T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FERMENTE GIDA ÜRETİMİNDE STARTER KÜLTÜR ETKİSİNİN BELİRLENMESİ VE FERMANTASYON SÜRECİNİN OPTİMİZASYONU

BETÜL TÜRKER

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. MEHMET KARAKUŞ

BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI
BİYOTEKNOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS
NİSAN/2022

İTHAF

“Annem ve Babam’a ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, her türlü imkanı sağlayan ve özenle takip eden tez danışmanlığımı yürüten kıymetli hocam Sağlık Bilimleri Üniversitesi Biyoteknoloji ABD Başkanı Doç.Dr. Mehmet KARAKUŞ'a, tezimin başarılı bir şekilde yürütülmesinde fikirleri ve yönlendirmeleri ile bana destek olan değerli Uzm. Biyolog Leyla TARHAN ÇELEBİ'ye ve her türlü laboratuvar imkanlarını benim ile paylaşan SFA ARGE ÖZEL SAĞLIK HİZMETLERİ ekibinde yer alan bütün çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Her daim yanımda olan manevi anlamda beni hiç yanlız bırakmayan bu süreci birlikte tamamladığım canım annem Ayfer TÜRKER'e çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri koordinatörlüğü (BAP) tarafından desteklenmiştir (Proje Kodu 2020/110).

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ ix
ŞEKİLLER LİSTESİ x
SİMGELER VE KISALTMALAR xii
ÖZET xiii
ABSTRACT xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. PROBİYOTİKLER 3
2.1.1. Probiyotik Mikroorganizmalar 3
2.2. LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ 4
2.2.1. *Lactobacillus* 5
2.2.2. *Lactococcus* 6
2.2.3. *Pediacoccus* 6
2.2.4. *Leuconostoc* 7
2.3. Laktik Asit Fermantasyonu 7
2.4. Turşu Üretimi 8
2.4.1. Turşu Üretiminde Starter Kültür 9
2.4.1.1. Dondurarak kurutma (Liyofilizasyon): 10
3. GEREÇ VE YÖNTEM 12
3.1. GEREÇ 12
3.2. YÖNTEM 13
3.2.1. Toprak Örneklerinin Toplanması 13
3.2.2. Mikroorganizma İzolasyonu 13
3.2.2.1. Aerobik zenginleştirme: 13
3.2.2.2. Anaerobik zenginleştirme: 13
3.2.3.Mikroorganizmaların Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi 14
3.2.3.1. Koloni morfolojisinin belirlenmesi: 14
3.2.3.2. Gram boyama: 14
3.2.3.3. Hücre morfolojisinin belirlenmesi: 15
3.2.3.4. Katalaz testi 15

3.2.3.5. Oksidaz testi: 15
3.2.4. Mikroorganizmaların Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi 15
3.2.4.1. Vitek 2 compact ile tanımlama: 15
3.2.5. Mikroorganizmaların Moleküler Yöntemler İle Tanımlanması 16
3.2.5.1. İzolatların MALDI-TOF MS (VITEK MS) ile identifikasyonu 16
3.2.6. Mikroorganizmaları Biyoreaktörde Üretim İşlemi 17
3.2.6.1. Mikroorganizma kültürlerinin hazırlanması 17
3.2.6.2. Mikroorganizmaların biyoreaktörde çoğaltılması: 17
3.2.6.3. *Lactobacillus plantarum* ve *Leuconostoc mesenteroides* türleri sayımı: 18
3.2.7. Dondurarak Kurutma İşlemi (Liyofilizasyon) 18
3.2.7.1. Mikroorganizmaların aktive edilmesi ve çoğaltılması: 18
3.2.7.2. Kriyoprotektan çözeltisinin hazırlanması 19
3.2.7.3. Dondurarak kurutma (Liyofilizasyon) işlemi: 19
3.2.7.4. Kurutma işlemi sonrası mikroorganizma sayısının belirlenmesi: 19
3.2.8. Liyofilize Kültürlerin Depolama Stabilitelerinin Belirlenmesi 20
3.2.8.1. Hızlandırılmış Raf Ömrü Testi (ASLT): 20
3.2.9. Lahana Turşusu Fermantasyon Deneyleri 21
3.2.9.1. Turşu üretimi: 21
3.2.9.2. Hammadde yüzeyi ve yıkama sularında mikrobiyolojik analiz: 21
3.2.9.3. Seçilmiş starter kültürler ile lahana turşusu üretimi: 21
3.2.10. Lahana Turşularında Fiziksel ve Mikrobiyolojik Analizler 22
3.2.10.1. pH analizi: 22
3.2.10.2. Toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı: 22
3.2.10.3 Toplam laktik asit bakteri sayımı: 22
3.2.10.4. Toplam maya-küf sayımı: 22
3.2.11. Starter Kültür İle Hazırlanan Turşularda Stabilite Analizi 22
3.2.12. Lahana Turşularında Duyusal Analiz 23
3.2.13. İstatiksel Analiz 23
4. BULGULAR 24
4.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu 24
4.2. *Leuc. mesenteroides ve L. plantarum* Suşlarına Ait Makroskobik Ve Mikroskobik İnceleme Bulguları 26
4.3. *Leuc.mesenteroides ve L.plantarum* Suşlarına Ait Vitek Analiz Sonuçları 27
4.4. *Leuc.mesenteroides ve L. plantarum* Suşlarına Ait MALDI TOF MS Analiz Sonuçları 27
4.5. *Leuc.mesenteroides ve L. plantarum* Suşlarının Biyoreaktörde Üretim İşlemi 29
4.6. Dondurarak Kurutmaya Dayanıklılık Kriyoprotektan Seçimi 29

4.7. Liyofilize Kültürlerin Depolama Boyunca Canlılık Değişimi 31
4.7.1: Liyofilize Kültürlerin ASLT Sonuçları 31
4.7.2: Liyofilize Kültürlerin 4 °C Ve 25 °C Stabilite Sonuçları 32
4.8. Lahana Turşusu Hammaddesi İçin Etkin Yıkama Yönteminin Belirlenmesi 33
4.9. Yıkantı Sularında Gelişen Mikroorganizmaların Tanımlama Çalışmaları 35
4.10. Lahana Turşusu Örneklerinde Fermantasyon Süresince Meydana Gelen Kimyasal Değişimler 39
4.9. Lahana Turşusu Örneklerinde Fermantasyon Süresince Meydana Gelen Mikrobiyal Değişimler 40
4.10. Fermantasyon Sonunda Turşu Örneklerine Ait Duyusal Analiz Sonuçları 41
5. TARTIŞMA 42
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 48
KAYNAKLAR 49
EK 53

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Lahana turşusunun tip özellikleri gösterilmiştir 8

Tablo 4.1: Topraktan izole edilen mikroorganizmaların izolasyon besiyerindeki sayım sonuçları..... 24

Tablo 4.2: Türlerin fenotipik ve moleküler analiz sonuçları 27

Tablo 4.3: *Leuc. mesenteroides* biyokimyasal analiz analiz sonuçları 27

Tablo 4.4: *L. plantarum* biyokimyasal analiz sonuçları 29

Tablo 4.5: *L. plantarum* ve *Leuc. mesenteroides* suşunun biyoreaktörde canlılık oranına ait analiz sonuçları 29

Tablo 4.6: *L. plantarum* ve *Leuc. mesenteroides* suşunun canlılık oranına ait analiz sonuçları..... 30

Tablo 4.7: Arrhenius modellemesi ile miks kültürün dayanım süresi hesaplama sonuçları 31

Tablo 4.8: Kriyoprotektan içeren ve kriyoprotektan içermeyen liyofilize kültürlerin ASLT test sonuçları 32

Tablo 4.9: Kriyoprotektan kullanılarak liyofilize edilen kültürün 4 °C ve 25 °C depolama sürecinde canlılık sonuçları 33

Tablo 4.10: Sirkeli su, karbonatlı su ve musluk suyu ile yıkanan hammaddeye ait canlılık Oranı 34

Tablo 4.11: Sirkeli su, karbonatlı su ve musluk suyu ile yıkanan hammaddaye ait yıkantı suyu sonuçları 34

Tablo 4.12: Lahana turşularının duyusal değerlendirme sonuçları..... 41

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Starter kültür üretimindeki aşamalar 9

Şekil 3.1: Toprak üst yüzeyi numune alımı……12

Şekil 3.2: Toprak alt yüzeyi numune alımı…….12

Şekil 3.3: Anaerobik ortam için kullanılan jar 14

Şekil 3.4: Biyokimyasal analizde kullanılan tanımlama cihazı..... 16

Şekil 3.5: MALDI TOF MS analizinde kullanılan plak..... 17

Şekil 3.6: Liyofilizatörde kurutulan numuneler 19

Şekil 4.1: *Lactobacillus plantarum* ışık mikrokobunda Gp 100X büyütmede görüntüsü.. 26

Şekil 4.2: *Leuconestoc mesenteroides* ışık mikroskobunda Gp 100X büyütede görüntüsü...26

Şekil 4.3: MALDI TOF MS analizi sonrası *L. plantarum* ait kütle/şiddet grafiği ve izolat güvenlik değer sonuçlarını gösteren kütle spektroskopisi grafiği 28

Şekil 4.4: MALDI TOF MS analizi sonrası *Leuc. mesenteroides* ait kütle/şiddet grafiği ve izolat güvenlik değer sonuçlarını gösteren kütle spektroskopisi grafiği..... 28

Şekil 4.5: Lahana turşusu üretiminde kullanılan hammaddeye ait yıkantı sularında gelişen farklı mikroorganizmaların örnek petri görüntüleri..... 35

Şekil 4.6: Karbonatlı su ile yıkanan hammadde yüzeyinde tespit edilen mikroorganizmaların a: *Bacillus simplex*,b:*Serratia liquefaciens*,c:*Micrococcus luteus* ait MALDI TOF MS analiz sonrası kütle/şiddet grafiği değer sonuçlarını gösteren kütle spektroskopisi grafiği..... 36

Şekil 4.7: Musluk suyu ile yıkanan hammadde yüzeyinde tespit edilen mikroorganizmaların a: *Pantoea agglomerans*,b: *Serratia liquefaciens*,c: *Staphlococcus cohnii* luteus ait MALDI TOF MS analiz sonrası kütle/şiddet grafiği değer sonuçlarını gösteren kütle spektroskopisi grafiği.....37

Şekil 4.8: Sirkeli su ile yıkanan hammadde yüzeyinde tespit edilen mikroorganizmaların a: *Paenibacillus cookie*,b: *Enterecoccus durans*,c: *Pseudomonas fluorescens* luteus ait MALDI TOF MS analiz sonrası kütle/şiddet grafiği değer sonuçlarını gösteren kütle spektroskopisi grafiği……...38

Şekil 4.9: Lahana turşusu fermantasyon süresince salamura örneklerindeki pH değişimi…39

Şekil 4.10: Lahana turşusu fermantasyon süresince salamura örneklerindeki laktik asit bakteri değişimi 40

Şekil 4.11: Lahana turşusu fermantasyon süresince salamura örneklerindeki mezofil bakteri değişimi 40

SİMGELER VE KISALTMALAR

DRCM : De Man Differantial Rein Forced Clostridial Broth

FTS : Steril Fizyolojik Tuzlu Su

G : Gram

HCCA : Siyano-4 hidroksisinamik asit

LAB : Laktik Asit Bakteri

L : Litre

MPa : Mega Pascal

µl : Mikrolitre

ml : Mililitre

MRSA : De Man Rogosa and Sharpe Agar

MRSB : De Man Rogosa and Sharpe Broth

NA : Nutrient Agar

PDA : Potato Dextrose Agar

Rpm : Dakikada Devir Sayısı

SDA : Sabouroud Dextrose Agar

TSA : Triptic Soy Agar

TSB : Trıptıc Soy Broth

YGC : Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar

FERMENTE GIDA ÜRETİMİNDE STARTER KÜLTÜR ETKİSİNİN BELİRLENMESİ VE FERMANTASYON SÜRECİNİN OPTİMİZASYONU

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada ülkemiz florasından izole edilip tanımlanan yerli mikroorganizmalar ile lahana turşu üretiminde kullanılmak üzere yerli starter kültür eldesi hedeflenmiştir. Elde edilen starter kültürün stabilitesi çalışma kapsamında değerlendirilecektir.

Gereç ve Yöntem: İzole edilen ve tanımlanan *Lactobacillus plantarum* ve *Leuconostoc mesenteroides* türleri biyoreaktörde çoğaltılmış liyofilizasyon yöntemi kullanılarak starter kültür hazırlanmıştır.

Bulgular: Çalışmada farklı arazilerden toplanan toprak örnekleri mikrobiyolojik açıdan incelenmiş ve MALDI TOF MS ile karakterize edilerek tiplendirilmiştir. Tanımlama çalışmaları neticesinde 18 adet *Lactobacillus plantarum* ve 24 adet *Leuconostoc mesenteroides* suşu tespit edilmiştir. *Lactobacillus plantarum* ve *Leuconostoc mesenteroides* bakterileri biyoreaktörde çoğaltılmıştır. Starter mix kültür üretiminde canlılık kaybının minimum olması için *Lactobacillus plantarum* için %10 laktoz, %5 maltodextrin, %15 nişasta kombinasyonu, *Leuconostoc mesenteroides* için ise %10 laktoz, %15 maltodextrin, %5 nişasta içeriği hazırlanmıştır. 40 °C ASLT test sıcaklığında kriyojenik madde ile kaplanan starter mix kültür ile kriyojenik madde kullanılmayan grup canlık düzeyleri hesaplanmıştır. ($p<0,05$) 4 °C ve 25 °C gerçek zamanlı sıcaklık değerlerinde depolanan starter mix kültür hücre canlılık sonuçları değerlendirildiğinde, canlıkta az da olsa kayıp meydana geldiği belirlenmiştir. ($p>0,05$) Sonuçlar, starter mix kültürün raf ömrünü 1 yıl boyunca koruduğunu göstermiştir. Duyusal analiz sonuçları starter mix kültür ilave edilen örnek grupları ve kontrol grupları arasında belirgin duyusal farklılıkların olmadığını göstermiştir. ($p>0,05$)

Sonuç: Turşu üretiminde yerel starter kültür kullanımı ile fermantasyon süreci fiziksel ve mikrobiyolojik açıdan kontrol altına alınarak standart özelliklere sahip fermente turşu üretiminde kısa sürede verimli sonuçlar alınmıştır.

Anahtar Kelimeler: Fermantasyon, Laktik asit bakterisi, Probiyotik, Starter kültür, Turşu.

DETERMINING THE EFFECT OF STARTER CULTURE IN FERMENTED FOOD PRODUCTION AND OPTIMIZING THE FERMENTATION PROCESS

ABSTRACT

Aim: In this study, it was aimed to obtain local starter cultures to be used in the production of sauerkraut with local microorganisms isolated and identified from the flora of our country. The stability of the obtained starter culture will be evaluated within the scope of the study.

Material and Methods: Starter culture of isolated and identified *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* species was prepared using the lyophilization method multiplied in the bioreactor.

Results: In the study, soil samples collected from different fields were examined microbiologically and characterized and typed by MALDI TOF MS. As a result of identification studies, 18 *Lactobacillus plantarum* and 24 *Leuconostoc mesenteroides* strains were identified. *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* bacteria were grown in the bioreactor. In order to minimize the loss of viability in starter mix culture production, 10% lactose, 5% maltodextrin, 15% starch combination was prepared for *Lactobacillus plantarum*, 10% lactose, 15% maltodextrin, 5% starch content was prepared for *Leuconostoc mesenteroides*. At 40 °C ASLT test temperature, the viability levels of the group without cryogenic material were calculated with the starter mix culture coated with cryogenic material. ($p<0.05$) When the viability results of the starter mix culture cells stored at 4 °C and 25 °C real-time temperature values were evaluated, it was determined that there was a slight loss in viability. ($p>0.05$) The results showed that the starter mix culture preserved its shelf life for 1 year. The results of the sensory analysis showed that there were no significant sensory differences between the sample groups to which the starter mix culture was added and the control groups. ($p>0.05$)

Conclusion: With the use of local starter culture in pickle production, the fermentation process was brought under physical and microbiological control, and efficient results were obtained in a short time in the production of fermented pickles with standard properties.

Key Words: Fermentation, Lactic acid bacteria, Probiotic, Starter culture,Pickles.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Fermantasyon teknolojisi gıdaların üretiminde ve muhafaza edilmelerinde insanoğlunun uyguladığı en eski biyoteknoloji uygulamalarından birisidir (1). Fermantasyon uygulanabilirliği pratik, besleyici özelliklerinin geliştirilebildiği aynı zamanda lezzet açısından farklı tatların ortaya çıkmasını mümkün kılan bir gıda üretim yöntemi olarak tanımlanmaktadır (2).

Gelişen biyoteknoloji uygulamaları ile birlikte tüketicilerin taze meyve ve sebzelerden elde edilen fermente ürün taleplerinde artış görülmektedir (3). İnsanların taleplerindeki bu artış bu ürünlerin yıllardır kullanılıyor olması ve tüketilmesi, zamanla test edilerek sağlıklı ve doğal olduğunu düşünmeleri ile ilişkilendirilmiştir (4).

Ülkemiz çeşitli meyve ve sebzelerin üretilmesine olanak sağlayan verimli topraklara sahiptir. Hammadde açısından bizlere sağladığı bu zenginlik neticesinde birçok ürün fermantasyon yöntemi ile bizlere kazandırılmaktadır. Yaygın bilinen fermente gıdalar arasında yoğurt, kefir, zeytin, şalgam suyu, turşu önemli bir yer tutmaktadır.

Turşu kelimesinin kökeni "ekşi" anlamına gelen Farsça bir kelime olan *"torsh*" dan gelmektedir. Tüm dünyada ve ülkemizde çeşitli formulasyonlarla üretilen turşu yaygın tüketilen fermente ürün grubunu oluşturmaktadır. Türk mutfağının vazgeçilmez bir unsuru olan turşu ülkemizde lahana, salatalık, havuç, pancar, yeşil domates, şalgam, fasulye gibi sebzelerin laktik asit bakterileri (LAB) ile fermente edilmesiyle üretilen, uzun süre dayanabilen geleneksel bir üründür (5). Probiyotik mikroorganizma grubu içerisinde yer alan LAB, insanlık tarihi boyunca besin maddesi üretiminde önemli bir yer edinmiştir. Çeşitli fermente ürünlerin üretilmesinde ve muhafaza edilmesinde kullanılan mikroorganizma grubunu oluşturmaktadır (6).

Fermantasyonda görev alan mikroorganizmalar hammadde yüzeyinde doğal florada bulunmakta yada starter kültür (başlatıcı kültür) olarak fermente gıda üretiminde ortama eklenmektedir (7). Doğal fermantasyon spontan gelişen bir süreç olduğundan standardize edilmiş bir ürün oluşumu mümkün değildir. Starter kültürün fermente gıda üretiminde ortama eklenmesiyle fermantasyon prosesini kontrol altında tutarak standardize ürün eldesi sağlanabilmektedir (8).

Ülkemizde turşu üretimi son yıllara kadar küçük ölçekli üretimler ile kısıtlı kalmakta iken meyve ve sebze üretiminin giderek artması, artan sanayileşme ve insanların ilgisi ile turşu üretimi her geçen gün önem kazanmaktadır. Talebin artması ile birlikte turşunun gıda endüstrisindeki önemi anlaşılmış ve ürün kalitesini artıracak çalışmalar büyük önem taşımaya başlamıştır.

Bu çalışmada turşu fermantasyonunda kullanılmak üzere ülkemiz topraklarından izole edilen probiyotik nitelik taşıyan bakteriler ile yerli starter kültür üretimi hedeflenmiştir. Floradan izole edilen mikroorganizmaların tanımlama çalışmaları yapılmış, fermantasyon süresince starter kültür kullanımı ile turşunun fiziksel, mikrobiyolojik, duyusal özellikleri incelenmiş ve hazırlanan starter kültürün fermantasyon süresince stabiliteleri değerlendirilmiştir. Hammadde yüzeyinden ortama gelen mikroorganizmaların mikrobiyal yükünün tespit edilmesi ile fermente ürün üretim tesislerinde uygulanmak üzere etkili yıkama yöntemi belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. PROBİYOTİKLER

Yunanca kökenli terim olan probiyotik, kelime anlamı itibariyle yaşam için anlamına gelmektedir. Probiyotik tanımı kesin olarak yapılmasada zaman içerisinde bir çok yazar konu ile ilgili tanımlamalar yapmıştır. İlk olarak 1965 yılında bir mikroorganizma tarafından salgılanan ve başka bir canlının üremesini-çoğalmasını etkileyen maddeler anlamında tanımlanmıştır (9). Fuller 1989'da probiyotikleri "üzerinde yaşadıkları canlıların faydasına olacak şekilde mikroorganizma dengesini iyileştiren ve canlı yapıdaki mikrobiyal besin ilavesi" şeklinde ifade etmiştir (10,11). En çok kabul gören ve en basit tanımlardan biri Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından organize edilen bir uzman komitesi tarafından sunulan şu ifadelerdir:"Probiyotik organizmalar, canlı mikroorganizmalardır ve yeterli miktarlarda uygulandıklarında konakçıya sağlık açısından yarar sağlar" (12).

