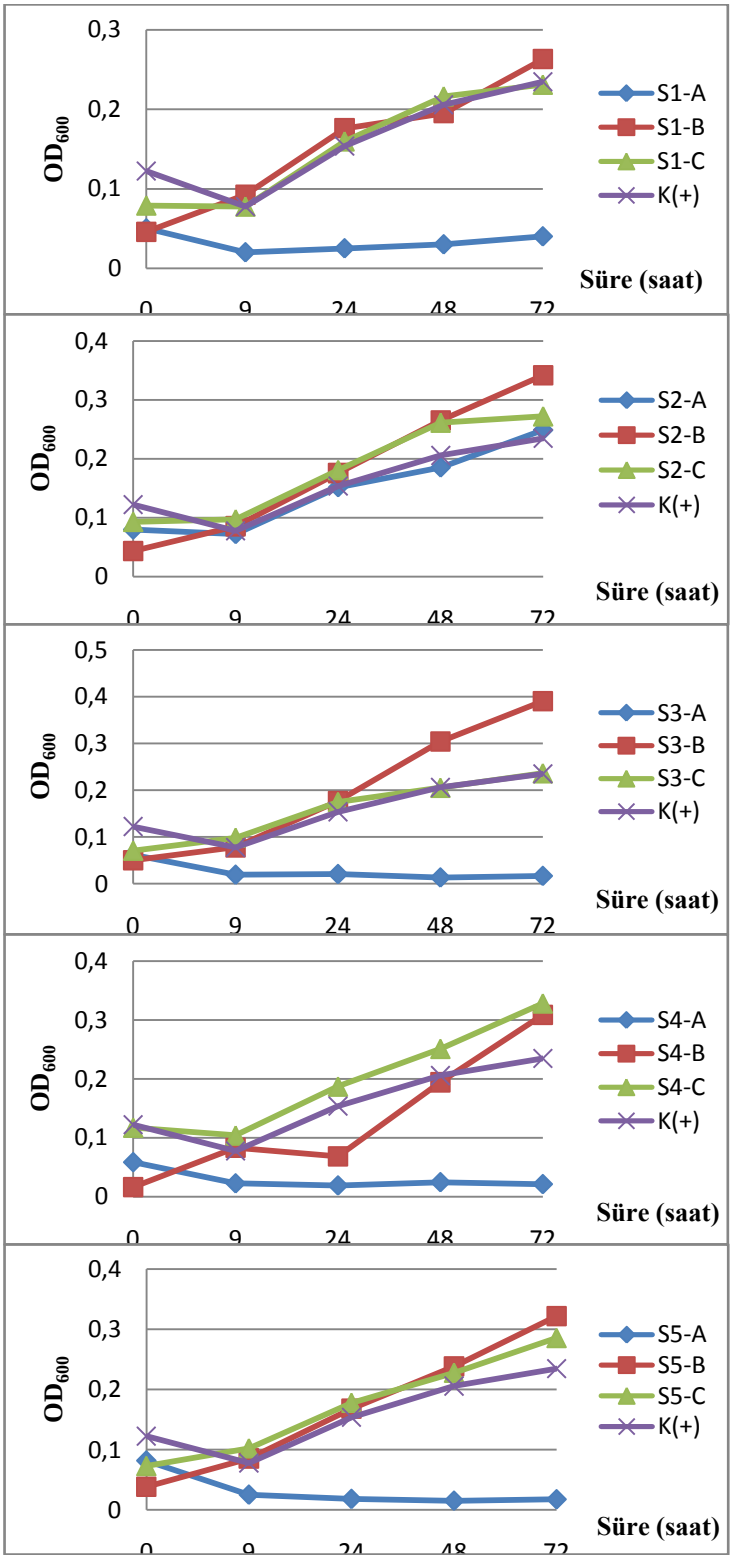


Şekil 4.7: Beş farklı LAB suşundan elde edilen supernatantların *D. hansenii* gelişimi üzerine etkisi. Mikroplaka kuyusunda, *D.hansenii* başlangıç konsantrasyonu yaklaşık 2×10^5 hücre/ml. 0, 24, 48 ve 72. saatlerde abs. ölçümü.

4.1.6 Laktik asit bakterilerinden elde edilen supernatantın *R. mucilaginosa* gelişimi üzerine etkisi

R. mucilaginosa gelişimi üzerine LAB supernatantlarının etkisinin absorbans ölçüm sonuçları Şekil 4.8'de verilmiştir. Mikroplaka kuyusunda, *R. mucilaginosa* başlangıç konsantrasyonu yaklaşık $3,5\times10^5$ hücre/ml'dir. 0, 9, 24, 48 ve 72. saatlerde ölçümler yapılmıştır. S1-A, S3-A, S4-A ve S5-A'nın 72. saatteki absorbans değerlerine bakıldığında (sırasıyla 0,042; 0,017; 0,021 ve 0,018), toplam supernatantın antimaya etkisi açıkça görülmektedir. Antimaya etki organik asitlerden kaynaklanmaktadır. H_2O_2 ve bakteriyosin etkisi gözlenmemiştir. K(+)'da 72. saatte OD_{600} ölçüm sonucu ise 0,235'tir. S2-A'da (0,249) antimikrobiyal etki zayıftır.

Bölüm 4.1'de verilen sonuçlar genel olarak değerlendirilecek olursa, S1-A sonuçlarında önemli bir antimaya etkisi görülmüştür. Bu grup *L. pentosus*'a ait supernatantın toplam etkisidir. Özellikle mikroplaka kuyusunda başlangıç konsantrasyonu yaklaşık 10^3 hücre/ml olduğunda sıfıra çok yakın değerler elde edilmiş ve inaktivasyon eğrilerinde maya gelişiminin baskılandığı görülmektedir. Başlangıç konsantrasyonu (*C. parapsilosis*) yaklaşık 10^5 hücre/ml olduğunda antimaya etkisi zayıflamaktadır. Fakat başlangıç konsantrasyonu yüksek de olsa *D. hansenii* gelişimi üzerine S1-A etkisi olmuştur ve inaktivasyon eğrisinde yükselme görülmemiştir. *R. mucilaginosa*'nın S1-A sonucunda, başlangıç hücre konsantrasyonunun ($3,5\times10^5$ hücre/ml) zamanla azaldığı ancak sıfırlanmadığına dikkat edilmiştir. S1-A supernatantı nötralize edilip katalaz eklendiğinde antimaya etkisinde düşüş tespit edilmiştir. Antimaya etkisinin büyük ölçüde organik asitlerden kaynaklandığı görülmektedir. *L. plantarum*'a ait S2-A supernatantının antimaya etkisi her maya türü için zayıf bulunmuştur. *L. brevis* suşlarına ait S3-A, S4-A ve S5-A gruplarında ise antimaya etkisi vardır. Bu suşlar sırasıyla, *L. brevis* 2, 1 ve 3'tür. Genellikle *L. brevis* 2'nin antimaya aktivitesi *L. brevis* 1'den; *L. brevis* 1'inki ise *L. brevis* 3'ten etkili bulunmuştur. Bu suşlara ait A grubu supernatantlarda gelişim hızı azaltılmıştır, ancak antimaya etkisi S1-A'daki kadar güçlü değildir. Ayrıca genellikle bütün maya suşlarında B ve C gruplarındaki absorbans değerleri, K(+)'e ait absorbans değerlerinden yüksek çıkmıştır. Kontrol değerinin üzerinde çıkan bu inaktivasyon eğrileri değerlendirmeye alınmamıştır. Sonuç olarak, LAB supernatantlarının antimaya etkisinin H_2O_2 ve bakteriyosinden kaynaklanmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.8: Beş farklı LAB suşundan elde edilen supernatantların *R. mucilaginosa* gelişimi üzerine etkisi. Mikroplaka kuyusunda, *R. mucilaginosa* başlangıç konsantrasyonu yaklaşık $3,5\times10^5$ hücre/ml. 0, 9, 24, 48 ve 72. saatlerde abs. ölçümü.

4.2 *L. pentosus*'tan Elde Edilen Toplam Supernatantın Farklı Maya Türleri Üzerine Etkisi

Bölüm 4.1'de *L. pentosus, L. plantarum* ve üç farklı *L. brevis* suşundan izole edilen supernatantların toplam etkisi (A), nötralize edilmiş haldeki etkisi (B) ve nötralize edilip katalaz eklenmiş durumdaki antimaya etkisi (C), altı farklı maya türü üzerinde mikroplaka okuma tekniği kullanılarak denenmiştir. Bu ön tarama işleminde elde edilen OD_{600} değerleri incelenmiştir. *L. pentosus*'a ait supernatantın toplam etkisinin (A) güçlü olduğu, yaklaşık 10^3 CFU/ml maya başlangıç konsantrasyonunda maya gelişimini inaktive ettiği görülmüştür.

Deneyin bundan sonraki kısmına, *L. pentosus* supernatantının toplam haldeki antimaya etkisi ile ilişkili olarak devam edilmiştir. *L. pentosus*'tan elde edilen toplam supernatantın *C. krusei, C. lusitaniae, C. parapsilosis, C. zeylanoides, D. hansenii* ve *R. mucilaginosa* gelişimi üzerine etkisinin ayrıntılı araştırılması deneyinde, mikroplaka ölçüm tekniği ve agar plaka üzerinde koloni sayım tekniği olmak üzere iki farklı metot kullanılmıştır. Bu deneyle ilgili sonuçlara aşağıda yer verilmiştir.

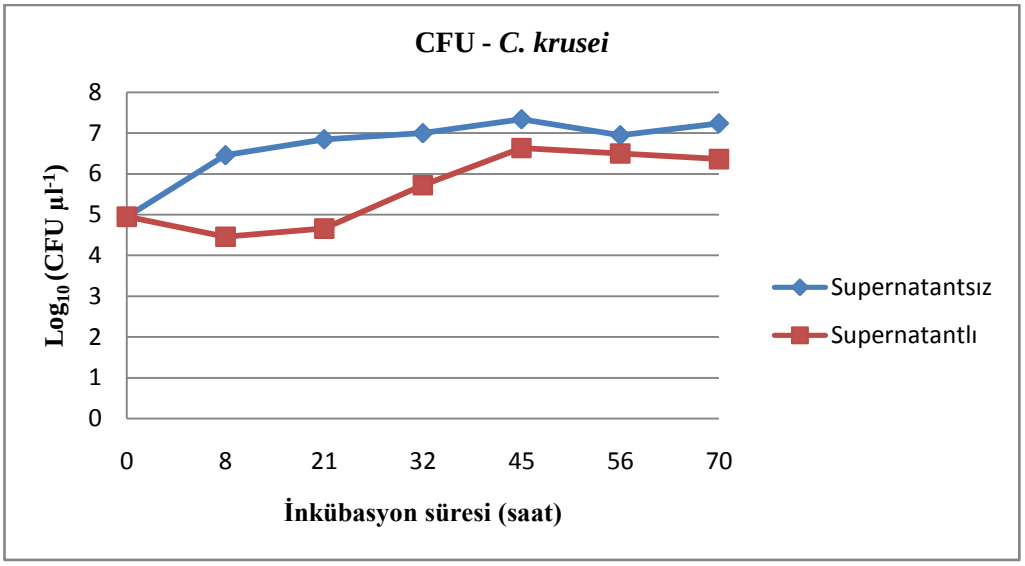
Aşağıda, herbir maya türüyle ilgili ikişer şekil bulunmaktadır. Bunlardan birincisi koloni sayım tekniği sonuçlarını, ikincisi ise mikroplaka okuyucusu ile ölçülen OD_{600} sonuçlarını vermektedir. Her iki deney için de ölçümler 0, 8, 21, 32, 45, 56 ve 70. saatlerde gerçekleştirilmiştir.

