



Doğal Fermente Gıdalardan İzole Edilen Muhtemel Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri ve Laktik Asit Üretim Düzeylerinin İncelenmesi^A

Özüm ÖZOĞLU^{1*}, Mehmet GÜMÜŞTAŞ², Sibel Aysıl ÖZKAN³,
Evrım GÜNEŞ ALTUNTAŞ⁴

Öz: Laktik asit bakterileri pek çok fermente ve probiyotik gıdanın bünyesinde yer alan faydalı bakterilerdir. Bu bakterileri önemli kılan özellikleri arasında GRAS (Generally Recognized As Safe) statüde olmaları ve ürettikleri antimikrobiyal metabolitler bulunmaktadır. Laktik asit bakterilerinin ürettiği antagonistik etkiye sahip en önemli metabolit bu gruba adını veren laktik asit olup; bunun yanı sıra hidrojen peroksit, asetik asit, diasetil, bakteriyosin vb. metabolitler ile de antagonistik etkiye neden olmaktadır. Bu çalışmada çeşitli peynir, sucuk ve kefir örneklerinden izole edilen 23 adet muhtemel laktik asit bakteri izolatının *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (metisilin ve oksasilin dirençli) patojenleri üzerindeki inhibisyon etkisi Agar Spot Yöntemi ile araştırılmıştır. Test sonucunda pozitif etki gösteren izolatların süpernatantları ile Kuyu Difüzyon denemesi gerçekleştirilmiştir. Son olarak izolatların ürettiği laktik asit miktarları HPLC yöntemi ile de

^A Bu çalışmada elde edilen HPLC sonuçları, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinatörlüğü 17H0415001 No'lu Projesi'nde de kullanılmıştır. Aynı zamanda bu çalışmanın sonuçları Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne sunulan Özüm ÖZOĞLU'nun yüksek lisans tezinin bir kısmını oluşturmaktadır. Bu çalışma etik kurul izni gerektirmemektedir. Makale araştırma ve yayın etiğine uygun olarak hazırlanmıştır.

* **Sorumlu yazar/Corresponding Author:** ¹ Özüm ÖZOĞLU, Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 16059, Bursa-TÜRKİYE, ozoglu@uludag.edu.tr, [OrcID 0000-0003-3600-142X](https://orcid.org/0000-0003-3600-142X)

² Mehmet GÜMÜŞTAŞ, Ankara Üniversitesi, Adli Bilimler Enstitüsü, Dikimevi Tıp Fakültesi Yerleşkesi, 06590, Ankara-TÜRKİYE, mgumustas@ankara.edu.tr, [OrcID 0000-0003-2793-7154](https://orcid.org/0000-0003-2793-7154)

³ Sibel Aysıl ÖZKAN, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Tandoğan Yerleşkesi, 06560, Ankara-TÜRKİYE, ozkan@pharmacy.ankara.edu.tr, [OrcID 0000-0001-7494-3077](https://orcid.org/0000-0001-7494-3077)

⁴ Evrim GÜNEŞ ALTUNTAŞ, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Sistem Biyoteknolojisi İleri Araştırma Birimi, Gümüşdere 60. Yıl Yerleşkesi, 06135, Ankara-TÜRKİYE, Evrım.Gunes.Altuntas@ankara.edu.tr, [OrcID 0000-0003-4897-9388](https://orcid.org/0000-0003-4897-9388)

belirlenmiştir. Agar Spot Testi'ne göre izolatların neredeyse tamamı tüm patojenler üzerinde etkinlik gösterirken, patojenler üzerindeki inhibisyon etkiyi gösteren zon çaplarının 1-24.5 mm aralığında değiştiği tespit edilmiştir. 24.5 mm zon çapı ile maksimum etki 31 nolu izolat tarafından *E.coli ATCC 25922* üzerinde gözlemlenirken; 1 mm zon çapı ile minimum etki 431 nolu izolat tarafından *S. Enteritidis ATCC 13076* test mikroorganizmasına karşı gözlemlenmiştir. Kuyu Difüzyon Testi'nde ise hiçbir pozitif sonuç elde edilememiş ve bu nedenle bakterilerin antagonistik etkilerinin daha çok laktik asit üretiminden kaynaklandığı düşünülmüştür. Yapılan kromatografik çalışma ile laktik asit bakterilerinin ürettiği laktik asit miktarının 0.13-5.52 mmol aralığında olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar laktik asit bakterilerinin bakteriyosin gibi önemli protein bazlı inhibitörleri üretmese bile, ürettiği temel metabolit olan laktik asit ile etkin bir antimikrobiyal aktivite kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, laktik asit, laktik asit bakterisi, HPLC.

Investigation of Antimicrobial Activities and Lactic Acid Production Levels of Presumptive Lactic Acid Bacteria Isolated From Naturally Fermented Foods

Abstract: Lactic acid bacteria are useful bacteria which are included to composition of many fermented and probiotic food. Being GRAS (Generally Recognized As Safe) statute and the antimicrobial metabolites produced by them are among the properties which make these bacteria significant. The most important metabolite with antagonistic effect produced by lactic acid bacteria is lactic acid that gives the name of these bacteria, besides LAB can have antagonistic effect by producing hydrogen peroxide, acetic acid, diacetyl, bacteriocin etc. In this study, inhibition effects of 23 presumptive lactic acid bacteria isolates that isolated from various cheese, sucuk and kefir samples on *Salmonella Enteritidis ATCC 13076*, *Streptococcus mutans ATCC 25175*, *Escherichia coli ATCC 25922*, *Bacillus subtilis ATCC 6633* and *Staphylococcus aureus ATCC 43300* (methicillin and oxacillin resistant) were investigated by Agar Spot method. According to the assay, Well Diffusion Test was performed with supernatant of the isolates showed positive results. Finally, the quantification of lactic acid was detected by HPLC method. As a result of Agar Spot Test, while all of the isolates were effective on all pathogens, the inhibition zone diameters were ranged between 1-24.5 mm. While the maximum effect was observed by isolate 31 on *E.coli ATCC 25922* with a zone diameter of 24.5 mm, the minimum effect was observed by isolate 431 against *S. Enteritidis ATCC 13076* test microorganism with a zone diameter of 1 mm. Then, due to not to have any positive results from Well Diffusion Assay, it has been considered the antagonistic effect of the bacteria were originated from lactic acid production. It was observed that lactic acid produced by LAB was ranged between 0.13-5.52 mmol by chromatographic study. Even if the LAB do not produce protein-based inhibitors such as bacteriocin, the results shows LAB has an effective antimicrobial activity capacity with lactic acid, the main metabolite of LAB.

Keywords: Antimicrobial activity, lactic acid, lactic acid bacteria, HPLC.