Özellikle memeliler için hacimli sebzelerden oluşan kaba yiyeceklerin tüketiminde yararlı olan kalın bağırsağın insanlarda yararsız olduğunu bildirmiştir. Dahası vücuda *Laktobacil* türlerinin alımının artması ile birlikte, toksin üreten bakterileri yerinden edip tehlikeli bağırsak çürümesi süreçlerini durdurarak sağlığın geliştirileceğini ve yaşamın uzatılacağını bildirmişlerdir (13).

Yüzyılın sonunda probiyotik mikroorganizmaların bağırsakta bulunan zararlı mikroorganizmalar ile savaştığı dış ortamdan gelen toksik maddelere karşı bağırsak duvarında koruyucu bir tabaka oluşturduğu saptanmış, antimikrobiyal maddeler üretme ve sindirim için önemli bazı enzimleri sentezleyerek besinlerin kimyasal sindirimine yardımcı olmaları yapılan çalışmalar sonucunda anlaşılmış ve belgelenmiştir.

2.1.1. Probiyotik Mikroorganizmalar

Probiyotiklerin uygun miktarda alınmaları ile birlikte konağın fizyolojik ve biyolojik etkilerinin olumlu yönde ilerlediği belirtilmiştir (14). Probiyotik bakteriler genellikle Gram (+) ve sporsuz bakterilerdir. Probiyotik bakteriler optimum 35-38°C'de ve pH 5,5-6,0 aralığındaki ortamları yaşam alanı olarak tercih ederler. Araştırmalar farklı

bölgelerden izole edilmiş ve tanım olarak probiyotik olduğu kanıtlanan birçok izolatın olduğunu göstermiştir (15).

Probiyotik suşlar, GRAS (Generally Regarded as Safe) kapsamında herhangi bir sekonder toksin üretmeyen ve tüketildiklerinde insan sağlığına herhangi bir zararı olmayan bakterilerden seçilmelidir.

Sağlığa faydalı herhangi bir mikroorganizma probiyotik olarak kabul edilse de probiyotik mikroorganizmaların resmi sınıflandırmaları için minimum kriterler bir probiyotiğin şu şekilde olması gerektiğini gösterir (16).

- Cins ve tür bazında tanımlanmış olması gerekmektedir.
- Canlılık göstermelidir.
- İnsan ve hayvanda yan etki oluşturmamalı, güvenilir olmalıdır.
- Patojen bakterilere karşı antimikrobiyal bileşikler üreterek antagonistik etki göstermelidir.
- Çeşitli hastalıkların tedavisinde bağırsak florasını düzeltmek amacı ile kullanılabileceğinden antibiyotiklerden etkilenmemelidirler.
- Bağırsak ortamında stabil kalmalıdır. Düşüh pH ve safra tuzları gibi olumsuz koşullardan etkilenmemelidir.
- Gıdalara ilave edildiğinde kaliteyi düşürmemelidir.
- Kontrollü çalışmalarda belirli dozlarda uygulandığında etkili olmalıdır.
- Üretim ve depolama işlemleri sırasında canlılığını ve aktivitelerini korumalıdırlar.
- Biyolojik etki gösterebilmeleri için mutlaka bağırsak yüzeyine tutunmalıdırlar.

Halihazırda birçok bakteri probiyotik olarak kullanılmakta ve bu probiyotiklerin önemli bir kısmını LAB oluşturmaktadır. Laktik asit bakterileri özellikle fermente ürünlerin hazırlanmasında büyük öneme sahiptir. Bu organizmalar arasında yer alan *Bifidobacterim* ve *Lactobacillus* genus üyeleri sıklıkla kullanılan laktik probiyotikler olarak tanımlanmaktadır (17).

2.2. LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ

Bu bakteriler karbonhidrat fermantasyonunda ana veya tek ürün olarak laktik asit üreten, filogenetik olarak yakından ilişkili mikroorganizmaların heterojen bir grubudur. Laktik asit bakterileri insanlar tarafından yaygınlıkla tüketilen fermente gıda ürünlerinde

baskın bir şekilde bulunmakta ve eksopolisakkarit yapısı üretebilmektedirler. Aynı zamanda starter kültür olarak kullanılabilmekte ve probiyotik olarak adlandırılan ürünlerin içeriğinde bulunmaktadırlar (18).

Laktik asit bakteri grubu üyeleri, Gram (+), sporülasyon oluşturmayan, katalaz negatif, asit toleranslı, gelişmeleri için glikoz, amonyum, vitamin ve çeşitli aminoasitlere gereksinim duyan genellikle düşük Guanidine + Citosine (G + C) içerikli kok ya da çubuklardır. Laktik asit bakteri grubu üyeleri anaerob veya mikroaerofiliktir. Katalaz enzimleri olmaksızın aerob koşullarda gelişebilen nadir bakteri grubudur (19-21). Laktik asit bakterileri homofermantatif ve heterofermantatif olarak sınıflandırılmıştır. Bu ayrım grup üyelerinin glikozu parçalayarak oluşturdukları son ürüne göre yapılmıştır (22).

Laktik asit bakterileri, *Streptococcaceae* ve *Lactobacillaceae* olmak üzere iki ana grupta yer almaktadırlar. Belirtilen bu aileler içerisinde yer alan türlerden olan *Pediococcus* ve *Streptococcus* ile birlikte *Lactobacillaceae* ailesinde bulunan *Lactobacillus* türleride bu grup içerisinde yer almaktadır. (23).

2.2.1. *Lactobacillus*

Lactobacillus cinsi LAB grubunun en geniş alt gruplarından birini oluşturmaktadır. Bu grup bakteriler Gram (+), fakültatif anaerobik ya da mikroaerofilik %5 CO_2'li ortamda gelişen, basil şeklinde, oksidaz ve katalaz testleri bakımından negatif, herhangi bir spor oluşumu gözlenmeyen bakterilerdir. Morfolojik olarak polimorf yapıda bazen kısa zincirler şeklinde değişik formlarda bulunmaktadır. Optimum gelişme gösterdikleri ortam sıcaklığı 30-40°C ve hafif asidik ortamlardır (24).

Lactobacillus türleri değişken morfolojik ve fizyolojik özellikleri sayesinde doğada en çok rastlanan mikroorganizma grubu içerisinde yer almaktadır. *Lactobacillus* türlerinin bir kısmı ozmotik basınca, düşük su aktivitesine ve yüksek tuz konsantrasyonuna direnç göstermektedir. Düşük pH aralığında asit üretebildikleri ve düşük pH aralığında yaşabilen bu tür asidofilik özelik göstermektedir (24).

Lactobacillus cinsi sınıflandırması fermentasyon sonunda oluşturduğu laktik asit miktarına göre, değişken sıcaklık ve biyokimyasal reaksiyonlarına göre sınıflandırılmıştır. Bu genus ,temelde üç farklı grup (*Termobacterium, Streptobacterium, Betabacterium*) içerisinde incelenmektedir (4).

Betabacterium grubunda yer alan türler fermentasyon son ürünü olarak asetik asit, CO_2 ve çeşitli organik asitleri üretmektedirler. Zorunlu heterofermentatif olarak tanımlanan *Lactobacillus* türleri *Betabacterium* grubu içerisinde sınıflandırılmıştır. İnsan gastrointestinal sisteminde yaygınlıkla tespit edilen heterofermentatif özellikte bakteriler *Lactobacillus buchneri, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus fermentum*, ve *Lactobacillus plantarum* olduğu tespit edilmiştir (25-27).

2.2.2. *Lactococcus*

Lactococcus cinsi günümüzde endüstriyel fermantasyonlarda, büyük ölçekli kullanımları ile özel bir öneme sahip laktik asit bakteri grubudur. *Lactococcus* türleri ile ilgili ilk çalışmalar, Pasteur'ün fermentatif değişikliklerle ilgili mikrop teorisini kanıtlamaya çalışan Joseph Lister tarafından yapılmıştır (28). *Lactococlar, L. lactis, L. garviae, L. piscium* ve *L. raffinolactis* türlerinden oluşmaktadır (29). *Lactoccocus* türleri laktoz, mannitol ve rafinoz dahil olmak üzere şekerlerden asit üretme yeteneklerine göre farklılık gösterirler.

Lactococcus türünün çoğu üyesi daha önce *Streptococcus* ve *Lactobacillus* cinsine aitti. Yapılan çalışmalar sonucunda türlerin birbirinden farklı özellikler taşıdığı tespit edilmiştir. *Lactococcus* türleri çiftler halinde veya kısa zincirler halinde büyür ve *Streptococcus* cinsinin birçok üyesinin aksine, bu organizmalar uzun zincirler halinde büyümez. Hem maksimum büyüme sıcaklıkları, hem de tuzu tolere edememeleri ile *Streptococcus* cinsinden ayrılırlar. Grup üyeleri 45 °C'de gelişme göstermemektedir. Bu özellikleri ile de *Enterococcus* cinsinden ayrılırlar (30,31).

Lactococcus türleri süt ve süt ürünleri yapımında bazı türleri ise krema ve tereyağı aromasına katkıda bulunmaları ile endüstriyel alanda kullanımı tercih edilen starter kültürlerdir (32).

2.2.3. *Pediacoccus*

Pediococcus cinsi, çiftler ve tetradlar halinde bulunan Gram (+), katalaz-negatif, hareketsiz, küresel hücrelerden oluşmaktadır. Tek hücreler nadiren bulunur ve pediokoklar zincir oluşturmaz. Genellikle isteğe bağlı olarak anaerobiktirler ve 25–50°C sıcaklık aralığında gelişmektedir. Tuza toleranslı olan bu türün bazı suşları % 6,5 NaCl içeren ortamda gelişebilir ve geniş bir pH aralığında (4,5-8,2) büyümektedir (33).

Pediacoccus türleri büyüme ve metabolik aktivite için çeşitli aminoasit ve inorganik iyonlara ihtiyaç duyarlar. İnorganik iyonlardan bazıları potasyum, fosfat magnezyum, kalsiyum, çinko, demir ve manganezdir. Özellikle metiyonin ve lizin *Pediococcus*'ların büyüme ve gelişmesini uyaran aminoasit gruplarıdır. *Pediococcus*'lar, tek bir nitrojen kaynağı olarak amonyum tuzları üzerinde büyüyemez ve genellikle nitratı nitrite indirgeyemezler (4,29). Pediosinler (bakteriyosinler), *Pediococcus* tarafından üretilen protein içerikli antimikrobiyal bileşiklerdir (34). Genel olarak, nispeten dar bir öldürme spektrumuna sahiptirler ve sadece üreten suşla yakından ilgili bakteriler için toksiktirler. Üretici hücreler kendi pediosinlerine karşı bağışıklık göstermektedir (33).

2.2.4. *Leuconostoc*

Leuconostoc mezofilik (optimum büyüme 25°C), Gram (+), katalaz-negatif, hareketsiz, zorunlu olarak heterofermentatif koklardır. Türün üyelerinin morfolojik yapıları genellikle çiftler ve zincirler halindedir (30). Bu genus üyelerinde sitokrom bulunmamakta ve indol oluşumu gözlenmemektedir (35). Bu türlerin optimum gelişme koşullarını sergileyebilmeleri için pH 4,5 ve üzerinde bir pH değerlerine sahip ortama gereksinim duyar (30).

Leuconostoc üyeleri fermente gıdaların kalitesi, güvenliği ve işlevselliğini arttırmaya yönelik ürün üretimine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Türün bazı üyeleri tarafından sitrat fermantasyonu gerçekleştirilir. Bu fermantasyon ile birlikte hem süt ürünlerinde (peynir, tereyağı) önemli bir lezzet bileşiği olarak diasetili hem de bazı peynir türlerinde arzu edilen gaz oluşumu için CO_2 sağlanır. Fermente sebzeler (örn.lahana turşusu, kimchi), süt ürünleri, ekşi hamur ve fermente zeytin gibi gıdalar için tat bileşikleri (örn., laktik asit, asetik asit, etanol, diasetil), ekzopolisakkaritler (glukanlar ve fruktanlar), çeşitli bakteriyosinler ve diğer maddeleri üretirler. *Leuconostoc* suşlarının diğer önemli özellikleri arasında asetaldehitin uzaklaştırılması, dekstranlar ve bakteriyosinlerin üretimi yer almaktadır (36). Çeşitli aroma bileşikleri üretebilme, laktik asit fermantasyonunun ilk aşamasını gerçekleştirme, tuza direnç gösterme, yüksek şeker dirençliliği özellikleri ile starter kültür olarak kullanılmaktadır (4,37).

2.3. Laktik Asit Fermantasyonu

Laktik asit fermantasyonu şekerleri laktik asite dönüştürme yeteneğine sahip LAB tarafından (*Lactobacillus spp*. *Lactococci, Streptococcus thermophilus ve Leuconostoc*

vb.) gerçekleştirilen prosestir. Laktik asit fermantasyonu ülkemizde fermente yiyecek ve içeceklerin üretiminde önemli rol oynamaktadır (38).

Laktik asitin fermantasyon sonucunda nihai son ürün olarak elde edilmesi homofermentatif ve heterofermantatif bakteriler sayesinde gerçekleşmektedir. Homofermantatif bakteriler şeker fermentasyonunda Fruktoz Di Fosfat (FDP) yolunu kullanırlar. Homofermantatif grup üyeleri laktik asit üretiminin yanında eser miktarda formik asit, asetik asit ve etonol oluştururlar (39,40).

Laktik asit fermantasyonunda başlangıç substrat miktarı, pH, tuz konsantrasyonu, sıcaklık mikroorganizmaların gelişimini etkileyen faktörlerdir (41,42). Fermantasyon sırasında bu parametreler dikkate alınarak optimum koşulların sağlanması gerekmektedir (43). Günümüzde geleneksel ürünlere ilave olarak gelişen gıda üretim teknolojisi ile birlikte fermente gıda pazarında ciddi oranda bir artış yaşanmıştır (38).

2.4. Turşu Üretimi

Lahana turşusu, turşu kurmaya elverişli beyaz lahananın (*Brassica oleracea*) salamura, sirkeli salamura veya doğrudan tuz içerisine eklenerek teknolojisine uygun olarak hazırlanan laktik asit fermantasyonun gerçekleştiği fermente üründür. Lahana yapraklarında doğal flora elemanı olarak bulunan bakteriler oksijence fakir ortamda laktik asit üretimi gerçekleştirir ve bu ortam lahananın korunmasını sağlar (44-45).

Lahana turşusu üretiminde fermantasyon salamura eklenir eklenmez başlamaktadır. Ancak lahana turşu üretiminin ilk aşaması uygun lahana seçimi ile başlamaktadır. Seçilen lahana sarımtrak-beyaz renkte, esmerleşmemiş veya siyahlaşmamış, pembeleşme göstermeyenler arasından seçilmelidir. Lahanaların içinde varsa çürük, ezik, hasarlı olanlar çıkarılmalıdır. Çevresel şartlara ve starter kültür kullanım durumuna bağlı olarak fermantasyon süresi değişkenlik göstermektedir (46).

Tablo 2.1: Lahana turşusunun tip özellikleri gösterilmiştir (46)

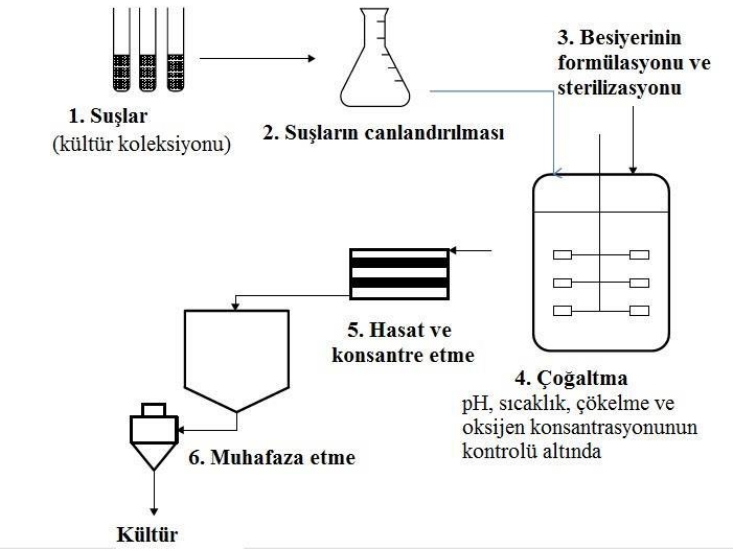
Özellikler	Tipler		
	Salamuralı	Sirkeli-Salamuralı	Kuru-Tuzlu
Şekil	Yapraklar doğranmış veya doğranmamış	Yapraklar doğranmış veya doğranmamış	Yapraklar yaklaşık 3-5mm genişliğinde doğranmış
Toplam Asitlik (Laktik asit olarak)	En az %0,5 En çok %2,0	En az %1,5 En çok %2,5	En az %1,0 En çok %2,0
Tuz Konsantrasyonu	En çok %6,0	En çok %6,0	En çok %3,0

Fermentasyon işleminin seyri reaksiyonun gerçekleştiği ortamda oksijen varlığı veya yokluğuna göre değişmektedir. Oksijen varlığı bakteriyel gelişimi etkilemekte ve bu durumda salamura yüzeyinde mikrobiyal gelişim gözlenebilmektedir. Oksijen miktarının düşük seviyelerde olduğu reaksiyonlarda ise herhangi bir mikrobiyal aktivitteden söz edilemez (47).

2.4.1. Turşu Üretiminde Starter Kültür

Starter kültür, seçilmiş belirli bir suşun veya belirli karışık mikrobiyal popülasyonun fermente ürünlerde fiziksel ve mikrobiyal açıdan kontrollü bir süreç sağlanması amacıyla gıda üretiminde kullanılan mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (48).

Starter kültürlerin canlılığının korunması ve kültürlerin muhafaza edilme yöntemleri endüstriyel fermente gıda üretim yöntemlerinin önemli konularından birini oluşturmaktadır (49). İlk oluşturulan starter kültürler sıvı formda üretilirken 1960'lı yıllarda starter kültür kullanımı yaygınlaşmıştır (50). Sıvı kültürlerin yanında kurutulmuş, dondurarak kurutulmuş starter kültür üretim teknikleri yaygınlaştırılmıştır (51,52).



Şekil 2.1: Starter kültür üretimindeki aşamalar (50)

Dondurarak kurutma yöntemi günümüzde starter kültürlerin muhafazasında uygulanmaktadır (53). Dondurarak kurutma yöntemi konsantre starter kültür üretimi ve uzun süre depolama sağlaması ile starter kültür eldesinde kullanılmaktadır (54,55).

Kurutma prosesi çeşitli şekillerde ve farklı teknikler kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Bunlar sırasıyla vakumlu kurutma, dondurularak kurutma, sprey kurutma, akışkan kurutma ve kuru hava ile kurutma yöntemleridir.

2.4.1.1. Dondurarak kurutma (Liyofilizasyon): Dondurarak kurutma (liyofilizasyon) yönteminin temel çalışma prensibi çözücünün veya süspansiyon ortamının düşük bir sıcaklıkta kristalize edildiği ve daha sonra katı durumdan doğrudan gaz fazına dönüştürüldüğü kurutma işlemidir (56).

Liyofilizasyon işlemi mikroorganizmaların korunmasında ve saklanmasında tercih edilen yöntemdir (57). Diğer kurutma işlemlerinde, hücrelerin maruz kaldığı stres ile membran zararlanması, protein denatürasyonu ve DNA hasarı gibi çeşitli zararlanmalar meydana gelebilmektedir. Dondurarak kurutma ise daha yüksek canlılık oranı sağlamak ile birlikte mikroorganizmaların morfolojik ve biyokimyasal özelliklerini de korumaktadır (58).

Dondurarak kurutma işlemleri temelde üç basamakta gerçekleşir

1. Ön dondurma

2. Birincil kurutma

3. İkincil kurutma

Bu yöntem probiyotik gıda ürünlerinin hazırlanmasında yaygınlıkla kullanılan bir yöntem olup gelişen teknolojik altyapı ile birlikte kapsülasyon kurutma uygulamalarınıda içermektedir (59,60). Dondurarak kurutma sırasında meydana gelen kristaller hücre canlılığını tehdit etmesi sebebiyle bu işlemlerin öncesinde ortama kriyoprotektan adı verilen kriyojenik bileşenler ilave edilmektedir (60). Kriyoprotektanlar, emülsiyonun fiziksel ve kimyasal hasarına neden olabilecek donma ve kurutma aşamalarında lipit katmanlarında meydana gelen gerilmeleri önlemek için kullanılan bileşiklerdir (61). Bu kriyoprotektanlar hücreler içinde birikir ve iç ve dış hücre ortamları arasındaki ozmotik farkı azaltmaktadır (59,62,63).

Probiyotik kültürlerin kapsülasyonunda çeşitli kriyoprotektanlar kullanılmaktadır. Bunlardan polisakkarit yapıda olanların başında aljinat, ksantan gam, nişasta ve türevleri gelirken, protein yapıda jelatin ve lipit yapıda süt yağı, kakao yağı ve hidrojene yağ bazlı bileşikler kullanılmaktadır (64).