4.2.1 *L. pentosus*'tan elde edilen toplam supernatantın *C. krusei* gelişimi üzerine etkisi

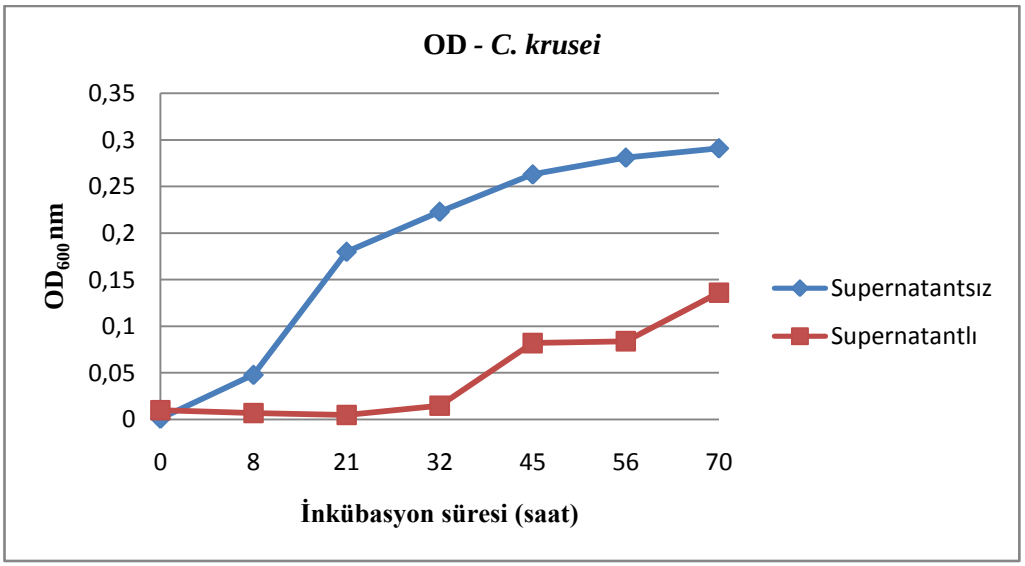
L. pentosus'dan elde edilen supernatantın *C. krusei* gelişimi üzerine antimaya etkisi koloni sayımı metodu ile ölçülmüştür. Sonuçlar Şekil 4.9'da gösterilmektedir. *C. krusei* büyüme eğrisi (♦) incelendiğinde, herhangi bir antimikrobiyal madde eklenmeden 10^5 CFU/ml'den 10^7 CFU/ml üzerinde değerlere kadar hücre sayısında artış olmuştur. Supernatant eklendiğinde ise hücre sayısının ilk 8 saatte 10^5 hücre/ml değerinin altına düştüğü, 21. saatten sonra ise yükselme gösterdiği görülmüştür. Bu yükselmeye rağmen, inaktivasyon eğrisinin normal büyüme eğrisinin altında kaldığı, lag fazının uzadığı ve durağan faz seviyesinde azalma olduğu görülmektedir.

Mikroplaka kuyularında 10^5 CFU/ml başlangıç konsantrasyonu olan *C. krusei*'nin gelişimi mikroplaka okuyucu ile 600 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Supernatantsız

maya gelişim eğrisi 8. saatten sonra maya gelişiminin logaritmik faza girdiğini göstermektedir (Şekil 4.10). Supernatant eklenmiş hali gösteren inaktivasyon eğrisinde (■) 0-32 saat aralığında oluşan değişimler çok belirgin gözlenememektedir. Fakat 32. saatten sonra maya absorbans değerinde belirgin bir artış olmuştur. Mikroplaka okuyucunun okuma yapması için maya hücrelerinin yaklaşık 10^6 CFU/ml konsantrasyonun üzerinde olması gerekmektedir. Bu sebeple, absorbans ölçümü ile elde edilen sonuçlarda, inaktivasyon eğrisinde ilk 32 saatte, ortamda hücreler bulunduğu halde bu seviye gözlenememektedir.



Şekil 4.9: *C. krusei* gelişimi üzerine antimaya etki. Koloni sayımı.



Şekil 4.10: *C. krusei* gelişimi üzerine antimaya etki. Optik yoğunluk.

4.2.2 *L. pentosus*'tan elde edilen toplam supernatantın *C. lusitaniae* gelişimi üzerine etkisi

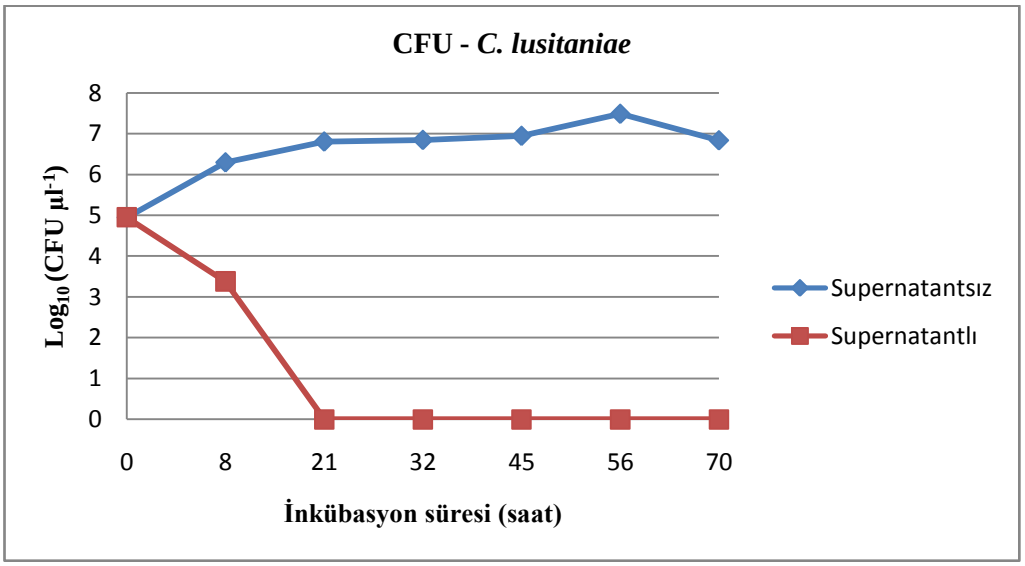
Şekil 4.11 ve 4.12, *C. lusitaniae*'nin supernatant eklenmemiş ve eklenmiş haldeki gelişim eğrilerini göstermektedir. *C. lusitaniae* başlangıç hücre konsantrasyonu 10^5 CFU/ml'dir. Normal gelişim eğrisinde (♦) hücre konsantrasyonunun 56. saat civarında 10^7 CFU/ml'nin üzerine çıktığı görülmektedir. Supernatant eklendiğinde oluşan inaktivasyon eğrisi (■), hücre konsantrasyonunda hızlı bir düşüş olduğunu göstermektedir. 21. saate bakıldığında hücre sayısı sıfırdır. Sonraki saatlerde yapılan ölçümlerde gelişim görülmemekte ve supernatantın antimaya aktivitesi sürmektedir. Şekil 4.9'da başlangıç miktarı aynı olan *C. krusei* aynı miktardaki antimikrobiyal supernatant ile inkübe edildiğinde, bu mayanın ortama dayanıklılık gösterdiği görülmektedir. *C. lusitaniae* suşu, *C. krusei*'ye göre daha hassastır.

Şekil 4.12'de, antimaya etki optik yoğunluk sonuçlarına göre görülmektedir. Buna göre, normal gelişim eğrisinde 8. saatten sonra maya kültürü logaritmik büyüme evresine girmiştir. İnaktivasyon eğrisi incelendiğinde, 21. saate kadar olan hücre konsantrasyon düşüşü takip edilemese de eğrinin tamamına bakıldığında antimaya etkisi görülmektedir. Mikroplaka kuyusundaki hücre miktarı 10^6 CFU/ml'den küçük değerlerde olduğu için mikroplaka okuyucusu ile optik yoğunluk okunamamaktadır.

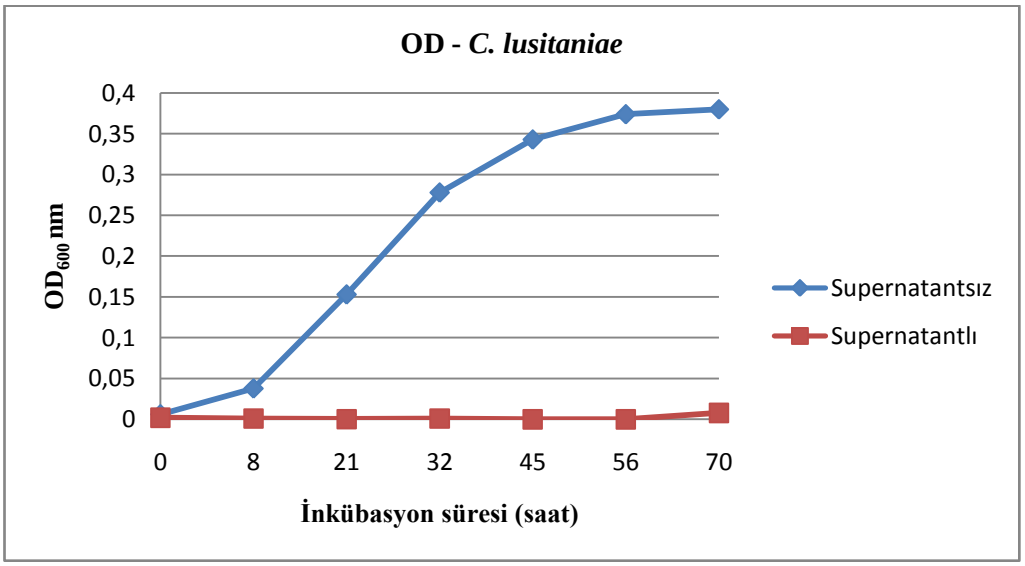
4.2.3 *L. pentosus*'tan elde edilen toplam supernatantın *C. parapsilosis* gelişimi üzerine etkisi

C. parapsilosis üzerine supernatantın antimikrobiyal aktivitesi koloni sayım ve absorbans ölçüm teknikleri ile sırasıyla Şekil 4.13 ve 4.14'te gösterilmektedir. Mikroplaka kuyularında *C. parapsilosis* başlangıç konsantrasyonu 10^5 CFU/ml'den azdır. Supernatant eklendiğinde antimaya etkisi görülmüş ve 8. saate kadar hücre konsantrasyonunda düşüş oluşmuştur. Ancak 8. saatten sonra maya hücreleri sayısında artış olmuştur. Şekil 4.13'teki iki eğri kıyaslandığında *C. parapsilosis* üzerine antimaya etkisi açıkça görülmektedir. *C. parapsilosis* inaktivasyon eğrisi seviyesinin normal gelişim eğrinin altında olduğu görülmektedir. Bu durum antimaya etkinin varlığını göstermektedir. Büyüme eğrisiyle kıyaslandığında, inaktivasyon eğrisinde lag fazının uzadığı ve 45. saatte durağan faza ulaşıldığında 1 log düzeyinde bir azalma tespit edilmiştir. *C. parapsilosis*'in aynı başlangıç konsantrasyonuna sahip *C. lusitaniae*'ye göre daha dayanıklı olduğu görülmektedir (Şekil 4.11 ve 4.13).

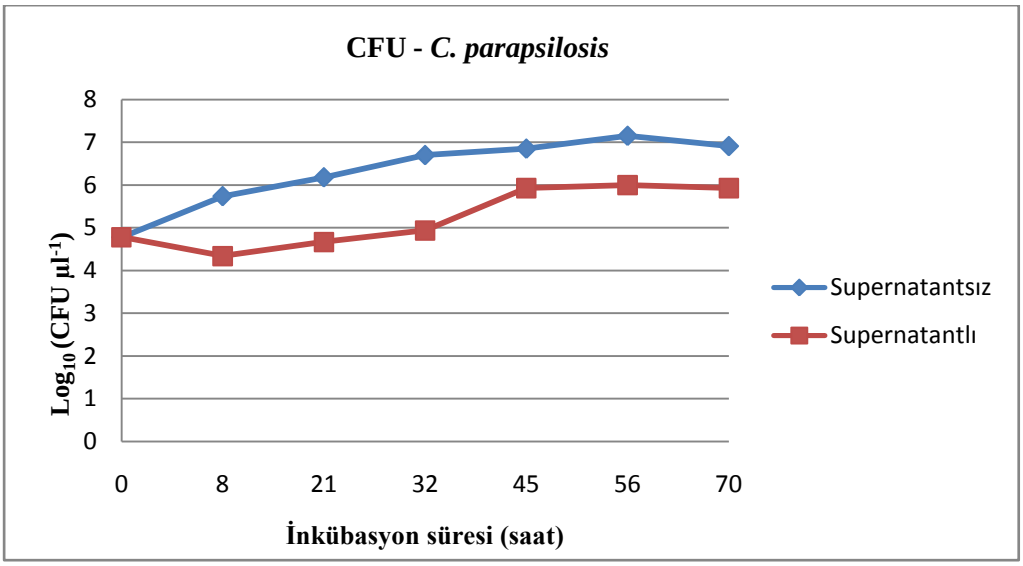
C. parapsilosis'in OD_{600} sonuçları Şekil 4.14'te verilmiştir. Mayanın gelişim eğrisinde, 70. saat sonunda OD_{600} değeri 0,591 olmuştur. Supernatant eklendiğinde antimaya aktivite oluştuğu görülmektedir. Fakat Şekil 4.13'te koloni sayım sonucu sıfır olmadığı halde, Şekil 4.14'te absorbans değerleri sıfır olarak okunmaktadır. Bu durum, mikroplaka okuyucusunun yaklaşık 10^6 CFU/ml konsantrasyonu üzerindeki değerleri ölçebilmesi sonucudur ve hücre konsantrasyonu tayininde bir dezavantaj oluşturmaktadır.