Giriş

Laktik asit bakterileri (LAB), çok uzun yıllardan beri fermente gıdaların bileşiminde bulunan ve bir takım ortak özelliklere sahip bir grup bakteridir. Bu bakterileri ortak noktada birleştiren ve isimlendirilmelerinde doğrudan etkisi olan en önemli özellikleri laktik asit üreticisi olmalarıdır (Axelsson ve Ahrné, 2000; Durlu-Ozkaya ve ark., 2001; Gumustas ve ark., 2017; Orji, J. O. ve ark., 2020). İlk kez 1873 yılında Joseph Lister sütte bulunan bir bakteriyi izole etmiş ve “*Bacterium lactis*” olarak isimlendirmiştir. Bakterinin isimlendirilmesi sonraki yıllarda *Streptococcus lactis* ve ardından *Lactococcus lactis* olarak değiştirilmiştir. İlk yıllarda LAB'nin sütte bulunan şekeri fermente eden bakteriler olduğu düşünülse de sonraki yıllarda farklı ortamlardan da benzer bakteriler izole edilebilmiştir (Axelsson ve Ahrné, 2000). Tipik bir LAB; aerotolerant olup standart koşullarda gelişebilen, aside toleranslı, organotropik, çoğunlukla fermentatif, kok ya da çubuk şeklinde, son ve başlıca ürün olarak laktik asit üreten bakterilerdir. Genellikle hücreleri hareketsizdir. Gelişmeleri için vitamin ve aminoasitler gibi kompleks gelişme faktörlerine ihtiyaç duymaktadırlar (König ve ark., 2017). Bazı LAB, ağız ve nazofaringeal mukozada kolonize olurken (oral streptokoklar), bazıları bağırsak mikrobiyotasında (bifidobakteriler, enterokoklar ve bazı laktobasiller) ve bazıları da vajinal mikrobiyotada bulunmaktadırlar (bazı laktobasiller). Tüm bu mikrobiyota üyeleri apatojenik olup faydalı bakteri grubunda yer almaktadır. Normalde bulunmamaları gereken bölgelerde tespit edildiklerinde, patojen özellik gösterebilmektedirler. Bu normal dışı durumlara enterokoklar ve hemolitik streptokoklar dikkat çekmektedir (Teuber, 2008).

Günlük diyetle yer alan yoğurt, peynir, zeytin turşu gibi hem fermente hem de fonksiyonel grupta yer alabilecek gıdalar; LAB aktivitesi sonucunda üretilmektedirler (Altuntaş ve ark., 2010; Nebbia ve ark., 2021; Yıldırım Kumral ve ark., 2020). Aralarında *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* (Zheng ve ark. (2020), *Amylolytobacillus*, *Bombilytobacillus*, *Latilytobacillus*, başlıca olmak üzere 25 cinsin daha taksonomide bu gruba dahil olmasını önermişlerdir.), *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* cinslerinin bulunduğu LAB arasında; yoğurt üretiminde *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* bakterileri, peynir üretiminde *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *L. lactis ssp. cremoris*, *L. lactis ssp. lactis* biovar. *diacetylactis*, *S. thermophilus*, *L. sake*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. helveticus* bakterilerinden oluşan termofilik ve/veya mezofilik starter kültür kombinasyonları, turşu üretiminde ise *L. brevis*, *L. plantarum*, *P. pentosaceus*, *P. cerevisiae* bakterileri ön plana çıkmaktadır (Çelik ve Uysal, 2009; Erginkaya ve ark., 2003; Zheng ve ark., 2020).

Gastrointestinal sistem, pek çok mikroorganizmanın dahil olduğu bir ekosistemdir. Bu ekosistemde probiyotik karakteri ve patojen inhibisyonu ile LAB, dominant olabilmekte ve intestinal sağlığı olumlu etkileyebilmektedir (Ali, 2010; Campana ve ark., 2017). Konakçı sağlığı üzerindeki olumlu etkileri ile oldukça güncel bir konu olan probiyotik mikroorganizmaların neredeyse tamamı LAB arasındadır. Probiyotik mikroorganizmalar konakçı üzerindeki etkilerini; epitel hücrelere tutunma, kolonize olma, biyosümfaktan üretimi, patojenler ile oto ve ko-agregasyon, antagonistik metabolit üretimi, enzim üretimi gibi özellikleri ile göstermektedirler (Campana ve ark., 2017; Cosansu ve ark., 2007; Dowarah ve ark., 2018; Halkman ve ark., 1994; Halkman ve Ayhan, 2005; Ringø ve ark., 2020; Rodríguez ve ark., 2002).

Gıdaların muhafazasında ısı ya da ısı olmayan farklı yöntemler tercih edilebilmektedir. Isıl işlemleri kısıtlı kılan nokta; gıdaların besin içeriğinin korunmasındaki zorluk olup, ısı olmayan işlemler arasında biyomuhafaza da bulunmaktadır. Mikrobiyal gıda üretiminde kullanılan kültür, ürünü ortaya çıkarmasının yanında ürünün korunmasını da sağlıyorsa ayrıca koruyucu kullanılmasına gerek kalmamaktadır. Bu noktada LAB'nin ürettiği antimikrobiyal maddeler önem arz etmektedir. LAB tarafından üretildikleri bilinen ve aralarında laktik asitin de bulunduğu etanol, diasetil, H₂O₂, bakteriyosin gibi inhibitör maddeler, laktik asit bakterilerinin buldukları ortamda dominant kültürler haline gelmesini sağlayabilmekte ve patojen gelişimini önleyebilmektedir (De Vuyst ve Leroy, 2007; Gomez ve ark., 2021; Orji, J. O. ve ark., 2020). Ürettiği her bir metabolitin etki spektrumu farklıdır; ancak laktik asit üretimi nedeniyle düşürdüğü pH, diğer bakterilerin gelişimini oldukça sınırlamaktadır. Günümüzde antagonistik etkileri oldukça iyi anlaşılmış LAB, doğal olarak antimikrobiyal özellikleri ile özdeşleşmiştir.

Bu bilgiler doğrultusunda yapılan çalışmada; doğal fermente gıdalardan peynir, kefir ve sucuk örneklerinden izole edilen ve laktik asit bakterisi olduğu düşünülen 23 izolatın bazı temel özellikleri tespit edildikten sonra patojen mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Ayrıca, izolatların laktik asit üretim düzeyleri HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) yöntemiyle belirlenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Araştırmada, Ankara'nın değişik bölgelerinden temin edilen ve doğal fermantasyon yöntemiyle üretildiği bilinen 3 adet peynir, 2 adet sucuk ve 2 adet kefir örneği kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite testlerinde Gram pozitif; *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (metisilin ve oksasilin dirençli), *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, Gram negatif; *Escherichia coli* ATCC 25922, ve *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076 test bakterileri olarak kullanılmıştır.

İzolasyon ve Morfolojik Tanımlama

Toplanan örneklerden laktik asit bakteri izolasyonu amacıyla yayma plak yöntemi kullanılmış olup, besiyeri olarak MRS (De Man Rogosa Sharpe, Merck) broth/agar ve M17 broth/agar (Merck) kullanılmıştır. Bakterilerin M17 besiyerinde daha iyi geliştikleri tespit edildiği için denemelere M17 besiyeri ile devam edilmiştir. İzolasyon aşamasında inkübasyon sıcaklığı 30°C ve süresi 24-48 saat olarak uygulanmıştır (Daodaji ve ark., 2020; Harrigan ve McCance, 1976). İzolatların morfolojik tanımlaması ve Gram reaksiyonları, Gram boyama yöntemi ile belirlenmiştir (Doetsch, 1981; Mathialagan ve ark., 2018).