Gıdaların dondurularak kurutulması çalışmalarında kullanılan yağsız süt tozu, maltodekstrin, laktoz ve sukroz gibi kriyoprotektanlar depolama ve liyofilizasyon esnasında LAB'nin yüksek oranda canlı kalmasını sağlamaktadır (65-68).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

Starter kültür üretiminde kullanılmak üzere mikroorganizmaların izolasyonu için kullanılan toprak numuneleri Marmara adası Topağaç Köyü'ne ait 30 farklı tarım alanından temin edilmiştir. Toprak numune örnekleri Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de gösterilmiştir. İzole edilen toprak numunelerinin biyokimyasal tanımlamaları Vitek 2, tür tanımlamaları ise MALDI TOF MS analiz cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Tanımlama çalışmaları neticesinde tespit edilen *Lactobacillus plantarum* ve *Leuconostoc mesenteroides* suşları starter kültür üretiminde kullanılmak üzere biyoreaktörde kontrollü bir şekilde çoğaltılmıştır. Üretim işlemi tamamlanan *Lactobacillus plantarum* ve *Leuconostoc mesenteroides* liyofilizatörde dondurarak kurutularak fermente lahana turşusu denemelerinde starter kültür olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.1: Toprak üst yüzeyinden numune alımı



Şekil 3.2: Toprak alt katmanından numune alımı

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Toprak Örneklerinin Toplanması

Toprak numuneleri probiyotik nitelik taşıyan mikroorganizmaların izolasyonu ve tanımlanması için Eylül 2020 yılında Türkiye'nin en büyük ikinci adası olan Marmara adası florasından temin edilmiştir. Toprağın üst yüzeyi temizlendikten sonra steril bir spatula ile 1-5 cm derinliğinden ve 1-30 cm derinliğinden yaklaşık 3000 g, 30-60 cm derinliğinden ise yaklaşık 4000 g toprak numunesi alınarak steril poşetler içerisine bırakılmıştır. 1-30 cm derinliklerinden alınan numuneler 25°C'de kuru ve aerobik koşullarda, 30-60 cm derinliğinden alınan toprak numuneleri ise 25°C'de kuru ve anaerobik koşullarda taşınmıştır.

3.2.2. Mikroorganizma İzolasyonu

3.2.2.1. Aerobik zenginleştirme: Toprak örneklerinden mikroorganizmaları izole etmek için üst yüzeyinden alınan numunelerden 10 g tartılıp 90 ml Tryptic Soy Broth (TSB) içerisine eklenerek çözülmesi sağlanmıştır. Bu karışımlar vortex (Ika,Vortex1,Almanya) ile iyice karıştırıldıktan sonra homojenizasyon sağlanmıştır. Supernatant alınarak steril tüplere aktarılmış ve zenginleştirme amacı ile 24 saat 25-30°C'de inkübe edilmiştir. Zenginleştirilen numunelerin 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} oranında seri dilüsyonları hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrasında 10^{-3} oranında seyreltilen toprak örnekleri seçilerek, Tryptic Soy Agar (TSA), Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ve Nutrient Agar (NA) besiyerlerine mikrobiyal ekimleri yapılmıştır. 24-48 saat, 25-30°C'de aerobik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda saf kültürler tanımlamada kullanılmak üzere stok kültürler halinde -80 °C derin dondurucularda saklanmıştır.

3.2.2.2. Anaerobik zenginleştirme: Toprağın üst yüzeyi temizlendiksen sonra alınan numuneler 10 dakika alt-üst edilip karıştırılarak homojenize edildikten sonra 10 g tartılarak 90 ml Differential Reinforced Clostridial Broth (DRCM), De Man Rogosa and Sharpe (MRS) Broth, Tryptic Soy Broth (TSB), eklenerek çözülmesi sağlanmıştır. Vortex (Ika,Vortex 1, Almanya) cihazı yardımıyla homojen hale getirilen numunelerin üst yüzeylerindeki sıvı alınarak steril tüplere aktarılmıştır. Zenginleştirme amacı ile 25-30°C'de mikroaerobik ve anaerobik koşullarda 24 saat inkübe edilerek zenginleştirilmiştir. Zenginleştirilen numunelerin 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} oranında seri

dilüsyonları hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrasında 10^{-3} oranında seyreltilen toprak örnekleri seçilerek, Tryptic Soy Agar (TSA), Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Nutrient Agar (NA) ve De Man Rogosa And Sharpe (MRS) agar besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. Anaerobik koşullarda inkübasyon için 2,5 l hacimli anaerobik jar (Merk, Almanya) kullanılmıştır. Anaerobik ve mikroaerofilik mikroorganizmalar için uygun ortam Anaerocult C (Merk, Almanya) ve Anaerocult P (Merk, Almanya) petleri ile sağlanmıştır. İnkübasyon sonunda saf kültürler tanımlamada kullanılmak üzere stok kültürler halinde -80 °C derin dondurucularda saklanmıştır.



Şekil 3.3: Anaerobik ortam için kullanılan jar

3.2.3.Mikroorganizmaların Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.3.1. Koloni morfolojisinin belirlenmesi: Topraktan izole edilen mikroorganizmaların tanımlama çalışmaları için -80 °C'de muhafaza edilen saf kültürlerin koloni morfolojilerinin belirlenmesi için opaklık, boyut, form, renk, profil özellikleri incelenmiş ve tipik koloni morfolojileri belirlenmiştir (69).

3.2.3.2. Gram boyama: Aktifleştirme işlemi için örnekler, gliserol içeren kültürlerden öze yardımıyla alınmış TSA, MRS, MRS-BCG agar besiyerlerine sürme plak yöntemi ile ekimi yapılmıştır. Mikroorganizmalar 30 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Gram boyama için petri üzerinde gelişen tek koloniler tercih edilmiştir. Aseptik koşullarda, kültürlerden bir öze dolusu (10 µL) örnek alınarak, steril lam üzerine eşit ve homojen bir şekilde yayılmıştır ve havada kuruması sağlanmıştır. Fiksasyon işlemleri alevden geçirilerek saplanmış ve fikse edilen bakteriler ilgili firmanın (Merck, Germany) ürün kataloğunda belirtmiş olduğu talimatlar izlenerek gerçekleştirilmiştir. İlk aşama olan Kristal Viyole çözeltisinde bir dakika bekletildikten sonra lugolçözeltisi damlatılarak bir

dakika daha beklenilmiştir. Distile su ile yaklaşık 5 saniye süren yıkama işlemi sonrasında arındırma basamağı olan dekolorizasyon basamağı gerçekleştirilmiştir. Dekolorizasyon işlemleri sonrasında distile su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve lamların kurumasu sağlanmıştır. Zıt boya uygulaması gerçekleştirildikten sonra lamlar kurutularak immersiyon yağı kullanılarak 100X objektifte ışık mikroskobunda (Motic, BA210, Almanya) incelenmiştir. Boyama sonucunda eflatun-mor renkli hücreler gram pozitif, pembe-kırmızı renkli hücreler ise gram negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3.3. Hücre morfolojisinin belirlenmesi: Hücre morfolojisini belirlemek üzere gram boyama aşamasından sonra mikroorganizmaların mikroskop altında incelemeleri gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizmalar hücre morfolojileri bakımından kok (yuvarlak) ve basil (çubuk) olarak değerlendirilmiştir. Bu aşamadan sonra morfolojik olarak gram pozitif bakteriler biyokimyasal testlerde değerlendirilmek üzere seçilmiştir. Mikroorganizmalar biyokimyasal testlerde kullanılmak üzere yatık agar besiyerinde saklanmıştır. Gram negatif ve maya hücreleri çalışma kapsamından çıkarılmıştır.

3.2.3.4. Katalaz testi: Gram pozitif olduğu tayin edilen örneklerin katalaz enzimi varlığı bakımından katalaz testi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde %30luk H_2O_2 (Merk,Almanya) çözeltisi kullanılmıştır. 10 ml'lik MRS veya M17 sıvı besiyerinde 30 °C'de 18-24 saat geliştirilen taze kültürlerin üzerine 3-4 damla H_2O_2 çözeltisi damlatılarak gaz çıkışı gözlenmiş; gaz oluşturanlar katalaz pozitif, oluşturmayanlar ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (70,71).

3.2.3.5. Oksidaz testi: Gram pozitif ve katalaz negatif olarak belirlenen izolatlar, MRS veya M17 katı besiyerinde 30 °C'de 2-3 gün süreyle geliştirilmiş ve oluşan koloniler Oksidaz test kiti (Merk, Almanya) ile teste tabi tutulmuşlardır. Katı besiyerinde gelişen kolonilerden plastik öze yardımıyla alınarak, oksidaz test kartları üzerindeki alana aktarılmış ve yaklaşık 1 dakika bekletilerek renk değişimine göre sonuçlar değerlendirilmiştir. Test kartı üzerinde mavi rengin oluşması oksidaz pozitif olarak kaydedilmiştir.

3.2.4. Mikroorganizmaların Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.4.1. Vitek 2 compact ile tanımlama: Gram boyama, katalaz ve oksidaz testi uygulanmış izolatların biyokimyasal düzeyde tür tanımlama ve doğrulama çalışmaları Vitek 2 (Biomerieux, Vitek 2, Fransa) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Yatık agarda

saklanan kültürler tanımlama için tekrar TSA, MRS-BCG, MRS agar besiyerlerine seyreltilerek ekimi yapılmıştır. Mikroaerobik-anaerobik koşullarda 30±2,5°C'de 24-48 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası besiyerinde gelişen tek koloniler fizyolojik tuzlu su (%0,9 NaCl) içeren steril tüpe aktarılmıştır. Densitometre de 0.5 Mc farland ayarlaması yapılan test tüplerinin ucuna GP ID kartı yerleştirilmiştir. Hazırlanan test tüpü cihaz kasetinin içerisine yerleştirilerek gram pozitif bakterilerin biyokimyasal açıdan değerlendirilmesi yapılmıştır.



Şekil 3.4: Biyokimyasal analizde kullanılan tanımlama cihazı

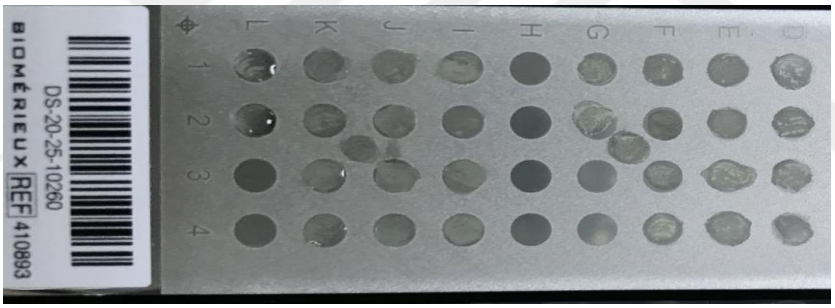
3.2.5. Mikroorganizmaların Moleküler Yöntemler İle Tanımlanması

3.2.5.1. İzolatların MALDI-TOF MS (VITEK MS) ile identifikasyonu: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry- Matriks Yardımlı Lazer İyonizasyon Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) yöntemi ile identifikasyonda, mikroorganizmaların hücre yapılarında bulunan protein profili çıkarılarak referans bir spektrum ile karşılaştırması esasına dayanmaktadır (72).

MALDI-TOF VITEK MS (BioMerieux, VITEK MS, Fransa) kütle spektroskopisi timeline dayanan şeker ve peptidlerin lazer ışınlarıyla parçalanması sonrasında kütle ile orantılı absorbsiyon analizine dayanan tayin yöntemidir. Günümüzde birçok alanda kullanılan bu yöntem sayesinde bakterilerin tür düzeyinde ayrımı sağlanabilmektedir (73).

Araştırma kapsamında izole edilen 120 adet gram pozitif bakterinin tanımlama işlemi için TSA, MRS agar besiyerlerine seyreltilerek ekimi yapılmıştır. Mikroaerobik-anaerobik koşullarda 30-35 °C'de 24-48 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon

sonrası besiyerinde gelişen tek koloniler MALDI TOF MS plağına inoküle edilmiştir. Her mikroorganizma plak üzerinde bulunan kuyucuklara ayrı ayrı sürülmüştür. Plak üzerine inokule edilen mikroorganizmalar üzerine 1 µl formik asit (%70'lik) eklenerek kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işlemi sonrasında (HCCA: siyano-4 hidroksisinamik asit) solüsyonundan 1 µl kuyucuklara eklenerek tekrar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Plak üzerindeki kontrol kuyucuğuna referans suş inokule edilmiştir. Plak kasete yerleştirilerek okuma işlemi yapılarak probiyotik nitelikteki mikroorganizmaların cins ve tür bazında tanımlaması cihaz kütüphanesinde yer alan veriler ile karşılaştırması sonucu yapılmıştır. Analiz sonucunda yüksek ve muhtemel düzeyde olmak züere iki farklı skalada değer berlilenerek tür tayini gerçekleştirilmiştir. Bu işlemlere göre 2000-3000 arası değerler cins düzeyinde ve muhtemel tür düzeyinde teşhis; 1700-1999 arasındaki skala değerleri kullanılarak değerlendirilmiştir (74-77). Tanımlama çalışmaları neticesinde 18 adet *Lactobacillus spp* ve 24 adet *Leuconostoc spp* türleri probiyotik içerikli turşu starteri olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.5: MALDI TOF MS analizinde kullanılan plak

3.2.6. Mikroorganizmaları Biyoreaktörde Üretim İşlemi

3.2.6.1. Mikroorganizma kültürlerinin hazırlanması: *Lactobacillus plantarum ve Leuconostoc mesenteroides* türleri gliserollü kültürlerden öze yardımıyla alınarak aktifleştirmek üzere MRS agar besiyerine seyreltilerek ekimi yapılmıştır. 30-35°C'de 24-48 saat anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir. Petri üzerinde gelişen koloniler öze yardımı ile toplanarak densitometre de Steril Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) içerisinde 0.5 Mc farland ayarlanarak biyoreaktörde çoğaltılmak üzere hazır hale getirilmiştir.

3.2.6.2. Mikroorganizmaların biyoreaktörde çoğaltılması: Starter kültür üretiminde çalışma boyunca 4 L hacminde küçük ölçekli üretimler için tasarlanan biyoreaktör (Sartorius Biostat, A plus, Türkiye) kullanılmıştır. Biyoreaktör içerisinde mikroorganizmaların büyüme ortamı olarak MRS broth içeren sıvı besiyeri kullanılmıştır.

Lactobacillus plantarum ve *Leuconostoc mesenteroides* türleri farklı zamanlarda ayrı ayrı çağaltılmıştır. *Lactobacillus plantarum* türü başlangıç süspansiyonu yaklaşık olarak $1x10^8$ log cfu/ml olarak kültür ortamına aşılandı. *Lactobacillus plantarum* suşu üretimi için uygun fizyolojik koşullar; sıcaklık 32±2,5°C ortam pH'sı 5 M NaOH ile 6,0-7,0 aralığında, ortam CO_2 değeri %20 olarak ayarlanmıştır. Çalkalama hızı 200 rpm ve inkübasyon süresi 72 saat olarak belirlenmiştir. İnkübasyon sonucunda *Lactobacillus plantarum* suşu üretilmiştir. *Leuconostoc mesenteroides* başlangıç süspansiyonu yaklaşık olarak $1x10^8$ log cfu/ml olarak densitometrede ayarlanmıştır. Reaktör sıcaklığı 32±2,5°C, ortam pH'sı 6,0-7,0 cihaz çalkalama hızı 200 rpm olarak ayarlanmıştır.72 saat inkübasyon sonucunda üretim tamamlanmıştır.

3.2.6.3. *Lactobacillus plantarum* ve *Leuconostoc mesenteroides* türleri sayımı: Türler biyoreaktöre aşılandıktan sonra, 24 saatte bir numune alınarak sayım gerçekleştirilmiştir. 72 saat biyoreaktör içerisindeki inkübasyon süresi sonunda başlangıç süspansiyonuna göre logaritmik olarak değişimleri hesaplanmıştır. Sayım için üretilen *Lactobacillus plantarum* ve *Leuconostoc mesenteroides* türleri ekimleri farklı zamanlarda yapılmıştır. 1 ml örnek alınak 9 ml % 0,9 NaCl içeren (FTS) içerisinde 10^{-1} ve 10^{-7} aralığında seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilüsyondan, yayma plak yöntemine göre 0,1 mL örnek MRS Agar içeren petrilere aktarılmıştır. Ekim yapılan petriler 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır (78). Süre sonunda canlı bakteri miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanarak, sonuçlar log cfu/mL cinsinden ifade edilmiştir (69).

$$\mathrm{N} = \frac{C}{\left(\mathrm{Vx}(\mathrm{n1} + 0{,}1n2)\right)xd}$$

N: Örneğin 1 g veya 1 mL'sindeki mikroorganizma sayısı

C: Sayımı yapılan tüm petrilerdeki toplam koloni sayısı

V: Sayımı yapılan petrilere aktarılan hacim (mL)

n1: İlk seyreltiden ekim yapılan petri adedi

n2: İkinci seyreltiden ekim yapılan petri adedi

d: Sayımı yapılan ardışık iki seyreltiden konsantre olanının seyreltme oranı

3.2.7. Dondurarak Kurutma İşlemi (Liyofilizasyon)

3.2.7.1. Mikroorganizmaların aktive edilmesi ve çoğaltılması: Biyoreaktörde gerçekleşen üreme, sayımla ve/veya densitometre ile doğrulandıktan sonra, fazın sonundaki bakteri hücrelerini toplamak için 1,500 *xg*'de 4°C'de 10 dk santrifüj (Nüve,

NF800, Türkiye) edilmiş ve elde edilen pellet 10 mL %0,9 NaCl içeren FTS kullanılarak 2 kez yıkanmıştır. Yıkanan her bir pellet hücre sayısı $1x10^{10}$ log cfu/ml olacak şekilde kriyoprotektan çözeltisi ile süspanse edilmiştir (79).

3.2.7.2. Kriyoprotektan çözeltisinin hazırlanması: Çalışmada üç farklı kriyojenik maddenin laktoz (SigmaAldrich, Steinheim, Almanya), maltodekstrin (SigmaAldrich DE 16,5-19,5, Steinheim, Almanya) ve nişasta (SigmaAldrich, Steinheim, Almanya) içerikli kriyoprotektan kombinasyonları hazırlanmıştır. Kriyojenik maddelerin toplam bileşimleri %30 oranında olacak şekilde kriyoprotektan kombinasyonları hazırlanarak denemeler yapılmıştır. Hazırlanan kombinasyonlar liyofilizasyon tabaklarına aseptik olarak dağıtılmış ve liyofilizatore dizilmiştir.

3.2.7.3. Dondurarak kurutma (Liyofilizasyon) işlemi: Liyofilizasyon işlemi (LABFEEZ, -80 freze-dryer, Çin) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Liyofilizasyon işlemleri için hazırlanan numuneler çalışma öncesinde -80 C'de dondurulan liyofilizasyon bölmesindeki hazenelere yerleştirilmiştir. Donma işlemi -80 C'de gerçekleştirilmiştir. Kurutma esnasında, cihaz basıncının 5 mpa olmasına dikkat edilmiştir. 48 saat sonrasında liyofilizasyon işlemi sona ermiştir.



Şekil 3.6: Liyofilizatörde kurutulan numuneler

3.2.7.4. Kurutma işlemi sonrası mikroorganizma sayısının belirlenmesi: Starter kültürlerin liyofilizasyon sonrası ile depolama sırasındaki canlılıklarının belirlenmesi için aşağıda belirtilen formül kullanılmıştır (80). Her bir örnekten 1 ml alınak 9 ml % 0,9 NaCl içeren FTS içerisinde 10^{-1} ve 10^{-7} aralığında seri dilüsyonları

hazırlanmıştır. Bakteriyel ekimi yapılan petri kapları 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası gelişen koloniler sayılmış ve hücrelerin canlılık düzeyi hesaplanmıştır.

Canlılık (%) = 100 x N/N0

N0: Proses öncesi hücre canlılığı (log cfu/ml)
N: Dondurma veya dondurarak kurutma sonrası hücre canlılığı (log cfu/ml)

3.2.8. Liyofilize Kültürlerin Depolama Stabilitelerinin Belirlenmesi

3.2.8.1. Hızlandırılmış Raf Ömrü Testi (ASLT): *L. plantarum* ve *Leuc. mesenteroides* starter kültürlerin depolama süresince canlılık değişiminin tahmin edilebilmesi ve kültürlerin raf ömrünün belirlenmesi için gerçek zamanlı (RT) ve hızlandırılmış raf ömrü (ASLT) testi gerçekleştirilmiştir. RT testi için *L. plantarum* ve *Leuc. mesenteroides* içeren starter mix kültür'ün bozulmaya başladığı zamanı belirlemek için gerçek sıcaklık ortamında steril şase ambalaj içerisinde +4 °C (Bosh, KDN55NWFON A+, Almanya) ve 25 °C (Nüve, ES 120, Türkiye) saklanmıştır. ASLT testi için hazırlanan starter mix kültür steril şase ambalaj içerisinde 40 °C (Nüve, TK, Türkiye) sıcaklıkta 4 ay depolanmıştır. ASLT testi uygulamasında depolama boyunca kriyojenik madde ilave edilmiş starter mix kültür ve kriyojenik madde ilave edilmeyen mix kültürün canlılık düzeyini belirlemek için depolamanın 0., 10., 20., 30., 40., 50., 60., 70., 80., 90., 100., 110., 120. ve 130. günlerinde canlı hücre sayısı belirlenmiştir.