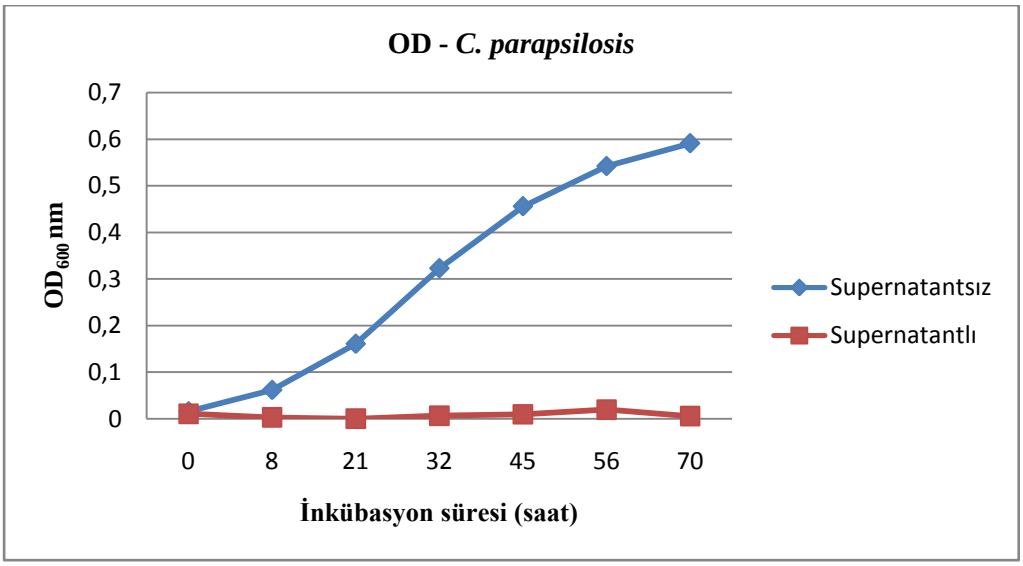
Şekil 4.11: *C. lusitaniae* gelişimi üzerine antimaya etki. Koloni sayımı.



Şekil 4.12: *C. lusitaniae* gelişimi üzerine antimaya etki. Optik yoğunluk.



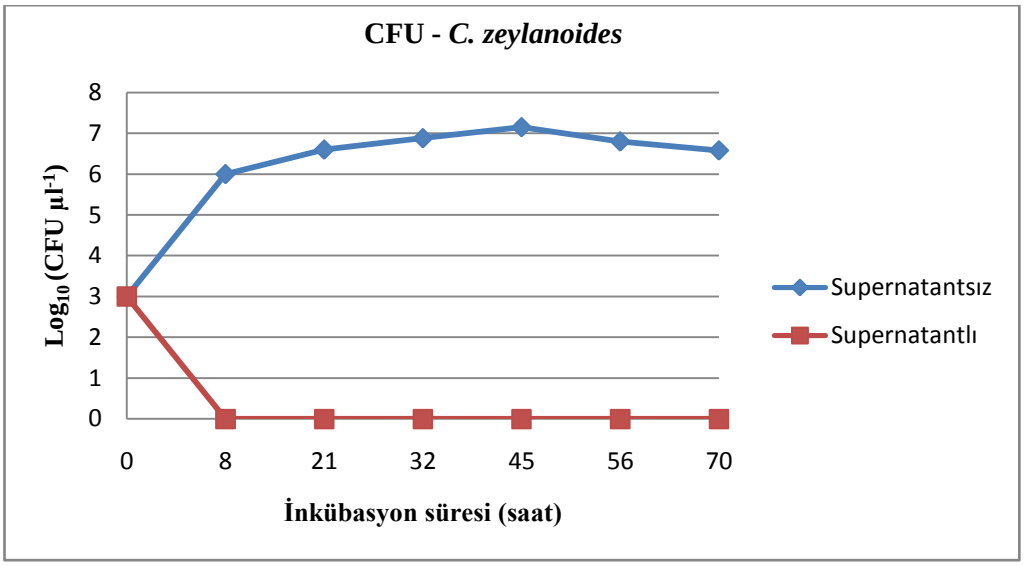
Şekil 4.13: *C. parapsilosis* gelişimi üzerine antimaya etki. Koloni sayımı.



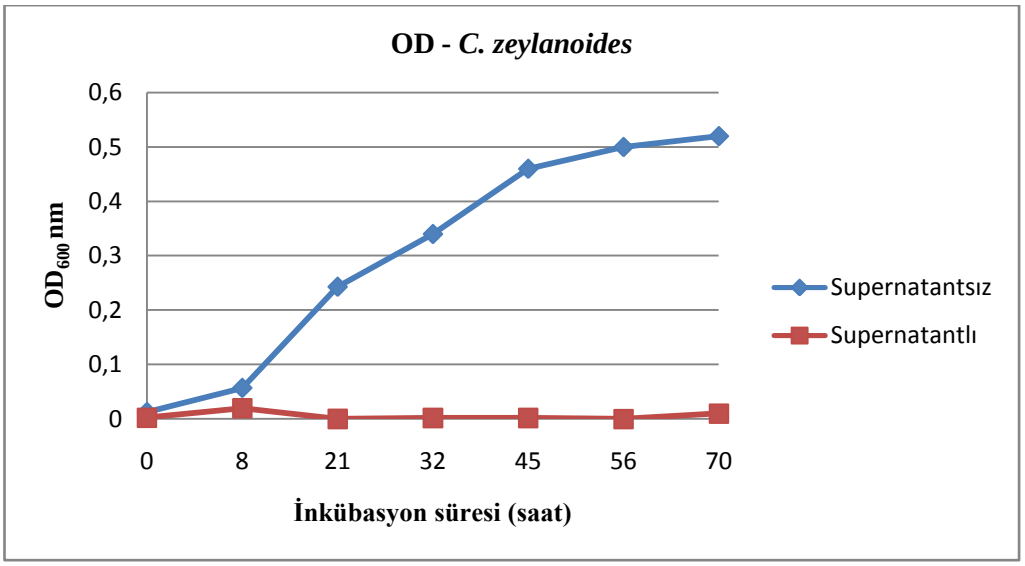
Şekil 4.14:*C. parapsilosis* gelişimi üzerine antimaya etki. Optik yoğunluk.

4.2.4 *L. pentosus*'tan elde edilen toplam supernatantın *C. zeylanoides* gelişimi üzerine etkisi

C. zeylanoides üzerine supernatantın gösterdiği antimaya etki Şekil 4.15 ve 4.16'da verilmiştir. *C. zeylanoides* deneyinde mikroplaka kuyularında başlangıç konsantrasyonu 10^3 CFU/ml'dir. Şekil 4.15'te supernatant eklendiğinde hücre sayısında 8 saat içinde çok hızlı bir düşüş olmuştur. 8 ve sonraki saatlerde yapılan ölçümlerde hücrelerin tamamen öldüğü görülmektedir. Şekil 4.16'da OD_{600} sonuçları incelendiğinde, *C. zeylanoides*'e supernatant eklendiğinde oluşan antimaya etki açıkça görülmektedir. Ancak 0-8 saat aralığında inkübasyon eğrisindeki azalma (Şekil 4.15), optik yoğunluk ölçümünün inkübasyon eğrisinde gözlenememektedir.



Şekil 4.15: *C. zeylanoides* gelişimi üzerine antimaya etki. Koloni sayımı.



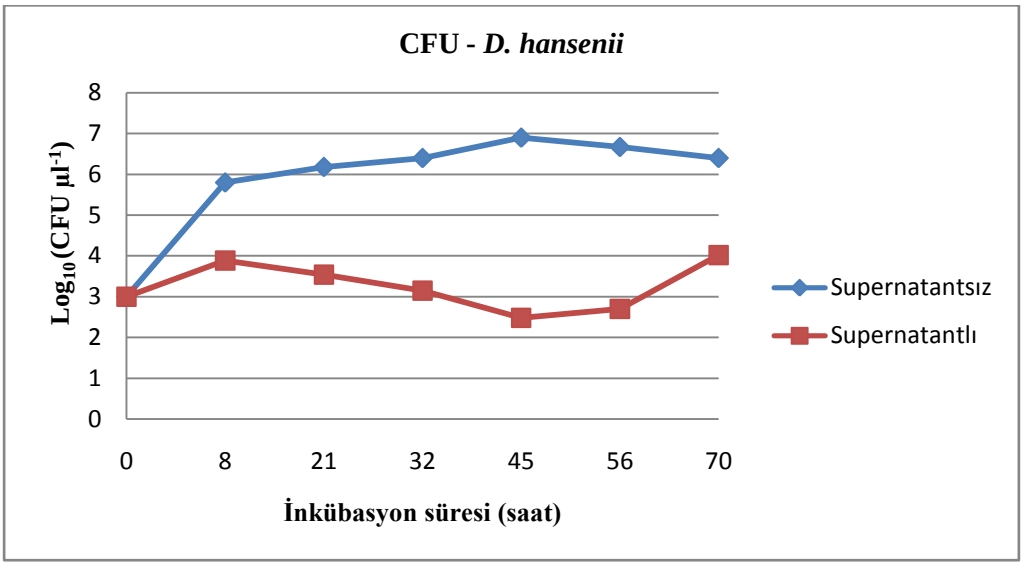
Şekil 4.16: *C. zeylanoides* gelişimi üzerine antimaya etki. Optik yoğunluk.

4.2.5 *L. pentosus*'tan elde edilen toplam supernatantın *D. hansenii* gelişimi üzerine etkisi

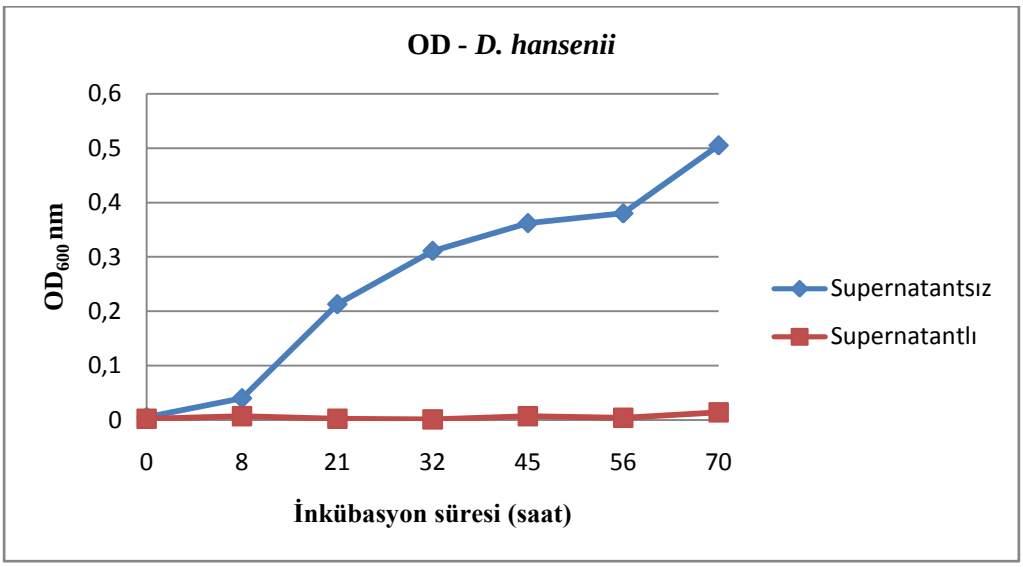
Şekil 4.17 ve 4.18, supernatant eklenmemiş ve eklenmiş halde *D. hansenii* gelişiminin koloni sayımı ve absorbans ölçümü sonuçlarını vermektedir. Mikroplaka kuyularında *D. hansenii* başlangıç konsantrasyonu 10^3 CFU/ml'dir. Şekil 4.17'de supernatant eklendiğinde *D. hansenii* gelişim hızı, eklenmemiş haline göre düşüktür. 8. saatten sonra 45. saate kadar hücre sayısı düşmekte, 45. saatten sonra tekrar artış olmaktadır. Ancak maya hücreleri zamanla ortama adaptasyon geliştirmiştir. Şekil 4.17'deki inaktivasyon eğrisi Şekil 4.15 ile kıyaslandığında; *D. hansenii* ve *C. zeylanoides* türlerinin mikroplaka kuyularındaki başlangıç miktarı 10^3 CFU/ml

olduğu halde, *C. zeylanoides* hücreleri tamamen inaktive olmuştur. *D. hansenii* suşunun *C. zeylanoides*'e göre daha dayanıklı olduğu görülmektedir.