Agar Spot Testi

İzolatların antimikrobiyal etkisi öncelikle Agar Spot testi ile belirlenmiştir (Altuntaş ve ark., 2010; Schillinger ve Lücke, 1989). Bu amaçla izolatlar M17 Broth besiyerinde iki kez aktifleştirildikten sonra (30°C, 24 saat) M17 Agar besiyerine her bir aktif kültürden nokta ekimi yapılmıştır. Petri kutuları 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılarak koloni oluşumu sağlanmıştır. Test mikroorganizması olarak kullanılan patojen mikroorganizmaların

Tryptic Soy Broth (TSB, Merck) besiyerindeki 18-24 saatlik kültürlerinden 8 µL alınarak içinde 45°C sıcaklıkta 8 mL yumuşak-TSA (%0.7 agar içeren) bulunan tüplere aktarılmış ve tüp karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra karışım, laktik asit bakterisi izolatlarının kolonileri üzerine dökülmüş ve katılaşması için oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Petri kutuları 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin bitiminde koloni etrafında zon oluşumuna bakılarak sonuç pozitif veya negatif olarak değerlendirilmiş ve zon çapları ölçülmüştür.

Kuyu Difüzyon Testi

Agar Spot testinde pozitif sonuç veren izolatlar, Kuyu Difüzyon yöntemi ile test edilmiştir (Altuntaş ve ark., 2010; Schillinger ve Lücke, 1989). İzolatlar M17 Broth besiyerinde 30°C'de 24 saat süreyle iki kez aktifleştirilmiş ve aktif kültürler 6000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüjledikten sonra elde edilen süpernatant, 0.45 µm por çaplı filtreden (Sartorius, Almanya) geçirilerek hücreler ayrılmıştır. M17 Agar üzerinde 8 mm çapında kuyucuklar açılmış ve kuyucuklara elde edilen süpernatantlardan 50 µL aktarılmıştır. Petri kutuları bir gece 4°C'de bekletilerek süpernatantların besiyerine difüze olması sağlanmıştır. Daha sonra kuyucuklar üzerine 8 µL test mikroorganizması kültürü içeren 8 mL yumuşak-TSA (%0.7 agar içeren) aktarılmıştır. Agarın katılaşması için oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra Petri kutuları 30 ve 37°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda kuyucuk etrafında zon oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir.

LAB İzolatları Tarafından Üretilen Laktik Asitin Tespiti ve Miktar Tayini

Standart Solüsyonların Hazırlanması

Laktik asit stok çözeltisi 100 mmol olacak şekilde ultra saf su ile hazırlanmıştır. Kalibrasyon için ise çözelti saf su ile 0.25 - 50 mmol (n=5) aralığında seyreltilerek kullanılmıştır.

Laktik Asit Miktarının Belirlenmesi

Laktik asit miktar tayini amacıyla öncelikle LAB izolatlarının yukarıda belirtildiği şekilde elde edilen süpernatantları kullanılmıştır. Süpernatantlar, uygun konsantrasyonlarda kalibrasyon eşitliğinde yerine yerleştirilerek laktik asit miktarı tespit edilmiştir (Gumustas ve ark., 2013).

Kromatografik Koşullar

HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) yöntemiyle laktik asit tayini için optimum kromatografik koşulların belirlenmesinde, öncelikle sabit faz özellikleri; fonksiyonel grup, tanecik çapı, silika türü açısından değerlendirilmiştir. Devamında hareketli faz organik düzenleyicisinin seçimi, hareketli faz organik çözücü türünün ve oranının etkisi, akış hızı ve sıcaklık etkileri araştırılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda optimum koşullarda kromatografik analizler gerçekleştirilmiştir. Analizde sabit faz olarak Synergi Polar RP (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) belirlenmiş ve bu kolon kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Kolon ömrünü uzatmak ve safsızlıkların analiz üzerine etkisini azaltmak amacıyla koruyucu kolon kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı değiştirilerek sonuçlara sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda kolon fırın sıcaklığı 25°C'de sabit tutulmuştur. Suyla farklı asitlerin karışımları kullanılarak hareketli faz denemeleri gerçekleştirilmiş ve etkin

ayırma sağladığı için % 0.25 (h/h) H_3P^{o4} içeren çözelti (pH:2,5) hareketli faz olarak kullanılmıştır. Hareketli faz çözeltileri; vakum altında 0.45 μ m por çaplı selüloz asetat filtre ile süzölmüş ve çözönmemiş oksijenin uzaklaştırılması için 15 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiştir. 210 nm'de görüntöleme yapılan sistemde akış hızı denemeleri yapılmış (0.5-1.25 mL/dk) ve en iyi sonuçların elde edildiği 1mL/dk akış hızı, çalışmanın tüm basamaklarında kullanılmıştır. Analizler, 20 dakikalık kolon şartlanması beklenmesinin ardından başlatılmıştır. Çalışma kapsamında optimizasyonu yapılan yöntem, Uluslararası Uyum Konseyi'nin belirlediği analitik yöntem geçerlilik testleri temel alınarak gerçekleştirilmiştir (ICH Official Web Site : ICH, n.d.).

İstatiksel Analiz

One-Way Anova (Minitab) varyans analizi, LAB izolatu ve hedef mikroorganizma faktörlerine dayalı olarak LAB suşları arasında antimikrobiyal aktivitenin istatistiksel farklarını ($P<0.05$) belirlemek için Tukey ve LSD prosedürleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Çalışmada kullanılan LAB izolatlarına ait detaylar Çizelge 1'de görölmektedir. Çizelgede de göröldüğü gibi izolatların 22 adedi kok formunda, 1 adedi çubuk formunda gözlenmiştir. Ayrıca tüm izolatlar Gram reaksiyonunda pozitif sonuç göstermiştir. İzolatlar, Gr (+) reaksiyon göstermeleri ve laktik asit fermantasyonu sonucu üretilen fermente gıdalardan izole edilmeleri ve laktik asitin tayini sırasında laktik asit üretmeleri nedeniyle muhtemel LAB oldukları düşünölmüştür (König ve ark., 2017).

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan izolatların özellikleri

İzolat No	İzole edildiği gıda	Gram reaksiyonu	Morfoloji
11	Peynir	Gr +	Kok
12	Peynir	Gr +	Kok
13	Peynir	Gr +	Kok
14	Peynir	Gr +	Kok
21	Peynir	Gr +	Kok
23	Peynir	Gr +	Kok
24	Peynir	Gr +	Kok
31	Kefir	Gr +	Kok
32	Kefir	Gr +	Kok
33	Kefir	Gr +	Kok
41	Sucuk	Gr +	Kok
421	Sucuk	Gr +	Çubuk
4221	Sucuk	Gr +	Kok
4222	Sucuk	Gr +	Kok
431	Sucuk	Gr +	Kok
432	Sucuk	Gr +	Kok
51	Sucuk	Gr +	Kok
62	Peynir	Gr +	Kok
631	Peynir	Gr +	Kok
632	Peynir	Gr +	Kok
71	Kefir	Gr +	Kok
72	Kefir	Gr +	Kok
73	Kefir	Gr +	Kok

İzolatlara uygulanan agar spot testi sonuçları Çizelge 2’de verilmiştir. Agar Spot Testi’nde toplam 5 patojen için (*S. Enteritidis*, *Str. mutans*, *E. coli*, *B. subtilis* ve *Staph. aureus* (metisilin ve oksasilin dirençli)) denemeler iki paralelli gerçekleştirilmiş olup, sonuçlar bu iki paralelin ortalaması alınarak Çizelge 2’ye eklenmiştir.