Arrhenius modeli mikrobiyoloji alanında belirli sıcaklıkta bakteriyel gelişmeyi ve farklı sıcaklıklarda ulaşılan kinetik bakteriyel büyüme seviyelerini belirli bir saklama süresinden sonra tahmin etmemizi sağlar. Bu amaçla Arrhenius modeli bozunma reaksiyon oranı sabitinin sıcaklık ile ilişkisinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu eşitlikten farklı olan bir diğer parametre Q_{10} değeridir. Bu değer reaksiyonun sıcaklık duyarlılığının ölçüsünü ifade etmektedir. ASLT testinde kullanılan tüm parametreler Q_{10} = 2 eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır. Q_{10}'un 2 olması, reaksiyon hızının, sıcaklıktaki her 10 °C'lik artışla iki katına çıktığını gösterir. ASLT testi aşağıdaki denklem ile hesaplanmıştır (81).

$Q_{10} = \theta s\ (T)/\theta s\ (T+10)$

θs (T): T °C sıcaklığındaki raf ömrü
θs (T+10): (T + 10) °C sıcaklıkta raf ömrü

Hızlandırılmış Yaşlanma Faktörü (AAF): Q10* (TAA-TRT)/10
Hızlandırılmış Test Süresi Gün (AAT): (RT / TRT)
Çalışma Gün Aralığı (x): (AAT/RT)
Çalışma Gün Adet : (AAT/ x)

3.2.9. Lahana Turşusu Fermantasyon Deneyleri

3.2.9.1. Turşu üretimi: Yerel marketlerden temin edilen turşuluk lahanalar, üretim öncesi +4°C'de muhafaza edilmiştir. Üretim sırasında yıkanan lahanaların zarar gören kısımları ayrılmıştır. Salamura hazırlamada lahana turşusu standardı TS 4200 referans alınarak % 6,0 oranında tuz ve su kullanılmıştır. Fermantasyon denemeleri cam kavanozlarda gerçekleştirilmiştir.

3.2.9.2. Hammadde yüzeyi ve yıkama sularında mikrobiyolojik analiz: Üç farklı yıkama metodunun kullanıldığı çalışmada yıkama suları ve hammadde yüzeyinden mikroorganizmalar izole edilip toplam mikrobiyal yükleri belirlenmiştir. Musluk suyu, sirkeli su, karbonatlı su ile yıkanan lahana örneklerinin yıkama sularından 1'er ml alınıp 9'ar ml TSB içerisine eklenerek vortex (IKA, Vortex1, Almanya) ile karıştılmıştır. Sonrasında karışım suopernatantı toplanarak steril tüplere aktarılmış ve zenginleştirme amacı ile 24 saat 25-30 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} seri dilüsyonlar hazırlanan seyreltiklerden, TSA, PDA, SDA, NA besiyerlerine ekimleri yapılmış ve 24-48 saat 25-30 °C'de aerobik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda saf kültürler tanımlamada kullanılmak stok kültürler halinde -80 °C dondurucuda saklanmıştır.

3.2.9.3. Seçilmiş starter kültürler ile lahana turşusu üretimi: Laboratuvara getirilen turşuluk lahanalar öncelikle hammadde için uygun yıkama yöntemini belirlemek için gruplara ayrılmıştır. Turşu içerisinde hammadde kaynaklı bozulmaları önlemek için üç farklı yıkama yöntemi belirlenmiştir. Üç farklı gruba ayrılan lahanalar musluk suyu, sirkeli su ve karbonatlı su hazırlanarak toz, çamur gibi kirliliklerinden arındırılmıştır. Üç farklı yıkama yöntemi sonrası steril swab (Isolab, Steril, Türkiye) ile hammadde yüzeyinden ve yıkama sularından örnek alınarak mikrobiyal ekimleri yapılmıştır.

Lahanalar 3 L fermantasyon kaplarına düzgün bir şekilde yerleştirilmiştir. Salamuranın hazırlanması sırasında 1,5kg'lık lahana, 1,5kg'lık salamura ile birlikte fermantasyon kaplarına doldurulmuştur. Hazırlanan salamura, bidonlara yerleştirilen

lahanaların üzeri tamamen salamura ile kaplanacak şekilde dökülmüştür ve kapak kapatılmıştır. Fermantasyon denemeleri cam kavanozlarda gerçekleştirilmiştir.

Fermantasyon denemeleri *Lactobacillus plantarum* ve *Leuconostoc mesenteroides* in karışık kültüründen oluşan $1X10^{14}$ cfu/ml oranında içeriğe sahip starter mix ile inoküle edilmiş ve kontrol grubu olarak bakteri inokülasyonu yapılmamış örnekler ile 28 °C'de sıcaklık kontrollü karanlık bir odada 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Hammaddenin salamuraya konması ile birlikte örneklere hazırlananan starter kültürler ilave edilmiştir. Fermantasyon sonrasında mikrobiyolojik ve kimyasal anazlierin yanısıra duyusal analiz ve starter kültür stabilite testleride yapılmıştır.

3.2.10. Lahana Turşularında Fiziksel ve Mikrobiyolojik Analizler

3.2.10.1. pH analizi: Salamuraların pH değeri, potansiyometrik olarak, pH-metre (Mettler Toledo, S-20K, İsviçre) ile 20 °C'de ölçülmüştür. Cihazın kalibrasyon işlemlerinde pH 4,0 ve pH 7,0 tampon çözeltileri (Merk, Almanya) kullanılmıştır.

3.2.10.2. Toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı: Fermantasyon süresince ve depolanan turşu salamuralarından aseptik koşullarda alınan örnekler, % 0,9 tuz içeren FTS ile seyreltilmiş ve toplam mezofilik aerobik bakteri, toplam maya-küf sayımı ve toplam LAB sayımı için seri dilüsyonları kullanılmıştır. Toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı, PCA besiyerinde yayma kültürel sayım yöntemine göre yapılmıştır. Örnekler 30 °C'de 48 saat inkübe edilerek canlı hücre sayımı yapılmıştır (82).

3.2.10.3 Toplam laktik asit bakteri sayımı: Çalışma kapsamında toplam LAB sayım işlemleri, yayma kültürel sayım yöntemi kullanılarak MRS Agar besiyerinde yapılmıştır. Ekim yapılan petriler 30 °C'de ki inkübatörde (Nüve, ES, Türkiye) 72 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında canlı hücre sayımı yapılmış ve elde edilen sonuçlar log kob/mL olarak tayin edilmiştir (69).

3.2.10.4. Toplam maya-küf sayımı: Maya-küf sayımı, Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (YGC) besiyerinde yayma kültürel sayım yöntemine göre yapılmıştır. Örnekler 30° C'de 48 saat inkübe edilerek canlı hücre sayımı yapılmıştır (69).

3.2.11. Starter Kültür İle Hazırlanan Turşularda Stabilite Analizi

Starter kültürler kullanılarak gerçekleştirilen 2 tekrarlı fermantasyon denemeleri sonrasında salamura örneklerinden yayma plak yöntemine göre MRS agar besiyerine

ekim yapılmıştır. Katı besiyerinde üreme gözlenen plaklardan tek koloni seçimi yapılmış ve rastgele olacak şekilde 20 adet saf kültür salamuraya eklenmiştir. Takip eden aşamalarda salamuraya ilave edilen bakterilerin konfirmasyon işlemleri için MALDI TOF (BioMerieux, VITEK MS, Fransa) tanımlama sistemi kullanımış ve tür tayini gerçekleştirilmiştir.

3.2.12. Lahana Turşularında Duyusal Analiz

Fermentasyon sonunda lahana turşularında panalistler tarafından görünüş, renk, koku, lezzet ve genel beğeni parametreleri esas alınarak duyusal değerlendirme yapılmıştır.

3.2.13. İstatiksel Analiz

Analiz sonucunda elde edilen veriler hesaplanırken; bu verilerin ortalaması, verilerin standart sapması, korelasyon katsayıları ve bunlara bağlı p-skorları hesaplanmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen veriler T-test, one-way (ANOVA) analizleri kullanılarak değerlendirilmiştir. P skoru 0,05'ten küçükse veriler anlamlı kabul edilmiştir. ($p<0,05$)

4. BULGULAR

4.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu

Mikroorganizmaların izolasyon ve tanımlama çalışmaları için temin edilen toprak numuneleri Marmara adası Topağaç köyü topraklarından izole edilmiştir. Toplanan 30 farklı toprak örneği bakteri ve maya büyümesini destekleyen NB,TSB, MRSB ve SDB içerisinde 10^{-2} konsantrasyonunda seri dilüsyonları hazırlanarak izolasyon çalışmaları başlatılmıştır. Seyreltilen toprak örneklerindeki mikroorganizma popülasyonunu tespit etmek üzere çeşitli izolasyon besiyerlerine yayma plak yöntemi kullanarak mikrobiyal ekimleri yapılmıştır. İzole edilen mikroorganizmaların agar yüzeyindeki bakteri ve maya sayımlarının karşılaştırılması Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1: Topraktan izole edilen mikroorganizmaların izolasyon besiyerindeki sayım sonuçları

	İzolasyon Besiyeri			
Toprak Örnek Kodu	**Trıytıc Soy Agar log cfu/ml**	**Nutrienth Agar log cfu/ml**	**De Man Rogosa and Sharpe Agar log cfu/ml**	**Potato DextroseAgar log cfu/ml**
T1	10,00±2,00	7,66±2,08	4,00±1,00	1,33±0,57
T2	6,66±1,15	8,66±1,52	2,33±0,57	TE*
T3	11,66±1,52	13,00±1,00	4,66±1,15	1,66±0,57
T4	6,33±1,52	5,66±0,57	2,00±1,00	TE*
T5	3,00±1,00	4,66±1,52	1,66±0,57	TE*
T6	9,66±2,08	7,33±1,15	2,33±1,15	2,00±1,00
T7	3,33±1,52	3,66±1,52	2,33±0,57	TE*
T8	2,66±0,57	4,66±1,52	4,66±0,57	TE*
T9	5,66±0,57	4,00±1,00	3,33±0,57	1,33±0,57
T10	10,00±1,00	6,00±2,00	2,33±0,57	2,00±1,00
T11	10,66±1,15	10,33±1,52	2,00±1,00	1,66±0,57
T12	3,66±0,57	4,66±0,57	3,37±0,57	TE*
T13	6,00±1,00	6,66±2,08	3,00±1,00	3,00±1,00
T14	7,66±1,52	7,00±1,00	4,00±1,00	1,00±1,00
T15	6,66±1,15	5,66±1,15	3,66±0,57	2,66±0,57
T16	3,33±0,57	3,33±1,15	2,33±1,15	TE*
T17	4,66±0,57	4,33±1,52	3,33±1,52	2,66±1,52
T18	8,33±2,03	7,66±1,15	3,00±1,00	2,27±1,07
T19	10,33±1,52	7,66±1,52	3,66±0,57	1,33±1,15
T20	8,00±1,73	8,33±0,52	6,00±1,00	3,00±1,00
T21	2,66±1,52	3,66±1,52	3,33±1,15	TE*
T22	8,00±1,00	7,00±1,00	4,00±0,81	3,33±0,57
T23	7,33±1,15	8,33±1,15	3,00±1,00	4,00±1,00
T24	6,00±1,00	5,00±1,00	2,66±0,57	2,66±1,15
T25	6,66±1,15	5,33±1,52	3,00±1,00	1,66±1,15
T26	5,66±0,57	7,33±1,15	2,33±0,57	2,33±0,57
T27	4,66±1,15	4,33±1,15	1,66±0,57	TE*
T28	5,66±1,15	4,33±1,52	2,00±1,00	1,33±1,52
T29	4,66±0,57	6,33±1,15	3,33±057	3,00±2,00
T30	3,66±0,57	5,33±1,15	3,66±0,57	TE*

TE* Tespit Edilmedi; Tüm sonuçlar üç paralel çalışmanın ortalama ± standart sapma sonuçlarıdır

Sayım sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek bakteri TSA, NA ,MRS agar yüzeyinde sırası ile (11,66±1,52 log cfu/ml - 13,00±1,00 log cfu/ml - 4,66±1,15 log cfu/ml) tespit edilirken en yüksek maya sayımı (1,66±0,57 log cfu/ml) sonuçları ile T3 örnek grubunda belirlenmiştir.

Topraktan izole edilen bakterilerin tür tayininin yapılabilmesi için fenotipik ve morfolojik özellikleri değerlendirilmiştir. Ayrıca bakterilerin tür tayinlerinin birbirlerini desteklemesi amacı ile tür seviyesinde tanımlama yapan Vitek 2 (Biomerieux, Vitek 2, Fransa) ve Maldi-Tof (BioMerieux, VITEK MS, Fransa) cihazları ile ileri tanımlama yapılmıştır.

Gram boyama, hücre morfolojileri (basil, kok, oval), katalaz ve oksidaz test sonuçları değerlendirildiğinde izole edilen mikroorganizmaların %60'ının gram (+), %40 gram (-) bakteri olduğu tespit edilmiştir. Gram (-) bakteriler ve mayalar çalışma kapsamından çıkarılmıştır.

Gram (+) bakterilerin tanımlama çalışmaları neticesinde tanımlanan tüm türler %99.9 güven aralığında sonuç vermiştir. Baskın tür olarak *Leuconestoc mesenteroides* %20, *Bacillus subtilis* %30, *Bacillus clausii* %20, *Lactobacillus plantarum* % 15, *Enterococcus faecium* %10, türleri en fazla izole edilen mikroorganizmalar olarak belirlenmiştir. Baskın türlerin fenotipik ve moleküler sonuçları Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2: Türlerin fenotipik ve moleküler analiz sonuçları

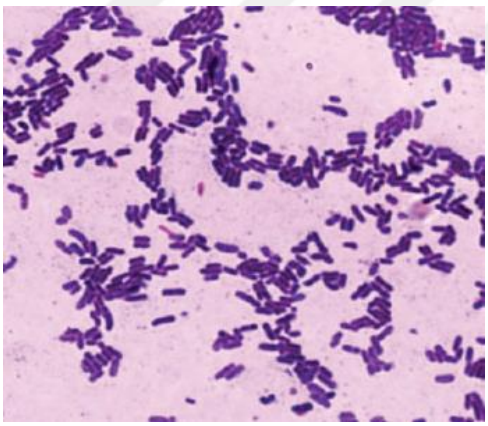
		Fenotipik Özellik		Biyokimyasal Özellik		Moleküler Tanımlama
İzolasyon Kaynağı	**İzolat**	**Gram Boyama**	**Hücre Morfoloji**	**Katalaz**	**Oksidaz**	**MALDI TOF MS İdentifikasyon Oranı(%)**
T2 T4 T11 T13 T19 T26 T28	*Bacillus subtilis*	+	Basil	+	+	99,90%
T6 T16 T17 T19 T20 T22 T25 T26	*Bacillus clausii*	+	Basil	+	+	99,90%
T1 T8 T10 T14 T21 T24 T29	*Lactobacillus plantarum*	+	Basil	-	-	99,90%
T5 T7 T12 T18 T23 T27 T29	*Leuconestoc mesenteroides*	+	Oval	-	+	99,90%
T3 T9 T15 T17 T23 T30	*Paenibacillus cookii*	-	Basil	+	+	99,90%
T3 T7 T12 T14 T22 T25 T28 T29 T30	*Enterococcus faecium*	+	Kok	-	-	99,90%

(+) Pozitif; (-) Negatif

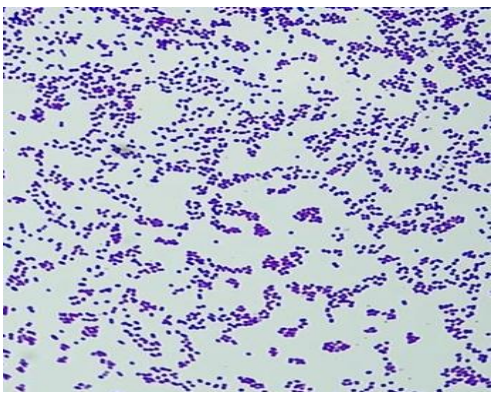
Tanımlama çalışmaları neticesinde tüm türler arasından *Leuconestoc mesenteroides* ve *Lactobacillus plantarum* türleri lahana turşu üretiminde kullanılmak üzere starter kültür olarak seçilmiştir.

4.2. *Leuc. mesenteroides ve L. plantarum* Suşlarına Ait Makroskobik Ve Mikroskobik İnceleme Bulguları

Sterter kültür üretiminde kullanılmak üzere belirlenen *L. plantarum* ve *Leuc. mesenteroides* türleri hücre morfolojileri incelemeleri için MRS agar yüzeyinde çizgi ekim plak yöntemi uygulanarak saf kültür oluşturulmuştur. Saf kültür oluştuktan sonra yaş preperasyonlar hazırlanmıştır. Standart gram boyama yöntemi sonrasında morfolojik özellikleri bakımından değerlendirilmiştir. *L. plantarum* ve *Leuc. mesenteroides* izolatlarına ait preperatlar ışık mikroskobu ile (100 X) büyütmede incelenmiştir. *L. plantarum* morfolojisi basil şeklinde, *Leuc. mesenteroides* morfolojisi ise oval olarak gözlemlenmiştir. Boyanma özelliklerine göre *L. plantarum* ve *Leuc. mesenteroides* mor renk gözlemlenmesi ile gram pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.1: *Lactobacillus plantarum* ışık mikroskobunda 100 X büyütmede görüntüsü



Şekil 4.2: *Leuconestoc mesenteroides* ışık mikroskobunda 100 X büyütmede görüntüsü

4.3. *Leuc.mesenteroides ve L.plantarum* Suşlarına Ait Vitek Analiz Sonuçları

Toprak örneklerinden izole edilen ve saflaştırılan mikroorganizmaların gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri yapıldıktan sonra biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacı ile Vitek 2 tür tayin analizi gerçekleştirilmiştir. İzole edilen gram pozitif bakterilerin tanımlanması için Vitek 2 GP kart kiti üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanılmıştır.Vitek 2 tanımlama sisteminde sonuçlar %85 - %88 kabul edilebilir, %89 - %92 iyi, %93 - %95 çok iyi, %95 - %99 mükemmel olarak değerlendirilmiştir.

Otomatize tanımlama sistemi sonuçlarına göre *L. plantarum* ve *Leuc. mesenteroides* türleri %95 doğruluk oranı ile tanımlanmıştır. Türlere ait identifikasyon tabloları Vitek 2 yazılımı sayesinde türetilmiştir. Vitek 2 analiz sonuçları MALDI TOF MS tanımlama sistemi ile desteklenmiştir. Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'de türlerin Vitek 2 analiz sonuçları gösterilmiştir.