Şekil 4.18, *D. hansenii* gelişimine supernatant etkisinin mikroplaka metodu ile okunan absorbans değerlerini vermektedir. Antimaya etkisini şekilde görmek mümkündür. Ancak supernatant içeren kültürlere ait büyüme eğrisi Şekil 4.17'ye göre daha düzdür. Antimaya etkisinin ayrıntıları (8. saatten sonraki düşüş ve 45. saatten sonraki yükselme) belirgin olarak görülememektedir. Ayrıca, Şekil 4.17'de *D. hansenii* gelişiminin 45. saatten sonra durağan faza girdiği gözlenirken, Şekil 4.18'de (45. saate gelindiğinde maya gelişimi durağan faza girse de) 56. saatten sonra absorbans değeri yükselmiştir.

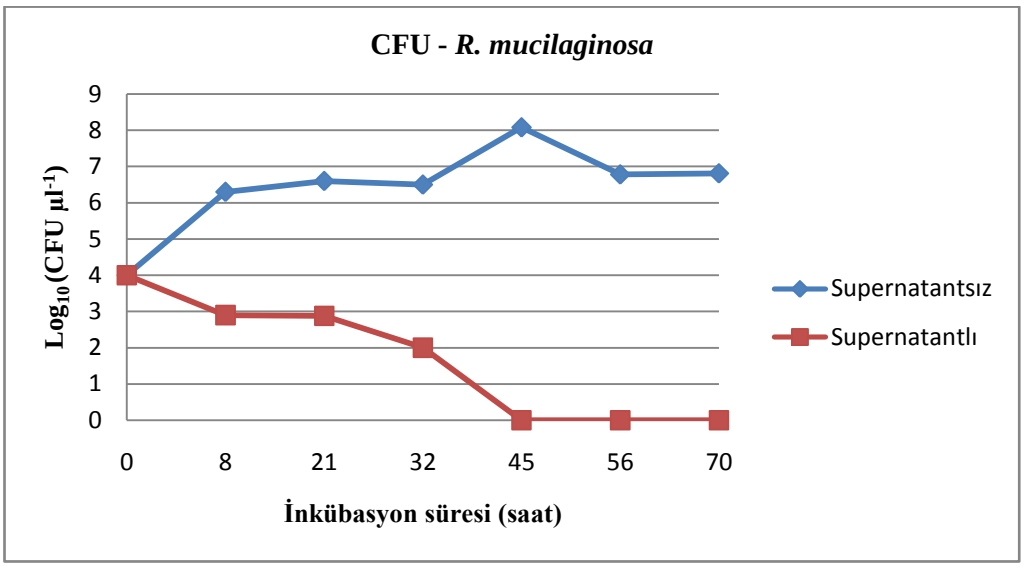


Şekil 4.17: *D. hansenii* gelişimi üzerine antimaya etki. Koloni sayımı.

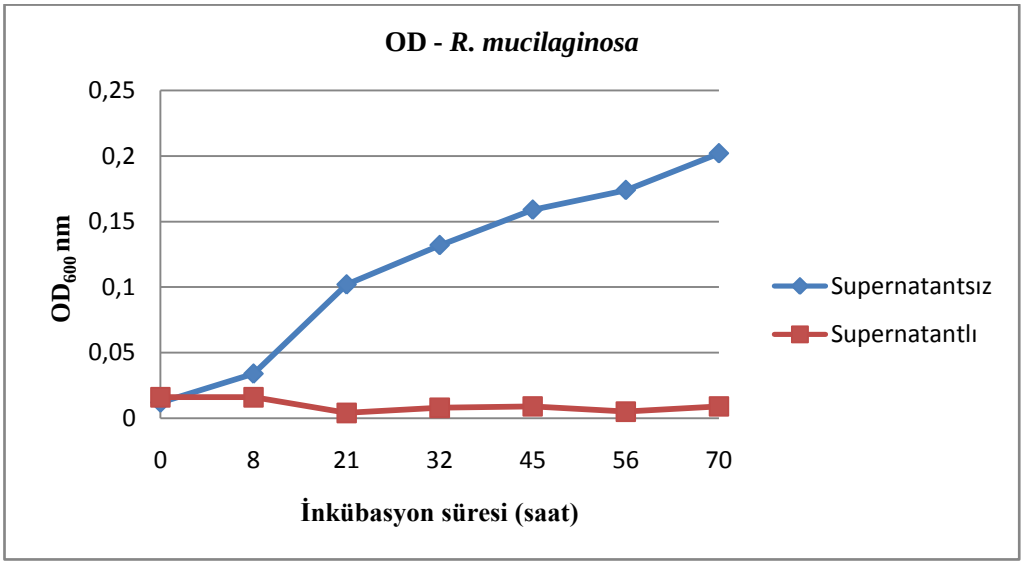


Şekil 4.18: *D. hansenii* gelişimi üzerine antimaya etki. Optik yoğunluk.

4.2.6 *L. pentosus*'tan elde edilen toplam supernatantın *R. mucilaginosa* gelişimi üzerine etkisi



Şekil 4.19: *R. mucilaginosa* gelişimi üzerine antimaya etki. Koloni sayımı.



Şekil 4.20: *R. mucilaginosa* gelişimi üzerine antimaya etki. Optik yoğunluk.

Şekil 19 ve 20, *R. mucilaginosa* gelişimi üzerine supernatant etkisini göstermektedir. Mikroplaka kuyularında *R. mucilaginosa* başlangıç konsantrasyonu 10^4 CFU/ml'dir. Şekil 4.19, supernatantın etkisinin sebep olduğu hücre sayısındaki 45. saate kadar olan kademeli azalmayı göstermektedir. 45. saatten sonra hücreler tamamen ölmüştür. 56 ve 70. saatlerdeki ölçümlerde maya gelişimi görülmemiştir. Sonuçlara göre, supernatantın inaktivasyon etkisine karşı maya hücreleri dayanıklılık gösterememiştir. Bu etki büyük oranda organik asitlerden kaynaklanmaktadır. Supernatant içinde organik asitler dışında, tek başına bulunduğu zaman etki

gösteremeyecek kadar düşük konsantrasyonlarda başka maddelerin de bulunabileceği ve bu maddelerin organik asitlerle sinerjistik bir etki oluşturabileceği de düşünülmektedir. Aynı zamanda organik asitlerin ortam pH'ını düşürmesiyle aktivasyon gösteren peptitlerin supernatant içinde bulunabileceği bir çalışmada gösterilmiştir (De Muynck ve diğ., 2004).

Şekil 4.20, supernatantın antimaya etkisinin mikroplaka okuyucusuyla ölçüm sonuçlarını vermektedir. Şekil 4.20'deki iki eğri karşılaştırıldığında *R. mucilaginosa* üzerine antimaya etki açıkça görülmektedir. 21. saatte absorbans değeri sıfıra yaklaşmış gözükmekte, ancak Şekil 4.19'da (koloni sayım metoduyla ölçüm yapılınca) canlı halde hücrelerin kültürde bulunduğu anlaşılmaktadır.

Bölüm 4.2'de verilen sonuçlar değerlendirilecek olursa, mikroplaka yöntemi kullanıldığında supernatantın mayalar üzerine antimikrobiyal etkisi görülmektedir. Koloni sayım metoduyla antimikrobiyal etki izlendiğinde gelişimdeki ayrıntılar takip edilebilmektedir. Maya gelişimi 10^5-10^6 CFU/ml altında değerlerde olduğunda oluşan dalgalanmalar koloni sayım yönteminde takip edilirken, mikroplaka okuyucuyla elde edilen OD_{600} ölçüm sonuçlarında düz çizgiye yakın bir eğri oluşmaktadır. LAB supernatantının, maya kültürü üzerine etkisiyle oluşan inaktivasyon eğrisinin belirlenmesi açısından dezavantaj oluşturmakta ve mikroplaka okuyucunun kullanımını sınırlandırmaktadır. İnaktivasyon eğrisindeki lag, log ve durağan fazlarda oluşan değişikliklerin izlenmesi koloni sayım metoduyla mümkün olmaktadır.

C. krusei, *C. lusitaniae* ve *C. parapsilosis* ile yapılan deneylerde mikroplaka kuyularında başlangıç hücre konsantrasyonları 10^5 CFU/ml civarındadır. Bu konsantrasyonda, supernatantın antimaya etkisi yalnızca *C. lusitaniae* gelişimini tamamen inhibe etmiştir. *C. krusei* ve *C. parapsilosis*'in hücre sayılarında başlangıçta düşüş olsa da sonradan artış görülmektedir.

Bunun haricinde *C. zeylanoides* ve *D. hansenii*'ye ait Şekil 4.15 ve Şekil 4.17'ye bakıldığında, her iki türün başlangıç konsantrasyonu eşit olduğu (10^3 CFU/ml) ve aynı miktarda *L. pentosus* supernatantı ile ekim yapıldığı halde, *C. zeylanoides* türü tamamen inaktive edilmiş, *D. hansenii* inaktivasyon eğrisinde ise 45. saate kadar azalma, 45. saatten sonra ise artış gözlenmiştir.

R. mucilaginosa türünün başlangıç konsantrasyonu 10^4 CFU/ml'dir. Şekil 4.19'da 45. saatte *R. mucilaginosa* hücrelerinin tamamen öldüğü görülmüştür. *R. mucilaginosa* hücreleri ortama adapte olamamıştır.

4.3 Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Supernatantların İncelenmesi

4.3.1 Laktik asit bakterilerinden elde edilen supernatantların pH değerleri

Laktik asit bakterilerinin antimaya özelliğinin tespit edilmesi için supernatant solüsyonları elde edilmiştir. Solüsyonların pH değerleri ölçülmüştür. Bu değerler Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Supernatantların pH değerleri 3,77-5,48 arasında değişmektedir. *L. pentosus* supernatantı pH 3,77 olup, en düşük değer bu bakteri supernatantına aittir. En yüksek pH değeri *L. plantarum* suşunun supernatantıdır (pH 5,48). *L. brevis* 2, *L. brevis* 1 ve *L. brevis* 3 supernatantları ise sırasıyla pH 4,26; 4,31 ve 4,29 olarak ölçülmüştür.

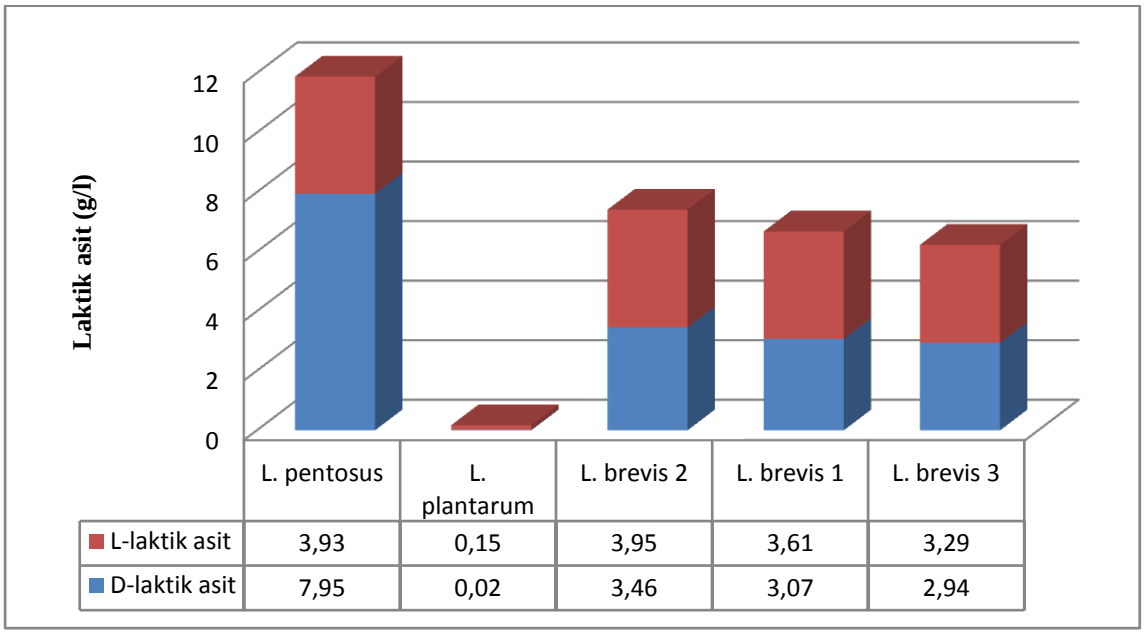
Çizelge 4.1: Farklı laktik asit bakterilerinden elde edilen supernatantların pH değerleri.