Çizelge 2. Çeşitli örneklerden izole edilen 23 adet laktik asit bakterisinin; *S. Enteritidis*, *Str. mutans*, *E. coli*, *Staph. aureus* ve *B. subtilis* patojenleri için Agar Spot Yöntemi’ne göre oluşturdukları zon çapları (mm)

İzolat No	<i>Salmonella</i> <i>Enteritidis</i> ATCC 13076	<i>Streptococcus</i> <i>mutans</i> ATCC 25175	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> ATCC 43300	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
11	10.50 ^{C,c} (o)	8.50 ^{D,e} (o)	13.50 ^{A,a} (o)	12.50 ^{B,b} (o)	9.50 ^{CD,d} (o)
12	9.50 ^{C,c} (o)	9.00 ^{D,d} (o)	13.00 ^{A,b} (o)	19.00 ^{B,a} (o)	8.50 ^{CD,e} (o)
13	8.25 ^{C,c} (o)	7.50 ^{D,e} (o)	12.50 ^{A,b} (o)	13.00 ^{B,a} (o)	7.50 ^{CD,d} (o)
14	9.00 ^{C,c} (o)	6.75 ^{D,e} (o)	13.00 ^{A,a} (o)	13.00 ^{B,b} (o)	8.00 ^{CD,d} (o)
21	10.00 ^{C,c} (o)	6.50 ^{D,e} (o)	15.00 ^{A,a} (o)	15.00 ^{B,b} (o)	10.00 ^{CD,d} (o)
23	9.75 ^{C,c} (o)	8.75 ^{D,d} (o)	20.50 ^{A,a} (g)	6.00 ^{B,e} (o)	10.50 ^{CD,b} (o)
24	10.00 ^{C,c} (o)	7.50 ^{D,e} (o)	22.50 ^{A,a} (g)	11.00 ^{B,b} (o)	10.00 ^{CD,d} (o)
31	10.50 ^{C,c} (o)	7.50 ^{D,e} (o)	24.50 ^{A,a} (g)	13.00 ^{B,b} (o)	10.00 ^{CD,d} (o)
32	9.00 ^{C,d} (o)	7.50 ^{D,e} (o)	24.00 ^{A,a} (g)	15.00 ^{B,b} (o)	10.50 ^{CD,c} (o)
33	10.50 ^{C,b} (o)	8.25 ^{D,d} (o)	24.00 ^{A,a} (g)	6.50 ^{B,e} (o)	9.00 ^{CD,c} (o)
41	10.50 ^{C,d} (o)	10.50 ^{D,e} (o)	21.50 ^{A,a} (g)	15.00 ^{B,b} (o)	11.00 ^{CD,c} (o)
421	9.00 ^{C,d} (o)	6.50 ^{D,e} (o)	14.50 ^{A,a} (o)	12.50 ^{B,b} (o)	10.00 ^{CD,c} (o)
4221	11.50 ^{C,c} (o)	8.50 ^{D,e} (o)	18.00 ^{A,a} (o)	11.50 ^{B,b} (o)	10.50 ^{CD,d} (o)
4222	12.00 ^{C,c} (o)	8.50 ^{D,e} (o)	17.50 ^{A,a} (o)	13.00 ^{B,b} (o)	9.00 ^{CD,d} (o)
431	1.00 ^{C,e} (z)	2.50 ^{D,d} (z)	7.00 ^{A,b} (o)	6.50 ^{B,c} (o)	9.50 ^{CD,a} (o)
432	9.00 ^{C,a} (o)	9.00 ^{D,b} (o)	0.00 ^{A,d} (-)	4.50 ^{B,c} (z)	0.00 ^{CD,e} (-)
51	10.50 ^{C,c} (o)	9.25 ^{D,e} (o)	16.00 ^{A,b} (o)	19.50 ^{B,a} (o)	9.50 ^{CD,d} (o)
62	11.00 ^{C,c} (o)	10.00 ^{D,d} (o)	14.50 ^{A,b} (o)	17.00 ^{B,a} (o)	9.00 ^{CD,e} (o)
631	11.50 ^{C,c} (o)	8.75 ^{D,e} (o)	13.00 ^{A,a} (o)	13.00 ^{B,b} (o)	10.50 ^{CD,d} (o)
632	14.00 ^{C,c} (o)	8.25 ^{D,e} (o)	14.00 ^{A,b} (o)	19.00 ^{B,a} (o)	14.00 ^{CD,d} (o)
71	8.75 ^{C,d} (o)	8.50 ^{D,e} (o)	16.00 ^{A,a} (o)	12.50 ^{B,b} (o)	10.00 ^{CD,c} (o)
72	20.00 ^{C,a} (g)	8.75 ^{D,e} (o)	12.50 ^{A,b} (o)	11.50 ^{B,c} (o)	9.50 ^{CD,d} (o)
73	10.00 ^{C,c} (o)	8.00 ^{D,e} (o)	11.50 ^{A,b} (o)	13.50 ^{B,a} (o)	9.00 ^{CD,d} (o)

* Hücre içindeki farklı büyük harfler istatistiksel olarak önemli farklılığı göstermektedir (P<0.05).

* Her bir satırdaki farklı küçük harfler istatistiksel olarak önemli farklılığı göstermektedir (P<0.05).

* (z): Zayıf antimikrobiyal etki, (o): Orta düzeyde antimikrobiyal etki, (g): Güçlü antimikrobiyal etki, (-): antimikrobiyal etki gözlenmemiştir.