Tablo 4.3: *Leuconestoc mesenteroides* biyokimyasal analiz sonuçları

İdentifikasyon Bilgileri	Kart	Olasılık	Tür	Uyum	Lot No	Yorum
	GP	95%	*Leuconostoc mesenteroides*	Çok İyi İdentifikasyon	2420020103	Katalaz(-) Koagulaz(-)

Biyokimyasal Deneyler

2	AMY	+	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	5	ADH1	+	11	AGLU	-
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	Aspa	-	16	BGAR	-	19	PHOS	+
20	LcuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	+	30	Dsor	+	31	ÜRE	-	37	Dgal	-
38	dRIB	+	39	Ilatk	-	42	LAC	-	24	NAG	+	46	BACI	+
47	NOVO	-	50	NC6.5	-	52	dman	+	53	Dmne	+	56	Dtre	+
57	Draf	-	58	O129R	-	59	SAL	+	60	Sac	+	63	ADh2s	-
64	OPTO	+												

Tablo 4.4: *Lactobacillus plantarum* biyokimyasal analiz sonuçları

İdentifikasyon Bilgileri	Kart	Olasılık	Tür	Uyum	Lot No	Yorum
	GP	95%	*Lactobacillus plantarum*	Çok İyi İdentifikasyon	24202103	Katalaz(-)

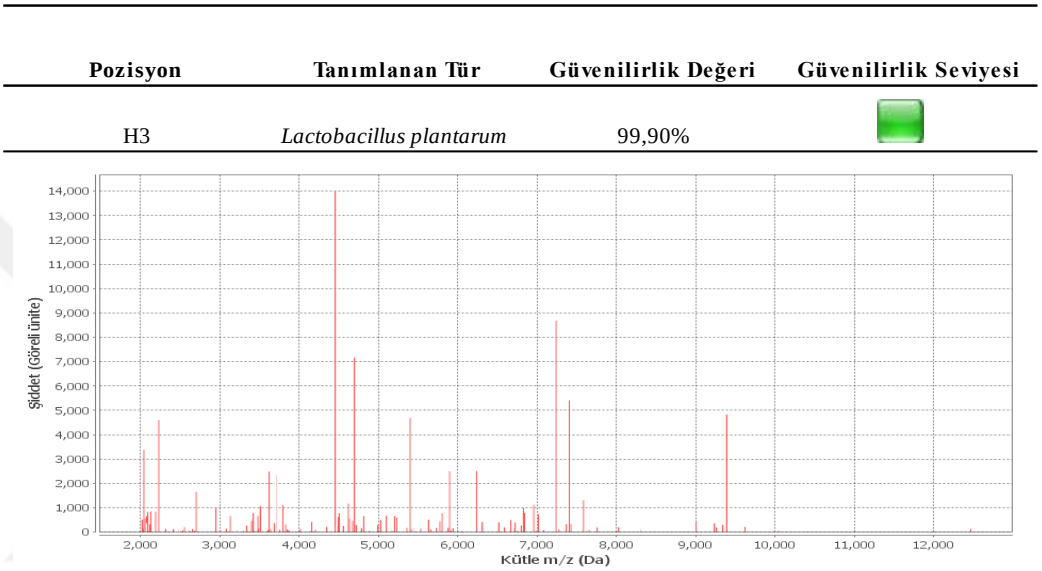
Biyokimyasal Deneyler

2	AMY	+	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	5	ADH1	-	11	AGLU	-
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	Aspa	-	16	BGAR	-	19	PHOS	-
20	LcuA	+	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	27	BGUR	-
28	AlaA	+	29	TyrA	+	30	Dsor	+	31	ÜRE	-	37	Dgal	-
38	dRIB	+	39	Ilatk	-	42	LAC	-	24	NAG	+	46	BACI	+
47	NOVO	+	50	NC6.5	+	52	dman	+	53	Dmne	+	56	Dtre	-
57	Draf	+	58	O129R	+	59	SAL	+	60	Sac	+	63	ADh2s	-
64	OPTO	+												

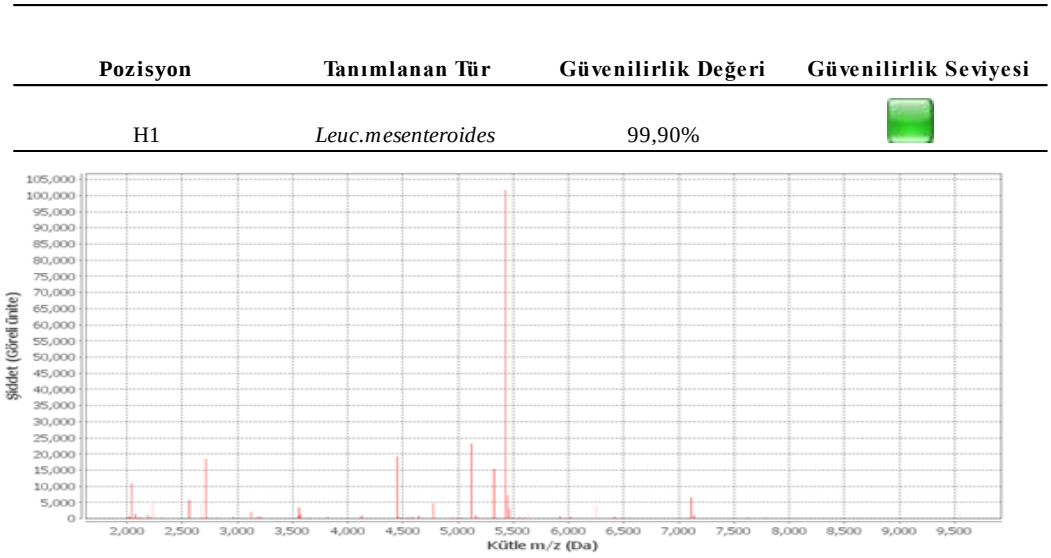
4.4. *Leuc.mesenteroides ve L. plantarum* Suşlarına Ait MALDI TOF MS Analiz Sonuçları

Vitek 2 tanımlama sistemi ile ön tanımlaması yapılan *L. plantarum* ve *Leuc. mesenteroides* türlerinin MALDI TOF MS ile detaylı tür tayin analizleri çalışma kapsamında değerlendirilmiştir. Cihaz MALDI TOF MS plağı üzerinde yer alan 50

örnekleme noktasının her biri için 40 lazer atışı gerçekleştirmiştir. Tür tayin şemaları değerlendildiğinde *L. plantarum* ve *Leuc. mesenteroides* türleri için 2000-20.000 m/z (Da) aralığında kütle spektrumları oluşturulmuştur. *Leuc. mesenteroides* kütle spektrum grafiğinde ~ 5.500 m/z (Da)'da %99,90 güven aralığında tanımlanmıştır. *L. plantarum* MALDI TOF tayini sonrasında ~ 4.500 m/z (Da) değerinde ve %99.90 güven aralığında tayin edilmiştir.



Şekil 4.3: MALDI TOF analizi sonrası *L. plantarum'e* ait kütle/şiddet grafiği ve izolat güvenlik değer sonuçlarını gösteren kütle spektroskopisi grafiği



Şekil 4.4: MALDI TOF analizi sonrası *Leuc. mesenter*oides'e ait kütle/şiddet grafiği ve izolat güvenlik değer sonuçlarını gösteren kütle spektroskopisi grafiği

4.5. *Leuc.mesenteroides ve L. plantarum* Suşlarının Biyoreaktörde Üretim İşlemi

L. plantarum ve *Leuc. mesenteroides* türlerinin üretim işlemi 4 L biyoreaktörde 1 L çalışma hacminde kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizmalar farklı zaman aralıklarında 72 saatlik inkübasyon süresince çoğaltılmıştır. *L. plantarum* ve *Leuc. mesenteroides* numuneleri'nin biyorektöre aktarımı için başlangıç süspansiyonları $1x10^8$ cfu/ml olarak ayarlanmıştır. Biyoreaktörde üretim işlemi sırasında *L. plantarum* ve *Leuc. mesenteroides* türlerinin canlılıklarını tespit etmek için t=0, t=12, t=24, t=48, t=72 saat noktalarında logaritmik artış hesabı için ortamdan örnek alımları gerçekleştirilmiştir. Biyoreaktörde üretilen *L. plantarum* ve *Leuc. mesenteroides* türlerinin canlılık oranlarına ait sonuçlar Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5: *L. plantarum* ve *Leuc.mesenteroides* suşunun biyoreaktörde canlılık oranına ait analiz sonuçları

	İnkübasyon Süresi				
Bakteri	**0. saat log cfu/ml**	**12.saat log cfu/ml**	**24.saat log cfu/ml**	**48.saat log cfu/ml**	**72.saat log cfu/ml**
Lactobacillus plantarum	11,00±1,00	12,66±1,15	16,00±2,00	19,66±1,52	23,66±1,52
Leuconestoc mesenteroides	11,33±1,52	12,00±1,00	17,00±1,73	20,00±1,73	22,33±1,15
Kontrol grup	0	0	0	0	0

Tüm sonuçlar üç paralel çalışmanın ortalama ± standart sapma sonuçlarıdır

L. plantarum t=0 anında 11±1,00 log cfu/ml t=72 anında ise 23,66±1,52 log cfu/ml oranında canlılık göstermiştir. *Leuc .mesentoriedes* ise t=0 anında 11,3±1,52 log cfu/ml, t=72 anında ise 22,33±1,15 log cfu/ml canlılık göstermiştir. Her iki mikroorganizmanın 72 saatlik inkübasyon süresindeki mikrobiyal artışları değerlendirildiğinde fark anlamlı olarak kabul edilmiştir. ($p<0,05$)

4.6. Dondurarak Kurutmaya Dayanıklılık Kriyoprotektan Seçimi

L. plantarum ve *Leuc. mesenteroides* türlerinin dondurma ve kurutulması sırasında dirençlerini arttırmak için kullanılan kriyoprotektan çeşidi ve miktarı hücrelerin canlılıkları üzerinde farklılıklar oluşturabilmektedir.

Deneysel olarak elde edilen sonuçlar *L. plantarum* ve *Leuc. mesenteroides* türlerinin liyofilizasyon işlemlerinde doğru kriyoprotektan oran seçiminin canlılık üzerine etkili olduğunu göstermektedir. ($p<0,05$)

Optimizasyon çalışması için *L. plantarum* ve *Leuc. mesenteroides* suşlarının liyofilizasyon öncesi ve sonrası canlılık sonuçları değerlendirilmiş ve canlılık oranının maksimum olduğu kriyoprotektan kombinasyonu starter kültür üretiminde kullanılmak üzere seçilmiştir. Kriyojenik maddenin minimum ve maksimum konsantrasyonları sırası ile %5-%20 aralığında belirlenmiştir. *L. plantarum* ve *Leuc. mesenteroides* suşlarının dondurarak kurutulması için kullanılacak optimum kriyoprotektan konsantrasyonu ve canlılık düzeyi Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6: *L. plantarum* ve *Leuc. mesenteroides* suşunun canlılık oranına ait analiz sonuçları

Grup	**Kaplama Materyali Oran %**			***L.plantarum* Sayım Sonucu log cfu/ml**		***Leuc.Mesenteroides* Sayım Sonucu log cfu/ml**		**Canlılık Oranı %**	
	L	**M**	**N**	L.Ö	L.S	L.Ö	L.S	*L.plantarum*	*Leuc.mesenteroides*
1	5	5	20	11,38	8,45	10,51	9,40	74,2	89,5
2	5	20	5	10,36	7,41	11,11	9,60	71,6	86,4
3	20	5	5	10,54	8,43	10,63	9,40	80,0	88,4
4	10	10	10	10,26	8,36	11,41	9,56	81,5	83,7
5	15	5	10	10,40	8,61	10,52	8,38	82,8	79,7
6	5	15	10	10,48	9,54	10,62	8,00	91,1	75,3
7	**10**	**5**	**15**	**11,20**	**11,18**	**11,54**	**9,32**	**99,7**	**80,8**
8	5	10	15	10,20	9,32	10,41	8,48	91,4	81,4
9	**10**	**15**	**5**	**10,57**	**8,51**	**10,36**	**10,28**	**80,5**	**99,2**
10	15	10	5	10,46	8,45	11,26	8,70	80,7	77,3
Kontrol	0	0	0	10,08	7,08	10,34	7,20	70,2	69,7

L.Ö canlılık: Liyofilizasyon öncesi canlılık ; L.S canlılık: Liyofilizasyon sonrası canlılık ; L: Laktoz (%) ; M: Maltodextrin (%) ; N: Nişasta (%)

L. plantarum ve *Leuc. mesenteroides* türlerinin liyofilizasyon işlemi sırasında canlılık düzeyi, kullanılan kriyoprotektan çeşidi ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişim göstermiştir. Farklı oranlarda laktoz, maltodextrin ve nişasta kullanılarak kurutulan *L. plantarum* ve *Leuc. mesenteroides* suşlarının canlılık düzeyinin verildiği Tablo 4.6'da görülebileceği gibi en yüksek canlılık *L. plantarum* suşu için %99,7 iken; *Leuc. Mesenteroides suşu* için ise %99,2 olarak bulunmuştur. Optimum noktalar

kullanılarak hazırlanan kriyojenik madde kombinasyonları *L. plantarum* için (%10 laktoz, %5 maltodextrin, % 15 nişasta), *Leuc. Mesenteroides* için (%10 laktoz, %15 maltodextrin, %5 nişasta) olarak belirlenmiştir. Hazırlanan starter kültür kriyojenik koruyucu madde ilave edilmeyen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; koruyucu madde ilave edilen kültür ortamlarının liyofilizasyon öncesinde ve sonrasında canlılık oranının daha fazla olduğu tespit edilmiştir. ($p<0,05$)

4.7. Liyofilize Kültürlerin Depolama Boyunca Canlılık Değişimi

4.7.1: Liyofilize Kültürlerin ASLT Sonuçları

Kriyoprotektan içermeyen ve optimum konsantrasyonlarda kriyoprotektan içeren liyofilize starter mix kültür grubuna 40 °C'de ASLT testi uygulanmıştır. Çalışma süresince liyofilize kültürlerin canlılıkları araştırılmıştır. Sonuçlar starter mix kültürün uzun dönem depolanmasını tahmin etmek için model olarak kullanılmıştır. Arrhenius çalışma modeli sonuçları Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.7: Arrhenius modellemesi ile, liyofilize miks kültürün, dayanım süresi hesaplama sonuçları gösterilmiştir

ARRHENIUS Modellemesi (40 °C)

Numune Adı	RT	RT1	Nem	TRT	TAA	Q 10	AAF	AAT	Çalışma Adet	Çalışma Gün Aralık	Çalışma Süresi Ay
Starter Mix	365	12	40	25	40	2	3	122	12	10	4

RT: Hedef ömür gün, RT 1: Hedef ömür ay, TRT: Depo satış sıcaklığı, TAA: Hızlandırılmış ortam sıcaklığı veya nem, Q10: Arrhenius sabiti, AAT: Hızlandırılmış test süresi gün

Arrhenius eşitliğine göre hesaplanan hızlandırılmış süre ile gerçek zamanlı süre arasındaki korelasyonun incelenmesi için Tablo 4.7'den yararlanılmıştır. Starter mix kültürün 12 aylık hedef raf ömrü için 4 aylık hızlandırılmış süre hesaplanmıştır. Liyofilize kültürlerin 10 gün aralıklar ile mikrobiyal canlılık sonuçları değerlendirilmiş ve canlılık oranı hesaplanmıştır. Kriyoprotektan içeren ve kriyoprotektan içermeyen liyofilize kültürlerin ASLT sonuçları Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.8: Kriyoprotektan içeren ve kriyoprotektan içermeyen liyofilize kültürlerin ASLT test sonuçları

Sıcaklık (°C)	Hızlandırılmış Depolama Süresi	Kriyorotektan İçeren Starter Mix Kültür Sayım Sonucu		Kriyorotektan İçermeyen Starter Mix Kültür Sayım Sonucu	
	Gün	log cfu/ml	Canlılık %	log cfu/ml	Canlılık %
40 °C	0	11,60	100	11,77	100
	10	10,98	98,41	10,64	90,40
	20	10,34	94,21	9,69	91,07
	30	9,48	91,63	8,53	88,03
	40	8,74	92,23	6,84	80,19
	50	8,39	95,98	5,74	83,92
	60	8,13	96,91	4,64	80,84
	70	7,72	94,90	3,65	78,66
	80	7,31	94,76	2,81	76,99
	90	6,85	93,62	2,43	86,48
	100	6,38	93,21	2,09	86,01
	110	5,95	93,32	1,77	84,69
	120	5,49	92,23	1,00	56,50
	130	4,98	90,65	0,50	50,00

Tüm sonuçlar iki paralel çalışmanın ortalama sonuçlarıdır

Kriyoprotektan kullanılmadan liyofilize edilen starter mix kültürün 40 °C'de sıcaklığa karşı stabilitesinin düşük olduğu belirlenmiştir. Kriyorotektan içermeyen starter mix kültür ve kriyoprotektan içeren mix kültür 130 günlük depolamada hücre canlılıkları karşılaştırıldığında kriyojenik korucu madde içermeyen grup hücre canlılığında önemli düzeyde azalma tespit edilmiştir. ($p<0,05$) Kriyoprotektan içermeyen starter mix kültürün 0. gün depolama canlılık sonuçları ile 130. gün canlılık sonuçları arasında önemli fark olduğu belirlenmiştir. ($p<0,05$) Kriyoprotektan kullanımının 40 °C sıcaklıkta mikroorganizmaların canlılıklarının korunmasında oldukça önemli olduğu tespit edilmiştir. Kriyoprotektan içeren sterter mix kültürün depolamanın 120. gününe kadar hücre canlılıkları sınırlı seviyede değişirken ($p>0,05$), 130. günde hücre canlılıklarında önemli düzeyde azalma tespit edilmiştir. ($p<0,05$) Canlılık sonuçları değerlendirildiğinde 130.günde oluşan farklar istatistiksel açıdan önemli olup starter mix kültür raf ömrü 12 ay olarak kabul edilmiştir.

4.7.2: Liyofilize Kültürlerin 4 °C Ve 25 °C Stabilite Sonuçları

Hızlandırılmış stabilite test sonuçlarına göre raf ömrü 12 ay olarak belirlenen starter mix kültürün gerçek zamanlı sıcaklık değerlerinde (4 °C ve 25 °C) hücre canlılıklıkları 12 ay boyunca değerlendirilmiştir. Kriyoprotektan kullanılan liyofilize kültürlerin depolama boyunca canlılık analiz sonuçları Tablo 4.9'da verilmiştir.

Tablo 4.9: Kriyorotektan kullanılarak liyofilze edilen kültürün 4 °C ve 25 °C'de depolama sürecinde canlılık sonuçları

Sıcaklık (°C)	Depolama Süresi	Kriyorotektan İçeren Starter Mix Kültür Sayım Sonucu		Sıcaklık (°C)	Kriyorotektan İçeren Starter Mix Kültür Sayım Sonucu	
	Ay	log cfu/ml	Canlılık %		log cfu/ml	Canlılık %
4 °C	0	11,12	100	25 °C	11,49	100
	1	11,12	99,97		11,41	99,34
	2	10,85	97,57		11,04	96,73
	3	10,45	96,33		10,83	98,05
	4	10,43	99,85		10,48	96,78
	5	10,36	99,33		10,23	97,65
	6	10,21	98,49		10,10	98,69
	7	10,19	99,85		9,83	97,32
	8	10,13	99,41		9,74	99,13
	9	10,11	99,84		9,41	96,57
	10	10,08	99,66		9,38	99,72
	11	9,98	99,02		9,36	99,80
	12	9,93	99,49		9,24	98,73

Tüm sonuçlar iki paralel çalışmanın ortalama ± standart sapma sonuçlarıdır

Kriyoprotektan içeren liyofilize starter mix kültürün 4 °C ve 25 °C depolama sıcaklıklarında canlılık sonuçları değerlendirildiğinde starter mix kültürün 4 °C depolama sıcaklığında daha iyi canlı kalma eğilimi gösterdiği tespit edilmiştir. 4 °C'de starter mix kültürün hücre canlılığı ortalama %99,13 iken, 25 °C'de %98,34 olarak tespit edilmiştir. 25 °C depolama sıcaklığında stabilite çalışmaları gerçekleştirilen liyofilize starter mix kültürün canlılık oranı, 4 °C depolama sıcaklığındaki canlılık oranına kıyasla depolama süresine bağlı olarak liyofilize kültürün hücre canlılığında azalma gözlenmiştir. Ancak bu azalma istatistiksel anlamda önemsiz bulunmaktadır. ($p>0,05$) Kriyoprotektan içeren mix kültürün 25 °C gerçek zamanlı sıcaklık değeri ile 40°C ASLT test sonucu karşılaştırıldığında 12 aylık depolama sıcaklığında hücrelerin canlılığını koruduğunu farkın istatistiksel açıdan önemli olmadığı tespit edilmiştir. ($p>0,05$) Sonuçlar 4 °C ve 25 °C depolama sıcaklıklarının mikroorganizmaların canlılıklarını önemli düzeyde etkilemediğini göstermiştir. Her iki sıcaklık değerinde de starter mix kültürün 12 ay raf ömrünü koruduğu tespit edilmiştir.