Suş No	LAB Türü	pH değeri
13.1	*L. pentosus*	3,77
17.3	*L. plantarum*	5,48
23.1	*L. brevis* 2	4,26
25.A	*L. brevis* 1	4,31
27.A	*L. brevis* 3	4,29

4.3.2 Laktik asit bakterilerinden elde edilen supernatantların içerdiği D- ve L-laktik asit miktarları

Laktik asit bakterisi supernatantlarının içerdiği laktik asit miktarının, supernatantların pH değeri ve antimaya özelliği ile ilişkisini incelemek amacıyla *L. pentosus, L. plantarum, L. brevis* 1, 2 ve 3 supernatantının içeriğindeki D- ve L-laktik asit konsantrasyonları enzimatik kitler kullanılarak hesaplanmıştır. Bulunan değerler Şekil 4.21'de gösterilmiştir. *L. pentosus* supernatantının içerdiği D- ve L-laktik asit konsantrasyonu sırasıyla 7,95 ve 3,93 g/l'dir. *L. plantarum* supernatantında laktik asit izomerleri miktarının sıfıra yakın olduğu görülmektedir. *L. brevis* 1, 2 ve 3'ten elde edilen supernatantların toplam laktik asit içerikleri (sırasıyla 6,68; 7,41 ve 6,23 g/l), *L. pentosus* supernatantının toplam laktik asit içeriğinden (11,88 g/l) düşüktür.

Üç farklı *L. brevis* suşu arasında toplam laktik asit miktarı en fazla olan *L. brevis* 2 supernatantıdır. *L. pentosus*'un ürettiği D-laktik asit konsantrasyonu diğer izomerinden fazlayken; *L. brevis* suşlarında durum tam tersidir. Ayrıca L-laktik asit konsantrasyonları incelendiğinde, *L. pentosus* supernatantında bulunan L-laktik asit değeri *L. brevis* suşlarının değerlerine yakınken; D-laktik asit miktarlarına bakıldığında, *L. pentosus*'un ölçülen D-laktik asit değeri diğer suşlara göre daha fazladır.



Şekil 4.21: *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. brevis* 1, 2 ve 3 suşlarının ürettiği D- ve L-laktik asit konsantrasyonlarının enzimatik yöntemle 340 nm dalga boyunda ölçümü.

4.4 Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Supernatantların Mayalar Üzerine Etkisiyle ilgili Tartışmalar

4.4.1 Laktik asit bakterilerinden elde edilen supernatantların mayalar üzerine etkisi

Son yıllarda tüketicinin az işlenmiş gıdalara talebinin artmasıyla mayaların sebep olduğu bozulmalarda artış olmuştur. *Debaryomyces, Candida* ve *Rhodotorula* türleri gıdalara toprak, su, gıda işleme ortamları gibi çeşitli yollardan bulaşarak enzimatik aktiviteleri sonucu fiziksel, kimyasal ve duyusal özellikleri etkilemekte ve gıdalarda bozulmaya sebep olmaktadır (Deak, 2008). Ayrıca bağışıklık sistemi zayıf bireylerde hastalığa sebebiyet vermektedir.

Az işlenmiş ve güvenli gıda düşüncesiyle ortaya çıkan biyokorumada, sentetik koruyucular yerine doğal antimikrobiyal maddelerin kullanımı amaçlanmaktadır. Laktik asit bakterileri (LAB) ve ürettikleri antimikrobiyal metabolitler pek çok araştırmaya konu olmuştur. LAB'ın ürettiği metabolitler genellikle yakın türler üzerinde etkiliyken, bilinen antifungal ve antimaya özellikleri de bulunmaktadır. Örneğin Okkers ve diğ. (1999), vajinal salgıdan izole edilen *L. pentosus*'un antimaya özellik gösteren bir bakteriyosin (pentocin TV35b) ürettiğini tespit etmiştir. Fakat mayalar genellikle LAB metabolitlerine karşı dayanıklı mikroorganizmalardır.

Bu çalışmada, farklı LAB suşlarından elde edilen supernatantlardaki antimaya etkisinin büyük ölçüde organik asitlerden kaynaklandığı görülmüştür. *L. pentosus* supernatantı en yüksek antimaya etkiyi gösterirken, *L. brevis* suşları arasında antimaya etkisi en yüksek olan *L. brevis* 2, sonra *L. brevis* 1 ve 3 suşlarıdır. Çalışmanın devamında *L. pentosus* suşundan elde edilen supernatantın toplam etkisinin incelenmesine yoğunlaşılmıştır.

Falguni ve diğ.'nin çalışmasında (2010), süt ürünlerinden elde edilen *L. plantarum* ve *L. brevis*'in de aralarında bulunduğu LAB türlerinin %50'si antimaya özelliğine sahip bulunmuştur. Mayaların küflere göre daha dayanıklı olduğu görülmüştür. Bu çalışmada da metabolitlerin gösterdiği antimaya aktivite her LAB türünde aynı bulunmamıştır. Örneğin *L. plantarum* supernatantı mayalar üzerine çok az etki gösterirken, buna yakın bir tür olan *L. pentosus* supernatantının antimaya etkisi daha güçlüdür. LAB metabolitlerinin gösterdiği antimaya özellik aynı türün suşları

arasında da farklılık göstermiştir. Örneğin, *L. brevis* suşlarının supernatantları mayaları farklı oranlarda inaktive etmiştir.

Bu çalışmanın bulguları, hidrojen peroksitin mayalar üzerine önemli bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Oksijen varlığında sentezlenen H_2O_2 LAB'da katalaz enzimi bulunmadığı için bir süre sonra ortamda birikmektedir. Bu metabolitin maya, küf ve bakterilere karşı güçlü antimikrobiyal özelliği bulunmaktadır. Fakat ortamda bulunan diğer organik bileşiklerle reaksiyona girdiği için etkisi uzun sürmemektedir. Zalan ve diğ. (2011), *L. plantarum*'un da aralarında olduğu LAB türlerinin meyve suyu sıvı besiyeri ortamında ürettiği organik asit, H_2O_2 miktarlarını araştırmıştır. Organik asitler arasında temel fermentasyon ürünü olan laktik asit en yüksek düzeydedir. İki *L. plantarum* suşundan biri oldukça düşük miktarda H_2O_2 (0.25 mg/l) üretmiştir. LAB'ın ürettiği hidrojen peroksit miktarı, tek başına antimaya aktivitesi gösterebilmek için düşük olsa da, diğer metabolitlerle sinejistik bir etki oluşturabilmektedir.

Ayrıca MRS besiyeri ortamında yeast ekstraktın içerdiği katalaz enzimi hidrojen peroksidi parçalayacağı gibi (Schnürer ve Magnusson, 2005), bu çalışmada kullanılan maya türlerinin sentezlediği katalaz da parçalanmaya sebep olmuş ve antimaya etkisini ortadan kaldırmış olabilir. Örneğin hidrojen perokside karşı dayanıklılık gösteren *D. hansenii* türünde farklı aktivitelere sahip iki farklı katalaz enzim geni tespit edilmiştir (Segal-Kischinevzky ve diğ., 2011).

Kantachote ve diğ. (2010), *L. plantarum* DW3 suşunun ürettiği antimikrobiyal maddelerin *R. mucilaginosa* üzerine etkisini mikroplaka kuyu metoduyla araştırmıştır. Antimaya etkisi protein yapılı bileşiklerden kaynaklanmamaktadır. H_2O_2 de antimaya özellikli maddelerin arasında bulunmamaktadır. Bu durumun, statik kültürde geliştirilen, LAB'ın, yeterince oksijenle temas etmemesinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Bu çalışmada da, LAB'ın statik kültürde geliştirilmiş olması, yetersiz H_2O_2 üretiminin nedeni olabilir.

Kantachote ve diğ.'nin çalışmasının devamında, DW3'ün organik asitlerin yanında fenillaktik asit ürettiği, buna ek olarak henüz bilinmeyen çeşitli antimikrobiyal maddeler de sentezlediği açıklanmıştır. Fenillaktik asitin 5 mg/ml'si, *R. mucilaginosa* kültürünü %90 oranında inaktive etmiştir. Ayrıca *L. plantarum* DW3'ün, gıda kaynaklı patojenlere ve gıdaları kontamine eden mayalara karşı etkili

starter kültür olarak kullanılabilir özellikte olduğu yapılan incelemelerle tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, bakteriyosin ve protein yapılı bileşiklerin antimaya etkisi görülmemiştir. Bu durum, LAB'ın kendi genetik ve metabolik yapısıyla ilişkili olabileceği gibi, indikatör maya türlerinin dayanıklılığından veya ortam koşullarından kaynaklanabilmektedir. Bilindiği gibi bakteriyosin ve protein yapılı bileşikler, aynı ortamdaki diğer mikroorganizmalarla rekabet sonucu sentezlenmektedir. Ayrıca sentezi değişen stres koşullarından çok çabuk etkilenmektedir. Bu çalışmada kullanılan LAB kültürleri, tüp içinde, MRS sıvı besiyerinde, 25°C'de saf kültür olarak geliştirildi. Delgado ve diğ. (2005), sofralık yeşil zeytinin fermentasyonunda, *in situ* bakteriyosin üretimini artırmaya yönelik bir çalışma yapmışlardır. Zeytinden izole edilen *L. pentosus* suşu optimum koşullardan farklı (suboptimal) ekstrem büyüme koşullarında geliştirildiğinde bakteriyosin üretimi stimule edilmiştir. Bakteri büyümesi yüksek pH ve düşük sıcaklık etkisiyle azalırken, bakteriyosin aktivitesinde artış olduğu görülmüştür. NaCl ise bakteriyosin üretimini inhibe etmiştir.

De Muynck ve diğ. (2004), *L. brevis* ve *L. plantarum*'un da içlerinde bulunduğu bir grup LAB'tan izole edilen supernatantın antifungal özelliklerini incelemişlerdir. *L. brevis*'in supernatantı (pH 3,5) test edilen çoğu küf türünü inaktive ederken, pH 5.0, 5.5 ve 6.0'ya nötralize edildikten sonra antifungal aktivitesi kaybolmuştur. Bu çalışmada da supernatant pH 6.0'ya nötralize edildiğinde antimaya aktivitesi kaybolmuştur. LAB'ın ürettiği organik asitlerin ortamdaki pH'ı düşürmesiyle aktive olan antifungal maddeler (peptit gibi) bulunabilmektedir. Bu maddeler nötralizasyonla elimine olabilmektedirler. *L. coryniformis* subs. *coryniformis* Si3 suşunun sentezlediği tespit edilen bir peptit pH 3.0-4.5 arasında aktivite gösterirken, pH 4.5-6.0 olduğunda antifungal aktivitesinde ani bir düşüş oluşmaktadır (De Muynck ve diğ., 2004). Ayrıca üretilen farklı maddeler arasında sinerjistik bir etki de olabilmektedir.

Voulgari ve diğ. (2010), geleneksel Yunan peynir ve yoğurdundan izole ettikleri fakültatif heterofermentatif (*L. plantarum, L. paraplantarum, L. pentosus, L. rhamnosus* ve *L. paracasei* subsp. *paracasei*) ve zorunlu heterofermentatif (*L. brevis, L. buchneri* ve *L. fermentum*) LAB türlerinin, *Debaryomyces hansenii* mayasına ve *Penicillium candidum* küfü üzerine değişen derecelerde inaktivasyon etkisi

bulunurken, hiçbir türün *S. cerevisiae* üzerine etkisi bulunmamıştır. Deneyin devamında, fakültatif heterofermentatif LAB suşlarının supernatantları izole edilmiştir. Makalede, supernatantın inhibisyon aktivitesinin incelenmesine, yalnız *Penicillium* için devam edildiği görülmektedir. LAB'ların supernatantları nötralize edilip, katalaz uygulandığında antifungal aktivitesinde düşüş olmuştur, ancak aktivite tamamıyla yok olmamıştır. Bu durum protein yapılı bileşiklerin varlığına işaret etmektedir. Ardından supernatant pepsin, tripsin, alfa-kimotripsin ve proteinaz K ile muamele edilmiş ve antifungal aktivite kaybolmuştur. Bu suşların, antifungal özellikli, protein yapılı bileşikler sentezlediği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada, *L. pentosus, L. brevis* ve *L. plantarum* suşlarının sentezlediği D- ve L-laktik asit konsantrasyonları enzimatik kitler kullanılarak tespit edilmiştir. Toplam laktik asit miktarı en yüksek olan *L. pentosus* türüdür (11,88 g/l). Supernatantın pH'sı ise 3,77'dir. Sonuçlarda da görüldüğü gibi, *L. pentosus*'un antimaya akitivitesi en yüksektir. Antimaya aktivitesi göstermeyen *L. plantarum*'un D- ve L- laktik asit değerleri sıfıra yakındır. *L. brevis* suşlarının mayalara gösterdiği inaktivasyon etkisi, yüksekten düşüğe doğru *L. brevis* 2, 1 ve 3 şeklindedir. Bu suşların ürettiği toplam laktik asit konsantrasyonları sırasıyla 7,41; 6,68 ve 6,23 g/ml'dir. Bu sonuçlara göre, antimaya etkisiyle toplam laktik asit miktarı arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Toplam laktik asit miktarı arttıkça antimaya etkisinde de artış olmuştur.