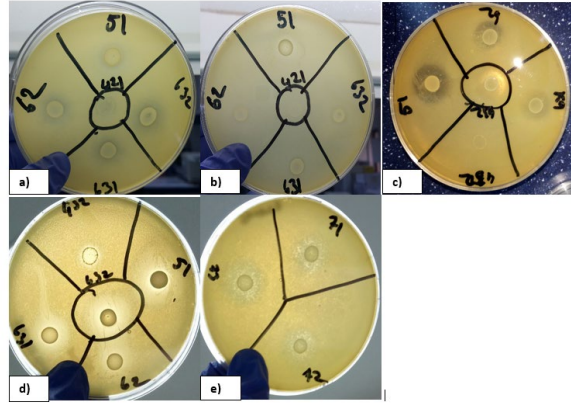
Çizelge 2’ye göre; Agar Spot testinde neredeyse tüm test mikroorganizmaları üzerinde izolatların 1-24.5 mm aralığında antimikrobiyal zon oluşturduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen etki zon çaplarına göre güçlü (20mm≤), orta (6-19 mm) ve zayıf (5 mm≥) olarak gruplandırılmıştır (Aka-Gbezo ve ark., 2017; Erdoğan ve Bostancı, 2020; Kıvanç ve ark., 2011; Schillinger ve Lücke, 1989). Oluşan zon çaplarına göre her bir izolatin test mikroorganizmaları üzerindeki etki istatistiksel açıdan farklılık göstermektedir (P<0.05). Bu sonuç, Erdoğan ve Bostancı’nın (2020) kefirlerden izole ettikleri LAB ile yapmış oldukları çalışmanın antimikrobiyal etki sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Bahsi geçen çalışmada 27 LAB izolatinin, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas*

aeuroginosa, *Listeria monocytogenes* üzerinde daha fazla olmakla birlikte diğer test mikroorganizmaları (*Staph. aureus*, *Str. faecalis*, *E. coli*, *B. subtilis*) üzerinde de antimikrobiyal etkiye sahip olduğu (9-24 mm zon çapı aralığında) tespit edilmiştir (Erdoğan ve Bostancı, 2020). Tüm denemeler karşılaştırıldığında özellikle, 31, 32 ve 33 nolu izolatların 24 mm ve üstünde zon çapı ile *E. coli* bakterisi üzerinde oldukça etkin oldukları görülmektedir. Üç izolatın da kefir kökenli olduğu dikkat çekmekle birlikte diğer kefir kökenli izolatlar 71, 72 ve 73 nolu izolatlardan farklı oranda *E. coli* üzerinde etkili olmaları, antimikrobiyal etkinin diğer sonuçlar da olduğu gibi izolat kaynağından bağımsız olduğunu göstermektedir. Ayrıca, LAB'nın ürettiği olduğu bakteriyosin daha çok Gram pozitif bakteriler üzerinde etkiliyken; laktik asidin ise Gram negatif bakteriler üzerinde daha etkili olduğu ifade edilmektedir (Aka-Gbezo ve ark., 2017; Dinev et al., 2018; Stupar ve ark., 2021). Gram negatif *E. coli* üzerindeki güçlü antimikrobiyal etki bunu doğrulamaktadır. 432 no'lu izolatın *S. Enteritidis*, *Str. mutans* ve *Staph. aureus* üzerinde çok yüksek düzeyde olmasa da antagonistik etki gösterdiği, fakat *E. coli* ve *B. subtilis* üzerinde inhibisyon etki göstermediği tespit edilmiştir. 431 no'lu izolatın ise *B. subtilis* dışındaki diğer test mikroorganizmaları üzerinde etkili olmadığı gözlenmiştir. Çizelge 2'de görüldüğü üzere izole LAB, yaygın olarak en çok *E. coli* üzerinde antimikrobiyal etki gösterirken en az *Str. mutans* suşu üzerinde etkili olmuştur. Yine Çizelge 2'de görüldüğü üzere *S. Enteritidis*, *Str. mutans*, *E. coli*, *Staph. aureus* ve *B. subtilis* üzerine en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi sırasıyla; 72, 41, 31, 51 ve 632 izolatları göstermiştir.

Ertekin ve Çon (2014)'un yapmış oldukları çalışmada; peynir, sucuk, ekşi hamur ve turşudan izole edilmiş ve tanımlanmış 26 LAB izolatının, *Listeria monocytogenes* Li1 ve *Enterococcus faecium* indikatör mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri Agar Spot Yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışmanın sonunda izolatların büyük çoğunluğunun test mikroorganizmaları üzerinde, elde edildikleri kaynaktan bağımsız olarak farklı düzeylerde antimikrobiyal aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (Ertekin ve Çon, 2014). Literatürde yer alan bu çalışma izolat kaynağı, metod açısından yapılan çalışma ile oldukça benzerlik göstermekte ve sonuçları desteklemektedir.

Sari ve ark. (2018)'nin Bekasam'dan (Endonezya'ya özgü balık kökenli fermente gıda) izole edilen 11 adet LAB izolatı ile yapmış oldukları bir diğer çalışmada; 11 adet izolattan 4'ü (MS2, MS4, MS8 ve MS9) 3 test mikroorganizması üzerine (*Staph. aureus*, *E. coli*, ve *Salmonella sp.*) çalışmamıza benzer olarak farklı oranlarda antimikrobiyal etki göstermiştir (Sari ve ark., 2018). Bir başka çalışmada, deniz kaynaklı tüketime hazır gıdalardan elde ettikleri LAB izolatları ile yaptıkları çalışma sonucunda da izolatların antimikrobiyal etki gösterdiği ve bu etkinin izolat cinsi, kökeni ve test mikroorganizması faktörleri açısından istatistiksel olarak farklı bulunduğu tespit edilmiştir (P<0.05). Çalışmada deniz kökenli gıdalardan 99 LAB izolatı elde edilmiş (*Carnobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Weissella spp.*, ve *Enterococcus sp.* cinslerine ait) ve *L. monocytogenes*, *L. innocua* ve *E. coli* test mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonucunda; genel olarak en yüksek antimikrobiyal etki *Listeria suşları* üzerinde gözlenmiştir (Stupar ve ark., 2021).

Agar Spot denemesinde elde edilen zonları gösteren petri örnekleri Şekil 1'de görülmektedir.



Şekil 1. Çeşitli örneklerden izole edilen laktik asit bakterilerinin; a) *S. Enteritidis*, b) *Str. mutans*, c) *E. coli*, d) *Staph. aureus* ve e) *B. subtilis* patojenleri için Agar Spot Yöntemi'ne göre oluşturdukları zon örnekleri.

Agar Spot denemesinin ardından izolatların ürettiği metabolitin bakteriyosin olma ihtimali araştırılmıştır. LAB üreme ortamlarında gelişme eğrileri boyunca metabolit üretmeye devam etmektedir. Ancak bakteri üreme ortamından bakteriler ayrıldıktan sonra inhibitör etkiye neden olan madde eğer bakteriyosin benzeri bir metabolit ise inhibisyon etkisinin süpernatant ile de devam etmesi beklenmektedir (Altuntaş ve ark., 2010). Yapılan Kuyu Difüzyon çalışmasında bakterilerden arındırılmış ve filtreden geçirilmiş örnekler patojenler üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir. Bunun sonucunda; bakterilerin test mikroorganizmaları üzerindeki antagonistik etkisinin bakteri metabolizması ile ortaya çıkan organik asit üretiminden kaynaklandığı çıkarımı yapılmıştır. Elde edilen bu sonuç, Kıvanç ve Erikçi (2018)'nin sofralık fermente zeytinlerden izole ettikleri LAB'nin antimikrobiyal aktivitesinin ve bazı metabolik özelliklerinin belirlenmesine yönelik yapmış oldukları çalışmanın sonucu ile benzerlik göstermektedir. Çalışmada izole edilen 50 adet LAB'den antimikrobiyal aktivite gösteren 26 adedinden 6'sının (SZ5 *Lb. plantarum*, DZ2 *E. facium*, L. brevis EZ8, BZ1, SZ1 ve BZ4) metabolitleri, test mikroorganizmalarından (*B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*, *Staph. aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *L. plantarum*, *L. buchneri*, *L. bulgaricus*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *S. lactis*, *Aeromonas hydrophyla*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*) bir kısmına karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. SZ1 ve BZ1 izolatlarına ait süpernatantlar *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivite gösterirken; *B. cereus* ve *B. subtilis*'e karşı sadece BZ1 izolatına ait süpernatant etki göstermiştir. *S. Typhimurium*'a ise sadece SZ1 izolatının süpernatantı antibakteriyel etkili olmuştur. Ek olarak; BZ1 izolatının süpernatantı *S. aureus* hariç diğer test mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir. Bu sebeple antimikrobiyal etkinin bakteriyosin değil organik asit kaynaklı olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, izole LAB'nin laktik asit miktarları, titrimetrik yöntemle 0.261- 1.818 mg/mL arasında saptanmıştır (Kıvanç ve Erikçi, 2018).