4.8. Lahana Turşusu Hammaddesi İçin Etkin Yıkama Yönteminin Belirlenmesi

Lahana turşusu üretiminde kullanılmak üzere yerel üreticiden temin edilen lahana örnekleri turşu üretiminde hammadde mikroflorasından ortama geçerek bozulmaya neden olan toplam mikroorganizma yükünün tespiti için örneklere üç farklı yıkama prosesi

uygulanmıştır. Sirkeli su, karbonatlı su ve musluk suyu ile 5 dakika yapılan yıkama denemeleri sonucunda hammadde yüzeyinden ortama gelen mikroorganizmaların canlılıkları Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.10: Sirkeli Su, karbonatlı su ve musluk suyu ile yıkanan hammaddeye ait canlılık oranı

Yıkama Modeli	Hammadde Yüzeyi Yıkama Öncesi log cfu/ml	Hammadde Yüzeyi Yıkama Sonrası log cfu/ml	Canlılık %
Sirkeli Su	9,76±0,02	6,61±0,04	67,20
Karbonatlı Su	9,50±0,10	4,46±0,07	46,93
Musluk Suyu	9,60±0,06	5,48±0,05	57,09

Tüm sonuçlar üç paralel çalışmanın ortalama ± standart sapma sonuçlarıdır

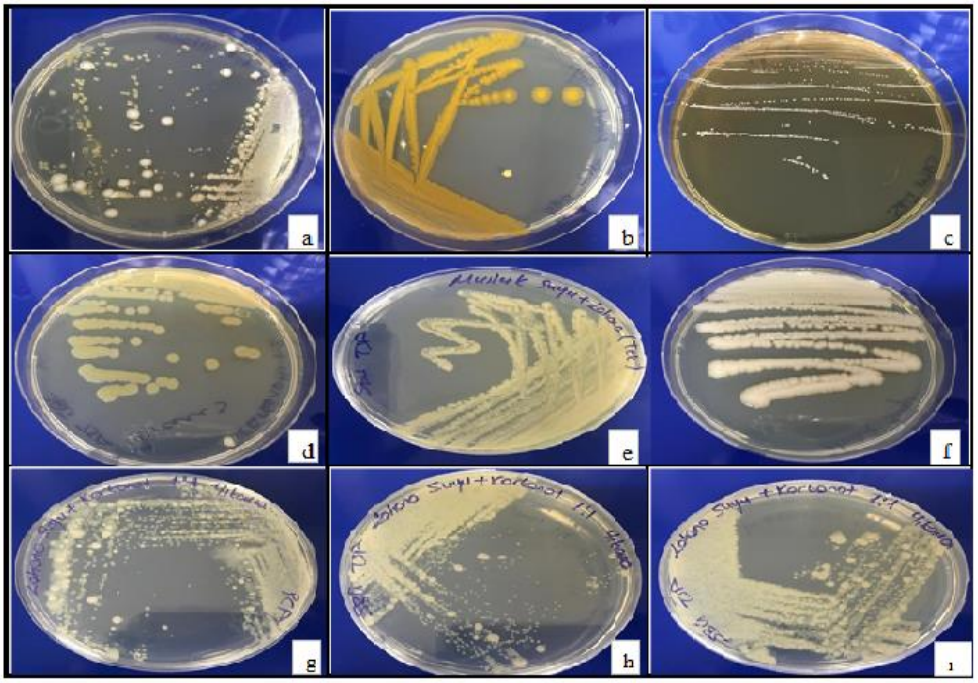
Sirkeli, karbonatlı ve musluk suyu ile yapılan hammadde yüzeyi yıkama sonuçları değerlendirildiğinde yüzeyde en fazla mikrobiyal canlılık % 67,20 ile sirkeli su ile yıkanan hammedde yüzeyinde; en düşük mikrobiyal canlılık % 46,93 ile karbonatlı su ile yıkanan hammadde yüzeyinde tespit edilmiştir. Sirkeli su ile yıkanan hammadde yüzeyinde mikrobiyal canlılığın yüksek olması yıkama prosesi sonrasında fermente ürün içerisine istenmeyen mikroorganizmaların geçmesine neden olabilmektedir. Karbonatlı su ve musluk suyu ile yıkamanın hammadde yüzeyindeki mikroorganizmaların inhibisyonunda etkili olduğunu göstermiştir. Sirkeli su, karbonatlı su ve musluk suyu ile yıkanan lahana örneklerinin yıkantı sularındaki mikrobiyal yük çalışma kapsamında değerlendirilmiştir. Yıkantı sularına ait sonuçlar Tablo 4.11'de verilmiştir.

Tablo 4.11: Sirkeli su, karbonatlı su ve musluk suyu ile yıkanan hammaddeye ait yıkantı suyu sonuçları

Yıkantı Suyu Modeli	Yıkantı Suyu Toplam Mikroorganizma log cfu/ml
Sirkeli Su	3,34±0,05
Karbonatlı Su	7,43±0,05
Musluk Suyu	6,47±0,06

Tüm sonuçlar üç paralel çalışmanın ortalama ± standart sapma sonuçlarıdır

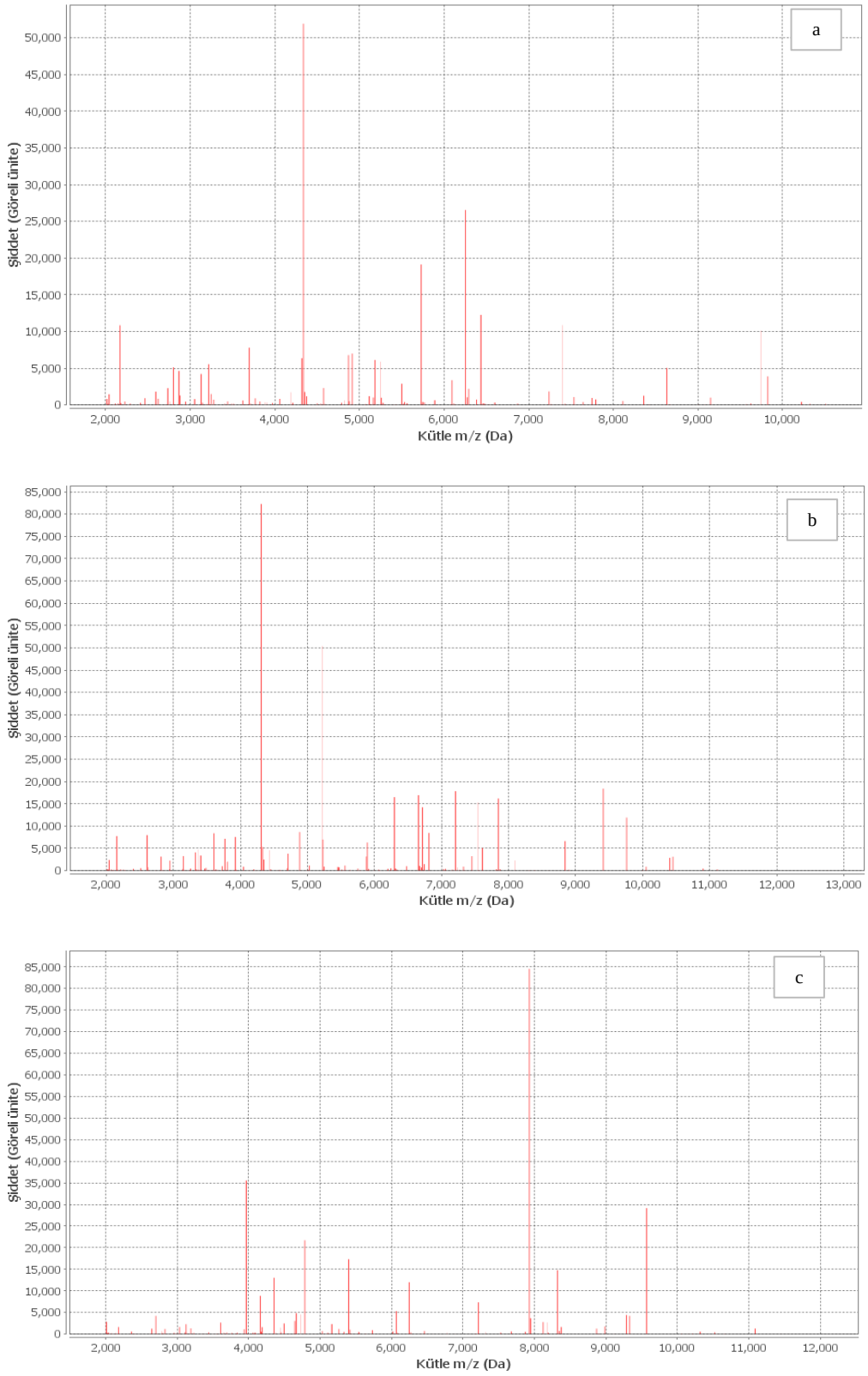
Lahana turşusu fermentasyonu için kullanılan hammaddenin yıkantı sularına ait mikrobiyal analiz sonuçları değerlendirildiğinde toplam mikrobiyal yük 7,43±0,05 cfu/ml ile en fazla karbonatlı su ile yıkanması sonrası tespit edilmiştir. Yıkantı sularındaki en düşük mikrobiyal popülasyon ise 3,34±0,05 cfu/ml ile sirkeli su ile yıkanan hammaddenin yıkantı suyundan elde edilmiştir. Musluk suyu ile yıkama sonuçları değerlendirildiğinde ise ortalama 6,47±0,06 cfu/ml oranında mikroorganizma tespit edilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde karbonatlı su ile yıkama her ne kadar mikroorganizmaları yüzeyden arındırsada hammadde yüzeyinde yapmış olduğu deformasyondan dolayı tercih edilmemektedir. Hammadde için musluk suyu ile yıkama yüzeydeki mikrobiyal yükü azaltması ve hammadde üzerinde deformasyona neden olmaması ile tercih edilen yıkama yöntemi olarak belirlenmiştir. Yıkantı sularına ait petri görüntüleri Şekil 4.5'de verilmiştir.



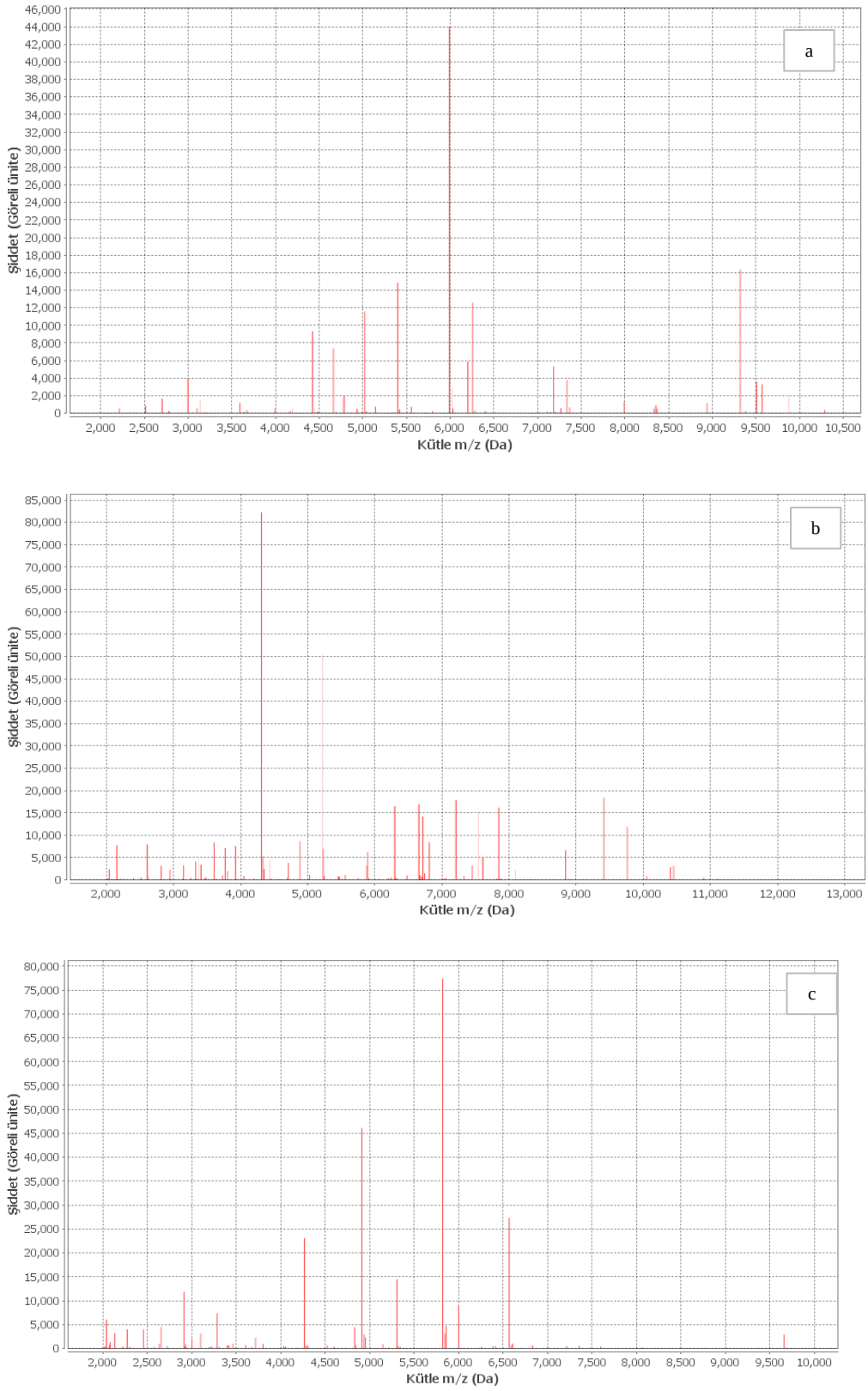
Şekil 4.5: Lahana turşusu üretiminde kullanılan hammaddeye ait yıkantı sularında gelişen farklı mikroorganizmaların örnek petri görüntüleri: Sirkeli su yıkantı suyu a, b, c; Musluk suyu yıkantı suyu: d,e,f; Karbonatlı su yıkantı suyu g,h,ı

4.9. Yıkantı Sularında Gelişen Mikroorganizmaların Tanımlama Çalışmaları

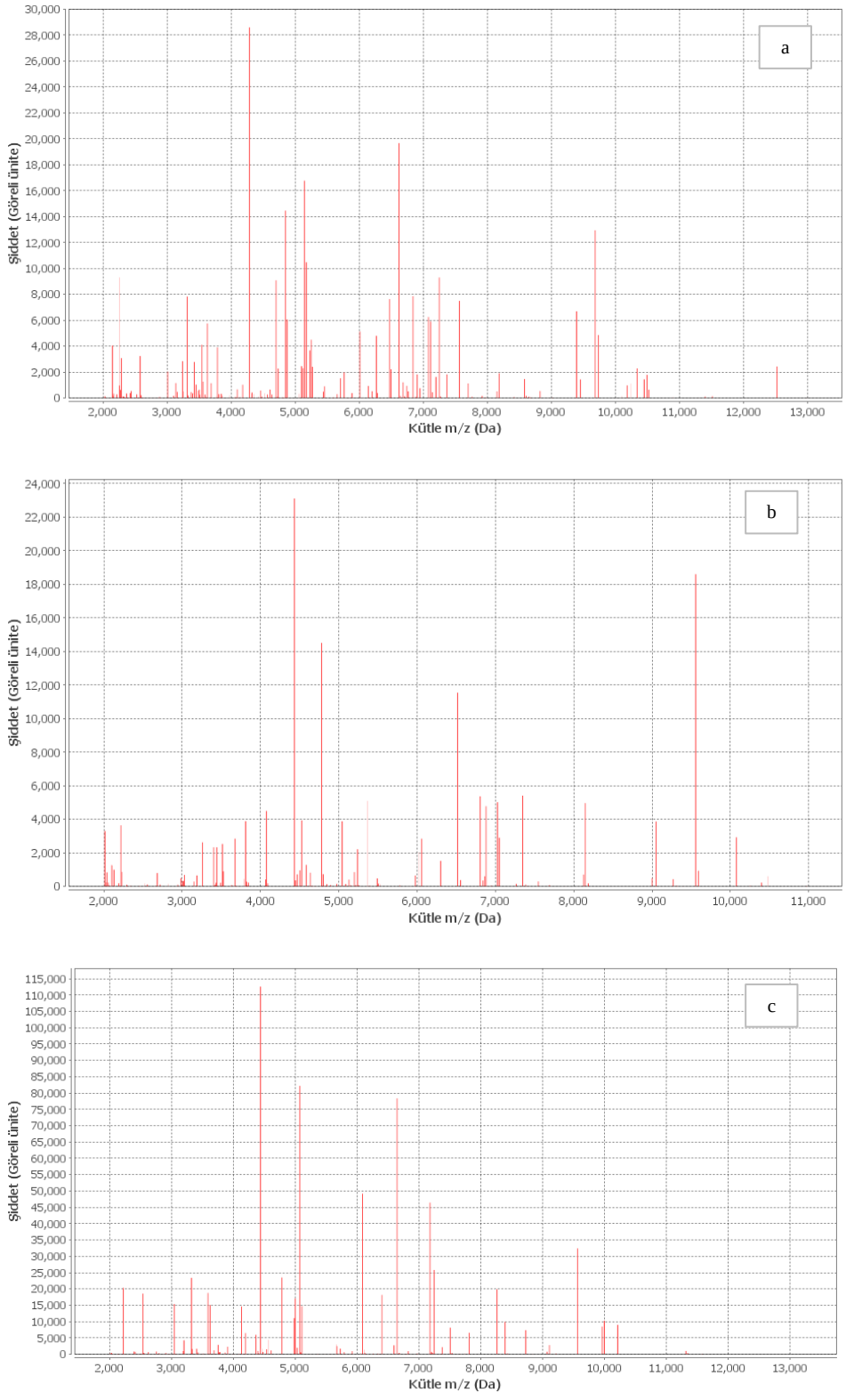
Yıkantı sularında gelişen mikroorganizmların tanımlama çalışmaları MALDI TOF MS analizi ile gerçekleştirilmiştir. Yıkantı sularında MALDI TOF MS analizi ile tespit edilen türlerin tür tayin şemaları Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.6: Karbonatlı su ile yıkanan hammadde yüzeyinde tespit edilen mikroorganizmaların a: *Bacillus simplex*, b: *Serratia liquefaciens*, c: *Mikrococcus luteus* ait MALDI TOF MS analizi sonrası kütle/şiddet grafiği değer sonuçlarını gösteren kütle spektroskopisi grafiği



Şekil 4.7: Musluk suyu ile yıkanan hammadde yüzeyinde tespit edilen mikroorganizmaların a: *Pantoea agglomerans*, b: *Serratia liquefaciens*, c: *Staphlococcus cohnii* ait MALDI TOF MS analizi sonrası kütle/şiddet grafiği değer sonuçlarını gösteren kütle spektroskopisi grafiği

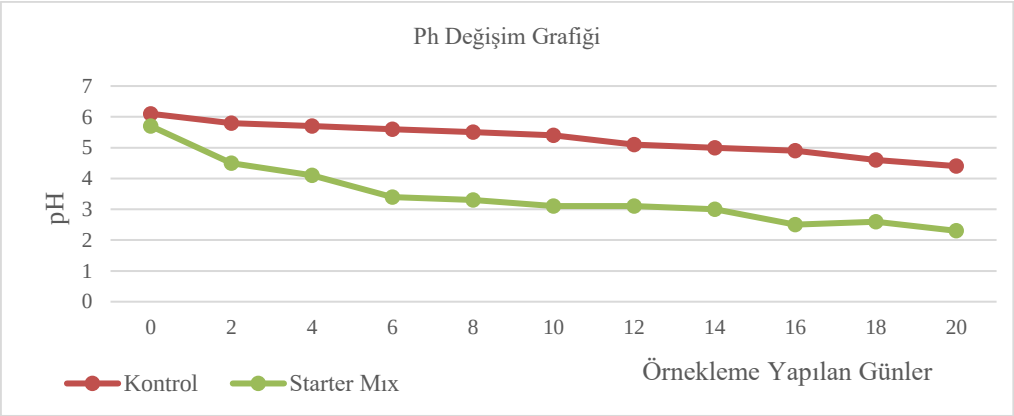


Şekil 4.8: Sirkeli su ile yıkanan hammadde yüzeyinde tespit edilen mikroorganizmaların a: *Paenibacillus cookie*, b: *Enterecoccus durans*, c: *Pseudomonas fluorescens* ait MALDI TOF MS analizi sonrası kütle/şiddet grafiği değer sonuçlarını gösteren kütle spektroskopisi grafiği

MALDI TOF MS ile yapılan tanımlama çalışmaları neticesinde sirkeli su ile yıkamada; *Bacillus clausii, Leuconestoc mesenteroides , Enterecoccus durans, Pseudomonas fluorescens, Paenibacillus cookie*, karbonatlı su ile yıkamada; *Bacillus simplex, Serratia liquefaciens, Mikrococcus luteus,* musluk suyu ile yıkamada; *Pantoea agglomerans, Serratia liquefaciens, Staphlococcus cohnii* türleri en sık rastlanan mikroorganizmalar olarak tespit edilmiştir. Türlerin tanımlama çalışmaları için 2000-20.000 m/z (Da) aralığında kütle spektrumları oluşturulmuştur. *Bacillus simplex, Serratia liquefaciens, Mikrococcus luteus* türleri sırası ile ~ 4.500 m/z (Da), ~ 4.500 m/z (Da), 8.000 m/z (Da), değerinde; *Pantoea agglomerans, Serratia liquefaciens, Staphlococcus cohnii* ~ 6.000 m/z (Da) ~ 4.500 m/z (Da), ~ 6.000 m/z (Da); *Paenibacillus cookie, Enterecoccus durans, Pseudomonas fluorescens* türleri ~ 4.500 m/z (Da) aralığında sonuç vermiştir. Tanımlanan türler %99.90 güven aralığında tayin edilmiştir.

4.10. Lahana Turşusu Örneklerinde Fermantasyon Süresince Meydana Gelen Kimyasal Değişimler

Lahana turşu fermantasyon deneylerinde fermantasyonun ilk günlerinde salamuranın pH değerlerinde düşüş, starter kültür ilave edilmeyen örnek grubunda daha yavaş gerçekleşirken, fermantasyonun ilerleyen aşamalarında mikrobiyal aktivitedeki artışa bağlı olarak hız kazanmıştır.Salamura örneklerindeki Ph değişim sonuçları Şekil 4.9'da verilmiştir.



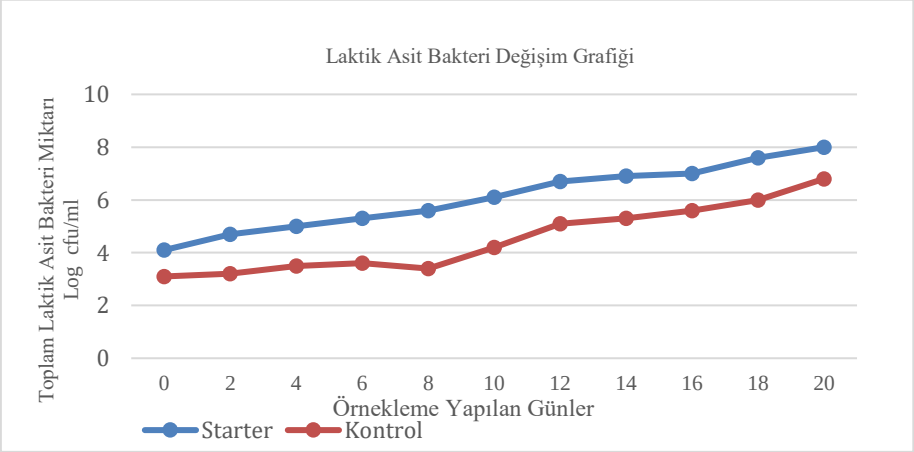
Şekil 4.9: Lahana turşusu fermantasyon süresince salamura örneklerindeki pH değişimi

Kontrol gruplarında pH düşüşü starter mix kültür kullanılan çalışma örneklerine kıyasla daha yavaş gözlenmiştir. Kontrol örneğinde 20 günlük fermantasyon süresince en düşük pH değeri pH 4,40 ±0,05 iken, starter kültür kullanılan turşu örneklerinde ise pH 2,0 ±0,99 olarak belirlenmiştir. Ph değişim sonuçları incelendiğinde starter mix kültür

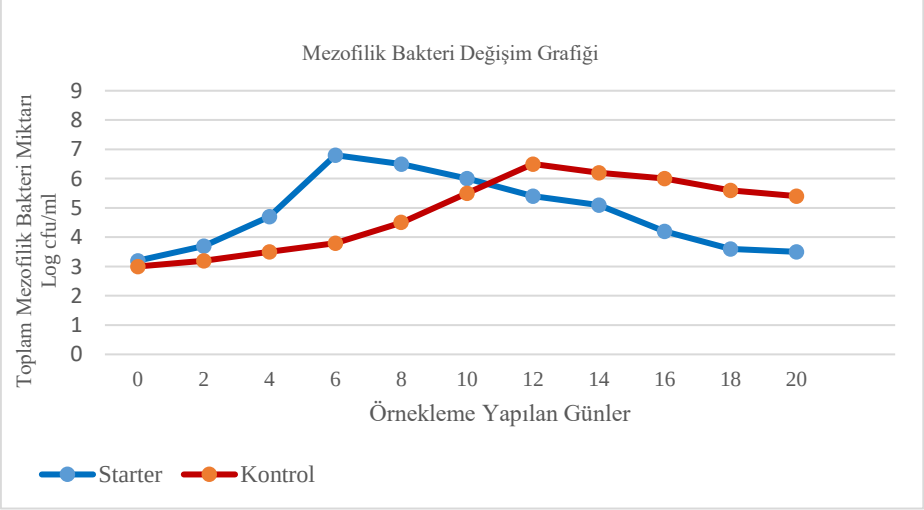
ilave edilen örnek grupları ve kontol grubu karşılaştırıldığında zamanla düşen pH değerleri istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. ($p<0,05$)

4.9. Lahana Turşusu Örneklerinde Fermantasyon Süresince Meydana Gelen Mikrobiyal Değişimler

Starter mix kültür kullanılarak hazırlanan ve starter kültür kullanılmadan hazırlanan lahana turşu örneklerinde 20 günlük fermentasyon süresince laktik asit bakterilerinin ve mezofilik bakterilerin turşu içerisindeki mikrobiyal değişimleri incelenmiştir. Laktik asit bakterilerinin ve mezofilik bakterilerin 20 günlük fermantasyon sürecindeki mikrobiyal değişimleri Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.10: Lahana turşusu fermantasyon süresince salamura örneklerindeki laktik aist bakteri değişimi



Şekil 4.11: Lahana turşusu fermantasyon süresince salamura örneklerindeki mezofilik bakteri değişimi

Lahanaların salamuraya konması ile birlikte turşu örneklerine ilave edilen starter mix kültür ortamda bulunan fermante edilebilir şekerleri kullanarak hızla çoğalmıştır.. Starter mix kültür kullanılan turşu örneklerinde LAB sayısı 4.günden itibaren en yüksek değere ulaşırken kontrol grubunda fermentasyonun 10.günden itibaren LAB sayısında artış tespit edilmiştir. Starter kültür kullanılan lahana turşu örneklerinde fermantasyonun ilk gününde LAB sayısı 4,5±0,85 log cfu/ml kontrol grubunda 2,13±0,18 log cfu/ml olarak hesaplanırken, 20 günlük fermantasyon süresi sonunda starter kültür kullanılan örnek gruplarında LAB sayıs 8,0±0,81 log cfu/ml kontrol grubunda 6,83±0,23 log cfu/ml olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar iki grup arasında zamana bağlı LAB grubundaki mikrobiyal değişimlerin istatistiksel açıdan önemli olduğunu ifade etmektedir. ($p<0,05$) Starter kültür eklenen lahana turşu örneklerinde ortamda laktik asit bakteri oranın artması ile birlikte hızlanan fermantasyon sürecinde mezofilik bakteri grubundaki mikrobiyal artış ve daha sonrasında ortamdaki sayılarının azalması istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. ($p<0,05$)

4.10. Fermantasyon Sonunda Turşu Örneklerine Ait Duyusal Analiz Sonuçları

Fermantasyon sonunda lahana turşularında, 10 panelist tarafından görünüş, renk, koku, lezzet, sertlik ve genel beğeni parametreleri esas alınarak, 1-5 aralığındaki skala ile duyusal değerlendirme yapılmıştır. Lahana turşularının duyusal değerlendirme sonuçları Tablo 4.13'de verilmiştir.

Tablo 4.12: Lahana turşularının duyusal değerlendirme sonuçları

Örnek Grup	Görünüş	Koku	Lezzet	Renk	Genel Beğeni
Kontrol	4,6±0,48	4,9±0,30	4,7±0,45	4,3±0,78	4,8±0,40
Starter Mix	4,8±0,40	4,5±0,50	4,7±0,45	4,5±0,50	4,9±0,30

Tüm sonuçlar 10 paralel çalışmanın ortalama ± standart sapma sonuçlarıdır

Çalışma kapsamında elde edilen duyusal değerlendirme sonuçları incelendiğinde starter kültür ilavesi ile hazırlanan turşuların beğeni oranı ile starter kültür ilavesi gerçekleştirilmeyen grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ortaya çıkmamıştır ($p>0,05$).

5. TARTIŞMA

Laktik asit bakterileri fermente gıda ürünlerinde yer almakta ve fermente gıda ürünlerindeki rolleri bilinmektedir. Günümüzde LAB'nin starter kültür formülasyonları kullanılarak üretilen gıda ürünleri endüstriyel açıdan önem taşımaktadır (49). Yerli starter kullanımı ile yapılan turşu denemeleri neticesinde fermantasyon standart özellikte kontrollu bir şekilde gerçekleşmiş ve endüstriyel anlamda yapılan üretimlere fayda sağlayacağı görülmüştür.

Turşu fermantasyonlarında starter kültür kullanımı ile kontrollü ve güvenilir fermantasyon gerçekleşmektedir (29). *Leuc. mesenteroides, Lb. brevis, Pediococcus acidilactici, L. plantarum* türleri sebze fermantasyonlarında starter kültür olarak kullanılmaktadır (83). Ogabi ve Pamir tarafından Türk turşuları üzerine yaptıkları bir araştırmada 51 turşu örneği ile çalışmışlardır. Bu turşulardan toplam 502 adet bakteri izole etmişlerdir. İzolasyon sonucunda 443 bakteri tür bazında tanımlanırkne 59 izolat ise tür tayini yapılamamıştır. İzole edilen tüm bakterilerin *Lactobacillaceae* familyasından olduğunu görmüşlerdir. Bu familyaya ait bakteriler *Lactobacillus, Pediococcus* ve *Leucocnostoc* cinslerinden 102 adet, *L. plantarum* 33 adet, *L. casei* 207 adet , *L. brevis* 72 adet, *L. buchneri* 13 adet, *P. damnosus* 17 adet, *Leuc. Mesenteroides* türlerini turşu örneklerinde tespit etmişlerdir (84). Rodriguez ve arkadaşları tarafından sebze fermantasyonunda en yaygın türlerin tanımlamasına yönelik yapılan yapılan bir diğer çalışmada en yaygın bulunan türler *Leuc. mesenteroides, L. brevis, P. pentosaceus, L. plantarum, L. citreum* ve *L. paraplantarum* olarak belirlenmiştir (85). Evren ve Şahin tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada Samsun yöresine ait farklı türlerde 39 turşu örneğindeki LAB içeriği ve starter kültür olarak kullanılabilme özellikleri incelenmiştir. Çalışılan turşu örneklerinde toplam 100 adet LAB grubu mikroorganizma tanımlanmıştır. Bakterilerin 40 adeti *L. plantarum,* 26'sı *L. pentosus,* 14 tanesi *L. arabinosus,* 20'si *L. casei* olarak belirlenmiştir. Starter kültür denemelerinde, starter kültür kullanılarak üretilen turşuların duyusal ve içerik yönünden daha iyi sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir (86). İzole edilen ve tanımlanan, *L. plantarum ve Leuc. mesenteroides* türlerinin starter kültür olarak hazırlanıp uygulanması turşu fermantasyonunda yaygın olarak kullanılan bakteri grupları içerisinde yer almaları ile ilişkilendirilebilir.

Çalışma kapsamında izole edilen bakterilerin tür tanımlama işlemleri %99,9 güven aralığında MALDI TOF MS cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Barreau ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada MALDI TOF Kütle Spektrometresi yöntemiyle anaerobik mikroorganizmaların tanımlanmasının iyileştirilip iyileştirilemeyeceğini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda 1325 adet anaerobik mikroorganizma MALDI TOF Kütle Spektrometresi ile analiz etmişlerdir. % 92.5'i tür düzeyinde doğru tanımlanmıştır. Ayrıca çoğu tanımlanamayan ya da nadir rastlanan türler tespit edilmiştir. Sonuçlara bağlı olarak bu tekniğin rutin olarak klinik anaerobik mikroorganizmaların tanımlanmasında başarılı bir teknik olduğunu ifade etmişlerdir (87). Duskova ve arkadaşları gıdalardan izole edilen laktobasilleri tanımlamamaya yönelik yaptıkları çalışmada PZR analizi, çoğaltılmış rDNA geni Restriksiyon Analizi (16S-ARDRA) ve MALDI TOF Kütle Spektrometresi analizi olmak üzere 3 farklı metod ile tanımlamışlardır. Tanımlama sırasında bu 3 metodu birbirleriyle kıyaslamışlardır. Tür düzeyinde tanımlama başarı oranını PZR analizi için % 77, MALDI-TOF Kütle Spektrometresi analizi için ise % 93 olarak tespit etmişlerdir. Birbirleriyle yakın ilişkili Lactobacillus türleri arasındaki farkı tespit ederken daha doğru sonuçlar elde edebilmek için MALDI TOF Kütle Spektrometresi yönteminin genotipik yöntemlerle birlikte kullanılmasının daha iyi sonuçlar vereceğini bildirmişlerdir (88). Kuzey Vietnam'daki bazı geleneksel fermente gıdalardan izole edilen 119 adet laktik asit bakterisi suşunun MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile hızlı sınıflandırma ve tanımlanmasını doğrulamak amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışma sonucunda MALDI-TOF Kütle Spektrometresinin güçlü, hızlı, güvenilir ve maliyetli bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir (89).

Fermantasyonda kullanılacak hammaddeden gelen mikroorganizmalar gıda ürünlerine değişen özellikler katmaktadır. Bu koşullar neticesinde tek bir LAB içeren starter kültürün, ortamda optimal gelişme gösterememe ve iyi derecede rekabetçi olamama gibi nedenler sonucunda fermantasyonu kontrol edemediği belirlenmiştir. Turşu üretiminde karışık starter kültür kullanımının fermantasyonu kontrol edebildiği ürün özelliğini iyileştirdiği belirlenmiştir (29). Fermantasyon denemelerinde *L. plantarum* ve *Leuc. mesenteroides* içeren mix starter kültür kullanımı ile fırsatçı mikroorganizmaların baskılanması ve istenilen standart fermente ürün elde edilmesi karışık starter kültür kullanımı ile açıklanabilir.

Kıran tarafından yapılan çalışmada, hazır gıdalardan izole edilen, ayrıca çeşitli kültür koleksiyonlarından temin edilen laktik asit bakterileri arasında, % 4 oranında hazırlanan tuz konsantrasyonunda tüm bakterilerin geliştiği, % 6,5 tuz konsantrasyonunda 5 adedi hariç diğerlerinin geliştiği, % 12 tuz konsantrasyonunda 4 tanesinin zayıf gelişme gösterdiği, diğerlerinin gelişemediği, % 18 tuz konsantarasyonunda ise hiçbirinin gelişemediği bildirilmektedir (36). Sánchez ve Palop tarafından tuz konsantrasyonları ile ilgili yapılan çalışmada bir çeşit patlıcan turşusu olan Almagro' dan izole edilen, *L. plantarum, L. pentosus, L. brevis ve L. fermentum* türlerinin % 4 tuz konsantrasyonunda geliştiğini, % 6,5 tuz konsantrasyonunda belirli oranlarda bütün türlerde gelişme görülebildiğini, % 8 tuz oranında *L. fermentum* haricinde diğer türlerde gelişme olduğunu bildirmişlerdir (90). Çalışma boyunca hazırlanan lahana turşu örnekleri TS 4200 lahana turşu üretimi için referans alınan standartda yer alan % 6,0 tuz konsantrasyonu kullanılarak hazırlanmıştır. Starter mix kültürün salamuraya ilave edilmesi ile hızla gelişen fermantasyon süreci *L.plantarum* ve *Leuc. mesenteroides* türlerinin % 6,0 tuz konsatrasyonunda işlevsel olmaları ilişkilendirilebilir.

Ağız yolu ile alınan probiyotikler intestinal bölgelere ulaşmadan önce midenin gastrik asit ortamından (pH 1,5-3,0) canlı olarak geçmesi gerekmektedir. Bu nedenle probiyotik mikroorganizma seçiminde ilk aranması gereken kriter suşların asit dirençleridir (91). *Leuc.mesenteroides* fermantasyonun ilk aşamalarında yüksek miktarda bulunurken; *L. plantarum* ise aside direnci yüksek mikroorganizma olmasından dolayı fermantasyonu sonlandırmada rol oynamaktadır (23). Kıran tarafından yapılan bir çalışmada, hazır gıdalardan izole edilen, ayrıca çeşitli kültür koleksiyonlarından temin edilen *L. plantarum* ve *Leuc. mesenteroides* türlerinin yer aldığı çeşitli laktik asit bakteri gruplarınıda içeren çalışmada türlerin pH 2,0 ve pH 3,0'da gelişemediği; pH 4,0, pH 5,0 ve pH 6,0 değerlerinde hepsinin gelişme gösterdiğini bildirmiştir (36). Araştırmamız sonucunda düşük pH değerleri kıyaslandığında starter mix kültür ilave edilen lahana turşu örneklerinde pH 2,0-3,0 aralığında toplam laktik asit bakteri sayısının 8,0±0,81 log cfu/ml olduğu kontrol gubu ile kıyaslandığında aralarında istatistiksel açıdan fark olduğu belirlenmiştir. ($p<0,05$) Tangüler tarafından şalgam suyundan izole edilen *Lactobacillus, Pediococus, Leuconostoc* cinslerinin pH 4,0'da gelişme gösterdiği, fakat pH 9,6'da hiçbir bakterinin gelişme gösteremediği belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada kontrol olarak kullanılan *L. buchneri, L. brevis, L. plantarum, L. fermentum, L. delbrueckii* türlerinden

L. buchneri hariç diğer 4 bakterinin pH 4,4'de gelişebildiği, fakat 5 bakteriden hiçbirinin pH 9,6'da gelişemediği belirtilmiştir (92). Schillinger tarafından gerçekleştirilen Doğu Himalaya bölgesinde ev ölçeğinde üretilen geleneksel fermente sebze ürünleri üzerinde yaptığı araştırmaları sonucunda, fermante ürünlerin pH değerlerini 3,50-5,00 arasında bulmuştur (93). Araştırmalarımız 20 günlük fermantasyon sürecinde pH 2,0-6,0 aralığında mikrobiyal canlılıkları değerlendirilen lahana turşu örnekleri starter mix kültür içeren starter mix kültür içermeyen kontrol grubu ile kıyaslandığında hücre canlılığını koruyarak ($p<0,05$) LAB grubu üyelerinin düşük pH değerlerinde de işlevsel olduğunu ispatlamıştır.

Starter kültürlerin üretiminde bozulmayı engellemek adına kurutma, konsantre etme ve önerilen şartlarda muhafaza etmek gerekir (50). Yüksek sıcaklıklarda mikroorganizmaların hücre canlılığı üzerinde zararlı etkilere yol açan hücre içi metabolik aktivitelerin (kimyasal ve enzimatik reaksiyonlar, lipit oksidasyonu gibi) artmasına bağlı olarak hücre canlılığı azalma eğilimi göstermektedir (94). Kim tarafından gerçekleştirlen çalışmada yağsız süt tozu ve soya unu kriyojenik koruyucu madde içeren liyofilize *W.cibaria* probiyotik suşu için ASLT testi uygulanmış ve stabilite çalışmaları boyunca türün hücre canlılığı değerlendirilmiştir. 50°C, 60 °C ve 70 °C depolama sıcaklığında kriyojenik madde ile kaplanan probiyotik suşu kriyojenik korucu madde içermeyen gruba göre yüksek depolama sıcaklıklarında raf ömrünü koruyarak yüksek canlılık göstermiştir (95). ($p<0,05$) Savedboworn *L. plantarum* probiyotik suşu liyofilizasyon esnasında ve depolama sonrasında kriyoprotektan kullanımının canlılık üzerine etkisini araştırmış 40 °C, 50°C, 60 °C ve 70 °C ASLT testi uygulamıştır. Gerçek zamanlı sıcaklık değeri olarak 4°C ve 30 °C depolama sıcaklığında probiyotik suşun hücre canlılığı üzerine etkilerini incelemiştir. Sonuçlar yüksek sıcaklık değerlerinde krüyoprotektan kullanımını ile hücre canlılığının korunduğu sonucunu tespit etmişlerdir (96). Çalışmamız süresince 40 ° yüksek sıcaklık değerinde ASLT testi uygulanan kriyoprotektan içeren starter mix kültür ve kriyoprotektan içermeyen grup arasındaki canlılık sonuçlarında önemli fark bulunmuştur. ($p<0,05$) Çalışma sonuçlarımız literatürü destekler niteliktedir.

Starter kültür elde etme yöntemlerinden biri olan liyofilizasyon işlemi hücrelerin sitoplazma zarında zarar meydana getirerek mikroorganizmalar içim ölümcül olabilmektedir (85). Starter külltür üretiminde kullanılmak üzere liyofilize edilen *L. plantarum* ve *Leuc. mesenteroides* türlerinin hücrelerini korumak ve dayanıklılıklarını

arttırmak için kriyoprotektan kullanılmıştır. Liyofilizasyon işlemi esnasında zararlı etkileri azaltmak için çeşitli şekerler, aminoasitler ve kriyojenik maddeler kullanılmaktadır (65-68). Khem tarafından yağsız süt tozu, sukroz ve laktoz kullanılarak lifolize edilen LAB grubu üyelerinin canlılıklarının değerlendirildiği çalışmada sonuçlar mikroorganizmaların ortalama canlı kalma oranlarının sırasıyla %100'e yakın, %60'larda ve %40-60 arasında olduğunu tespit etmiştir (97). Ambros tarafından kriyoprotektan olarak sorbitol, trehaloz ve maltodekstrinin kullanıldığı liyofilizasyon prosesinde probiyotik *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* F19 suşunun canlılığının artırılmasındaki etkinliğini test ettikleri araştırmalarında sorbitol içeren örneklerde liyofilizasyon sonrasında canlı kalma oranını % 65 olarak tespit edilmiştir (55). Shu tarafından gerçekleştirilen çalışmada liyofilize *Lb. debruecki* subsp. *bulgaricus* DSM 281 suşunun canlı kalma oranının araştırıldığı bir çalışmada yağsız süt tozu ile hazırlanan karışımın, distile su ile hazırlanan karışıma göre canlı kalma oranını artırdığını bildirmiştir (66). Çalışma kapsamında farklı kombinasyonlarda laktoz, maltodextrin ve nişasta ile mix karışım denemeleri yapılarak starter için en uygun kriyoprotektan oranı belirlenmiştir. *L. plantarum* ve *Leuc. mesenteroides* türlerinin liyofilizasyon işlemi sonrası canlılık düzeyleri sırası ile %99,7 ve %99,2 olarak tespit edilmiştir. Starter mix kültür üretiminde kriyoprotektan kullanımının hücre canlılığını, koruduğunu çıkan canlılık sonuçlarının literatür çalışmalarını destekler niteliktedir.

Turşu fermentasyonunda hammadde için etkin yıkama yönteminin belirlenmesi adına yapılan analizlerde sirke ile yıkanan hammadde yüzeyinde yapılan mikrobiyolojik analiz sonucunda milroorganizma yükünün fazla olduğu tespit edilmiştir. Karbonatlı su karışımı ve musluk suyu ile yıkanan hammadde yüzeyinde ise mikrobiyal yükün sirkeli su ile yıkanan gruplara göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Sirkeli suyun yüzeyde biyosidal etki göstererek mikroorganizmaların inhibisyonunu etkilediği, karbonatlı suyun ise hammaddenin yüzeyini deformasyona neden olması ile yıkama yöntemi olarak tercih edilmemektedir.

Endüstriyel olarak hazırlanan fermente ürünler ile (örneğin turşu, yogurt, şalgam, kefir vb) ev yapımı fermente ürünler arasında tat farklılıkları yaşanmaktadır. Toplumsal açıdan değerlendirme yapıldığında, geleneksel tat arayışı, butik fermente ürünlere yönelimi arttırmaktadır. Bu çalışmada, gelenksel yöntemleri desteklemek açısından, yapılan yerel izolasyon ve yerel izolatlardan saflaştırılan türlerin kullanılması önemli bir

gelişme olacaktır. Geleneksel tat ile geleneksel tadı sağlayan endüstriyel starterlerin elde edilmesi, milli ekonomiye değerli girdi sağlamanın yanında, toplumun büyük bir kesimine de hitap edecektir. Yerel izolattan saflaştırılan starter kültür kullanılarak hazırlanan turşu örneklerinin duyusal olarak belirgin bir üstünlük sağlamasının yanısıra, fermantasyon sürecinin kontrollu bir şekilde gerçekleşmesine ve patojen bulaşlarının da önüne geçilmesi hususunda önemli katkı sağladığı gözlenmiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada topraktan izole edilen *L. plantarum* ve *Leuc.mesenteroides* suşlarından hazırlanan mix starter kültürlerin fermente turşu denemelerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla planlanmış ve yürütülmüştür.

Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde yerli starter kullanılan turşu denemeleri kimyasal ve mikrobiyolojik açıdan değerlendirildiğinde ortamda ilk günden itibaren LAB'ların hakim olması fermantasyon sürecini kontrollü bir şekilde kısaltmıştır.

Starter kültür üretiminde optimum kriyoprotektan formulasyonu kullanılarak liyofilize edilen kültürlerin farklı sıcaklarda raf ömrü test edilerek sıcaklığın canlılık üzerine etkili olduğu belirlenmiştir.

Starter kültür kullanılarak hazırlanan turşu örneklerinde duyusal olarak belirgin bir üstünlük belirlenemesine ragmen fermantasyon sürecinin kontrollu bir şekilde gerçekleşmesine önemli katkı sağladığı anlaşılmıştır.

İthal kaynaklardan temin edilerek kullanılan, çeşitli koruyucu madde ve fermantasyonu hızlandırıcı yapay enzim içeren ve mikrobiyotamıza uyumlı olmayan starter kültür kullanımı yerine fermente turşu üretim alanlarında yerli starter kullanımı ile başarılı sonuçlar alınacağına ulaşılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Borgstorm, G. (1986). *Food Microbiology and Biochemistry*, New York: Collier-MacMillan
2. Steinkraus, K.H. (1983). Lactic acid fermentation in the production of foods from vegetables, creals and legumes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49, 337-348.
3. Board, R.G., Jones, D., Jarvis, B. (1995). Microbial fermentation: Beverages, foods and feeds. *Journal of Applied Bacteriology*, 79, 505.
4. Mavhungu, J. (2005). *Isolation and identification of lactic acid bacteria from 'Ting' in the Nothern Province of South Africa.* University of Pretoria, Pretoria South Africa.
5. Kabak, B. (2009, 27–29 Mayıs). *Turşu üretimi ve fermantasyonda rol oynayan mikroorganizmalar*. II. Geleneksel Gıdalar Sempzoyumu: Van,Türkiye.
6. Ji, F.D., Ji, B.P., Li, B., Han, B.Z. (2007). Microbial change during the salting process of traditional pickled Chinese cabbage. *Food Science and Technology International*, 13, 116-119.
7. Blandino, A., Al-Aseeri, M.E., Pandiella, S.S., Cantero, D., Webb, C. (2003). Cereal based fermented foods and beverages. *Food Research International*, 36, 527-543.
8. Leroy, F., De Vuyst, L. (2004). Functional lactic acid bacteria starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 67-78.
9. Kaur, I.P., Chopra K., Saini, A. (2002). Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 15, 1-9.
10. Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal Applied Bacteriology*, 66, 365-378.
11. Malago, J.J., Koninkx, J., F.J. G.,Marinsek-Logar, R. (2011). *Probiotic bacteria and enteric infections.* Netherland: Springer.
12. FAO/WHO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report* 2002. FAO/WHO Guidelines for the evaluation of probiotics in food. (İnternette) 2002, Mayıs. Erişim 11.09.2021 https://www.who.int/foodsafety/probiotic_guidelines.pdf
13. Del Piano, M., Morelli, L., Strozzi G.P., Allesina, S., Barba, M., Deidda, F. (2006). Probiotics: From research to consumer, *Digestive and Liver Disease*, 2, 248–255.
14. Şener, A., Temiz, A., Toğay, S.Ö., Bağcı, U. (2008). Çesitli prebiyotiklerin *Bifidobacterium animalis Subsp*. *Lactis* Bb-12'nin gelişimi ve asitlik geliştirme özelliği üzerine in vitro etkileri. Gıda Kongresi: Ankara, Türkiye.
15. Ceyhan, N., Alıç, H. (2012). Barsak mikroflorası ve probiyotikler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi,* 5, 107-113.
16. Swain, M.R., Anandharaj, M., Ray, R.C., Parveen Rani, R. (2014). Fermented Fruits and Vegetables of Asia: A Potential Source of Probiotics. *Biotechnology Research International*, 2014, 1–19.
17. Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Munoz-Quezada, S., Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 109, 35-50.
18. Rebecchi, A., Crivori, S., Sarra, P.G Sarra, Cocconcelli, P.S. (1998). Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 1043-1049.
19. Çon, A.H., Gökalp, H.Y. (2000). Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Metabolitleri ve Etki Sekilleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 30, 180-190.
20. Stiles, E.M., Holzaphel, W.H. (1997). Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1-29.
21. Yörük, G.N., Güner, A. (2011). Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması ve Weissella türlerinin gıda mikrobiyolojisinde önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6, 163-176.
22. Jay, M.J. (2005). *Modern Food Microbiology*, New York: Springer.
23. Daeschel, M.A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology,* 43, 164-167.
24. Kılıç, S. (2001). Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları,* 542, 37-55.
25. Wilhelm, H., Holzapfel, B., Wood, J.B. (1995). *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. London, England: John Wiley & Sons.
26. Andrighetto, C., Dea, P.D., Lombardi, A., Neviani, E., Rossetti, L., Giraffa, G. (1998). Molecular identification and cluster analysis of homofermentative thermophilic lactobacilli isolated from dairy products. *Research in Microbiology*, 149, 631-643.
27. Holzapfel, W.H., Schillinger, U. (2002). Introduction to pre- and probiotics. *Food Research*, 35, 109-116.

28. Lister, J. (1873). A further contribution to the natural history of bacteria and the germ theory of fermentative changes. *Earth and Environmental Science Transactions of The Royal Society of Edinburgh*, 27 , 313–344.
29. Hutkins, R.W. (2006). *Microbiology and Technology of Fermented Foods.* New Jersey: Blackwell Publishing.
30. Carr, F.J., Chill, D., Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A Literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28, 281-370.
31. Kıran, F. (2006*). Hücre duvarı protein profilleri ve pilazmid içeriklerine göre laktik asit bakterilerinin moleküler tanısı*. Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye.
32. Chagnaud, P., Machinis, K., Coutte, L.A., Marecat, A., Mercenier, A. (2001). Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria application to six common Lactobacillus species. *Journal of Microbiological Methods*, 44, 139-148.
33. Pederson, C.S. (1949). The Genus Pediococcus. *Bacteriology Reviews*, 13, 225-232.
34. Ahmad, V., Khan, M.S, Jamal, Q.M.S., Alzohairy, M.A., Karaawi, M.A., Siddiqui, S.D. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal Antimicrobial Agents*, 49, 1–11.
35. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (1986). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins.
36. Fitzgerald, G.F., Caplice, E. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 131-149
37. Kitchell, A.G., Shaw, B.G. (1975). Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their protein patterns. *Journal of General Microbiology*, 87, 333-342.
38. Kabak, B., Dobson, A.D. (2011). An Introduction to the Traditional Fermented Foods and Beverages of Turkey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 248-260.
39. Yetişmeyen, A. (1995). *Süt Teknolojisi.* Ankara: *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*.
40. Prescott, C.S., Dunn, G.C. (1987). *Industrial Microbiology*. Delhi: Springer.
41. Zhou, S., Causey, T., Hasona, A., Shanmugam, K. (2003). Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W 3110. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 399-407.
42. Abdel-Rahman, M., Tashiro, Y., Sonomoto, K. (2013). Recent Advances in Lactic Acid Production by Microbial Fermentation Processes. *Biotechnology Advances*, 31, 877–902.
43.Breidt, F., McFeeters, R.F., Perez Diaz, I.M., Lee, C. (2012). *Food Microbiology, fermented Vegetables*. Washington: ASM Press.
44. Niksic, M., Niebuhr, S.E., Dickson, J.S., Mendonca, A.F., Koziczkowski, J.J., Ellingson, J.L. (2005). Survival of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 during sauerkraut fermentation. *Journal of Food Protection*, 68, 1367-1374.
45. Ayotte E. (2012). *Fermented Products Produced in The World: Historical Process and Relationships with Health*. Alaska: Sauerkraut
46. TSE. *1990 Lahana Turşusu Standartı*. UDK 664.58, TS 4200.
47. Aktan, N., Yücel, U., Kalkan, H. (1998). *Turşu teknolojisi*. İzmir: Ege Üniversitesi Ege Meslek Yüksek Okulu Yayınları.
48. Leroy, F., Vuyst, D.L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 67-78.
49. Kavitake, D., Kandasamy, S., Devi, P.B., Shetty, P.H. (2018). Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods. *Food Bioscience*, 21, 34-44.
50. Taskila, S. (2017). *Starter cultures in food production*. New Jersey: Blackwell Publishing.
51. Parente, E., Cogan, T.M., Powell, I.B. (2017). *Starter Cultures*. Netherlands: Elsevier.
52. Whittington, H.D., Dagher, S.F., Bruno-Barcena, J.M. (2019). *How Fermented Foods Feed A Healthy Gut Microbiota Production and Conservation of Starter Cultures.* Switzerland: Springer Nature.
53. Ambros, S., Hofer, F., Kulozik, U. (2018). Protective effect of sugars on storage stability of microwave freeze-dried and freeze-dried *Lactobacillus paracasei* F19. *Journal of Applied Microbiology*, 125, 1128-1136.
54. Corveleyn, S., Dhaese, P., Neirynck, S., Steidler, L. (2017). U.S. Patent No. 9,574,169 .
55. Lu, Y., Huang, L., Yang, T., Lv, F., Lu, Z. (2017). Optimization of a cryoprotective medium to increase the viability of freeze-dried *Streptococcus thermophilus* by response surface methodology. *Food Science and Technology*, 80, 92-97.
56. Ciurzyńska, A., Lenart, A. (2011). Freeze-drying Application in food processing and biotechnology A Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61, 165-171.

57. Bagad, M., Pande, R., Dubey, V., Ghosh, A.R. (2017). Survivability of freeze- dried probiotic *Pediococcus pentosaceus* strains GS4, GS17 and *Lactobacillus gasseri* (ATCC 19992) during storage with commonly used pharmaceutical excipients within a period of 120 days. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine,* 7, 921-929.
58. Keivani Nahr, F., Mokarram, R. R., Hejazi, M. A., Ghanbarzadeh, B., Sowti Khiyabani, M., Zoroufchi Benis, K. (2015). Optimization of the nanocellulose based cryoprotective medium to enhance the viability of freez dried *Lactobacillus plantarum* using response surface methodology. *Food Science and Technology*, 64, 326-332.
59. Martin M.J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M.A., Morales, M.E. (2015). Microencapsulation of bacteria: a review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 27, 15–25.
60. Han, L., Pu, T., Wang, X., Liu, B., Wang, Y., Feng, J., Zhang, X. (2018). Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freezedried *Bacillus amyloliquefaciens* B1408 based on response surface methodology. *Cryobiology*, 81, 101-106.
61. Abdelwahed, W., Degobert, G., Fessi, H. (2006). A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly (vinyl alcohol): formulation and process optimization. *Journal Pharmaceutical*, 309, 178-188.
62. Lopez-Rubio, A., Sanchez, E., Sanz, Y., Lagaron , J.M. (2009). Encapsulation of living bifidobacteria in ultrathin PVOH electrospun fibers. *Biomacromolecules*, 10, 2823–2829.
63. Kets E.W., Teunissen, P.J.M., De Bont, J.A.M. (1996). Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying. *Applied Environmental Microbiology*, 62, 259–261.
64. Chen, C., Liu, S., Liu, W., Zhao, Y., Lu, Y. (2012). Synthesis of novel solidliquid phase change materials and electrospinning of ultrafine phase change fibers. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 96, 202–209.
65. Atak, Z., Koç, M., Kaymak-Ertekin, F. (2017). Gıda endüstrisinde aroma mikroenkapsülasyonu. *Akad Gıda Dergisi,*15, 416–425.
66. Shu, G., Wang, Z., Chen, L., Wan, H., Chen, H. (2018). Characterization of freezedried *Lactobacillus acidophilus* in goat milk powder and tablet: Optimization of the composite cryoprotectants and evaluation of storage stability at different temperature. *Food Science and Technology*, 90, 70-76.
67. Wang, G., Yu, X., Lu, Z., Yang, Y., Xia, Y., Lai, P.F.H.,Ai, L. (2019). Optimal combination of multiple cryoprotectants and freezing-thawing conditions for high lactobacilli survival rate during freezing and frozen storage. *Food Science and Technology*, 99, 217-223.
68. Yeo, S., Shin, H.S., Lee, H.W., Hong, D., Park, H., Holzapfel, W., Kim, E.B., Huh, C.S. (2018). Determination of Optimized Growth Medium and Cryoprotective Additives to Enhance the Growth and Survival of *Lactobacillus salivarius. Journal Microbiology Biotechnology*, 28, 718-731.
69. Halkman, A.K. (2005). *Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları.* Ankara: Başak Matbaacılık
70. Saginur, R., Clecner, B., Portnoy, J., Mendelson, J. (1982). Superoxol (Catalase) test for identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 15, 475-477.
71. William, A.S., Rouse, H., Champe, P.,Harvey, A.R. (2001). Lippincott's Illustrated Reviews Microbiology. Baltimore: Williams & Wilkins.
72. Rifaat, E.A., Tekiner, İ.H., Özpınar, H. (2014). Halk Sağlığı Açısından İçme ve Kullanma Sularında Koliform ve Fekal Koliform Bakterilerin Varlıklarının Klasik ve MASS Spektrometresi Yöntemleriyle İncelenmesi. *Electronic Journal of Food Technologies*, 9, 20-32.
73. Çetinkaya, E., Ayhan, K. (2012). Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2, 53-62.
74.Carolis, E.D., Posteraro, B., Lass-Flo, C., Vella, A., Florio, A. R., Torelli, R., Girmenia, C., Colozza, C., Tortorano, A.M., Sanguinetti M., Fadda, G. (2012). Species identification of *Aspergillus, Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 475-484.
75. Chalupová, J., Raus, M., Sedlářová, M., Šebela, M. (2014). Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnology Advances*, 32, 230–241.
76. Kara, M., Uysal, A., Soylu, S., Kurt, Ş., Soylu, E.M. (2017 15-17 Mayıs). Identification of plant-associated microorganisms employing maldi tof mass spectrometry as a rapid detection technique. International Conference on Agriculture Forest, *Food Sciences and Technologies*: Nevşehir, Türkiye.
77. Uysal, A., Kurt, Ş., Soylu, E.M., Kara, M., Soylu, S. (2018 9-12 Mayıs). Evaluation of the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for identification of some plant fungal pathogenic species. *International Agricultural Science Congress*: Van, Turkey.
78. Man, J.D., Rogasa, M., Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130-135.

79. Khoramnia, A., Abdullah, N., Liew, S. L., Sieo, C. C., Ramasamy, K., Ho, Y.W. (2011). Enhancement of viability of a probiotic Lactobacillus strain for poultry during freeze-drying and storage using the response surface methodology. *Animal Science Journal*, 82, 127-135.
80. Carvalho, A. S., Joana Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X., Gibbs, P.(2002). Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. *Biotechnology Letters*, 24, 1587-1591.
81.ASTM 1980 *Standard Guide for Accelerated Aging of Packages*, 02, ASTM F-1980-02
82. Gürgün, V., Halkman, A.K. (1988). *Mikrobiyolojide sayım yöntemleri*. Gıda Teknolojisi Derneği, Ankara: Sim Matbaası.
83. Muñoz, R., Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J.M., Rivas, B., Felipe, F.L., Gómez- Cordovés, C., Mancheño, J.M. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology,* 132, 79-90.
84. Ogabi, F., Pamir, M.H. (1973). Türk turşuları üzerinde araştırmalar, I. Çeşitli turşuların mikroflorasında bulunan laktik asit bakterileri. *A.Ü. Ziraat Fakültesi Yıllığı*, 23, 248-268.
85. Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., de las Rivas, B., de Felipe, F. L.,Gómez-Cordovés, C. and Mu oz, R. (2009), Food phenolics and lactic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, 132, 79–90.
86. Evren, İ., Şahin, İ. (1993). Turşudan laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve bunlardan starter kültür üretiminin araştırılması. *Doğa Yayınları*, 17, 881-890.
87. Barreau, M., Pagnier, I. and La Scola, B. (2013). Anaerobe, 22, 123.
88. Dušková, M., Šedo, O., Kšicová, K., Zdráhal, Z., Karpíšková, R., (2012). *International Journal of Food Microbiology,* 159, 107.
89. Doan, N.T.L., Van Hoorde, K., Cnockaert, M., De Brandt, E., Aerts, M., Le Thanh, B. and Vandamme, P., (2012). *Letters in Applied Microbiology,* 55 ,265.
90. Sánchez, I. and Palop, L. (2000). Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermantation of 'almagro' eggplants. *International Journal of Food Microbiology,* 59, 9-17.
91. Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E.M.M., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F. and Collins, J.K. (1999). Probiotics: Frommyth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials, *Antonie van Leeuwenhoek*,76,279-292.
92. Tangüler, H. (2010). Şalgam suyu üretiminde etkili olan laktik asit bakterilerinin belirlenmesi ve şalgam suyu üretim tekniğinin geliştirilmesi. Doktora Tezi. *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 367.
93. Schillinger, U., Tamang, J. P., Tamang, B., Franz, C.M.A.P., Gores, M., Holzaphel,W.H. (2005). Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas. *International Journal of Food Microbiology,* 105, 347-356.
94. Behboudi-Jobbehdar, S., Soukoulis, C., Yonekura, L., Fisk, I. (2013). Optimization of Spray-Drying Process Conditions for the Production of Maximally Viable Microencapsulated *L. acidophilus. Drying Technology*, 31, 1274-1283.
95. Kim, M., Nam, D. G., Kim, S. B., Im, P., Choe, J. S. ve Choi, A. J. (2018). Enhancement of viability, acid, and bile tolerance and accelerated stability in lyophilized *Weissella cibaria* JW15 with protective agents. *Food Science Nutrition,* 6-7, 1904-1913.
96. Savedboworn, W., Teawsomboonkit, K., Surichay, S., Riansa-Ngawong, W.,Rittisak, S., Charoen, R. ve Phattayakorn, K. (2019). Impact of protectants on the storage stability of freeze-dried probiotic *Lactobacillus plantarum*. *Food Science Biotechnology,* 28-3, 795-805.
97. Khem, S. (2015). Understanding the stabilisation of *Lactobacillus plantarum* by drying. Doctor of Philosophy, *RMIT University School of Applied Sciences, 207.*

EK

Duyusal Analiz Değerlendirme

Panelistin Adı-Soyadı					
Tarih					
Açıklama					
Örnek Numara					
Kalite Kriter	1 **(Çok Kötü)**	2 **(Kötü)**	3 **(Orta)**	4 **(İyi)**	5 **(Çok İyi)**
Renk					
Görünüş					
Lezzet					
Koku					
Genel Beğeni					
Tadım Sonrası Su İçmeyi Unutmayınız ..					