L. pentosus ve *L. brevis* 2 suşlarına bakıldığında L-laktik asit miktarlarının çok yakın olduğu görülmektedir (3,93 ve 3,95 g/ml). Ancak *L. pentosus* supernatantının içerdiği D-laktik asit 7,95 g/ml'dir ve *L. brevis* 2 suşundan (3,46 g/ml) yüksektir. Bu iki türden *L. pentosus*'un inaktivasyon seviyesi yüksekliğinin D-laktik aside bağlı olduğu düşünülmektedir. Diğer taraftan, heterofermentatif özellikte olan bu türlerin supernatantlarında laktik asitten farklı organik asitlerin veya aktivasyonu pH'a bağlı peptitlerin de bulunabileceği gözardı edilmemelidir. Toplam laktik asit miktarı ortam pH'ını düşürdüğü için pH'la ilişkili farklı metabolitler aktive olmuş olabilir. Ayrıca düşük aktiviteye sahip antimetabolitler laktik asit ile sinerjistik etki de oluşturabilir (Schwenninger ve Meile, 2004).

Ayrıca gözlenen antimaya aktivitesiyle supernatantın asit içeriğini ilişkilendirmek için, bulunan laktik asite ekivalent konsantrasyonda laktik asit test edilebilir. Böylece antimaya etkinin laktik asitin farklı bir maddeyle sinerjistik etkisinden olup olmadığı

belirlenebilir. Valerio ve diğ. (2009) çalışmasında, LAB'ın sentezlediği laktat ve asetat miktarları tayin edilmiştir. Daha sonra bu iki asidin ekivalent konsantrasyonları karıştırılarak antifungal etkileri test edilmiştir. Sonuç olarak asitlerin aktivitesi, supernatantın inaktivasyon etkisiyle ilişkili bulunmuştur. Bunun haricinde, *L. pentosus*'un ürettiği ve konsantrasyonu belirlenen D(-) ve L(+)-laktik asitin mayalar üzerine ayrı ayrı inaktivasyon özelliği de incelenebilir.

4.4.2 Mayaların antimikrobiyal maddelere karşı gösterdikleri hassasiyet

Çalışmada, *C. krusei, C. parapsilosis* ve *D. hansenii* türleri *L. pentosus*'dan elde edilen supernatantın toplam etkisine karşı dayanıklılık göstermişlerdir. Antimaya etki üç maya türünde de logaritmik faza girişi geciktirmiştir. *D. hansenii*'nin başlangıç hücre konsantrasyonu yaklaşık 10^3 CFU/ml olduğu için, logaritmik evreye girişi daha geç olmuştur.

McFarland standart solüsyonları ile maya hücrelerinin başlangıç hücre konsantrasyonları eşit olacak şekilde hazırlanmıştır. Göz kararı yapılan bu hazırlık işleminde hassasiyetin fazla olmadığı görülmüştür.

Başlangıç hücre konsantrasyonları eşit (10^5 CFU/ml) olan *C. krusei, C. parapsilosis* ve *C. lusitaniae*'nin inaktivasyon eğrilerine göre, dayanıklılığı en zayıf olan tür *C. lusitaniae*'dir. Literatür bilgilerinde, bu üç tür arasında antifungal maddelere karşı en dayanıksız türün *C. lusitaniae*, en dayanıklı türün ise *C. krusei* olduğu görülmektedir. *C. krusei* ve *D. hansenii*'nin dayanıklılığında DL-laktatı asimile eden bir maya türü olmasının rolü olduğu gözardı edilmemelidir. *C. lusitaniae*'nin daha fazla hassasiyet göstermesinde ise, DL-laktat asimilasyonu yapmıyor olmasının bir etkisi olabilir. *C. parapsilosis* laktat asimilasyonu yapmadığı halde, ortama adapte olmuştur. Maya hücrelerinin ortamdaki hidrojen iyonlarını uzaklaştıran bir akış sistemine sahip oldukları belirtilmiştir (Liptakova ve diğ., 2007). Hücre içi asitlik artışını ve anyonların birikmesini önleyen bu sistem, zayıf organik asit bulunan ortamda maya hücresine dayanıklılık sağlamış olabilir. Bu sonuçlara göre, supernatantın tamamıyle inaktive ettiği *C. lusitaniae* yanında *C. zeylanoides* ve *R. mucilaginosa* da bulunmaktadır. Literatürdeki antifungal maddeye karşı hassasiyetlere bakıldığında, *C. zeylanoides*'in hassas türler arasında olduğu görülmektedir. *C. zeylanoides* de DL-laktat asimilasyonu yapmayan türler arasındadır. Dolayısıyla DL-laktat ortamdan uzaklaştırılmamıştır.

R. mucilaginosa ise flukonazole karşı çok dayanıklıyken, amfoterisin B'ye karşı oldukça hassas bir mayadır. Amfoterisin B'nin *R. mucilaginosa*'yı inhibe ettiği minimum konsantrasyon 0,023 µg/ml olurken, *D. hansenii* için bu değer 0,25 µg/ml'dir. Bu çalışmada test edilen *D. hansenii* (10^3 CFU/ml başlangıç kons.) antimikrobiyal madde içeren ortama 45. saatten sonra adapte olurken, *R. mucilaginosa* (10^4 CFU/ml başlangıç kons.) 45. saatten sonra tamamen inaktive olmuştur.

4.4.3 Çalışmada uygulanan mikrotitre plaka ve hücre sayımı metotları ile ilgili tartışma

Bu çalışmada, laktik asit bakterilerinden elde edilen antimikrobiyal maddelerin sebep olduğu antimaya etkisi ve *L. pentosus*'tan izole edilen supernatantın toplam etkisine karşı farklı maya türlerinin gelişimi araştırıldı. Burdaki gibi çok sayıda örneğin test edildiği çalışmalarda kolay, tekrarlanabilir ve bir seferde çok sayıda örneğin denenebileceği bir metoda gerek duyulmaktadır. Koloni sayım metodu, zaman alıcı, yorucu ve malzeme sarfiyatının fazla olduğu bir metottur. Avantajı ise ortamda o anda bulunan canlı hücre sayısını vermesidir. Mikroplaka metodunda spektrofotometrik okuma ise bir kerede çok sayıda örneğin çalışılabildiği, kuyuda az miktarda besiyeri kullanımından dolayı malzeme sarfiyatının ve atık miktarının az olduğu, sayısal sonuçların ölçüm esnasında alınabildiği bir metottur. Dezavantajı ise okumanın anlamlı olması için hücre konsantrasyonunun belirli bir eşik değere ulaşmasının gerekliliğidir. Ayrıca ölmüş olan hücre de ışığı yansıtarak yanlış okumalara sebebiyet verebilmektedir.

Bu çalışmada, laktik asit bakterilerinden elde edilen antimikrobiyal maddelerin farklı maya türleri üzerine inaktivasyon etkilerini belirleyebilmek için mikroplaka ölçüm metodu uygulanmıştır. Bunun için mikroplaka kuyuları içinde, maya hücreleri supernatantlar ile inkübe edilmiştir ve mikroplaka okuyucusu ile belirli zaman aralıklarında ölçümler yapılmıştır. Supernatantı içeren kuyudaki gelişim kontrol kuyusundaki gelişim ile kıyaslanarak maya hücreleri üzerine inaktivasyon etkisi grafikleri çıkartılmıştır. Mikrotitre plaka metodu çok sayıda örnek içeren çalışmalarda bir ön tarama metodu olarak kullanılabilir. Ancak supernatantın inaktivasyon etkisinin zamanla değişiminin grafik üzerinde incelenmesi istendiğinde bu metot yetersiz kalmaktadır.

Bazı çalışmalarda, antimikrobiyal maddelerin mikroorganizma üzerine etkisinin agar besiyeri ortamında test edildiği görülmüştür. Katı besiyeri ortamının antimikrobiyal maddenin difüzyonunu azalttığı belirtilmiştir (De Muynck ve diğ., 2004). Bu çalışmada mikroplaka kuyuları içindeki sıvı besiyerinde gelişen mayaların antimikrobiyal maddelerle temasının daha iyi sağlandığı düşünülmektedir.

LAB supernatantının mikroorganizmalar üzerine, inkübasyonun başlangıcından itibaren gösterdiği antimikrobiyal etkinin koloni sayımı ve mikroplaka okuyucu metotları ile ölçülmesi ve oluşturulan inaktivasyon eğrilerinin karşılaştırılmasıyla ilgili, bu çalışmaya benzer bir makaleye literatürde rastlanmamıştır. Çalışma, bu açıdan özgün bir özellik taşımaktadır.

Bu çalışmada, *L. pentosus*'tan elde edilen supernatantın toplam hali mayalar üzerine inkübasyon başlangıcında uygulanmış ve maya gelişim eğrisinin zamanla değişimi incelenmiştir. Mikroplaka okuyucuda ölçüm yapılabilmesi için maya hücre konsantrasyonunun yaklaşık 10^6 hücre/ml'den yüksek olması gerekmektedir. İnaktivasyon eğrisinde zamana karşı maya hücre sayısındaki azalma belirli bir süreye kadar gözlenebilirken, konsantrasyon eşik değerin altına düştüğünde düz bir çizgi görülmektedir. Aynı saat aralıklarında koloni sayım metodu sonucu elde edilen grafiğe bakıldığında hücre sayısının sıfırlanmadığı, maya kültürünün tamamen inaktive olmadığı anlaşılmaktadır. Bir mikroorganizma üzerine antimikrobiyal etki araştırıldığında sadece mikroplaka metodunun uygulanması yanıltıcı sonuç verebilmektedir. Bunun yanında koloni sayımı metoduyla daha doğru sonuç alınabilmektedir. Bu sebeple, antimaya etkinin araştırıldığı deneylerde, mikroplaka okuyucusu metodunun tek başına uygulanması önerilmemektedir.

Yapılan bir çalışmada, antimikrobiyal madde bakteri ve mayanın logaritmik faz başlangıcında ortama eklenmiştir (Smaouni ve diğ., 2010). Oluşan antimikrobiyal etki koloni sayım metodu ve spektrofotometrik ölçüm ile izlenmiştir. Bakteri inaktivasyonu her iki metot ile gözlenmiştir. Koloni sayım metodu maya üzerine inaktivasyon etkiyi gösterirken, spektrofotometrik ölçüm bu etkiyi gösterememiştir. Bizim çalışmamızdan farklı yanı, inkübasyonun mikroplaka kuyularında değil tüplerde, daha yüksek hacimlerde gerçekleştirilmiş olması ve antimikrobiyalin kültür ortamına eklendiği andaki farklılıktır. Buna rağmen spektrofotometrik ölçüm antimikrobiyal etkiyi göstermekte yetersiz kalmıştır. Bu durum bizim bulgularımızla uyum sağlamaktadır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Son yıllarda doğal ve işlem görmemiş veya az işlem görmüş gıdalara yönelimin artmasıyla biyokoruma konsepti öne çıkmıştır. Biyokoruma amacıyla en çok kullanılan mikroorganizmalar laktik asit bakterileridir.

Bu çalışmada daha önce tulum peynirinden izole edilmiş *L. pentosus, L. plantarum* ve *L. brevis* suşlarından izole edilen supernatantların antimaya özellikleri araştırılmış ve antimaya özelliğin organik asitlerden kaynaklandığı tespit edilmiştir.