LAB'nin ve metabolitlerinin antimikrobiyal aktivitesinin incelendiği bir diğer çalışmada ise üretim ve olgunlaşma aşamasındaki Genestoso peynirinden izole edilen 395 LAB izolatının; *Enterococcus faecalis*, *Staph. aureus*, *L. plantarum*, *Clostridium tyrobutyricum* ve *L. monocytogenes* test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesi tıpkı bu çalışmada olduğu gibi Agar Spot ve Kuyu Difüzyon Yöntemleri ile incelenmiştir. Benzer şekilde izolatların büyük çoğunluğu test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal

aktivite gösterirken; süpernatantların etkisi sınırlı kalmıştır. İzolatlardan sadece 1 tanesi *L. monocytogenes* üzerinde antimikrobiyal etki göstermezken; 31 tanesi de *L. plantarum* üzerinde etkili olmamıştır. *Staph. aureus*, *Clostridium tyrobutyricum* ve *L. monocytogenes* test mikroorganizmalarına karşı hiçbir izolatin süpernatantı bu çalışmada olduğu gibi etki göstermezken; organik asitlerden ve hidrojen peroksitten kaynaklanan herhangi bir etkiyi ortadan kaldırmak için nötralize edilen ve katalazla işleminden geçirilen süpernatantlardan üçü *Enterococcus faecalis* ve biri *L. plantarum* üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Bu izolatların antimikrobiyal aktivitesinin bakteriyosin kaynaklı olabileceği sonucuna varılmıştır (González ve ark., 2007).

İzole LAB süpernatantlarının antimikrobiyal aktivitelerinin incelendiği başka bir çalışmada, Almanya'da geleneksel ve endüstriyel olarak üretilen fermente sucuklardan izole edilen LAB izolatlarının süpernatantlarının ve süpernatantlarında belirlenen bakteriyosinin *E. coli*, *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *Staph. aureus* ve *S. Typhimurium* gıda kaynaklı patojenlerine karşı antimikrobiyal etkisi Kuyu Difüzyon Yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışma sonunda; 169 izolatin% 12.4'ü yalnızca *L. innocua* ve *L. monocytogenes*'e karşı antibakteriyel etki gösterirken; izolatların% 6.5'inde, etkiden bakteriyosinlerin sorumlu olduğu tespit edilmiştir. Diğer test suşlarına karşı izolatlar, antimikrobiyal etki göstermemiştir. Yapılan çalışmada bakteriyosinin antimikrobiyal aktivitedeki önemi ortaya konulmuştur (Bungenstock ve ark., 2020) Çalışmanın bundan sonraki basamağında çeşitli gıdalardan izole edilmiş olan LAB'nin ürettiği laktik asit miktarları kromatografik olarak ölçülmüştür. Optimum koşullar kullanılarak gerçekleştirilen HPLC çalışmasında elde edilen sonuçlar Çizelge 3'te görülmektedir.

Çizelge 3. HPLC'de belirlenen izolatların ürettiği laktik asit miktarları

İzolat No	Laktik Asit Miktarı (mmol)
11	1.77
12	2.16
13	4.08
14	1.84
21	4.47
23	4.43
24	2.86
31	2.80
32	3.15
33	3.59
41	-
421	-
4221	5.39
4222	3.40
431	0.13
432	-
51	2.61
62	2.46
631	1.84
632	-
71	5.52
72	3.81
73	1.36

Çizelge 3'te görüldüğü üzere en yüksek laktik asit miktarı 71 numaralı izolat tarafından üretilirken; en düşük laktik asit miktarı ise 431 numaralı izolat tarafından üretilmiştir. 41, 421, 432 ve 632 numaralı izolatlar için ise üretilen laktik asit belirlenememiştir. En düşük laktik asit miktarı tespit edilen 431 numaralı izolat, aynı zamanda test mikroorganizmaları üzerinde de en düşük antimikrobiyal etki gösteren izolat olmuştur. Çizelge 2 ve Çizelge 3 karşılaştırıldığında benzer durum laktat tespit edilemeyen 432 numaralı izolat için de geçerli olmaktadır. Her ne kadar Çizelge 2 ve Çizelge 3 karşılaştırıldığında doğrusal olmamakla birlikte laktik asit miktarları ile antimikrobiyal etki arasında bir bağlantı bulunsa da 41, 421, 432 ve 632 gibi laktik asit tespit edilemeyen suşların da antimikrobiyal etki göstermesi bu etkinin sadece laktik asitten kaynaklanmadığını göstermektedir. LAB, laktik asit yanında; asetik asit, propiyonik asit, benzoik asit, diasetol ve etanol gibi diğer antimikrobiyal etkili maddeleri de üretmektedirler (Cizeikiene ve ark., 2013). Bu nedenle laktik asit tespit edilemeyen izolatlardaki antimikrobiyal etki laktik asit dışındaki bakteriyosin olmayan diğer organik asitlerden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

HPLC yönteminin aynı anda birden fazla metabolitin belirlenmesine olanak sağlaması, laktat düzeyinin tespitinde hassas ve güvenilir olması nedeniyle son yıllarda bakteri metabolit tespitinde sıklıkla kullanılmaktadır (Hori ve ark., 2019; Ucar ve ark., 2020; Yang ve ark., 2020; Zhang ve Li, 2018). Ucar ve ark. (2020) yapmış oldukları taze ve fermente salatalıklarda gentiobiyoz ve selobiyoz içeriği ve bu tür disakkaritlerin fermente salatalık suyu ortamında laktik asit bakterileri tarafından kullanımı üzerine yapmış oldukları çalışmada; salatalıklarda LAB tarafından fermantasyonun tamamlanmasını laktik asit, asetik asit ve etanol oluşumunu HPLC yöntemi ile takip ederek belirlemişlerdir. *Ruminococcaceae* suşu CPB6'dan L-laktat dehidrojenaz (LDH, EC.1.1.1.27) geninin klonlanarak plazmit pET28a ile *E. coli* BL21 (DE3)'e eksprese edildiği bir çalışmada *E. coli*'nin laktik asit kullanımı için HPLC yöntemi tercih edilmiş ve klonlamanın başarı ölçütlerinden biri olarak kullanılmıştır (Yang ve ark., 2020). Benzer şekilde *E. coli*'ye yeni bir yapay yol ekleyerek L-fenilalanin'den (L-Phe) LAB tarafından üretilen ve güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olan fenilaktik asit (PLA) üretiminin verimliliğini arttırmanın hedeflendiği bir çalışmada, L-fenilalanin ve fenilaktik asit HPLC yöntemi ile başarılı bir şekilde belirlenmiştir (Zhang ve Li, 2018). Çalışmada izolatların laktik asit üretim düzeylerinin belirlenmesinde HPLC yönteminden yararlanılması, laktik asidin tespiti ve muhtemel LAB'ların belirlenmesi açısından güncel literatür ile uyum sağlamaktadır.

Sonuç

LAB'nin ürettikleri çeşitli metabolitlerle gıda vd. kaynaklı patojen mikroorganizmalar üzerinde inhibe edici özelliklerinin olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada da çeşitli gıda örneklerinden izole edilen muhtemel LAB izolatlarının patojen suşlar üzerindeki antimikrobiyal etkinliği ve ürettikleri laktik asit miktarları araştırılmıştır. LAB izolasyonu için peynir, sucuk ve kefir gibi doğal olarak LAB içeren gıdalar seçilmiş olup; izole edilen toplam 23 adet izolattan 22 adedinin kok, 1 adedinin çubuk şeklinde olduğu gözlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite testlerine göre, Gram pozitif; *Staphylococcus aureus* (metisilin ve oksasilin dirençli), *Streptococcus*

mutans, *Bacillus subtilis*, Gram negatif; *Escherichia coli*, ve *Salmonella* Enteritidis patojenleri üzerinde neredeyse tüm izolatların antagonistik etki sergilediği tespit edilmiş ve bu etki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$). İzolatların süpernatantlarının test mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal etki göstermemesi nedeniyle; izolatların ürettiği antimikrobiyal metabolitin kaynağının daha çok laktik asit olduğu düşünülmüştür. Bunun yanında; izolatların laktik asit düzeyleri HPLC yöntemiyle incelendiğinde; 0.13-5.52 mmol aralığında laktik asit ürettikleri belirlenmiştir. Üretilen laktik asit miktarı ile antimikrobiyal etki arasında genel olarak bir bağlantı tespit edilmiş olsa da laktik asit üretimi belirlenemeyen izolatlarda da antimikrobiyal etkinin gözlenmesi nedeniyle bu etkinin laktik asit yanında diğer organik asitlerden de kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır.

Çalışmada kullanılan izolatların tür tahminleri ve identifikasyonlarının biyokimyasal ve genetik olarak yapılarak izolatların LAB olduklarının kesinleştirilmesi ve laktik asit metabolizmaları ile ilişkilendirme yapılması, gelecekte yapılacak çalışmalar için gıda güvenliği açısından önem arz edecek ve gerekli olacaktır.

Özet olarak; yapılan bu çalışma ile LAB'nin ürettiği laktik asit başta olmak üzere organik asitler ile patojen mikroorganizmalar üzerinde antagonistik etki gösterdikleri ortaya konmuş ve literatür desteklenmiştir.

Teşekkür Bilgi Notu

Bu çalışmaya ait veriler EGA ve ÖÖ tarafından toplanmıştır. Çalışmaya ait laboratuvar analizleri MG ve ÖÖ tarafından, istatistik analizler ise ÖÖ tarafından yapılmıştır. Makale metni, SAÖ ve EGA'nın gözetiminde ÖÖ tarafından yazılmıştır. Çalışmada kullanılan patojen suşların temininde sağladıkları destek için Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Banu KAŞKATEPE ve Doç. Dr. Müjde ERYILMAZ'a teşekkür ederiz. Bu çalışmada elde edilen HPLC sonuçları; Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinatörlüğü 17H0415001 No'lu Projesi'nde de kullanılmıştır. Aynı zamanda bu çalışmanın sonuçları Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne sunulan Özüm ÖZOĞLU'nun yüksek lisans tezinin bir kısmını oluşturmaktadır. Yapılan bu çalışma etik kurul izni gerektirmemektedir. Makale araştırma ve yayın etiğine uygun olarak hazırlanmıştır. Bu makaleyi hazırlayan yazarlar, araştırmaya eşit oranda katkı sağlamıştır ve makale yazarları, aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

Kaynakça

Aka-Gbezo, S., Konan, A. G., N'Cho, M., Achi, P., Koffi-Nevry, R., Koussemon-Camara, M., & Bonfoh, B. 2017. Screening of antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from anango baca slurry, a spontaneously fermented maize product used in Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 11(6): 2616–2629.

- Ali, A. A. 2010. Beneficial role of lactic acid bacteria in food preservation and human health: A review. *Research Journal of Microbiology*, 5(12): 1213–1221.
- Altuntaş, E. G., Ayhan, K. ve Okcu, G. 2010. Çiğ Süt ve Peynir Örneklerinden İzole Edilen Latik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyel Aktiviteleri. *GIDA*, 35(3): 197–203.
- Axelsson, L. and Ahrné, S. 2000. Lactic Acid Bacteria: *Applied Microbial Systematics*, Ed: Priest, F.G. and Goodfellow, M., Springer, Netherlands, (pp. 367–388).
- Bungenstock, L., Abdulmajood, A. and Reich, F. 2020. Evaluation of antibacterial properties of lactic acid bacteria from traditionally and industrially produced fermented sausages from Germany. *PLoS ONE*, 15(3): 1–15.
- Campana, R., Van Hemert, S. and Baffone, W. 2017. Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathogens*, 9(1): 1–12.
- Çelik, Ş. ve Uysal, Ş. 2009. Beyaz Peynirin Bileşim, Kalite, Mikroflora ve Olgunlaşması. *Atatürk Üniv.Ziraat Fak. Derg.*, 40(1): 141–151.
- Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A. and Bartkiene, E. 2013. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control*, 31(2): 539–545.
- Cosansu, S., Kuleasan, H., Ayhan, K. and Materon, L. 2007. Antimicrobial activity and protein profiles of *Pediococcus* spp. isolated from Turkish “sucuk.” *Journal of Food Processing and Preservation*, 31(2): 190–200.
- Daouadji, S. D., Abbouni, B., Bouricha, M., and Lamine, M. 2020. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from milk and traditional fermented dairy products of south Algeria against multidrug resistance pathogenic bacteria. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 10(5): 322-331..
- De Vuyst, L. and Leroy, F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(4): 194–199.
- Dinev, T., Beev, G., Tzanova, M., Denev, S., Dermendzhieva, D. and Stoyanova, A. 2018. Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* against pathogenic and food spoilage microorganisms: A review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 21(3): 253–268.
- Doetsch, R. N. 1981. Determinative Methods of Light Microscopy.: *Manual of Methods for General Bacteriology*, Eds: Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R. and Phillips, G. B., American Society for Microbiology, (pp. 21–31).
- Dowarah, R., Verma, A. K., Agarwal, N., Singh, P. and Singh, B. R. 2018. Selection and characterization of probiotic lactic acid bacteria and its impact on growth, nutrient digestibility, health and antioxidant status in weaned piglets. *PLoS ONE*, 13(3).
- Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E. 2001. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes’ milk. *Journal of Applied Microbiology*, 91(5): 861–870.

- Erdoğmuş, S. F. ve Bostancı, B. 2020. Kefir Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Antimikrobiyal Etkilerinin Değerlendirilmesi. *GIDA*, 45(1): 72–80.
- Erginkaya, Z., Güven, M., Kavas, C., Kabak, B. ve Karaca, B. O. 2003. Farklı Laktik Asit Kültürleriyle Üretilen Yoğurtlarda Laktik Asit Bakterilerinin *Aspergillus flavus* Üzerine Antifungal Etkisi. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 7(15): 31–36.
- Ertekin, Ö. ve Çon, A. H. 2014. Farklı Gıdalardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Endüstriyel ve Probiyotik Özellikleri. *Akademik Gıda*, 12(4): 6–16.
- Gomez, J. S., Parada, R. B., Vallejo, M., Marguet, E. R., Bellomio, A., Perotti, N. and de Carvalho, K. G. 2021. Assessment of the bioprotective potential of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in ground beef. *Archives of Microbiology*, 0123456789.
- González, L., Sandoval, H., Sacristán, N., Castro, J. M., Fresno, J. M. and Tornadijo, M. E. 2007. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control*, 18(6): 716–722.
- Gumustas, M., Kurbanoglu, S., Uslu, B. and Ozkan, S. A. 2013. UPLC versus HPLC on drug analysis: Advantageous, applications and their validation parameters. *Chromatographia*, 76(21–22): 1365–1427.
- Gumustas, M., Uslu, B. and Ozkan, S. A. 2017. The Role and the Place of High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Fermented Dairy Products: *Soft Chemistry and Food Fermentation*, Eds: Grumezescu, A.M. and Holban, A.M., Elsevier, (pp. 421–464).
- Halkman, A. K. ve Ayhan, K. 2005. Mikroorganizma Sayımı: *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, Ed: Halkman, A.K., Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, (p. 18).
- Halkman, A. K., Yetişmeyen, A., Halkman, Z., Yıldırım, M., Yıldırım, Z. ve Çavuş, A. 1994. Kaşar Peynir Üretiminde Starter Kültür Kullanımı Üzerinde Araştırmalar. *TÜBİTAK Türk Tarım ve Ormanlık Derg.*, 18(5): 365–377.
- Harrigan, W. F. and McCance, M. E. 1976. *Laboratory methods in food and dairy microbiology*, Academic Press Inc, London, 425p.
- Hori, C., Yamazaki, T., Ribordy, G., Takisawa, K., Matsumoto, K., Ooi, T., Zinn, M., and Taguchi, S. 2019. High-cell density culture of poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate)-producing *Escherichia coli* by using glucose/xylose-switching fed-batch jar fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127(6): 721–725.
- ICH Official web site : ICH. (n.d.). [https://www.ich.org/\(07.05.2021\)](https://www.ich.org/(07.05.2021)).
- Kıvanç, M. ve Erikçi, Ş. Y. 2018. Sofralık Fermente Zeytinlerden (*Olea Europaea* L.) İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktivitesinin ve Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi C- Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji*, 7(1): 41–51.
- Kıvanç, M., Yılmaz, M., and Çakır, E. 2011. Isolation and identification of lactic acid bacteria from boza, and their microbial activity against several reporter strains. *Turkish Journal of Biology*, 35(3): 313–324.

- König, H., Uden, G., and Fröhlich, J. 2017. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine: Vol. XXII* (2nd ed.), Springer International Publishing, 522p.
- Mathialagan, M., Thangaraj Edward, Y. S. J., David, P. M. M., Senthilkumar, M., Srinivasan, M. R., and Mohankumar, S. 2018. Isolation, Characterization and Identification of Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) from Honey Bees. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(4): 894–906.
- Nebbia, S., Lamberti, C., Lo Bianco, G., Cirrincione, S., Laroute, V., Coccagn-Bousquet, M., Cavallarin, L., Giuffrida, M. G. and Pessione, E. 2021. Antimicrobial potential of food lactic acid bacteria: Bioactive peptide decrypting from caseins and bacteriocin production. *Microorganisms*, 9(1): 1–19.
- Orji, J. O., Amaobi, C. B., B., M. I., Uzoh, C. V. and Emioye, A. A. 2020. Antagonistic effect and bacteriocinogenic activity of Lactic Acid Bacteria isolated from Sorghum bicolor - based ‘ ogi ’ on food borne bacterial pathogens from cabbage. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 21(1): 45–52.
- Ringø, E., Van Doan, H., Lee, S. H., Soltani, M., Hoseinifar, S. H., Harikrishnan, R. and Song, S. K. 2020. Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 129(1): 116–136.
- Rodríguez, J. M., Martínez, M. I. and Kok, J. 2002. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(2): 91–121.
- Sari, M., Suryanto, D. and Yurnaliza. 2018. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from bekasam against staphylococcus aureus ATCC25923, escherichia coli ATCC 25922, and salmonella sp. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 130(1).
- Schillinger, U. and Lücke, F. K. 1989. Antibacterial activity of Lactobacillus sake isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(8): 1901–1906.
- Stupar, J., Holøymoén, I. G., Hoel, S., Lerfall, J., Jakobsen, A. N. and Rustad, T. 2021. Diversity and antimicrobial activity towards listeria spp. and escherichia coli among lactic acid bacteria isolated from ready-to-eat seafood. *Foods*, 10(271): 17p.
- Teuber, M. 2008. Lactic Acid Bacteria: *Biotechnology: Second Edition*, Eds: Rehm, H. J. and Reed G., Wiley-Blackwell, pp. 325–366.
- Ucar, R. A., Pérez-Díaz, I. M., and Dean, L. L. 2020. Gentiobiose and cellobiose content in fresh and fermenting cucumbers and utilization of such disaccharides by lactic acid bacteria in fermented cucumber juice medium. *Food Science and Nutrition*, 8(11): 5798–5810.
- Yang, Q., Wei, C., Guo, S., Liu, J., and Tao, Y. 2020. Cloning and characterization of a l-lactate dehydrogenase gene from Ruminococcaceae bacterium CPB6. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(12): 1–10.
- Yıldırım Kumral, A., Kumral, N. A. ve Gürbüz, O. 2020. Candida boidinii'nin Farklı Suşlarının Deltamethrini Parçalama Potansiyellerinin İn-vitro Koşullarda Belirlenmesi. *Bursa Uludag Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 34(2): 337–349.

- Zhang, J. and Li, X. 2018. Novel strategy for phenyllactic acid biosynthesis from phenylalanine by whole cell recombinant *Escherichia coli* coexpressing l-phenylalanine oxidase and l-lactate dehydrogenase. *Biotechnology Letters*, 40(1): 165–171.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G. and Lebeer, S. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4): 2782–2858.