Supernatantın gösterdiği antimaya etkiyle üretilen laktik asit miktarı arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için laktik asit bakterilerinin sentezlediği toplam laktik asit, D- ve L- laktik asit miktarları enzimatik kitlerle belirlenmiştir. Bunun sonucu, *L. pentosus* suşunun D-laktik asit sentezinin diğer türlere göre fazla olduğu ve antimaya aktivitesinde D izomerinin etkisinin öne çıktığı görülmüştür.

Bu çalışmada kullanılan maya türleri gıda bozulmalarına sebep olan *C. krusei, C. lusitaniae, C. parapsilosis, C. zeylanoides, D. hansenii* ve *R. mucilaginosa* türleridir. *L. pentosus*'tan elde edilen toplam supernatant etkisinin *C. lusitaniae, C. zeylanoides* ve *R. mucilaginosa*'yı tamamen inaktive ettiği görülmüştür. *C. krusei, C. parapsilosis* ve *D. hansenii* supernatantın içerdiği antimaya maddelere dayanıklılık göstermiş ve ortama adaptasyon sağlamıştır.

Mikrotitre plaka metoduyla spektrofotometrik ölçüm ile geleneksel hücre sayım tekniği kıyaslanmıştır. Bunun sonucunda kullanım kolaylığı bulunan mikrotitre plaka metodunun yanıltıcı sonuçlar verebildiği görülmüştür. Mayanın spektrofotometrik metotla belirlenen inaktivasyon eğrisinde ölçülen değer sıfır görüldüğü halde, hücre sayım grafiğiyle kıyaslandığında maya gelişiminin tamamen inaktive olmadığı görülmüştür. Bu sebeple, mikroorganizma gelişimi üzerine antimikrobiyal maddelerin etkisi araştırılırken hücre sayım metodunun daha doğru sonuç verdiği için kullanılması önerilmektedir.

Laktik asit bakterisi supernatantlarının antimaya özelliklerinin mikrotitre plaka ve hücre sayımı olmak üzere iki farklı metot ile ölçülüp, maya gelişim eğrisi ile inaktivasyon eğrisi grafikleri üzerinde sonuçların karşılaştırılmasıyla ilgili bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu anlamda yapılan çalışma orjinal bir çalışma olup literatüre katkı sağlayacaktır.

Antimaya aktivitesiyle supernatantın asit içeriğini ilişkilendirmek için, bulunan laktik asite ekivalent konsantrasyonda laktik asit test edilebilir. Böylece antimaya etkinin laktik asitin farklı bir maddeyle sinerjistik etkisinden olup olmadığı belirlenebilir. Bundan başka, *L. pentosus*'un supernatantı içindeki miktarları belirlenen D(-) ve L(+)-laktik asitin mayalar üzerine ayrı ayrı inaktivasyon özelliği de incelenebilir.

KAYNAKLAR

Akın, N., 1996. Değişik sütlerden farklı starter kültür kullanılarak üretilen fermente süt ürünlerinde L(+) ve D(-) laktik asit miktarları, *Gıda Dergisi,* Gıda Teknolojisi Derneği Yayını, Vol. **21(4),** pp.287-292.

Angelis, M., Gobbetti, M., 2011. *Lactobacillus* spp.: general characteristics, In. Proginsli, H., Fuquay, J. W., Fox, P. F. editors, Encyclopedia of dairy sciences, Academic Press Ltd., New York, N.Y, pp. 78-90.

Anon, 2003. Krema ve kaymak tebliği, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, *Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği*, Tebliğ no: 2003/34, Resmi Gazete Yayın Tarihi: 27.09.2003.

Anon, 2006. Bira tebliği, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, *Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği*, Tebliğ no: 2006/33, Resmi Gazete Yayın Tarihi: 07.07.2006.

Anon, 2007. Yumurta ve yumurta ürünleri tebliği, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, *Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği*, Tebliğ no: 2007/54, Resmi Gazete Yayın Tarihi: 23.01.2008.

Anon, 2008. Renklendiriciler ve tadlandırıcılar dışındaki gıda maddeleri tebliği, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, *Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği*, Tebliğ no: 2008/22, Resmi Gazete Yayın Tarihi: 22.05.2008.

Anon, 2008. Şarap tebliği, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, *Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği*, Tebliğ no: 2008/67, Resmi Gazete Yayın Tarihi: 04.02.2009.

Anon, 2009. Fermente süt ürünleri tebliği, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, *Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği*, Tebliğ no: 2009/25, Resmi Gazete Yayın Tarihi: 16.02.2009.

Arroyo-López, F.N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernández, A., 2008. Role of yeasts in table olive production, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. **128**, pp. 189–196.

Asefa, D. T., Møretrø, T., Gjerde, R. O., Langsrud, S., Kure, C. F., Sidhu, M. S., Nesbakken, T., Skaar, I., 2009. Yeast diversity and dynamics in the production processes of norwegian dry-cured meat products, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. **133**, pp. 135-140.

Axelsson, L., 2004. *Lactic acid bacteria: classification and physiology* in Salminen, S., von Wright, A. ve Ouwehand, A., *eds*, *Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects*, Marcel Dekker, pp 1-66, New York ABD.

Bariola, J. R., Saccente, M., 2008. *Candida lusitaniae* septic arthritis: case report and review of the literature, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Vol. **61**, pp. 61–63.

Björkroth, J., Koort, J., 2011. Taxonomy and Biodiversity, In. Proginsli, H., Fuquay, J. W., Fox, P. F. editors, Encyclopedia of dairy sciences, Academic Press Ltd., New York, N.Y, pp. 45-48.

Bockelmann, W., Heller, M., Heller, K. J., 2008. Identification of yeasts of dairy origin by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), *International Dairy Journal*, Vol. **18**, pp. 1066–1071.

Bogaert, J. C. ve Naidu, A. S., 2000. *Lactic acid* in Naidu, A. S., *eds*, Natural Food Antimicrobial Systems, CRC Press, ABD.

Broadbent, J. R., Budinich, M. F., Steele, J. L., 2011. Non-starter lactic acid bacteria, Elsevier Ltd., pp. 639-644.

Calasso, M., Gobbetti, M., 2011. *Lactobacillus* spp.: other species, In. Proginsli, H., Fuquay, J. W., Fox, P. F. editors, Encyclopedia of dairy sciences, Academic Press Ltd., New York, N.Y, pp. 125-131.

Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., Vignolo, G., 2008. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina, *Meat Science*. Vol. **79**, pp. 483-499.

Chester, R., Cooper, Jr., 2011. Yeasts pathogenic to human. In: Kurtzman, C. P., Fell, J. W. ve Boekhout, T., editors. The Yeasts, a Taxonomic Study. Vol. **1**, 5th edition. New York, NY: Elsevier. pp. 9-19.

Codex Alimentarius Commission (CAC), 1989. Class Names and the International Numbering System for Food Additives, CAC/GL 36-1989, Rome, pp. 1-55.

Codex Alimentarius Commission (CAC), 1989. Class Names and the International Numbering System for Food Additives, CAC/GL 36-1989, Rev. 2008, Amd. 2011, CAC, Rome.

Córdoba, J. J., Andrade, M. J., Bermúdez, E., Núñez, F., Asensio, M. A. ve Rodríguez, M., 2010. *Debaryomyces* in Liu, D., *eds*, *Molecular Detectıon of Foodborne Pathogens*, CRC Press, pp. 565-576, Boca Raton, London, New York.

Corsetti, A., Gobbetti, M.. 2002. *Lactobacillus plantarum*, In. Proginsli, H., Fuquay, J. W., Fox, P. F. editors, Encyclopedia of dairy sciences, Academic Press Ltd., New York, N.Y, pp.1501-1507.

Corsetti, A., Valmorri, S., 2011. *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus plantarum*, In. Proginsli, H., Fuquay, J. W., Fox, P. F. editors, Encyclopedia of dairy sciences, Academic Press Ltd., New York, N.Y, pp. 111-118.

Dalié, D. K. D., Deschamps, A.M., Richard-Forget, F., 2010. Lactic acid bacteria – potential for control of mould growth and mycotoxins: a review, *Food Control*, Vol. **21**, pp. 370–380.

De Muynck, C., Leroy, A. I. J., De Maeseneire, S., Arnaut, F., Soetaert, W., Vandamme, E. J., 2004. Potential of selected lactic acid bacteria to

produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiological Research*, Vol. **159(4)**, pp. 339-346.

Deak, T., 2008. Handbook of food spoilage yeasts, CRC Press, Boca Raton, London, New York, pp. 1-9, 59-84, 117-173.

Deak, T., Beuchat, L. R., 1996. Handbook of food spoilage yeasts, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. pp.210.

Delgado, A., Brito, D., Peres, C., Noe-Arroyo, F., Garrido-Fernandez, A., 2005. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration, *Food Microbiology*, Vol. **22**, pp. 521-528.

El-Ziney, M. G., Debevere, J. M., Jakobsen M., 2000. *Reuterin* in Naidu, A. S., *eds*, *Natural Food Antimicrobial Systems*, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.

Ernst, E. J., Yodoi, K., Roling, E. E., Klepser, M. E., 2002. Rates and extents of antifungal activities of amphotericin b, flucytosine, fluconazole, and voriconazole against *Candida lusitaniae* determined by microdilution, etest, and time-kill methods, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. **46(2)**, pp. 578–581.

Fadda, M.E., Viale, S., Deplano, M., Pisano, M.B., Cosentino, S., 2010. Characterization of yeast population and molecular fingerprinting of *Candida zeylanoides* isolated from goat's milk collected in Sardinia, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. **136**, pp. 376–380.

Falguni, P., Shilpa, V., Mann, B., 2010. Production of proteinaceous antifungal substances from *Lactobacillus brevis* NCDC 02, *International Journal of Dairy Technology* Vol. **63(1)**, pp. 70-76.

Favel, A., Michel-Nguyen, A., Peyron, F., Martin, C., Thomachot, L., Datry, A., Bouchara, J. P., Challier, S., Noel, T., Chastin, C. ve Regli, P., 2003. Colony morphology switching of *Candida lusitaniae* and acquisition of multidrug resistance during treatment of a renal infection in a newborn: case-report and review of the literature. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* Vol. **47**, pp. 331-339.

Fleet, G. H., 2011. Yeast spoilage of foods and beverages. In: Kurtzman, C. P., Fell, J. W. ve Boekhout, T., editors. The Yeasts, a Taxonomic Study. Vol. **1**, 5th edition. New York, NY: Elsevier. pp. 53-63.

Gadaga, T. H., Mutukumira, A. N., Narvhus, J. A., 2001. The growth and interaction of yeasts and lactic acid bacteria isolated from Zimbabwean naturally fermented milk in UHT milk, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. **68**, pp. 21–32.

Goktepe, I., 2006. *Probiotics as biopreservatives for enhancing food safety* in Goktepe, I., Juneja, V. K. ve Ahmedna, M., *eds*, *Probiotics in Food Safety and Human Health*, CRC Press, pp. 285-307, Boca Raton FL.

Hill, C., O'Keeffe, T., Ross, P., 2002. Bacteriocins, *Elsevier Science Ltd.*, pp. 128-135.

Hurtado, A., Othman, N. B., Chammem, N., Hamdi, M., Ferrer, S., Reguant, C., Albert Bordons, A., Rozès, N., 2011. Characterization of *Lactobacillus* isolates from fermented olivesand their bacteriocin gene profiles, *Food Microbiology*, Vol. **28**, pp. 1514-1518.

Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., Rozès, N., 2011. Expression of *Lactobacillus pentosus* B96 bacteriocin genes under saline stress, *Food Microbiology*, Vol. **28**, pp. 1339-1344.

Jacques, N., Casaregola, S., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the hemiascomycetous yeasts, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. **126**, pp. 321-326.

Jehanno, D., Thuault, D., Bourgeois, C. M., 1992. Development of a method for detection of lactic acid bacteria producing exclusively the L(+)-isomer of lactic acid, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. **58(12),** pp. 4064-4067.

Jin, Q., Junga, J. Y., Kima, Y. J., Eoma, H., Kimc, S., Kima, T., Han, N. S., 2009. Production of l-lactate in *Leuconostoc citreum* via heterologous expression of l-lactate dehydrogenase gene, *Journal of Biotechnology*, Vol. **144**, pp. 160–164.

Johnson, E. A. ve Echavarri-Erasun, C., 2011. *Yeast biotechnology* in Kurtzman, C. P., Fell, J. W. ve Boekhout, T., *eds*, *The yeasts, a taxonomic study*, Fifth Edition, Elsevier, pp. 21-44, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo.

Kantachote, D., Prachyakij, P., Charernjiratrakul, W., Ongsakul, M., Duangjitcharoen, Y., Chaiyasut, C., Nitoda, T., Kanzaki, H., 2010. Characterization of the antiyeast compound and probiotic properties of a starter *Lactobacillus plantarum* DW3 for possible use in fermented plant beverages, *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol. **13 (5),** pp. 1-15.

Kishi, A., Uno, K., Matsubara, Y., Okuda, C. ve Kishida, T., 1996. Effect of the oral administration of *Lactobacillus brevis* subsp. coagulans on interferon-alpha producing capacity in humans. *Journal of the American College of Nutrition*. Vol. **15 (4)**, pp. 408-412.

Kleerebezem, M., Hols, P., Bernard, E., Rolain, T., Zhou, M., Siezen, R. J., Bron, P. A., 2010. The extracellular biology of the *lactobacilli*, *FEMS Microbiol Reviews*, Vol. **34**, pp. 199-230.

Lachance, M. A., Boekhout T., Scorzetti, G., Fell, J. W., Kurtzman, C. P., 2011. Candida Berkhout (1923). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., editors. The Yeasts, a Taxonomic Study. Vol. **2**, 5th edition. New York, NY: Elsevier. pp. 987-1278.

Lee, H., Yoon, H., Ji, Y., Kim, H., Park, H., Lee, J., Shin, H., Holzapfel, W., 2011. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. **145**, pp. 155–161.

Libkind, D. ve Sampaio, J. P., 2010. *Rhodotorula*. In: Liu, D., *eds, Molecular Detectıon of Foodborne Pathogens*, CRC Press, pp. 603-618, Boca Raton, London, New York.

Limsowtin, G. K. Y., Broome, M. C. ve Powell, I. B., 2002. Lactic acid bacteria, taxonomy, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, pp. 1470-1478.

Liptáková, D., Valík, L., Lauková, A., Strompfová, V., 2007. Characterisation of *Lactobacillus rhamnosus* VT1 and its effect on the growth of *Candida maltosa* YP1, *Czech Journal of Food Science*, Vol. **25**, pp. 272-282.

Liu, G., Lv, Y., Li, P., Zhou, K., Zhang, J., 2008. Pentocin 31-1, an anti-listeria bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* 31-1 isolated from xuan-wei ham, a traditional china fermented meat product, *Food Control*, Vol. **19**, pp. 353–359.

Liu, S. Q., 2003. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. **83**, pp. 115-131.

Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., 2003. Spoilage yeasts in the wine industry, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. **86**, pp. 23-50.

Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J., Schnürer, J., 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Letters*, Vol. **219**, pp. 129-135.

Mattaa, D. A., Almeidaa, L. P., Machadoa, A. M., Azevedoa, A. C., Kusanob, E. J. U., Travassosc, N. F., Salomao, R., Colomboa, A. L., 2007. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in Sao Paulo, Brazil, 1995–2003, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Vol. **57,** pp. 399–404.

Medeiros, A. O., Kohler, L. M., Hamdan, J. S., Missagia, B. S., Barbosa, F. A. R., Rosa, C. A., 2008. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil, *Water Research*, Vol. **42**, pp. 3921-3929.

Mills, S., O'Sullivan O., Hill, C., Fitzgerald, G., Ross, R. P., 2010. The changing face of dairy starter culture research: from genomics to economics, *International Journal of Dairy Technology*, Vol. **63(2)**, pp. 149-170.

Molin, G., 2003. *The role of Lactobacillus plantarum in foods and in human health* in Farnworth E. R., *eds, Handbook of Fermented Functional Foods*, CRC Press, pp. 305-342.. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.

Molloy, E. M., Hill, C., Cotter, P. D., Ross, R. P., 2011. Bacteriocins, *Elsevier Ltd.*, pp. 420-429.

Morace, G., Polonelli, L., 2005. Voriconazole activity against clinical yeast isolates: a multicentre Italian study, *International Journal of Antimicrobial Agents*, Vol. **26**, pp. 247-253.

Mu, W., Chen, C., Li, X., Zhang, T., Jiang, B., 2009. Optimization of culture medium for the production of phenyllactic acid by *Lactobacillus* sp. SK007, *Bioresource Technology*, Vol. **100**, pp. 1366–1370.

Muhialdin, B. J., Hassan, Z., Sadon, S. K., 2011. Antifungal Activity of *Lactobacillus fermentum* Te007, *Pediococcus pentosaceus* Te010, *Lactobacillus pentosus* G004, and *L. paracasi* D5 on Selected Foods, *Journal of Food Science*, Vol. **76(7)**, pp. 493-499.

Naidu, A. S. ve Clemens, R. A., 2000. *Probiotics* in Naidu, A. S., *eds*, *Natural Food Antimicrobial Systems*, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.

Narayanan, N., Roychoudhury, P. K., Srivastava, A., 2004. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization, *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol. **7(2),** pp. 167-180.

Narvhus, J. ve Axelsson, L., 2003. *Lactic acid bacteria* in Cabbalero, B., Trugo, L. ve Finglas, P., *eds*, Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, Academic Press, pp 3465 - 3472, London.

Narvhus, J. ve Gadaga, T., 2003. The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks: a review. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. **86**, pp. 51-60.

Nielsen, D. S., Jacobsen, T., Jespersen, L., Koch, A. G., Arneborg, N., 2008. Occurrence and growth of yeasts in processed meat products – Implications for potential spoilage, *Meat Science*, Vol. **80**, pp. 919–926.

Okkers, D.J., Dicks, L.M.T., Silvester, M., Joubert, J.J., Odendaal, H.J., 1999. Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*, *Journal of Applied Microbiology*, Vol. **87**, pp. 726–734.

Okungbowa, F. I., Chowdhury, R., Okungbowa, M. O., 2009. Biochemical characterization of a clinical *Candida krusei* isolate and its susceptibility to Amphotericin B, *Bioscience Research Communications*, Vol. **21(4)**, pp. 137-140.

Ouwehand A. C., Vesterlund, S., 2004. Antimicrobial components from lactic acid bacteria, pp. 375-396.

Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Messer, S. A., Boyken, L., Hollis, R. J., Jones, R. N., 2004. In vitro susceptibilities of rare *Candida* bloodstream isolates to ravuconazole and three comparative antifungal agents, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Vol. **48**, pp. 101–105.

Prachyakij, P., Schnürer, J., Charernjiratrakul, W., Kantachote, D., 2007. Selection and identification of lactic acid bacteria that inhibit yeast contaminants isolated from fermented plant beverages, *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, Vol. **29(2),** pp. 211-218.

Rattanachaikunsopon, P. ve Phumkhachorn, P., 2010. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production, *Annals of Biological Research*, Vol. **1 (4)**, pp. 218-228.

Ray, P., Liewen, M. B., 2004. *Antifungal food additives* in Arora, D. K., Bridge, P. D. ve Bhatnagar, D., *eds*, *Fungal biotechnology in agricultural, food and environmental applications*, Marcel Dekker Inc., pp. 291-297, New York.

Rodríguez, N., Salgado, J. M., Cortés, S., Domínguez, J. M., 2012. Antimicrobial activity of D-3-phenyllactic acid produced by fed-batch process against Salmonella enterica, *Food Control*, Vol. **25**, pp. 274-284.

Schnürer, J., Magnusson, J., 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives, *Trends in Food Science & Technology*, Vol. **16**, pp. 70–78.

Schwenninger, S. M., Lacroix, C., Truttmann, S., Jans, C., Spörndli, C., Bigler, L., Meile, L., 2008. Characterization of low-molacular-weight antiyeast metabolites produced by a food-protective *Lactobacillus-Propionibacterium* coculture, *Journal of Food Protection*, Vol. **71(12)**, pp. 2481-2487.

Schwenninger, S. M., Meile, L., 2004. A. mixed culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* inhibits food spoilage yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. **27**, pp. 229–237.

Segal-Kischinevzky, C., Rodarte-Murguía, B., Valdés-López, V., Mendoza-Hernández, G., González, A., Alba-Lois, L., 2011. The euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii* has two catalase genes encoding enzymes with differential activity profile, *Current Microbiology*, Vol. **62(3)**, pp. 933-943.

Shelef, L. A. ve Seiter, J., 2005. *Indirect and miscellaneous antimicrobials* in Davidson, P. M., Sofos, J. N. ve Larry, B. A., *eds*, *Antimocrobials in Food*, pp. 573-598. Boca Raton, FL.

Skaugen, M., Cintas, L., Nes, I. F., 2003. Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. In: *Genetic of Lactic Acid Bacteria*. Eds. Wood, B., Warner, P. J., Book Series: The Lactic Acid Bacteria, Vol. **3.** Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 225-249.

Smaoui, S., Elleuch, L., Bejar, W., Karray-Rebai, I., Ayadi, I., Jaouadi, B., Mathieu, F., Chouayekh, H., Bejar, S., Mellouli, L., 2010. Inhibition of fungi and gram-negative bacteria by bacteriocin BacTN635 produced by *Lactobacillus plantarum* sp. TN635, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. **162**, pp. 1132-1146.

Smid, E. J. ve Gorris, L. G. M., 2007. *Natural antimicrobials for food preservation* in Rahman, M. S., *eds*, *Handbook of Food Preservation*, CRC Press, pp. 237-258, Boca Raton FL.

Ström K., Sjögren J., Broberg A., Schnürer J., 2002. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe–L-Pro) and cyclo(L-Phe–*trans*-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. **68(9),** p. 4322–4327.

Suzuki, M., Prasad, G.S., Kurtzman, C.P., 2011. Debaryomyces Lodder & Kreger-van Rij (1952). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T.,

editors. The Yeasts, a Taxonomic Study, Vol. **2**, 5th edition. New York, NY: Elsevier, pp. 361-372.

Szabo, N. J., Dolan, L. C., Burdock, G. A., Shibano, T., Sato, S., Suzuki, H., Uesugi, T., Yamahira, S., Toba, M., Ueno, H., 2011. Safety evaluation of *Lactobacillus pentosus* strain b240, *Food and Chemical Toxicology*, Vol. **49**, pp. 251–258.

Theron, M. M. ve Lues, J. F. R., 2011. Organic acids and food preservation. CRC Press, ABD. pp. 21-95.

Todorov, S. D., Dicks, L. M. T., 2007. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST712BZ isolated from boza, *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. **38**, pp. 166-172.

Valerio, F., Favilla, M., Bellis, P., Sisto, A., Candia, S., Lavermicocca, P., 2009. Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti, Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products, *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. **32,** pp. 438-448.

Vogel R. F., Matthias, E., Genetics of *lactobacil***, Georgakopoulos, P., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N.**, 2010. Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products, *Food Control*, Vol. **21**, pp. 136-142.

Wang, X., Zheng, Z., Dou, P., Qin, J., Wang, X., Ma, C., Tang, H., Xu, P., 2010. Cloning, expression, purification, and activity assay of proteins related to D-lactic acid formation in *Lactobacillus rhamnosus*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. **87**, pp. 2117–2123.

White, A. S., Godard, R. D., Belling, C., Kasza, V., Beach, R. L., 2010. Beverages obtained from soda fountain machines in the U.S. contain microorganisms, including coliform bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. **137**, pp. 61–66.

Wong, B., Kiehn, T. E., Edwards F., Bernard, E. M., Marcove, R. C., de Harven, E., Armstrong, D., 1982. Bonn infection caused by debaryomyces hansenii in a normal host: a case report, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. **16(3),** pp. 545-548.

Wood, B. J. B. ve Holzapfel, W. H., 1995. *The lactic acid bacteria: the genera of lactic acid bacteria*, Blackie Academic and Professional, Glasgow BK.

Yang, E. J., Chang, H. C., 2010. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. **139**, pp. 56-63.

Zalan, Z., Hudacek, J., Toth-Markus, M., Husova, E., Solichova, K., Hegyi, F., Plockova, M., Chumchalova, J., Halasz, A., 2011. Sensorically and antimicrobially active metabolite production of *Lactobacillus* strains on Jerusalem artichoke juice, *Journal of Science and Food Agriculture*, Vol. **91**, pp. 672–679.

Zanon P., Farrow J. A. E., Phillips P. A., Collins M. D., 1987. *Lactobacillus pentosus* (Fred, Peterson, and Anderson) sp. nov., norn, rev.

International Journal of Systematic Bacteriology, Vol. **37(4),** pp. 339-341.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad:	Ahu ÜNER
Doğum Yeri ve Tarihi:	İstanbul, 18.01.1981
Adres:	İTÜ Ayazağa Kampüsü 34469 Maslak
E-Posta:	uner@itu.edu.tr
Lisans:	İTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik