

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN ANTİFUNGAL ETKİSİ

YASEMİN ŞEFİKA KÜÇÜKATA



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN ANTİFUNGAL ETKİSİ

Yasemin Şefika KÜÇÜKATA
(0000-0002-2316-1507)

Prof. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU
(Danışman)
(0000-0003-3043-1904)

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

BURSA, 2019

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

21/09/2019



İmza

Yasemin Şefika KÜÇÜKATA

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi
LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN ANTİFUNGAL ETKİSİ
Yasemin Şefika Küçükata
Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Danışman: Mihriban Korukluoğlu

İnsan ve hayvan beslenmesinde temel olan gıda ve yem maddelerinin üzerinde oluşan küfler, ekonomik kayıplara neden oldukları gibi oluşturdukları sekonder metabolizma ürünlerinin toksik etkileri ile sağlık açısından da büyük bir tehlike oluşturmaktadırlar. Bu amaçla gıda sanayinde koruyucu madde kullanımı oldukça yaygındır. Bu çalışmada doğal gıda koruyucusu olarak bilinen laktik asit bakterilerinin antifungal etkileri incelenmiştir.

Materyal olarak zeytinlerden izole edilip tanısı yapılan iki adet laktik asit bakterisi (*Lactobacillus plantarum* I ve II) ile *Aspergillus niger* ATCC 16404 ve Uludağ Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde izole edilip tanısı yapılan *Penicillium roqueforti* test mikroorganizması olarak kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki NaCl (0, 500, 1000 mg/L) ve K-Sorbat'ın (0, 250, 500, 750, 1000 mg/L) küfler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Laktik asit bakterilerinin antifungal etkisinin tespiti ve K-sorbatın ve NaCl'nin küfler üzerindeki etkisinin belirlenmesi disk difüzyon metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Test küfleri üzerinde antifungal etkinin belirlenmesi için besiyeri olarak MRS Agar kullanılmıştır.

Farklı konsantrasyonlardaki K-Sorbat ve NaCl'nin deneme materyali küfleri engelleme etkilerinin değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Laktik asit bakterilerinin *P. roqueforti* türü üzerinde oluşturduğu inhibisyon oranının *A. niger*'e oranla daha yüksek miktarda olduğu tespit edilmiştir. Artan K-Sorbat miktarı ile laktik asit bakterilerinin inhibisyon etkisi yükselirken artan NaCl konsantrasyonlarında etkisinin azaldığı incelenmiştir. 1000 mg/L'ye kadar artan K-Sorbat konsantrasyonunda ise *L.plantarum* suşlarının etkisinin daha düşük orandaki konsantrasyonlara kıyasla arttığı tespit edilmiştir. NaCl'nin denenen konsantrasyonlarında küf türleri üzerinde tek başına engellemede yeterli olmadığı; koruyucu madde ve doğal inhibitör olarak kullanılan laktik asit bakterileri gibi diğer engelleyici faktörlerin de dikkate alınması gerektiği sonucu ortaya çıkmıştır.

Anahtar kelimeler: Küf, antifungal, inhibisyon, K-sorbat, NaCl, Laktik asit bakterileri, *L.plantarum*

2019, ix +64 sayfa

ABSTRACT
MSc Thesis
ANTIFUNGAL EFFECT OF LACTIC ACID BACTERIA
Yasemin Şefika KÜÇÜKATA
Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering
Supervisor: Prof. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU

Molds contaminated food and feedstuff, which are fundamental substances of human nutrition, not only can cause economic losses but also toxicity of the secondary compounds that molds can form, endanger the human health. For preventing that, the use of preservatives are common in the industry. In this study the antifungal effects of lactic acid bacteria, which are known as natural food preservatives, has been examined. Two strains of lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum* I and II), *Aspergillus niger* ATCC 16404 and *Penicillium roqueforti* which has been isolated and identified at Uludağ University Food Engineering Department, are used as material. Different concentrations of NaCl (0, 500, 1000 mg/L) and K-sorbate (0, 250, 500, 750, 1000 mg/L) impacts on moulds has been examined. Determination of antifungal effects of lactic acid bacteria with K-sorbate and NaCl has been practiced by using disc diffusion method. MRS Agar used as nutrient for stating antifungal action on moulds.

Different concentrations of K-sorbat and NaCl have shown distinct inhibition effects on moulds. It is determined that inhibition rate of lactic acid bacteria is higher on *P.roqueforti* than *A.niger*. As K-sorbate concentration goes higher, it is found that hinderance quality of lactic acid bacteria elevated, on the other hand high amounts of NaCl caused low inhibition quality. At the 1000 mg/L K-Sorbat concentration, the antifungal effect of *L.plantarum* strains was found higher compared to lower concentrations of K-sorbate. As a result of that it is obtained that assayed concentrations of NaCl was not enough to suppress mould growth; preservatives and natural inhibition providers, such as lactic acid bacteria, and other spoilage preventing methods should be considered to combine together.

Key words: Moulds, antifungal, inhibition, K-sorbate, NaCl, lactic acid bacteria, *L.plantarum*

2019, ix+64 pages

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince bana yol gösteren, araştırmamın gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesi sırasında katkılarını esirgemeyen danışmanım Sayın Hocam Prof. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

İstatistiksel analiz uygulamalarında bana yardımcı olan Sayın Prof. Dr. A. Tanju GÖKSOY'a

Çalışmam süresince ilgi ve yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Dr. Gökşen ARIK'a, Tezimin çeşitli aşamalarında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Gıda Yüksek Mühendisi Selen KOÇAKOĞLU'na ve Gıda Mühendisi Merve ATAŞ'a,

Manevi desteğiyle daima yanımda olan arkadaşım Endüstri Mühendisi Merve KOÇ'a

Beni yetiştiren, hayatım boyunca bana maddi ve manevi yardımcı olan, bugünlere gelmemde her türlü çabayı gösteren babam Ahmet KÜÇÜKATA'ya, annem Pakize KÜÇÜKATA'ya, kardeşim Sami KÜÇÜKATA'ya ve yüksek lisans eğitimim süresince benimle evini paylaşan, Bursa'daki ailem olan abim Mehmet Emin KÜÇÜKATA ve ailesine,

Desteklerinden ötürü Uludağ Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi ve Araştırma Görevlisi hocalarım,

Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne,

Teşekkürlerimi sunarım.

Yasemin Şefika KÜÇÜKATA
Gıda Mühendisi

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
1.GİRİŞ.....	1
2.KAYNAK ARAŞTIRMALARI.....	3
3.MATERYAL VE YÖNTEM.....	11
3.1. Materyal.....	11
3.2. Yöntem.....	11
3.2.1. Laktik asit bakterilerinin hazırlanması.....	11
3.2.2. Küflerin hazırlanması.....	11
3.2.3. Canlı hücre sayımının belirlenmesi.....	12
3.2.4. K-Sorbit ve NaCl çözeltilerinin hazırlanması.....	13
3.2.5. K-Sorbit ve NaCl çözeltilerinin besiyerine ilavesi.....	13
3.2.6. Antifungal Aktivite Testi.....	14
3.2.7. Zon Çapı Ölçümü ve Değerlendirme.....	15
3.3. İstatistiksel Analiz.....	15
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	16
4.1. Mikroorganizmaların Sayım Sonuçları.....	16
4.2. <i>Lactobacillus plantarum</i> Suşlarının (I-II) Farklı K-sorbit ve NaCl Konsantrasyonlarında <i>Penicillium roqueforti</i> Üzerindeki Etkileri.....	16
4.2.1. <i>L.plantarum</i> suşlarının (I-II) K-sorbit katılmaksızın farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Penicillium roqueforti</i> üzerindeki etkisi.....	17
4.2.2. <i>L.plantarum</i> suşlarının (I-II) 250 mg/L K-sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Penicillium roqueforti</i> üzerindeki etkisi.....	20
4.2.3. <i>L.plantarum</i> suşlarının (I-II) 500 mg/L K-sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Penicillium roqueforti</i> üzerindeki etkisi.....	23
4.2.4. <i>L.plantarum</i> suşlarının (I-II) 750 mg/L K-sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Penicillium roqueforti</i> üzerindeki etkisi.....	26
4.2.5. <i>L.plantarum</i> suşlarının (I-II) 1000 mg/L K-sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Penicillium roqueforti</i> üzerindeki etkisi.....	29
4.2.6. <i>L.plantarum</i> suşlarının (I-II) farklı K-sorbit ve NaCl konsantrasyonlarında <i>P.roqueforti</i> üzerindeki etkilerinin istatistiksel analiz sonuçları.....	34
4.2.7. <i>L.plantarum</i> suşları ile farklı K-sorbit konsantrasyonlarının (mg/L) <i>P.roqueforti</i> üzerindeki etkileşimlerinin istatistiksel değerlendirilmesi.....	35
4.2.8. <i>L.plantarum</i> suşları ile farklı NaCl konsantrasyonlarının (mg/L) <i>P.roqueforti</i> üzerindeki etkileşimlerinin istatistiksel değerlendirilmesi.....	36
4.2.9. <i>L.plantarum</i> suşları ile farklı K-sorbit ve NaCl konsantrasyonlarının (mg/L) <i>P.roqueforti</i> üzerindeki etkileşimlerinin istatistiksel değerlendirilmesi.....	37
4.3. <i>Lactobacillus plantarum</i> Suşlarının Farklı K-sorbit ve NaCl Konsantrasyonlarında <i>Aspergillus niger</i> Üzerindeki Etkisi.....	40
4.3.1. <i>L.plantarum</i> suşlarının (I-II) K-sorbit katılmaksızın farklı NaCl Konsantrasyonlarında <i>Aspergillus niger</i> üzerindeki etkisi.....	40

4.3.2. <i>L.plantarum</i> suşlarının (I-II) 250 mg/L K-sorbat ve farklı NaCl Konsantrasyonlarında <i>Aspergillus niger</i> üzerindeki etkisi.....	42
4.3.3. <i>L.plantarum</i> suşlarının (I-II) 500 mg/L K-sorbat ve farklı NaCl Konsantrasyonlarında <i>Aspergillus niger</i> üzerindeki etkisi.....	44
4.3.4. <i>L.plantarum</i> suşlarının (I-II) 750 mg/L K-sorbat ve farklı NaCl Konsantrasyonlarında <i>Aspergillus niger</i> üzerindeki etkisi.....	47
4.3.5. <i>L.plantarum</i> suşlarının (I-II) 1000 mg/L K-sorbat ve farklı NaCl Konsantrasyonlarında <i>Aspergillus niger</i> üzerindeki etkisi.....	49
5.SONUÇ.....	54
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	63

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
°	Derece
g	Gram
kob	Koloni oluşturan birim
µL	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimol
a _w	Su aktivitesi
%	Yüzde
µm	Mikrometre

Kısaltmalar	Açıklama
F	F önemlilik testi
CO ₂	Karbondioksit
KO	Kareleri Ortalaması
KT	Kareleri Toplamı
K-sorbat	Potasyum sorbat
SD	Serbestlik Derecesi
NaOH	Sodyum Hidroksit
NaCl	Sodyum Klorür

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 4.1. 1000 ppm K-sorbat varlığında <i>L.plantarum</i> suşlarının ve <i>P.roqueforti</i> 'nin 14.günde petri kabındaki görüntüsü.....	29
Şekil 4.2. 1000 ppm K-sorbat varlığında <i>L.plantarum</i> suşlarının ve <i>A.niger</i> 'in 14.günde petri kabındaki görüntüsü.....	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. MRS Agar besiyerine katılan K-Sorbat ve NaCl konsantrasyonları kombinasyonları ppm (1000mg/L).....	14
Çizelge 4.1. Deneme materyali küfler ve laktik asit bakterilerinin sayım sonuçları (kob/mL).....	16
Çizelge 4.2. K-Sorbat içermeyen ve farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un suşlarının (I-II) <i>Penicillium roqueforti</i> üzerinde oluşturduğu ortalama koloni çapı (mm).....	18
Çizelge 4.3. K-Sorbat içermeyen farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un suşlarının (I-II) <i>Penicillium roqueforti</i> üzerinde oluşturduğu ortalama minimum inhibisyon konsantrasyonu (%).....	18
Çizelge 4.4. 250 ppm (mg/L) K-Sorbat ve farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un suşlarının (I-II) <i>Penicillium roqueforti</i> üzerinde oluşturduğu ortalama koloni çapı (mm).....	21
Çizelge 4.5. 250 ppm (mg/L) K-Sorbat ve farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un suşlarının (I-II) <i>Penicillium roqueforti</i> üzerinde oluşturduğu ortalama minimum inhibisyon konsantrasyonu (%).....	21
Çizelge 4.6. 500 ppm (mg/L) K-Sorbat ve farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un suşlarının (I-II) <i>Penicillium roqueforti</i> üzerinde oluşturduğu ortalama koloni çapı (mm).....	24
Çizelge 4.7. 500 ppm (mg/L) K-Sorbat ve farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un suşlarının (I-II) <i>Penicillium roqueforti</i> üzerinde oluşturduğu ortalama minimum inhibisyon konsantrasyonu (%).....	24
Çizelge 4.8. 750 ppm (mg/L) K-Sorbat ve farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un suşlarının (I-II) <i>Penicillium roqueforti</i> üzerinde oluşturduğu ortalama koloni çapı (mm).....	27
Çizelge 4.9. 750 ppm (mg/L) K-Sorbat ve farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un suşlarının (I-II) <i>Penicillium roqueforti</i> üzerinde oluşturduğu ortalama minimum inhibisyon konsantrasyonu (%).....	27
Çizelge 4.10. 1000 ppm (mg/L) K-Sorbat ve farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un suşlarının (I-II) <i>Penicillium roqueforti</i> üzerinde oluşturduğu ortalama koloni çapı (mm).....	31
Çizelge 4.11. 1000 ppm (mg/L) K-Sorbat ve farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un suşlarının (I-II) <i>Penicillium roqueforti</i> üzerinde oluşturduğu ortalama minimum inhibisyon konsantrasyonu (%).....	31
Çizelge 4.12. <i>L.plantarum</i> suşlarının deneme materyali <i>P.roqueforti</i> üzerinde oluşturduğu ortalama zon çaplarının ve etkileşimlerinin varyans analiz tablosu.....	35
Çizelge 4.13. <i>P.roqueforti</i> üzerindeki <i>L.plantarum</i> suşlarının (I-II) ve farklı K-sorbat konsantrasyonlarının (mg/L) interaksiyonu.....	36
Çizelge 4.14. <i>P.roqueforti</i> üzerindeki <i>L.plantarum</i> suşlarının (I-II) ve farklı NaCl konsantrasyonlarının (mg/L) interaksiyonu.....	36
Çizelge 4.15. <i>P.roqueforti</i> üzerindeki <i>L.plantarum</i> suşları (I-II) ile farklı K-sorbat ve NaCl konsantrasyonlarının (mg/L) interaksiyonu.....	37

Çizelge 4.16. K-Sorbit içermeyen farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un suşlarının (I-II) <i>Aspergillus niger</i> üzerinde oluşturduğu ortalama koloni çapı (mm).....	41
Çizelge 4.17. K-Sorbit içermeyen farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un suşlarının (I-II) <i>Aspergillus niger</i> üzerinde oluşturduğu ortalama minimum inhibisyon konsantrasyonu (%).....	41
Çizelge 4.18. 250 mg/L K-Sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un suşlarının (I-II) <i>Aspergillus niger</i> üzerinde oluşturduğu ortalama koloni çapı (mm).....	43
Çizelge 4.19. 250 mg/L K-Sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un suşlarının (I-II) <i>Aspergillus niger</i> üzerinde oluşturduğu ortalama minimum inhibisyon konsantrasyonu (%).....	43
Çizelge 4.20. 500 mg/L K-Sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un suşlarının (I-II) <i>Aspergillus niger</i> üzerinde oluşturduğu ortalama koloni çapı (mm).....	46
Çizelge 4.21. 500 mg/L K-Sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un suşlarının (I-II) <i>Aspergillus niger</i> üzerinde oluşturduğu ortalama minimum inhibisyon konsantrasyonu (%).....	46
Çizelge 4.22. 750 mg/L K-Sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un suşlarının (I-II) <i>Aspergillus niger</i> üzerinde oluşturduğu ortalama koloni çapı (mm).....	47
Çizelge 4.23. 750 mg/L K-Sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un suşlarının (I-II) <i>Aspergillus niger</i> üzerinde oluşturduğu ortalama minimum inhibisyon konsantrasyonu (%).....	47
Çizelge 4.24. 1000 mg/L K-Sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un suşlarının (I-II) <i>Aspergillus niger</i> üzerinde oluşturduğu ortalama koloni çapı (mm).....	50
Çizelge 4.25. 1000 mg/L K-Sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un suşlarının (I-II) <i>Aspergillus niger</i> üzerinde oluşturduğu ortalama minimum inhibisyon konsantrasyonu (%).....	50

1. GİRİŞ

Gıdalar, kompleks besinler olup tüm yaşam formları için karbon, enerji ve diğer maddelerin temel kaynağıdır. Aynı sebep ile zararlı olabilecek mikroorganizmaların gelişimini teşvik edebilmektedir. Gıdalarda duyuşal değişikliklere sebep olan kimyasal reaksiyonlar bakteriler, tek hücreli mayalar ve çok hücreli küflerin gelişmesi için aracı olmaktadır (Gupta ve Srivastava, 2014).

Gıda bozulmaları ile gerçekleşen ekonomik kayıpları azaltma, gıda proses maliyetini düşürme ve tüketicilerin talep ettikleri gıdaların yemeye hazır, besin değeri ve vitamince zengin, olabildiğince az işlemden geçmiş ve korunmuş olmasıyla birlikte gıda zinciri boyunca mikrobiyel patojenlerin bulaşmasından kaçınma, gıda endüstrisinin baş etmekte olduğu zorluklardır (Gálvez, 2007).

Küf kontaminasyonları gıdalarda raf ömrünü azaltma, ihracatta sınırlama ve tüketici memnuniyetsizliğine de sebep olarak gıda ürünleri açısından önemli bir sorun oluşturmaktadır. Sonuç olarak küf kaynaklı gıda bozulmaları hem endüstriyel hem de tüketici kaynaklı olarak önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Le Lay ve ark., 2016).

Bu olumsuz etkilerden mümkün olduğunca korunmak için, gıda maddeleri çeşitli yöntemler ile bozulmaya yol açan küflerden arındırılmaya veya korunmaya çalışılmaktadır. Çeşitli uygulamalar ile bozulmalara neden olan küfler imha edilmek suretiyle etkisiz hale getirilmekte veya canlı kalsalar bile ortamda çoğalmalarını ve faaliyetlerini engelleyecek koşullar oluşturulmaktadır (Kalyoncu, 2008).

Katkı maddeleri, gıdanın korunmasında veya tat, aroma ve görünümünün geliştirilmesi gibi alanlarda sanayide kullanılan bileşenlerdir. Birçok gıda katkı maddesi kimyasal sentezlerle gerçekleştirilirken bazıları da biyoteknolojik proseslerden elde edilir. Bunun yanında gıda katkı maddeleri doğal kaynaklardan da karşılanabilmektedir (Moldes ve ark., 2017).

Son yıllarda tüketicilerin gıdalarda kullanılan sentetik koruyucular hakkında endişeleri ile doğal koruyuculara yönelimin arttığı görülmektedir. Doğal antimikrobiyeller, bitkiler, hayvanlar, bakteriler, algler ve küfler dahil olmak üzere birçok farklı kaynaktan elde edilebilmektedirler. Yapılan son çalışmalar doğal antimikrobiyellerin mikroorganizma gelişimini önemli ölçüde engellediğini, gıda kalitesini geliştirdiğini ve raf ömrünü uzattığını göstermektedir (Gyawali ve İbrahim, 2014).

Mikroorganizmalar antimikrobiyel madde üretiminde geniş bir spektruma sahiptir. pH değerinin düşmesi ve laktik asit bakterileri tarafından üretilen organik asitlerin antimikrobiyel aktivitesi özellikle fermente gıdalarda biyolojik koruma mekanizmasının temelini oluşturmaktadır. Laktik asit bakterilerinin belirli suşları laktik asitten başka mikrobiyel gelişimi engelleyici maddeler (diasetil, reuterin, reuterisiklin gibi), antifungal bileşenler (propiyonat, fenil laktat, hidroksifenil-laktat, siklik dipeptidler ve 3-hidroksi yağ asitleri gibi), bakteriyosinler ve bakteriyosin benzeri engelleyici bileşenler üretmektedir (Gálvez ve ark., 2010).

Mevcut taksonomiye göre laktik asit bakteri gurubunda *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* da dahil olmak üzere altı aile ve en az 38 cins bulunmaktadır (Bianchini, 2015).

Bu çalışmada gıdalarda yaygın olarak bozulmaya neden olan iki küf *Aspergillus niger* ve *Penicillium roqueforti* test mikroorganizmaları olarak kullanılmış olup bu küfler üzerindeki antifungal etkisi test edilmek üzere laktik asit bakterisi *Lactobacillus plantarum*'un iki ayrı suşu kullanılmıştır. Böylece doğal olarak inhibitör etki araştırılmıştır. Ayrıca NaCl'ün iki dozu (500 ve 1000 mg/L) ve K-Sorbat'ın dört dozu (250, 500, 750 ve 1000 mg/L) kullanılmış, laktik asit bakterileri ise iki formda (hücre içeren ve içermeyen) denenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

Mikrobiyel kontaminasyonlar gıda güvenliği açısından önemli bir tehlike olarak kabul edilmektedir. Bununla beraber rafta buldukları sürece mikrobiyel aktivite veya enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan gıda bozulmaları dünya çapında da büyük önem arz etmektedir (Dehghan ve ark., 2018). Gıda ürünlerinin kontaminasyonu üretim prosesi, depolama ve satış gibi çeşitli aşamalarda oluşabilmektedir. Küf sporları prosesin işlendiği atmosfere hammadeden, gıdadaki bir bileşikten, konteynırlardan vb geçebilmekte ve gıda ürünü kontamine edebilmektedir (Levinskaite, 2012).

Endüstriyel gelişmelere rağmen küfler gıda bozulmalarında büyük problem oluşturmaya devam etmektedir. Gıda ve yemlerin korunmasında birçok fiziksel ve kimyasal koruma teknikleri bulunmaktadır. Koruyucu maddeler gıda endüstrisinde raf ömrünü uzatmak ve gıdanın kalitesini artırmak amacıyla uzun yıllardır kullanılmaktadır. Gıdanın tüketim açısından güvenilir olması için koruyucu madde olarak çoğunlukla benzoik, sorbik, asetik ve propiyonik asit gibi zayıf asitler ve tuzları kullanılmaktadır. pH ve su aktivitesi gibi faktörler zayıf asit koruyucularının aktivitesi üzerinde önemli etki göstermektedir (Levinskaite, 2012).

Gıdalarda gelişebilen küfler ve onları engelleme hakkında çok sayıda araştırma yapılmış, laktik asit bakterilerinin bu amaçla kullanımı ile ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu bölümde konuyla ilgili çalışmaların bazıları verilecektir.

Filtborg ve ark. (1996) araştırmalarında küfler tarafından meydana gelen duyuşal bozulmaların genellikle gelişmeleri boyunca ürettikleri enzimlerden kaynaklandığını ve küflerin lipaz, proteaz, karbohidraz gibi çeşitli enzimler ve daha fazlasını üretebildiğini belirtmiştir.

Gıdalarda sıkça bulunan toksik ve bozulma yapan küf cinslerinde ilk öne çıkan, doğal olarak havada, toprakta ve ekinlerde bulunan *Aspergillus*, *Penicilium* ve *Fusarium*'dur. Rodríguez ve ark. (2015) *Alternaria* küf cinsinin kozmopolit bir tür olduğunu ve bitki patojeni olarak tahıl ürünlerinde, meyve ve sebze de mikotoksin oluşturup ciddi ekonomik kayıplara sebebiyet verdiğini belirtmektedir.

Garnier ve ark., (2016) maya ve küflerin süt ürünlerinde önemli kayıplara neden olduğu bildirmişlerdir. Bu bozulmalarda küflerden çok mayalara vurgu yapılmıştır. Süt ürünlerinde bozulmaya sebebiyet veren mikroorganizmalar *Candida*, *Galactomyces* ve *Yarrowia* maya cinsleri olarak, *Penicillium*, *Mucor* ve *Cladosporium* küf cinsleri olarak belirtilmiştir.

Son zamanlarda küflerin, süt ürünlerinin sahip olduğu düşük pH ve/veya su aktivitesi gibi özellikleri tolere ederek gelişmeye devam etmeleri süt endüstrisinde aşılması zor bir problem olarak görülmektedir. Süt ürünleri içerisinde küflerle bozulmada yoğurt en tehlikeli ürünlerden biri olmaktadır. Şartların uygun olması durumunda yoğurt içerisinde gelişim göstermekte olan *Aspergillus niger* en yaygın kontaminant olmakla birlikte yoğurdun raf ömrü için kritik bir küf türüdür (Gougouli ve Koutsoumanis, 2012).

Son yıllarda fonksiyonel süt ürünleri dışında kalan tahıl orijinli fermente gıdalar/içecekler gıda tüketimindeki önemli eğilimler (vejetaryen, vegan, düşük yağ içerikli, düşük tuz içerikli gıdalar) nedeniyle ilgi çekici olmaktadır. Ancak tahıl bazlı ürünler için küflerle kontaminasyon başlıca bir sorun teşkil etmektedir. Bu küf türlerinden en yaygın olanları, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, ve *Rhizopus*'tur (Russo ve ark., 2017).

Mohapatra ve ark., (2017) tahıllarda bulunan bazı küf cinslerine *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Helminthosporium* ve *Pullularia*'yı örnek göstermiş ve uzun süreli depolamada hayatta kalamayacaklarını belirtmişlerdir. Depo küfleri olarak da bilinen *Penicillium* ve *Aspergillus spp.* ise tahılların depolanmasında problem oluşturmaktadır. Bu cinsler genellikle depolanan tahıllarda bulaşma ve mikotoksin üretimiyle geri dönülmez zarara sebebiyet verdikleri belirtilmiştir.

Aside karşı toleranslı olan veya asit seven bakteri ve küf cinsleri meyvelerde bazı tat ve kokular oluşturarak, ürünün rengini bozarak ve insan sağlığını tehdit eden bazı maddeler üreterek bozulmalara neden olurlar (Tournas ve ark., 2006). Narenciye ya da

turunçgiller olarak bilinen turunç, portakal, mandalina, greylift ve limon gibi ekonomik değeri yüksek meyveleri içine alan citrus cinsi meyvelerde en önemli bozulma türünün *Penicillium digitatum*'un sebep olduğu yeşil renk küflenme olduğu belirtilmiştir (Sukorini, 2013).

Botrytis cinerea'nın sebep olduğu gri renk küflenmenin hasat sonrası meyve ve sebzelerde en önemli bozulma nedenlerinden biri olduğu belirtilmektedir (Romanazzi ve ark., 2015). Diğer yandan *Penicillium expansum*'un sebep olduğu hasat sonrası oluşan mavi renk küflenme, ciddi ekonomik kayıplara sebep olarak elmalarda büyük problem oluşurmaktadır (Li ve ark., 2017). *B. cinerea* ve *P.expansum*'un dahil olduğu patojenik funguslar elma, armut ve diğer pektin bakımından zengin olan meyveler için temel bozulma kaynağıdır (Nikkhah, 2017).

Kf ve maya gelişiminin gıdaların üretimi ve depolamasında engellenmesi için güvenli ve faydalı stratejiler geliştirilmesi öncelikli bir konu olmaktadır. Son yıllarda kf cinslerinin diğer bakteriler tarafından kontrol edilmesi konusu özel bir ilgi görmektedir (Magnusson ve ark., 2003).

Doğru seçilmiş laktik asit bakterileri kf gelişimini kontrol altında tutabilmekte ve fermente gıdalarda raf ömrünü uzatabilmektedir. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel etkinliği, organik asit üretimi, besin için rekabet etmeleri ve antagonistik bileşenlerin üretimi olarak üç kısımda incelenmektedir. Bununla birlikte *Lactobacillus plantarum* da dahil birçok laktik asit bakterisi peptidleri veya antimikrobiyel proteinleri sentezleyerek bakteriyosin üretmektedir (Dali ve ark., 2009)

Bakteriyosinler laktik asit bakterilerinin oluşturduğu doğal antimikrobiyel moleküllerdir. Hayvanlardan izole edilen doğal antimikrobiyel bileşiklere lizozim rneği verilirken bitkilerden elde edilenlere örnek olarak esansiyel yağlar verilebilmektedir (Carocho ve ark., 2015)

Wen ve ark. (2016) yapmış olduğu bir çalışmada *L.plantarum*'un K25 adlı suşundan izole edilen plantarisin adlı bakteriyosinin gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler üzerinde geniş inhibisyon spektrumuna sahip olduğunu bildirmiştir

Nisin, gram-pozitif bakterilerin gelişiminin kontrol edilmesinde süt ürünleri ve diğer gıdalarda yaygın bir şekilde kullanılan bakteriyosindir. *Listeria monocytogenes*'in gelişiminin engellenmesinde etkili olduğu bildirilmektedir Gıda işleme ve fermentasyonunda sahip olduğu olumlu etkilerden dolayı laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler doğal koruyucu olarak özel bir yere sahiptir. (Field ve ark., 2018)

Laktik asit bakterilerinin küfler üzerinde engelleyici etkisinin oluşturdukları organik asitler (zellikle laktik asit, propiyonik asit ve asetik asit), CO₂, etanol, hidrojen peroksit, diasetil, reuterin ve diğer düşük moleküler ağırlıklı metabolitlerin yanında, protein bazlı maddelerin üretimi veya düşük molekül ağırlıklı peptidlerin; mikroorganizmalar arası rekabetin; asit üretimine bağlı pH düşmesi veya tüm bu faktörlerin kombinasyonu olabileceği ifade edilmektedir (Bianchini ve Bullerman, 2009)

Hassan ve Bullerman (2008) tarafından tanımlanan inhibisyon paterni Gerez ve ark. (2009)'nın laktik asit bakterilerinin 95 homo- ve heterofermentatif suşlarının antifungal etkisini belirlemek için yaptıkları çalışmada gözlenmiştir. Test edilmiş 95 suştan iki suşun (*Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus casei*) *Aspergillus niger*'i inhibe edebildikleri bildirilmektedir.

Lavermicocca ve ark. (2000)'nın yapmış olduğu bir çalışmada fermentasyona *Saccharomyces cerevisiae* ile birlikte laktik asit bakterilerinin (*L. Plantarum*) de dahil olduğu ekmek yapımında *A. niger*'in 20°C'de 7 güne kadar gelişiminin ertelendiği grlmştir. Yalnızca *Saccharomyces cerevisiae* ile fermente edilmiş ekmekte kf gelişimine 2 gün sonra rastlanırken, *S. cerevisiae* yanında laktik asit bakterisi *L.plantarum*'un da eklendiği ekmeklerde kf gelişimine 7 gün sonrasında rastlanmıştır.

Ayrıca ekmeğe hacim, duyuşal özellikler ve tat bakımından da olumlu etkiler sağladığı tespit edilmiştir.

Laktik asit bakterilerinin starter olarak tanımlanmış önemli özelliklerinin yanında bira üretiminde arpanın demlenme aşamasında *Lactobacillus plantarum* ve *Pediococcus pentosaceus*'un, *Fusarium* cinsi küfün gelişimini engellediği ve trikotesen toksininin üretimini sınırladığı belirtilmiştir (Dalié ve ark., 2009). Ayrıca Sathe ve ark. (2007) *L. plantarum*'un hıyarda gelişen *Aspergillus flavus* ve *Fusarium graminearum*'un gelişimini önemli ölçüde engellediği bildirmiştir.

Gagiu ve ark. (2013) yaptıkları çalışmalarda MRS broth içerisinde *L.plantarum*'a ait 3 suşun (C71, C78 ve C81) *Fusarium graminearum* 96, *F.culmorum* 46, *F.verticillioides* ve *A.flavus* 1038L üzerindeki inhibisyon etkilerini incelemiş; *Fusarium graminearum* 96, *F.culmorum* 46, *A.flavus*'un karışık *L.plantarum* suşlarına en hassas olan cinsler olduğunu belirtmiştir.

Laktik asit bakterilerinin ürettiği organik asitlerin çok çeşitlilik gösterdiği ve *L. plantarum*'un ürettiği fenilaktik ve 4-hidroksi-fenilaktik asit ve 3-fenilaktik asidin inhibe edici özellik gösterdiği rapor edilmiştir (Bianchini ve Bullerman, 2009).

Alkol fermentasyonlarında laktik asit bakterilerinin starter olarak kullanımı oldukça yaygın olup, bira üretiminde *L.plantarum*'un VTTE-78076 ve *P.pentosaceus* VTTE-90390 suşlarının *Fusarium* cinsi küf gelişimini ve bununla beraber ürettiği trikotesen oluşumunu engellediği tespit edilmiştir. Ayrıca şarap fermentasyonunda *Penicillium* ve *Aspergillus* gelişiminin ve okratoksin kontaminasyonunun da kontrol altına alındığı belirtilmiştir (Dalié ve ark., 2009).

Lactobacillus cinsi üyeleri arasında antifungal araştırma alanında *L.plantarum*'un önemli rol oynadığı bilinmektedir. (Crowley ve ark., 2013). *L.plantarum* suşlarından biriyle fermente edilen yulaf bazlı bir üründe Russo ve ark. (2017)'nin yapmış uygulamada *L.plantarum*'un en yüksek antifungal etkisinin *Fusarium culmorum* cinsi küf türünde etkili olduğu incelenmiştir.

Gıda ürünlerinde küflerin sebep olduğu bozulmaları ertelemek veya engellemek için kullanılan başlıca teknik çeşitli parametrelerin kombinasyonudur. Bu parametrelerden en yaygın olanları su aktivitesindeki hafif azalmalar (NaCl veya şeker ilavesi gibi), pH değerinin düşürülmesi ve antimikrobiyel maddelerin ilavesidir. Bu faktörlerin kombinasyonu fermantasyon ve depolama süreçlerinde küflerin gelişmesini etkili bir şekilde kontrol edebilmektedir. Yiğit ve Korukluoğlu (2007) yaptığı çalışmada *A.alternata* cinsi küfün malt ekstrakt agar şartlarında (pH 5.5; %0 NaCl) 400 mg/L potasyum sorbat varlığında tamamen engellendiğini belirtmiştir.

Sorbik asidin yaygın küf türlerinin sebep olduğu bozulmalardan etkilenen fırın ürünleri için en etkili zayıf asit olduğu rapor edilmiştir (Guynot ve ark., 2005a). Quattrini ve ark. (2018), *A.niger* ve *P.roqueforti* üzerindeki en yüksek MİK değerinin pH 4.5 şartlarında 0,4 mM oranında kullanılan sorbik asit olduğunu tespit etmiştir.

Düşük pH değerlerinde sorbik asit ve tuzlarının mikroorganizmanın hücre duvarına etki ederek hücre içi pH değişimi ile enzimlerin inaktivasyonuna ve denatürasyonuna sebep olduğu düşünülmektedir (Russell ve Furr, 1996). Bununla beraber Stratford ve Anslow (1998), mikroorganizmaların gelişiminin engellenmesinde etkili olan bir zayıf asit olmasının yanı sıra sorbik asidin, membran aktif bir bileşen olduğunu belirtmiştir.

Yapılan *in vitro* çalışmalar kalsiyum propiyonat, sodyum benzoat ve potasyum sorbatın bazı fırın ürünlerinden izole edilen küfler üzerinde pH 4,5 değerinde %0,3 konsantrasyonlarında inhibe edici etkisinin olduğunu göstermiştir (Marin ve ark, 2002).

Guynot ve ark., (2005b) yaptıkları çalışmada 3 ayrı koruyucu propiynat, sodyum benzoat ve potasyum sorbat arasından küf gelişmesi üzerinde inhibe edici etkisinin en etkili olanın pH 4,5 ve su aktivitesi 0,90 değerlerinde potasyum sorbat olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmanın da gösterdiği üzere su aktivitesi ve pH değerleri uygun düzeyde olduğu takdirde potasyum sorbat elverişli bir koruyucu olmaktadır.

Sodyum klorür (NaCl) yüz yıllardır gıdaları korumada kullanılan bir bileşik olmakla birlikte çeşitli gıdalarda lezzet amaçlı kullanılan, günlük diyetle esansiyel olan Na⁺ minerali kaynağıdır. 1 g tuzun 0,4 gramının sodyum, 0,6 gramının ise klorürden oluştuğu belirtilmektedir. FSA (Gıda Standartları Ajansı) ve WHO (Dünya Sağlık Örgütü) gibi otoritelerin NaCl alımı için belirlediği günlük limitler bulunmakta ve 5-6 gram olarak tavsiye edilmektedir. Yüksek sodyum alımının hipertansiyon hastalığı ile ilişkilendirildiğinden dolayı sağlık otoritelerince NaCl oranının azaltılması tavsiye edilmektedir (WHO 2016, FSA 2018).

Gıda maddelerine eklenen NaCl'ün su aktivitesi üzerinde etkili olmasının yanında antimikrobiyel özelliklerinin olabileceği gibi bakteri ve küfler üzerinde gelişmeyi teşvik edici olabileceği de belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda *A.niger* ve *P.roqueforti* gelişiminin %0 ile 2 NaCl oranlarında maksimuma ulaştığı %6 oranlarına yükseltildiğinde ise gelişmenin gerilediğini tespit etmişlerdir (Samapundo ve ark., 2010). NaCl oranındaki artışın %15-20 oranlarına kadar devam etmesiyle *A.niger* gelişiminin hızlandığı Tresner ve Hayes'in (1971) yaptığı çalışmalarda tespit edilmiştir. Bununla beraber yüksek NaCl konsantrasyonlarının da antifungal metabolit üretimi üzerinde olumsuz etkisi olduğu belirtilmiştir (Batish ve ark., 1990). Omar ve ark. (1994) artan NaCl konsantrasyonlarında yaptıkları sayımda *Aspergillus* cinsine ait türlerin sayısının azaldığını, en düşük sayının ise %40 NaCl oranında kaydedildiğini belirtmiştir.

Bozulmaya sebebiyet veren küfleri engellemek için kullanılan koruyucuların uzun süreli kullanımını küflerde bu kimyasallara karşı bir savunma mekanizması geliştirmesine yol açabilmektedir (Levinskaité, 2012).

Fungal dirençlilik üzerine yapılan bir araştırmada küflerin mayalara göre biyositlere karşı gösterdiği direncin daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Küf ve mayaların biyosit dirençlilik mekanizmasının iki temel sebeple olabileceği düşünülmektedir. Bunlardan biri doğal dirençlilik olup hücre duvarında bir bariyer oluşturma veya biyosit moleküllerinin geçişini azaltma şeklindedir. Diğerisi ise sonradan kazanılan dirençlilik

olan ve sıralı mutasyonlar ile hücrenin genetik yapısının kazandığı zamanla oluşturulan bir direnç sistemidir (Russell ve Furr, 1996).

Maya ve küfler antibiyotiklere direnç kazanmanın yanında sorbik asit ve benzoik asit gibi gıda koruyucularıyla birlikte dezenfektan maddelerinin bileşenlerine de dayanıklılık göstermektedir. *Penicillium*, *Saccharomyces* ve *Zygosaccharomyces*'in türlerinin büyük bir kısmı potasyum sorbat varlığında gelişim göstermekte, küf türlerinin önemli bir kısmı da sorbatı indirgeme yeteneğine sahip olduğu bildirilmektedir (Schnürer, 2005).

Yapılan bir çalışmada *A.niger*'in kimyasal koruyuculara en dayanıklı tür olduğunu onu da *Penicillium* türlerinin takip ettiğini tespit etmişlerdir. *Aspergillus niger*'in test edilmiş koruyucular arasında en çok potasyum sorbata direnç gösterdiği sonucuna ulaşmışlardır (Le Lay ve ark. 2016).

Yapılan çalışmalar bazı bakteri türlerinin belirli şartlarda K-sorbatı metabolize ettiğini göstermektedir. K-sorbatın metabolize edilmesi mikroorganizma türlerine göre değişkenlik göstermekte ve laktik asit bakterilerinin bunun sonucu ürettiği ürünler arasında da bir çeşitlilik söz konusudur (Montaño ve ark., 2012). Bir diğer çalışmada zeytin salamura suyunda K-sorbat miktarının azalıp trans-4-hekzanoik asit miktarının artması üzerine sorbatın degradasyonu sonucu oluşan ürünün trans-4-hekzanoik asit olduğunu tespit etmişlerdir (Casado ve ark., 2010).

Potansiyel antifungal laktik asit bakterilerinin dikkatli seçimi ile toksik küf gelişimi problemini azaltabilmek için sıcaklık başta olmak üzere, inkübasyon zamanı, agar seçimi, pH ve gıdanın besin değeri göz önünde bulundurulması, antifungal özelliklerin desteklenmesi için gereklidir (Dalié ve ark., 2009).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Materyal olarak zeytinlerden izole edilip tanısı yapılan iki adet laktik asit bakterisi (*Lactobacillus plantarum* I ve II) ile *Aspergillus niger* ATCC 16404 ve Uludağ Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde izole edilip tanısı yapılan *Penicillium roqueforti* test mikroorganizması olarak kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Laktik asit bakterilerinin hazırlanması

%80 gliserol içeren stoklarda -80°C'de depolanan laktik asit bakterileri analizlerden önce MRS broth içerisine rutin olarak gün aşırı aşılanmıştır. Kullanılmadan önce 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir (Peyer ve ark., 2016).

3.2.2. Küflerin hazırlanması

Tez kapsamında kullanılan *Penicillium roqueforti* ve *Aspergillus niger* 16404 yatık PDA (potato dekstroz agar) besiyerinde 5 gün süreyle inkübasyona bırakılmış, %1.5'lük steril Twen 80 çözeltisi ile spor solüsyonları hazırlanmıştır. Spor solüsyonları daha sonra kullanılmak üzere 4°C'de depolanmıştır (López-Malo ve ark., 2002).

3.2.3. Canlı hücre sayımının belirlenmesi

Küf sporlarının sayıma hazırlanması

Hazırlanan spor solüsyonlarından gerekli seyreltmeler yapılarak yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. Ekim için daha önceden petrilere dökülen Malt Ekstrakt Agar kullanılmıştır. Ekim yapılan petrilere 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra koloni sayımı yapılmıştır (İrkin ve Korukluoğlu, 2009).

Laktik Asit bakterilerinin sayıma hazırlanması

Saklama kültüründen alınan *L.plantarum* suşlarının 24 saatlik taze kültürleri gerekli seyreltmeler yapılarak dökme yöntemiyle ekim yapılmıştır. Ekim için daha önceden petrilere dökülen MRS Agar kullanılmıştır. Ekim yapılan petrilere 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra koloni sayımı yapılmıştır (Gagiu ve ark., 2013).

Hücre sayımının belirlenmesi

Küf ve laktik asit bakterilerinin sayımı aşağıdaki formül ile koloni oluşturan birim/mililitre (kob/mL) şeklinde kaydedilmiştir. Ardışık iki seyreltiden yapılan ekim sonuçlarının aralıklı aritmetik ortalaması alınarak örnekteki sayı hesaplanmaktadır. Bu hesaplamada kullanılan formül;

$$N: C / [V \times (n_1 + 0,1 \times n_2) \times d]$$
 şeklindedir.

Burada;

N: Gıda örneğinin 1 gram ya da 1 mL'sinde mikroorganizma sayısı

C: Sayımı yapılan tüm Petri kutularındaki koloni sayısı toplamı

V: Sayımı yapılan Petri kutularına aktarılan hacim (mL)

n₁: İlk seyreltiden yapılan sayımlarda sayımı yapılan Petri kutusu adedi

n₂: İkinci seyreltiden yapılan sayımlarda sayımı yapılan Petri kutusu adedi

d: Sayımın yapıldığı ardışık 2 seyreltiden daha konsantre olanın seyreltme oranıdır (Halkman, 2005).

3.2.4. K-Sorbat ve NaCl çözeltilerinin hazırlanması

K-Sorbat ve NaCl'ün %20'lik stok çözeltileri hazırlanmıştır. K-Sorbatın sterilizasyonu, K-Sorbat çözeltisinin CO₂ basıncı altında steril membran filtreden geçirilerek gerçekleştirilmiştir. Membran filtre olarak organik çözücülere, asit ve alkalilere dayanıklı teflon PFA olarak adlandırılan 47 mm çaplı filtre (Cole- Parmer) kullanılmıştır. Filtre kağıdı olarak, gözenek çapı 0,45 µm olan filtre çapına uygun selüloz asetat filtre kağıdı (Sartorius) kullanılmıştır (Yiğit ve Korukluoğlu 2007). NaCl çözeltisinin sterilizasyonu ise NÜVE buhar basınçlı sterilizatöründe 121°C'de 15 dakika süreyle yapılmıştır.

3.2.5. K-Sorbat ve NaCl çözeltilerinin besiyerine ilavesi

Denemede MRS agar besiyeri kullanılmıştır. Besiyerinin sterilizasyonundan sonra soğuk sterilize edilen %20'lik K-sorbat (0, 250, 500, 750, 1000 mg/L) ve %20'lik steril NaCl çözeltisi (0, 500, 1000 mg/L) ilave edilmiştir. Besiyerine ilave edilen K-Sorbat ve NaCl kombinasyonları Çizelge 3.1'de gösterilmiştir (Yiğit ve Korukluoğlu 2007).

Çizelge 3.1. MRS Agar besiyerine katılan K-Sorbat ve NaCl konsantrasyonları kombinasyonları ppm (1000mg/L)

K-Sorbat (ppm)	NaCl (ppm)
0	0
0	500
0	1000
250	0
250	500
250	1000
500	0
500	500
500	1000
750	0
750	500
750	1000
1000	0
1000	500
1000	1000

3.2.6. Antifungal Aktivite Testi

Laktik asit bakterilerinin antifungal etkisinin belirlenmesinde disk difüzyon metodu kullanılmıştır. Steril edilmiş MRS agar besiyerlerine belirlenen oranlarda K-Sorbat ve NaCl ilave edilmiştir. Dökülen besiyerleri 24 saat süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir. Küf spor solüsyonundan yayma yöntemiyle farklı petrilere *A.niger* ve *P.roqueforti* inoküle edilmiş, steril antibiyogram diskleri yerleştirilmiştir. Petri kabının tam ortasına gelecek şekilde yerleştirilmiş steril antibiyogram disklerine *L.plantarum*'un

iki farklı suşu ayrı ayrı 10 µL inoküle edilmiştir. Kontrol denemeleri hücre içermeyecek şekilde steril saf su olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan petriyerler 14 gün boyunca her 24 saatte bir zon ölçümü yapılmak üzere 30°C’de inkübasyona bırakılmıştır (Saladino ve ark., 2016).

3.2.7. Zon Çapı Ölçümü ve Değerlendirme

Küf gelişimi ve laktik asit bakterilerinin zon oluşumu 24 saatte bir 7 gün süreyle izlenmiştir. Zon çapı ölçümü, diskten itibaren küf gelişiminin başladığı noktaya kadar milimetre olarak ölçülmüştür (Yin ve Tsao, 1999).

Bir antimikrobiyel ajanın görünür mikroorganizma gelişiminin olmadığı en düşük konsantrasyonu minimum inhibisyon konsantrasyonu olarak adlandırılmaktadır (MİK) (Stanojevic ve ark., 2009). Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) koloni çapının kontrol denemeye oranlanmasıyla hesaplanmıştır (Kaiser ve ark., 2005).

MİK hesaplaması için kullanılan formül; $I: [(C-T)/C] \times 100$ şeklindedir. Burada:

I: Minimum inhibisyon konsantrasyonu

C: Kontrol petrisindeki küf misellerinin oluşturduğu koloni çapı (mm)

T: Test petrisindeki küf misellerinin oluşturduğu koloni çapı (mm)

Sonuçlar laktik asit bakterisinin disk etrafında oluşturduğu koloni çapı ve % minimum inhibisyon konsantrasyonu olarak ilgili çizelgelerde verilmiştir. Gelişimin tamamen engellendiği durumlarda %100, kontrol ile aynı çapta gelişim gösterdiğinde %0 engelleme olarak belirtilmiştir. Bir hafta boyunca gelişme olmaması durumunda petriyerler 14. güne kadar bekletilerek gözlenmiştir.

3.3. İstatistiksel Analiz

Deneme, tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme deseninde 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Bütün hesaplamalar JMP (Versiyon 7) istatistik paket programından yapılmıştır. F-önemlilik testlerinde %1 ve %5 olasılık düzeyleri kullanılmıştır. İstatistiksel farklı grupların belirlenmesinde LSD testi kullanılmıştır. İstatistiksel analiz tablolarında ana etkenler büyük harfle, ikili ve üçlü interaksiyonlar küçük harfle ifade edilmiştir.

İstatistiksel değerlendirme laktik asit bakterilerinin küfler üzerindeki zon çapı değerinin petrinin çapına oranlanmasıyla (90 mm) gerçekleştirilmiştir. Veriler 7. gün kaydedilen zon çapı ortalamalarının istatistiksel sonuçları şeklinde verilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Laktik asit bakterilerinin farklı konsantrasyonlardaki NaCl ve K-Sorbit eklenen besiyerlerinde deneme mikroorganizması olan *Penicillium roqueforti* ve *Aspergillus niger* üzerindeki etkilerin araştırıldığı bu çalışmada sonuçların küf türüne göre değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı zamanda farklı konsantrasyonlarda denenen NaCl ve K-Sorbit'ın da küf türleri üzerinde farklı sonuçlar verdiği, artan K-sorbit oranlarında yüksek inhibisyon gözlenirken artan NaCl oranında ise düşük inhibisyon değerleri kaydedilmiştir.

4.1. Mikroorganizmaların Sayım Sonuçları

Sayım sonuçları kob/mL olarak Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir.

$$N: C / [V \times (n_1 + 0,1 \times n_2) \times d]$$

Çizelge 4.1. Deneme materyali küfler ve laktik asit bakterilerinin sayım sonuçları (kob/mL)

Mikroorganizmalar	N (kob/mL)
<i>P.roqueforti</i>	$9,8 \times 10^7$
<i>A.niger</i>	$4,0 \times 10^6$
<i>L.plantarum</i> I	$7,7 \times 10^9$
<i>L.plantarum</i> II	$2,0 \times 10^9$

4.2. *Lactobacillus plantarum* Suşlarının (I-II) Farklı K-sorbit ve NaCl Konsantrasyonlarında *Penicillium roqueforti* Üzerindeki Etkileri

L.plantarum suşlarının (I-II) 0, 250, 500, 750, 1000 mg/L K-sorbit ve 0, 500, 1000 mg/L NaCl konsantrasyonları ile oluşturulan kombinasyonlarda *P.roqueforti* üzerinde oluşturduğu zon çapları (mm) ve minimum inhibisyon konsantrasyonları yüzdesi (MİK) bu bölümde verilmiştir.

4.2.1. *L.plantarum* suşlarının (I-II) K-sorbat katılmaksızın farklı NaCl konsantrasyonlarında *Penicillium roqueforti* üzerindeki etkisi

Uygulanan NaCl dozlarının K-sorbat katılmaksızın gerçekleştirilen örneklerdeki, *L.plantarum*'un iki ayrı suşunun (I-II) *P.roqueforti* üzerinde oluşturduğu zon çapı milimetre olarak Çizelge 4.2'de belirtilmektedir. Denenen NaCl dozlarının tamamında ilk gün ölçüm yapılabilecek herhangi bir gelişim gözlenememiştir. K-sorbat katılmaksızın deneme süreci günlük olarak incelendiğinde, laktik asit bakterilerinin NaCl konsantrasyonu 1000 mg/L uygulamalarında daha yüksek bir zon çapı verdiği görülmektedir. Bununla beraber NaCl ve K-Sorbat'ın katılmadığı denemeler ile NaCl'ün 500 mg/L konsantrasyonu arasında çok büyük farklılıklar olmayıp bu konsantrasyonun deneme materyali küf üzerinde geriletici bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. NaCl'ün 0 ve 500 mg/L konsantrasyonlarında zon oluşumu 4. günden sonra gözlenmezken 1000 mg/L konsantrasyonunda 6. güne kadar zon oluşumu gözlenmiştir.

L.plantarum'un, *P.roqueforti* üzerindeki inhibe edici etkisinin NaCl konsantrasyonunun artmasıyla tek başına olan etkisinden daha yüksek zon çapı verdiği kaydedilmiştir. Bu durumda kullanılan suşların NaCl ile sinerjik bir etki gösterdiği düşünülmektedir.

Laktik asit bakterisi *L.plantarum*'un oluşturduğu laktik asidin, ortam pH'sını düşürmesi ve gram-negatif bakterilerinin dış membran geçirgenliği ile antifungal aktivite gösterdiği (Pisoschi ve ark., 2018) ve ortamda bulunan NaCl'ün su aktivitesini düşürmesiyle bu etkinin yükseldiği görülmektedir (Van Long ve ark., 2017).

Yalnızca MRS agar şartlarında denenen laktik asit bakterilerinin *Penicillium* türleri ve *Rhizopus oryzae* üzerinde ancak 3-4 mm'ye kadar zon çapı gösterdiği kaydedilmiştir. pH değerinin azaltılmasıyla zon çaplarında artış görüldüğü belirtilmektedir (De Muynek ve ark., 2004).

Çizelge 4.2 K-Sorbat içermeyen ve farklı NaCl konsantrasyonlarında *Lactobacillus plantarum*'un suşlarının (I-II) *Penicillium roqueforti* üzerinde oluşturduğu ortalama koloni çapı (mm)

		K-sorbat içermeyen besiyeri						
		Gün						
NaCl(mg/L)	L.A.B.	1	2	3	4	5	6	7
0	<i>L.pl</i> I	-	4	4	4	0	0	0
	<i>L.pl</i> II	-	2	2	2	0	0	0
500	<i>L.pl</i> I	-	2	2	2	0	0	0
	<i>L.pl</i> II	-	2	2	2	0	0	0
1000	<i>L.pl</i> I	-	6	6	4	4	2	0
	<i>L.pl</i> II	-	10	4	4	4	4	0

Çizelge 4.3. K-Sorbat içermeyen farklı NaCl konsantrasyonlarında *Lactobacillus plantarum*'un suşlarının (I-II) *Penicillium roqueforti* üzerinde oluşturduğu ortalama minimum inhibisyon konsantrasyonu (%)

		K-Sorbat içermeyen besiyeri						
		Gün						
NaCl (mg/L)	L.A.B	1	2	3	4	5	6	7
0	<i>L.pl</i> I	-	4,44	4,44	4,44	0	0	0
	<i>L.pl</i> II	-	2,22	2,22	2,22	0	0	0
500	<i>L.pl</i> I	-	2,22	2,22	2,22	0	0	0
	<i>L.pl</i> II	-	2,22	2,22	2,22	0	0	0
1000	<i>L.pl</i> I	-	6,67	6,67	4,44	4,44	2,22	0
	<i>L.pl</i> II	-	11,11	4,44	4,44	4,44	4,44	0

L.plantarum'un iki ayrı suşunun (I-II) *P.roqueforti* üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonları incelendiğinde (Çizelge 4.3), 1000 mg/L NaCl konsantrasyonunda *L.plantarum*'un suşlarının inhibisyon yüzdesinin 2. günden itibaren 6. güne kadar azalarak devam ettiği görülmektedir. Her iki suşun da 1000 mg/L NaCl konsantrasyonunda 7.günden itibaren, 0 ve 500 mg/L konsantrasyonlarında 5.günden itibaren MİK oranının %0 olduğu görülmüştür. Laktik asit bakterilerinin inhibe edici aktivitelerinin en yüksek etkisini K-sorbat katılmaksızın NaCl'ün 1000 mg/L konsantrasyonunda %11,11 oranıyla 2. gün olduğu tespit edilmiştir.

NaCl konsantrasyonunun 500 mg/L'de küflerin gelişmelerini NaCl katılmaksızın hazırlanan örneklerle yaklaşık aynı değerleri vermesi deneme materyali küflerin düşük NaCl dozlarında gelişmelerinin etkilenmeden devam ettiğini göstermektedir.

Konsantrasyon 1000 mg/L'ye yükseldiğinde küf gelişiminde belirgin bir gerileme olmakta ve laktik asit bakterilerinin inhibisyon etkisinin arttığı görülmektedir. Düşük NaCl konsantrasyonlarında küf gelişiminin hızlandığı ve konsantrasyon arttıkça gerileme gözlemlendiği Samapundo ve ark. (2010)'nın yaptığı çalışma ile tespit edilmiştir.

L.plantarum'un küf türleri üzerindeki engelleyici etkisinin daha yüksek olabilmesi için diğer antimikrobiyel bileşikler veya gelişme faktörlerinin bazıları ile kombine edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

4.2.2. *L.plantarum* suşlarının (I-II) 250 mg/L K-sorbat ve farklı NaCl konsantrasyonlarında *Penicillium roqueforti* üzerindeki etkisi

Çizelge 4.4'te 250 mg/L K-sorbatın farklı NaCl konsantrasyonları ile kombinasyonlarında *L.plantarum*'un oluşturduğu zon çapları incelendiğinde; 1. gün ölçüm yapılabilecek herhangi bir gelişim gözlenmemiştir. 2. gün NaCl konsantrasyonu ve zon çapları arasında doğru orantı olduğu görülmektedir. NaCl konsantrasyonu 1000 mg/L'ye yaklaştıkça *L.plantarum* suşlarının oluşturduğu zon çapları da artış göstermiştir. NaCl katılmaksızın 250 mg/L K-sorbat uygulanan petrielerde 7. güne kadar zon çaplarının azalan değerleri görülmektedir. *L.plantarum* I suşunun oluşturduğu zon çapı 7. gün 14 mm olarak ölçülürken *L.plantarum* II suşunun oluşturduğu zon çapı 3. günden itibaren 7. güne kadar 8 mm olarak ölçülmüştür.

250 mg/L K-sorbat uygulanan denemelerde 0 ve 500 mg/L NaCl konsantrasyonları ile kombinasyonları arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir.

250 mg/L K-sorbat ile 1000 mg/L NaCl uygulamasında laktik asit bakterilerinin oluşturduğu zon çapı diğer konsantrasyonlara oranla daha yüksektir. 2.gün *L.plantarum* I'in oluşturduğu zon çapının 24 mm'den 7.gün 14 mm'ye kadar gerilediği, *L.plantarum* II'nin ise 2.gün 18 mm'den 7.gün 10 mm'ye gerilediği kaydedilmiştir.

250 ppm K-sorbat ile artan NaCl konsantrasyonlarının *L.plantarum* suşlarıyla sinerjik bir etki göstererek *P.roqueforti* üzerinde geriletici bir etkisi olduğu görülmektedir. 250 ppm K-sorbat varlığında 1000 ppm NaCl'ün laktik asit bakterilerinin bu kombinasyonda diğerlerinde daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu durum da NaCl'ün diğer antimikrobiyellerle birlikte doğru konsantrasyonlarla küflerin gelişimini geciktirmek için uygun bir bileşik olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 4.4. 250 ppm (mg/L) K-Sorbat ve farklı NaCl konsantrasyonlarında *Lactobacillus plantarum*'un suşlarının (I-II) *Penicillium roqueforti* üzerinde oluşturduğu ortalama koloni çapı (mm)

		250 ppm K-Sorbat						
		Gün						
NaCl (mg/L)	L.A.B	1	2	3	4	5	6	7
0	<i>L.pl. I</i>	-	8	6	6	4	4	2
	<i>L.pl.II</i>	-	10	8	8	8	8	8
500	<i>L.pl. I</i>	-	10	8	6	2	2	2
	<i>L.pl.II</i>	-	10	10	10	8	8	8
1000	<i>L.pl. I</i>	-	24	24	22	18	16	14
	<i>L.pl.II</i>	-	18	16	16	14	12	10

Çizelge 4.5. 250 ppm (mg/L) K-Sorbat ve farklı NaCl konsantrasyonlarında *Lactobacillus plantarum*'un suşlarının (I-II) *Penicillium roqueforti* üzerinde oluşturduğu ortalama minimum inhibisyon konsantrasyonu (%)

		250 ppm K-Sorbat						
		Gün						
NaCl (mg/L)	L.A.B	1	2	3	4	5	6	7
0	<i>L.pl. I</i>	-	8,89	6,67	6,67	4,44	4,44	2,22
	<i>L.pl.II</i>	-	11,11	8,89	8,89	8,89	8,89	8,89
500	<i>L.pl. I</i>	-	11,11	8,89	6,67	2,22	2,22	2,22
	<i>L.pl.II</i>	-	11,11	11,11	11,11	8,89	8,89	8,89
1000	<i>L.pl. I</i>	-	26,67	26,67	24,44	20,00	17,78	15,56
	<i>L.pl.II</i>	-	20,00	17,78	17,78	15,56	13,33	11,11

250 mg/L K-sorbit ile farklı konsantrasyonlardaki NaCl denemelerinde elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyonu (%) değerleri izelge 4.5'te gösterilmiştir. Laktik asit bakterilerinin gösterdiği en yüksek inhibisyon değerinin 250 mg/L K-sorbit ve 1000 mg/L NaCl şartlarında 2.gün olduğu tespit edilmiş olup *L.plantarum* I için %15.56, *L.plantarum* II için ise %11,11 olarak kaydedilmiştir.

250 ppm K-sorbit dozunun artan NaCl konsantrasyonları ile kombinasyonuyla, laktik asit bakterilerinin zon oluşumunda ve minimum inhibisyon konsantrasyonunda dikkate değer bir artış gözlenmiştir.

Tuzun su aktivitesini düşürmek için koruma amacıyla gıdalara katıldığı bilinmektedir (Huang ve ark., 2010). Tavsiye edilen günlük alım limitlerine (WHO, 2016) uyulduğu müddetçe tuz konsantrasyonunun artırılarak K-sorbit'ın 250 ppm gibi düşük düzeylerde tutulduğu durumda küfler üzerinde nispeten artan bir inhibisyon konsantrasyon oranı sağladığı görülmektedir.

4.2.3. *L.plantarum* suşlarının (I-II) 500 mg/L K-sorbat ve farklı NaCl konsantrasyonlarında *Penicillium roqueforti* üzerindeki etkisi

500 mg/L K-sorbat ve farklı tuz konsantrasyonlarında *L.plantarum*'un iki suşunun deneme materyali *P.roqueforti* üzerinde oluşturduğu ortalama koloni çapı çizelge 4.6'da verilmiştir. Birinci gün ölçüm yapılabilecek herhangi bir gelişim gözlenmemiştir. NaCl katılmaksızın 500 mg/L K-sorbat denemelerinde *L.plantarum* ve *L.plantarum* II'nin oluşturduğu koloni çapının 2.günden itibaren giderek azaldığı ve 7.gün 8 mm koloni çapı verdiği kaydedilmiştir.

500 mg/L K-sorbat ile 500 mg/L NaCl konsantrasyonu uygulamasında oluşan koloni çaplarının diğer konsantrasyonlardan daha düşük olduğu belirlenmiştir. Burada düşük konsantrasyonda NaCl'ün küf türleri üzerinde inhibe edici özelliğinden çok teşvik edici olduğu düşünülmektedir.

Aspergillus parasiticus ve *Penicillium canescens*'in de aralarında bulunduğu küfler üzerinde farklı NaCl konsantrasyonlarının etkisi hakkında yapılan bir çalışmada düşük NaCl konsantrasyonlarının (%0-5,0) küflerin gelişimi üzerinde teşvik edici etkisi gözlemlenirken yüksek konsantrasyonlarda (%10-15) gelişimi yavaşlatıcı, daha yüksek konsantrasyonlarda (%20) ise durdurucu etki gösterdiği tespit edilmiştir (Al Tamie, 2016). Bu sonuç elde edilen verilere benzerlik göstermektedir.

500 mg/L K-sorbat ile 1000 mg/L NaCl denemelerine bakıldığında laktik asit bakterilerinin ortalama koloni çaplarının arttığı belirlenmiştir. *L.plantarum* I ve II suşunun oluşturdukları ortalama koloni çapları sırasıyla 2.gün 22 mm ve 18 mm 7.gün ise sırasıyla 12 mm ve 10 mm olarak ölçülmüştür.

500 mg/L K-sorbat varlığında NaCl konsantrasyonuna 500 mg/L'den 1000 mg/L'ye artmasıyla laktik asit bakterilerinin oluşturduğu zon çaplarının daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durumda NaCl'ün ancak belirli bir konsantrasyonun üzerine çıkıldığında küfler üzerinde geriletici etkisi olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6. 500 ppm (mg/L) K-Sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında *Lactobacillus plantarum*'un suşlarının (I-II) *Penicillium roqueforti* üzerinde oluşturduğu ortalama koloni çapı (mm)

		500 ppm K-Sorbit						
		Gün						
NaCl (mg/L)	L.A.B	1	2	3	4	5	6	7
0	<i>L.pl. I</i>	-	14	14	12	10	8	8
	<i>L.pl.II</i>	-	12	10	8	8	8	8
500	<i>L.pl. I</i>	-	4	2	2	2	2	2
	<i>L.pl.II</i>	-	8	2	2	2	2	2
1000	<i>L.pl. I</i>	-	22	16	14	12	12	12
	<i>L.pl.II</i>	-	18	16	10	10	10	10

Çizelge 4.7. 500 ppm (mg/L) K-Sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında *Lactobacillus plantarum*'un suşlarının (I-II) *Penicillium roqueforti* üzerinde oluşturduğu ortalama minimum inhibisyon konsantrasyonu (%)

		500 ppm K-Sorbit						
		Gün						
NaCl (mg/L)	L.A.B	1	2	3	4	5	6	7
0	<i>L.pl. I</i>	-	15,56	15,56	13,33	11,11	8,89	8,89
	<i>L.pl.II</i>	-	13,33	11,11	8,89	8,89	8,89	8,89
500	<i>L.pl. I</i>	-	4,44	2,22	2,22	2,22	2,22	2,22
	<i>L.pl.II</i>	-	8,89	2,22	2,22	2,22	2,22	2,22
1000	<i>L.pl. I</i>	-	24,44	17,78	15,56	13,33	13,33	13,33
	<i>L.pl.II</i>	-	20	17,78	11,11	11,11	11,11	11,11

Farklı konsantrasyonlardaki NaCl ile 500 mg/L K-sorbat'ın kombinasyonlarının uygulandığı denemede MİK (%) incelendiğinde (Çizelge 4.7); en yüksek inhibisyon oranının 500 mg/L K-sorbat ve 1000 mg/L NaCl düzeylerinde *L.plantarum* I suşuna ait olduğu tespit edilmiş olup 7.gün itibariyle %13,33 olarak kaydedilmiştir. En düşük MİK değeri ise 500 mg/L K-sorbat ve 500 mg/L NaCl denemelerinde her iki suş için 7.gün itibariyle %2,22 olarak kaydedilmiştir.

500 mg/L K-sorbat varlığında yapılan denemelerde laktik asit bakterilerinin NaCl katılmaksızın gerçekleştirilen uygulamalarındaki minimum inhibisyon konsantrasyonunun 500 mg/L NaCl uygulamasına kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durumun daha önce belirtildiği üzere düşük konsantrasyondaki NaCl'ün küf üzerine stimüle edici etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle NaCl katılmaksızın gerçekleştirilen uygulamada 500 mg/L'den daha yüksek MİK sonuçları kaydedilmiştir.

Kurita ve Koike (1982) NaCl'nin ve esansiyel yağların antifungal etkisi üzerine yaptıkları çalışmada kullandıkları esansiyel yağ (perilaldehit) ile %10 oranındaki NaCl'ün antimikrobiyel etki gösterdiği görülmüştür. Bununla beraber %15 konsantrasyonunda NaCl tek başına kullanıldığında ise denenen küf türleri üzerinde inhibisyondan çok gelişimi teşvik edici etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu da NaCl'ün antifungal etkisinin birlikte sinerjik etki gösterebileceği bileşiklerin oranının antifungal etki üzerinde önemli bir parametre olduğunu göstermektedir.

K-sorbatın çeşitli antifungal maddeler ile birlikte *Penicillium* cinsi küfler üzerindeki etkisinin test edildiği bir çalışmada EDTA, sodyum ve kalsiyum tuzlarının K-sorbat ile kombinasyonu ile antifungal etkinin arttığını tespit etmişlerdir (Greenland ve Mateos., 2003).

4.2.4. *L.plantarum* suşlarının (I-II) 750 mg/L K-sorbat ve farklı NaCl konsantrasyonlarında *Penicillium roqueforti* üzerindeki etkisi

750 ppm K-sorbat dozlarının farklı NaCl konsantrasyonları ile hazırlanan denemelerde laktik asit bakterilerinin oluşturduğu koloni çapları birbirinden farklılık göstermektedir (Çizelge 4.8). Her iki suşun da ilk gün ölçüm yapılabilecek bir zon bölgesi oluşturmadığı tespit edilmiştir.

NaCl kullanmaksızın 750 mg/L K-sorbat denemelerinde suşlar arasındaki fark çok belirgin olmamakla birlikte 7.gün her iki suşun da zon oluşturmadığı kaydedilmiştir.

K-sorbat düzeyinin 750 mg/L olduğu bu denemede kullanılan *L.plantarum* suşlarının küfler üzerinde oluşturduğu zon çapının düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumun *P.roqueforti*'nin bu konsantrasyondaki K-sorbatı metabolize edebilme yeteneğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bazı *Penicillium* cinslerinin yüksek konsantrasyon K-sorbat dayanıklılığı ve metabolize etmesi üzerine yapılan çalışmada bu oranın 3700 mg/L olduğu ve *P.roqueforti*'nin 6 günlük inkübasyon süresince neredeyse tamamını tükettiği Marth ve ark. (1966) tarafından belirtilmiştir.

750 mg/L K-sorbat varlığında 500 mg/L NaCl konsantrasyonunda yapılan denemelerde 7.güne kadar diğer konsantrasyonlara oranla daha yüksek bir koloni çapı ortalaması belirlenmiştir. *L.plantarum* I'in oluşturduğu ortalama koloni çapı 7. gün 14 mm *L.plantarum* II 7.gün 12 mm zon çapı vermiştir. Bu kombinasyonun denenen diğer konsantrasyonlar arasında en yüksek zon çapı ve MİK (Çizelge 4.9) değerleri olduğu tespit edilmiştir. Bu durum uygun konsantrasyonda ayarlanan koruyucu maddelerin kombinasyonunun antifungal etkiyi yükseltmesi ile açıklanabilir.

Çizelge 4.8. 750 ppm (mg/L) K-Sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında *Lactobacillus plantarum*'un suşlarının (I-II) *Penicillium roqueforti* üzerinde oluşturduğu ortalama koloni çapı (mm)

		750 ppm K-Sorbit						
		Gün						
NaCl (mg/L)	L.A.B	1	2	3	4	5	6	7
0	<i>L.pl. I</i>	-	10	8	6	2	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	12	4	4	2	0	0
500	<i>L.pl. I</i>	-	34	26	20	18	16	14
	<i>L.pl.II</i>	-	26	18	12	12	12	12
1000	<i>L.pl. I</i>	-	20	16	14	10	8	6
	<i>L.pl.II</i>	-	10	6	4	4	2	0

Çizelge 4.9. 750 ppm (mg/L) K-Sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında *Lactobacillus plantarum*'un suşlarının (I-II) *Penicillium roqueforti* üzerinde oluşturduğu ortalama minimum inhibisyon konsantrasyonu (%)

		750 ppm K-Sorbit						
		Gün						
NaCl (mg/L)	L.A.B	1	2	3	4	5	6	7
0	<i>L.pl. I</i>	-	11,11	8,89	6,67	2,22	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	13,33	4,44	4,44	2,22	0	0
500	<i>L.pl. I</i>	-	37,78	28,89	22,22	20,00	17,78	15,56
	<i>L.pl.II</i>	-	31,11	20,00	13,33	13,33	13,33	13,33
1000	<i>L.pl. I</i>	-	22,22	17,78	15,56	11,11	8,89	6,67
	<i>L.pl.II</i>	-	8,89	6,66	4,44	4,44	2,22	0

MİK değerlerinin gösterildiği Çizelge 4.9 incelendiğinde NaCl katılmaksızın 750 mg/L miktarında eklenen besiyerinde *L.plantarum* suşlarının *P.roqueforti* üzerindeki düşük MİK değeri dikkat çekmektedir. 750 mg/L K-sorbat, 500 mg/L NaCl konsantrasyonunda ise 7.gün ölçülen minimum inhibisyon konsantrasyonu *L.plantarum* I suşu için %15,56, *L.plantarum* II suşu için ise %13,33 olarak kaydedilmiştir.

Burada 750 ppm K-sorbat varlığında NaCl konsantrasyonunun 1000 mg/L'ye artması ile antifungal etkinin azaldığı, *P.roqueforti*'nin 1000 ppm NaCl oranını tolere edebilirken 500 ppm oranında kıyasla gerilediği görülmektedir.

Razavi-Rohani ve Griffiths (2007)'in yapmış olduğu çalışmada sorbik asitin NaCl 'ün artan konsantrasyonlarıyla sinerjik etki gösterdiği ve denenen küf örneklerinde başarılı bir inhibisyon gerçekleştirildiği görülmektedir. Bununla beraber EDTA eklenen besiyerinde düşük NaCl konsantrasyon denemelerinde inhibisyonun yüksek oranlara kıyasla daha iyi olduğunu tespit etmiştir.

Yapılan çalışmada K-sorbat ve NaCl konsantrasyonlarının farklı kombinasyonlarının MİK ve zon çapı üzerindeki farklı etkileri görülmektedir. Laktik asit bakterilerinin küfler üzerindeki inhibisyon yeteneğini etkileyen çevresel faktörler dikkatle incelenmelidir. Seçilen koruyucular, koruyucuların konsantrasyonları ile laktik asit bakterilerinin oluşturduğu antifungal bileşenler arasındaki ilişkinin inhibisyon konsantrasyonu üzerinde olumlu veya olumsuz etkiler yapabileceği düşünülmektedir.

Gerez ve ark. (2010) laktik asit bakterilerinin oluşturduğu antifungal özellikteki son ürünlerin suşa bağlı olabileceğini belirtmiştir. Oliveria ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada laktik asit bakterisinin suşunun ve fermentasyon süresinin antifungal karakterlerinde değişiklik gösterebildiğini ifade etmektedir. Potansiyel antifungal aktivitelerinin ideal substrat koşullarında daha iyi olduğu tespit edilmiştir.

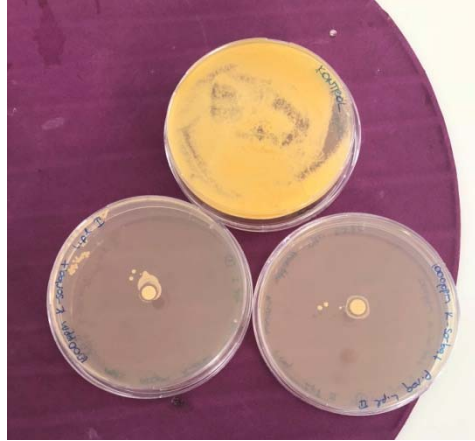
4.2.5. *L.plantarum* suşlarının (I-II) 1000 mg/L K-sorbat ve farklı NaCl konsantrasyonlarında *Penicillium roqueforti* üzerindeki etkisi

Uygulaması yapılan denemelerde en yüksek koloni çapı ve MİK değerlerinin 1000 mg/L K-sorbat'ın farklı NaCl dozlarıyla olan kombinasyonlarında gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.10 ve 4.11).

NaCl olmaksızın denenen 1000 mg/L K-sorbat dozlarında 14.güne kadar küf gelişimi tespit edilmemiştir. Canlı hücre içermeyen kontrol petrisinde 4.günde küf gelişimine rastlanmamış ancak 5.günden itibaren gelişme gözlemlenmiştir. 14.gün sonunda laktik asit bakterisi inoküle edilmiş petrilere paralel denemeler dahil küf gelişimi görülmezken laktik asit bakterisi olmayan kontrol petrilere küf gelişimi tüm petri içerisinde gözlemlenmiştir.

Yapılan çalışmada 1000 ppm K-sorbat varlığında laktik asit bakterisi içermeyen kontrol petrisinde 14.günde küf gelişimine rastlanırken *L.plantarum* suşlarının inoküle edildiği denemelerde küf gelişimini durdurmada başarılı olduğu görülmektedir.

Şekil 4.1. 1000 ppm K-sorbat varlığında *P.roqueforti* ve *L.plantarum* suşlarının 14.günde petri kabındaki görüntüsü



1000 mg/L K-sorbat düzeyinde NaCl'ün 500 ve 1000 mg/L konsantrasyonlarına artmasıyla *L.plantarum*'un, *P.roqueforti* üzerindeki geriletici etkisinin azaldığı görülmektedir. NaCl katılmaksızın hazırlanan denemelerde küf gelişimi 14. güne kadar

gözlenmezken, 1000 mg/L K-sorbatın 500 mg/L NaCl konsantrasyonuyla kombinasyonunda 7.günden, 1000 mg/L NaCl konsantrasyonuyla kombinasyonunda ise 5.günden itibaren küf gelişimi gözlenmiştir (Çizelge 4.10).

Artan NaCl konsantrasyonlarının K-sorbatın antifungal etkisi üzerinde azaltan bir etki yaptığı gözlenmektedir. Bununla beraber değişen ortam şartlarında küflerin K-sorbat'ı metabolize edebilmesi de söz konusu olabilmektedir.

Küflerin K-sorbatı metabolize edebilmesi ve NaCl'ün konsantrasyonunun belirli konsantrasyonlarda inhibisyon üzerinde farklılıklar oluşturduğu çeşitli kaynaklarda belirtilmektedir (Belz, 2012, Fadda ve ark, 2015).

Çizelge 4.10. 1000 ppm (mg/L) K-Sorbitat ve farklı NaCl konsantrasyonlarında *Lactobacillus plantarum*'un suşlarının (I-II) *Penicillium roqueforti* üzerinde oluşturduğu ortalama koloni çapı (mm)

		1000 ppm K-Sorbitat						
		Gün						
NaCl (mg/L)	L.A.B	1	2	3	4	5	6	7
0	<i>L.pl. I</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>L.pl.II</i>	-	-	-	-	-	-	-
500	<i>L.pl. I</i>	-	-	-	-	-	-	56
	<i>L.pl.II</i>	-	-	-	-	-	-	56
1000	<i>L.pl. I</i>	-	-	-	-	60	50	50
	<i>L.pl.II</i>	-	-	-	-	56	52	44

Çizelge 4.11. 1000 ppm (mg/L) K-Sorbitat ve farklı NaCl konsantrasyonlarında *Lactobacillus plantarum*'un suşlarının (I-II) *Penicillium roqueforti* üzerinde oluşturduğu ortalama minimum inhibisyon konsantrasyonu (%)

		1000 ppm K-Sorbitat						
		Gün						
NaCl (mg/L)	L.A.B	1	2	3	4	5	6	7
0	<i>L.pl. I</i>	-	100	100	100	100	100	100
	<i>L.pl.II</i>	-	100	100	100	100	100	100
500	<i>L.pl. I</i>	-	100	100	100	100	100	62,22
	<i>L.pl.II</i>	-	100	100	100	100	100	62,22
1000	<i>L.pl. I</i>	-	100	100	100	66,67	55,56	55,56
	<i>L.pl.II</i>	-	100	100	100	62,22	53,33	48,89

1000 mg/L K-sorbat'ın farklı NaCl konsantrasyonlarına *L.plantarum*'un iki farklı suşunun hesaplanan MİK Çizelge 4.11'de gösterilmiştir. NaCl katılmayan denemelerde inhibisyon oranı 14.güne kadar %100 ölçülürken, 500 mg/L'de 6. Güne, 1000 mg/L'de ise 4. güne kadar %100 ölçülmüştür.

Liewen ve Marth (1984)'ın yaptıkları çalışmada K-sorbat hassasiyeti gösteren küf gelişiminin 1000 ppm ve daha yüksek konsantrasyonlarda engellenebildiği belirtilmektedir.

Minimum inhibisyon konsantrasyonunun, artan NaCl miktarlarıyla azalma göstermesi bu düzeylerde NaCl'nin *Penicillium roqueforti*'yi stimüle edebilmesi olarak düşünülmektedir. Artan NaCl konsantrasyonlarının *L.plantarum* suşlarının ortamda bulunan diğer koruyucu maddeleri tolere edebilmesini sağlayabileceği gibi belirli konsantrasyonlardaki NaCl, laktik asit bakterilerinin ve K-sorbat'ın antifungal etkisi üzerinde değişiklikler meydana getirebilmektedir.

Samapundo ve ark. (2010) NaCl miktarının artırılmasının küfler üzerindeki etkisinin incelenmesi hakkındaki çalışmada *P.roqueforti*'nin gelişiminin azalma yönünde olmadığını, %20 NaCl içeren besiyerinde dahi gelişiminin devam ettiği tespit edilmiştir.

Belz (2012)'in ekmekte NaCl'ün azaltılmasının küfler üzerine (*Penicillium* spp ve *Aspergillus* spp.) yaptığı çalışmada, NaCl katılmaksızın hazırlanan ekmeklerde küf gelişiminin daha yavaş olduğunu tespit etmiş olup, bunu düşük düzeyde NaCl konsantrasyonlarının küflerin gelişimini teşvik etmesi şeklinde açıklamıştır.

Küflerin gelişiminin engellenmesinde laktik asit bakterilerinin farklı koruyucu maddeler ile kombinasyonunun antifungal etki üzerinde sinerjik etki gösterebileceği gibi antagonistik bir etki de oluşturabilmektedir. 1000 mg/L konsantrasyonda K-sorbat'ın tek başına kullanımı etkili bir sonuç verirken farklı NaCl ile konsantrasyonlarıyla beraber *L.plantarum* suşlarının *P.roqueforti*'yi geriletmediği ancak gelişimini tamamen durduramadığı görülmektedir.

Yüksek miktarlarda K-sorbat'ın antifungal etkiyi artırdığı bilirse de konsantrasyonun artması gıdada istenmeyen özelliklere sebebiyet verebilmektedir. Bununla beraber yine belirli konsantrasyonlarda K-sorbat'ın degrade edilmesi de gıdalara antifungal olarak eklenirken çevresel şartların, konsantrasyonun ve diğer bileşenlerle etkileşiminin dikkatlice incelenmesi gerekmektedir (Stopforth ve ark., 2005).

Son yıllarda tüketicilerin gıdalardaki katkı maddelerin azaltılmasına yönelik talebi ve ısrarı gıdaları korumada mevcut yöntemlerin birlikte en iyi etkiyi verecek şekilde kullanılmasını veya yeni yöntemler bulmayı gerektirmektedir.

Gıda Standartları Kurumu (FSA, 2018), Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 2016) gibi bazı otoritelerin fazla oranda tuzun sağlık üzerine olumsuz etkileri üzerine tuz kullanımına getirdiği sınırlamalar gıdalarda kullanılan NaCl'ün başka maddelerle değiştirilmesi gibi bazı alternatif yollar sunmaktadır.

Samapundo ve ark. (2010) NaCl oranının azaltılması ve başka tuzlar ile değiştirilmesinin küfler üzerindeki etkisi hakkında yaptığı çalışmada *P.roqueforti* için MgCl₂'ün NaCl'den kısmen daha iyi inhibe edici etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca su aktivitesinin düşürülmesinde gliserol ve NaCl kullanımının farkını araştırdıkları çalışmada su aktivitesi, NaCl eklenmiş besiyerlerinde daha düşük olmakla birlikte gliserol eklenen besiyerlerinde *Penicillium roqueforti*'nin de dahil olduğu *Penicillium* cinsi küflerin gelişimi üzerinde daha büyük oranda bir inhibisyon tespit etmişlerdir.

Bütün bunların yanında tuzun azaltılmasına yönelik yardımcı ve alternatif bir yol olarak modifiye atmosfer paketleme, pastörizasyon, kimyasal koruyucuların eklenmesi uygulamaları da gerçekleştirilebilir (Belz, 2012).

K-sorbat'ın antimikrobiyel etkisini etkileyen en önemli parametrelerden bir diğeri de pH'dır. Antifungal etkinin pH değeri düştükçe arttığı belirtilmektedir (Stopforth ve ark., 2005).

Muynck ve ark. (2004) 5 laktik asit bakterisinin oluşturduğu antifungal maddelerin etkileri üzerine yaptıkları çalışmada antifungal bileşiklerin etkisinin ortamın pH değerine göre değişkenlik gösterdiğini belirtmiştir. Ortam pH'sının 5'ten daha yüksek olduğu değerlerde oluşturdukları antifungal bileşiklerin etkisinin düşük olduğunu belirtmektedirler.

Penicillium roqueforti ve diğer türlerin zayıf asit koruyuculara karşı yüksek tolerans gözlemlenmiştir. *P.roqueforti* ve *P.commune* küflerinin pH 6 oranında %0.3 K-sorbat konsantrasyonunda diğer küflere kıyasla artan bir tolerans tespit edilmiştir (Levinskaite, 2012).

Koruyucu maddelerin ortalama düzeydeki konsantrasyon miktarının tolere edilmesi, küf gelişimini engellemek yerine, gelişimi teşvik etmesi durumunun dikkate alınarak, tüketicinin de isteği üzerine koruyucu konsantrasyonunun azaltılmasında tüm parametrelerin göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

4.2.6. *L.plantarum* suşlarının (I-II) farklı K-sorbat ve NaCl konsantrasyonlarında *P.roqueforti* üzerindeki etkilerinin istatistiksel analiz sonuçları

Bu bölümde *P.roqueforti*'nin K-sorbat, NaCl ve laktik asit bakterileri *L.plantarum* I ve *L.plantarum* II ile etkileşimlerinin istatistiksel analiz sonuçları değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.12'de *L.plantarum* I ve II'nin K-sorbat'ın ve NaCl'nin *P.roqueforti* üzerindeki etkileşimlerinin varyans analiz sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.12 *L.plantarum* suşlarının deneme materyali *P.roqueforti* üzerinde oluşturduğu ortalama zon çaplarının ve etkileşimlerinin varyans analiz tablosu

Varyans Analiz Tablosu				
Varyans kaynağı	SD	KT	KO	F
Bakteri	1	23,511	23,511	<,0001**
K-Sorbit	4	46244,444	11561,111	<,0001**
NaCl	2	353,867	176,9335	<,0001**
BakterixK-sorbit	4	121,600	30,4	<,0001**
K-sorbitxNaCl	8	101,422	12,67775	<,0001**
BakterixNaCl	2	4093,689	2046,8445	<,0001**
BakterixK-sorbitxNaCl	8	127,467	15,933375	<,0001**
Hata	60	80,00	1,33	Prob>F

**<: <%1 düzeyinde önemli

İncelenen varyans analiz tablosuna göre (Çizelge 4.12) bu istatistiksel değerlendirmede bakteri-K-sorbit-NaCl interaksiyonlarının tümü %1 düzeyinde önemli bulunmuştur.

4.2.7. *L.plantarum* suşları ile farklı K-sorbit konsantrasyonlarının (mg/L) *P.roqueforti* üzerindeki etkileşimlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

Çizelge 4.13'te *L.plantarum* suşlarının (I-II) 0, 250, 500, 750 ve 1000 mg/L K-sorbit ile deneme materyali *P.roqueforti* üzerindeki etkileşimleri verilmiştir. Bakteri ve K-sorbit'in etkileşimleri ortalamaları büyük harfler ile diğer değerler ise küçük harfler ile gösterilmektedir.

Yapılan çalışmada *L.plantarum* suşlarının (I-II) K-sorbit ile etkileşimde en yüksek ortalamanın 1000 ppm K-sorbit konsantrasyonunda verdiği görülmektedir. Bakteri ortalamalarına bakıldığında suşlar arasında belirgin bir fark görülmemektedir. Laktik asit bakterilerinin *P.roqueforti* üzerindeki geriletici etkisinin en düşük olduğu dozun 750 mg/L K-sorbit olduğu kaydedilmiştir.

K-sorbit'ın yüksek konsantrasyonlarda *L.plantarum* suşları ile kombinasyonunda küfler üzerindeki inhibe edici etkisinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak düşük konsantrasyonlarda inhibisyon etkisinin azaldığı görülmektedir.

Laktik asit bakterilerinin K-sorbit olmaksızın tek başına *P.roqueforti*'yi inhibe etmede başarısız olduğu kaydedilmiştir.

Çizelge 4.13. *P.roqueforti* üzerindeki *L.plantarum* suşlarının (I-II) ve farklı K-sorbit konsantrasyonlarının (mg/L) interaksiyonu

Bakteri	K-sorbit					Bakteri ort.
	0	250	500	750	1000	
<i>L.plantarum I</i>	0,0 f	5,56d	9,33b	6,67c	62,67a	16,84A
<i>L.plantarum II</i>	0,0 f	8,67b	6,44cd	4,0e	63,33a	16,49B
K-sorbit ort.	0,0 E	7,11C	7,89B	5,33D	63,00A	

4.2.8. *L.plantarum* suşları ile farklı NaCl konsantrasyonlarının (mg/L) *P.roqueforti* üzerindeki etkileşimlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

Çizelge 4.14'te *L.plantarum*'un I ve II suşunun *P.roqueforti* üzerindeki etkisinin farklı konsantrasyonlarda NaCl ile interaksiyonları verilmiştir.

Çizelge 4.14. *P.roqueforti* üzerindeki *L.plantarum* suşlarının (I-II) ve farklı NaCl konsantrasyonlarının (mg/L) interaksiyonu

Bakteri	NaCl			Bakteri ort.
	0	500	1000	
<i>L.plantarum I</i>	19,07b	14,67d	16,80c	16,85A
<i>L.plantarum II</i>	21,20a	15,47d	12,80e	16,49B
NaCl ort.	20,14A	15,07B	14,80B	

Laktik asit bakterilerinin *P.roqueforti* üzerindeki inhibisyon etkisinin NaCl ile etkileşimlerinde en yüksek ortalamanın NaCl katılmaksızın gerçekleştirilen uygulamada kaydedildiği görülmektedir.

Artan NaCl konsantrasyonlarında *L.plantarum*'un inhibisyon etkisinin düştüğü tespit edilirken suşlar arası belirgin bir fark görülmemektedir.

4.2.9. *L.plantarum* suşları ile farklı K-sorbat ve NaCl konsantrasyonlarının (mg/L) *P.roqueforti* üzerindeki etkileşimlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

Deneme materyali olan *P.roqueforti* üzerinde farklı konsantrasyonlarda K-sorbat ve NaCl şartlarında laktik asit bakterilerinin oluşturduğu zon çapı interaksyonları Çizelge 4.15'te verilmiştir.

Çizelge 4.15. *P.roqueforti* üzerindeki *L.plantarum* suşları (I-II) ile farklı K-sorbat ve NaCl konsantrasyonlarının (mg/L) interaksyonu

NaCl (ppm)	Bakteri	K-Sorbat (ppm)				
		0	250	500	750	1000
0	<i>L.pl. I</i>	0,0 l	14,00f	14,00f	0,0 l	80,00b
	<i>L.pl.II</i>	0,0 l	8,00i	8,00i	0,0 l	90,00a
500	<i>L.pl. I</i>	0,0 l	1,33kl	2,00k	14,00f	56,00c
	<i>L.pl.II</i>	0,0 l	8,00i	1,33kl	12,00g	56,00c
1000	<i>L.pl. I</i>	0,0 l	0,0 l	12,00f	6,00j	52,00d
	<i>L.pl.II</i>	0,0 l	10,00h	10,00h	0,0 l	44,00e

Her iki *L.plantarum* suşunun verdiği en yüksek değerlerin NaCl içermeyen, 1000 ppm K-sorbat şartlarında kaydedildiği görülmektedir. 250 ve 750 ppm K-sorbat içeren koşullar arasında bir fark olmaksızın *L.plantarum*'un bu oranlarda *P.roqueforti* üzerinde geriletilici bir etki oluşturmadığı tespit edilmiştir.

500 ppm NaCl ve farklı K-sorbat değerlerinin verdiği sonuçlara bakıldığında artan K-sorbat oranıyla sonuçlarda artış olduğu gözlemlenmiştir. Denenen tüm konsantrasyonların kombinasyonlarında en yüksek ikinci değer 500 ppm NaCl -1000 ppm K-sorbat şartlarında olduğu kaydedilmiştir.

NaCl konsantrasyonunun 1000 mg/L olduğu durumda K-sorbat oranının artmasıyla laktik asit bakterilerinin inhibisyon etkisinin arttığı görülmektedir.

K-sorbat'ın ve NaCl'nin katılmadığı durumda *L.plantarum* suşlarının tek başına *P.roqueforti*'nin gelişimini engelleyemediği görülmektedir. Bununla beraber K-sorbat

katılmaksızın artırılan NaCl değerlerinin de *L.plantarum* suşlarının inhibisyon edici etkisini değiştirmediği tespit edilerek “0” olarak kaydedilmiştir.

250, 500 ve 750 mg/L K-sorbat değerlerinde kũfũn gelişmeye devam etmesinin daha önce de belirtildiği üzere sorbatı metabolize edebilme yeteneği ve koruyuculara direnç kazanma mekanizmaları ile açıklanabilmektedir. Besin maddeleri açısından zengin olan gıda rũnleri, gıdanın fizyolojik özelliklerine (sıcaklık, pH, su aktivitesi, redoks potansiyeli) adaptasyon sağlayabilme ve besin maddelerini zũmseyebilme yetenekleri olan bazı bakteri ve kũf rleri tarafından kolonize edilebilmektedirler (Le Lay ve ark., 2016).

NaCl konsantrasyonunun artmasının da kũf rlerinin gelişimini çoğu zaman geriletmediği tespit edilmiştir. Yapılan alışmalar sonucu Chen (1964) *Aspergillus* ve *Penicillium* rlerinin dũřuk su aktivitesinde gelişebilme yetenekleri sayesinde NaCl konsantrasyonlarına en dayanıklı kũf rleri olduğunu belirtmiştir. Bu kũf rlerine ait olan 26 rden 7’sinin %30 NaCl içeren besiyeri üzerinde dahi gelişebildiğini tespit etmiştir.

750 mg/L K-sorbat şartlarında artan NaCl miktarının değişken sonuçlar verdiği grũlmektedir. NaCl konsantrasyonunun 0 ve 1000 mg/L olduğunda kũfler üzerinde geriletici etki gözlenmezken 500 mg/L’de gözlenmiştir. Bu da koruyucu olarak kullanılan bileşenlerin konsantrasyonlarının laktik asit bakterisinin antifungal etkisini farklı şekillerde etkilediğini ortaya koymaktadır. NaCl’nin diğer moleküllerle antifungal etkisinin araştırıldığı çalışmada %5 etanol varlığında, %15 NaCl konsantrasyonunun havadan bulaşan kũflerin gelişiminde potansiyel bir gerileme gerçekleştiği bildirilmektedir. Ancak etanol oranının %8’e NaCl oranının %25’e çıkmasıyla bu engellenenin gerilediği tespit edilmiştir (Kurito ve Koike, 1983).

Laktik asit bakterilerinin deneme materyali kũfler üzerinde NaCl katılmaksızın K-sorbat içeren şartlarda daha yüksek sonuçlar verdiği tespit edilmesiyle beraber iki koruyucunun kombine edildiği konsantrasyonlara bakıldığında da artan değerler kaydedildiği grũlmektedir. Nispeten yüksek pH değerlerine sahip gıdalarda potasyum sorbat

kullanımı, düşük su aktivitesi (0,80) veya diğer etki kontrol faktörleri ile kombine edilerek uygulanması gerektiği tavsiye edilmektedir. Bununla beraber K-sorbit'ın diğer koruyucu maddeler ile kombine edilerek yapılacak çalışmalarda konsantrasyonunun en düşük düzeyde tutulmasının önemli olduğu ifade edilmektedir (Guynot ve ark., 2005b).

4.3. *Lactobacillus plantarum* Suşlarının Farklı K-sorbit ve NaCl Konsantrasyonlarında *Aspergillus niger* Üzerindeki Etkisi

L.plantarum suşlarının (I-II) 0, 250, 500, 750, 1000 mg/L K-sorbit ve 0, 500, 1000 mg/L NaCl konsantrasyonları ile oluşturulan kombinasyonlarda *A.niger* üzerinde oluşturduğu zon çapları ve minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) bu bölümde verilmiştir.

Uygulamada laktik asit bakterilerinin deneme materyali küfler üzerindeki antifungal etkisinin test sonuçlarına göre *Aspergillus niger*'in *Penicillium roqueforti*'ye kıyasla inhibisyonunun daha zor olduğu belirlenmiştir. Le Lay ve ark. (2016) yaptıkları bir çalışmada *A.niger*'in kimyasal koruyuculara en dayanıklı tür olduğunu onu da *Penicillium* türlerinin takip ettiğini tespit etmişlerdir. Bununla beraber *Aspergillus niger*'in test edilmiş koruyucular arasında en çok potasyum sorbata direnç gösterdiği sonucuna ulaşmışlardır.

4.3.1. *L.plantarum* suşlarının (I-II) K-sorbit katılmaksızın farklı NaCl Konsantrasyonlarında *Aspergillus niger* üzerindeki etkisi

K-sorbit içermeyen besiyeri denemelerinde farklı NaCl dozlarına göre laktik asit bakterilerinin *A.niger* üzerinde oluşturduğu zon çapları Çizelge 4.16'da verilmiştir. Her iki suşun da ilk gün ölçüm yapılabilecek bir zon bölgesi oluşturmadığı tespit edilmiştir.

NaCl ve K-sorbit içermeyen besiyerinde *L.plantarum*'un *A.niger* üzerinde zon oluşturmadığı tespit edilmiştir. NaCl oranının artmasının zon çapı üzerinde büyük bir farklılık oluşturmadığı, *L.plantarum* I'in 2.gün ve 3.gün 2 mm, *L.plantarum* II'nin ise yalnızca 2.gün 2 mm koloni çapı oluşturduğu kaydedilmiştir. İlerleyen günlerde ise *A.niger*'in gelişmeye devam ettiği ve tüm petriyi kapladığı gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.16. K-Sorbit içermeyen farklı NaCl konsantrasyonlarında *Lactobacillus plantarum*'un suşlarının (I-II) *Aspergillus niger* üzerinde oluşturduğu ortalama koloni çapı (mm)

		K-Sorbit içermeyen besiyeri						
		Gün						
NaCl (mg/L)	L.A.B	1	2	3	4	5	6	7
0	<i>L.pl. I</i>	-	0	0	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	0	0	0	0	0	0
500	<i>L.pl. I</i>	-	2	2	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	2	0	0	0	0	0
1000	<i>L.pl. I</i>	-	2	2	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	2	0	0	0	0	0

Çizelge 4.17. K-Sorbit içermeyen farklı NaCl konsantrasyonlarında *Lactobacillus plantarum*'un suşlarının (I-II) *Aspergillus niger* üzerinde oluşturduğu ortalama minimum inhibisyon konsantrasyonu (%)

		K-Sorbit içermeyen besiyeri						
		Gün						
NaCl (mg/L)	L.A.B	1	2	3	4	5	6	7
0	<i>L.pl. I</i>	-	0	0	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	0	0	0	0	0	0
500	<i>L.pl. I</i>	-	2,22	2,22	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	2,22	0	0	0	0	0
1000	<i>L.pl. I</i>	-	2,22	2,22	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	2,22	0	0	0	0	0

Çizelge 4.17’de verilen farklı NaCl konsantrasyonlarında *A.niger* üzerindeki *L.plantarum* suşlarının MİK değerleri incelendiğinde inhibisyon etkisinin kaybolduğu görülmektedir.

Yapılan çalışmada etkisi incelenen *L.plantarum* suşlarının *A.niger*’i inhibe etmede yetersiz olduğu tespit edilmiştir. Artan NaCl miktarının inhibisyon üzerinde dikkate değer bir değişim gerçekleştirmediği tespit edilmiştir. Bu da *A.niger*’in uygulanan NaCl konsantrasyonlarında varlığında gelişmeyi sürdürebildiğini göstermektedir. 124 tür *Penicillium* ve 81 tür *Aspergillus*’un, NaCl toleransını test üzere yapılan bir çalışmada diğer organizmalara göre daha fazla dirençli oldukları görülmektedir. Her iki türün de %20’ye kadar NaCl’ü tolere edebildikleri, yarı yarıya oranla %25 NaCl oranında gelişimini sürdürdükleri belirtilmiştir (Tresner ve Hayes, 1971).

A.niger gibi koruyuculara dirençli küf türlerinin gelişiminin geciktirilmesi ya da durdurulmasında inhibisyon etkisi yüksek suşların seçilmesi gerektiği düşünülmektedir. Bununla beraber küf gelişimini kontrol altına alabilmek için NaCl vb. bileşiklerin eklenerek su aktivitesinin düşürülmesi gibi yöntemler kullanılırken *A.niger*’in tolere edebileceği konsantrasyonların dikkatli incelenmesi gerekmektedir.

4.3.2. *L.plantarum* suşlarının (I-II) 250 mg/L K-sorbat ve farklı NaCl Konsantrasyonlarında *Aspergillus niger* üzerindeki etkisi

K-sorbat miktarının 250 mg/L’ye artırıldığı denemelerde farklı NaCl konsantrasyonlarında *L.plantarum* suşlarının oluşturduğu koloni çapları Çizelge 4.18’de gösterildiği üzere yalnızca 2.gün koloni çapı kaydedildiği 3.günden itibaren inhibisyonun gerilediği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.18. 250 mg/L K-Sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında *Lactobacillus plantarum*'un suşlarının (I-II) *Aspergillus niger* üzerinde oluşturduğu ortalama koloni çapı (mm)

		250 ppm K-Sorbit						
		Gün						
NaCl (mg/L)	L.A.B	1	2	3	4	5	6	7
0	<i>L.pl. I</i>	-	2	0	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	0	0	0	0	0	0
500	<i>L.pl. I</i>	-	4	0	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	2	0	0	0	0	0
1000	<i>L.pl. I</i>	-	4	0	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	2	0	0	0	0	0

Çizelge 4.19. 250 mg/L K-Sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında *Lactobacillus plantarum*'un suşlarının (I-II) *Aspergillus niger* üzerinde oluşturduğu ortalama minimum inhibisyon konsantrasyonu (%)

		250 ppm K-Sorbit						
		Gün						
NaCl (mg/L)	L.A.B	1	2	3	4	5	6	7
0	<i>L.pl. I</i>	-	2,22	0	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	0	0	0	0	0	0
500	<i>L.pl. I</i>	-	4,44	0	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	2,22	0	0	0	0	0
1000	<i>L.pl. I</i>	-	4,44	0	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	2,22	0	0	0	0	0

250 mg/L K-sorbat varlığında *A.niger*'in gelişimine devam ettiği, artan NaCl konsantrasyonlarının laktik asit bakterilerinin MİK değerini etkilemediği gözlemlenmektedir (Çizelge 4.19).

Artan K-sorbat oranının *A.niger*'in engellemesinde yeterli olmadığı düşünülmektedir. Sorbatın düşük konsantrasyonlarının (%0,05-0,15) gıdalardaki küf gelişimini engelleyebilmesi için pH ve sıcaklıkta gerekli ayarlamaların yapılması gerektiği belirtilmektedir (Junqueira-Gonçalves ve ark., 2016).

Uygulanan K-sorbat ve NaCl kombinasyonlarının *A.niger*'in inhibisyonunda yeterli olmadığı, diğer ortam parametrelerinin (pH ve a_w gibi) kontrol edilerek daha etkin sonuç alınabileceği düşünülmektedir. Quattrini ve ark., (2018) küflerin inhibisyonunda birlikte kullanılan koruyucuların kombinasyonlarının da *A.niger* üzerinde önemli olduğunu belirtmektedir. Bununla beraber pH'nın laktik asit gibi organik asitlerin aktivitesi üzerinde önemli bir rolü olduğunu ve bu aktivitenin pH<5 değerinde daha yüksek olabileceğini bildirmektedir.

K-sorbatın antifungal aktivitesinin su aktivitesinin azalmasıyla arttığı belirtilmektedir *A.niger* ve *P.corylophilum*'u ancak pH 5.5 değerinde K-sorbat ve a_w 'nin belirli kombinasyonları (%0,30 K-sorbat ve 0,85 a_w) sayesinde engellenebildiğini tespit etmiştir (Guynot ve ark, 2005). Yapılan çalışmada uygulanan NaCl konsantrasyonlarının su aktivitesi üzerinde belirgin bir azalma oluşturmadığı bununla beraber bu konsantrasyonların *A.niger*'in gelişimini teşvik ettiği görülmüştür.

4.3.3. *L.plantarum* suşlarının (I-II) 500 mg/L K-sorbat ve farklı NaCl Konsantrasyonlarında *Aspergillus niger* üzerindeki etkisi

500 mg/L K-sorbat düzeyinin farklı NaCl konsantrasyonlarıyla olan kombinasyonlarında *L.plantarum* suşlarının oluşturduğu zon çapları ortalaması ve hesaplanan MİK Çizelge 4.20 ve 4.21'de gösterilmektedir.

Uygulamasý yapılan 500 mg/L K-sorbat ve farklý konsantrasyonlardaki NaCl ile kombinasyonlarında diđer sonuçlara benzer olarak *L.plantarum* suřlarının *A.niger* üzerinde yüksek inhibisyon konsantrasyonu kaydedilememiřtir.

1000 mg/L'ye yükselen NaCl konsantrasyonlarında *L.plantarum* suşlarının oluşturduğu zon çapında diğer dozlara nispeten bir artış gözlenmiş (izelge 4.20) ve *L.plantarum* I'in MİK değeri 2.gün %8,89 olarak tespit edilmiştir (izelge 4.21).

500 mg/L K-sorbat şartlarında *L.plantarum* suşlarının 1000 mg/L NaCl'de diğer miktarlara kıyasla daha yüksek zon çapı vermesinin *A.niger*'in belirli düzeydeki NaCl ile gelişiminin teşvik edilmesi olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmada elde edilen verilen bunu doğrular niteliktedir. Cuppers ve ark (1997) yaptıkları analizlerin sonucunda *A.niger* ve *P.roqueforti*'nin %1.25 NaCl oranında maksimum düzeyde gelişim gösterdikleri kaydedilmiştir.

Farklý potasyum sorbat konsantrasyonları içeren yenilebilir gıda paketlenmesi için kullanılabilecek gluten filmlerinin küfler üzerine etkilerini araştıran Tre ve ark. (2012) *A.niger* zerinde inhibisyon zonu oluşumu için potasyum sorbat konsantrasyonunun en az %10 olması gerektiğini kaydetmişlerdir. Aynı alışmada K-Sorbat içeren gluten filmlerinin yavaş gelişen kf türlerine (*Fusarium incarnatum*) hızlı gelişen kf türlerinden (*A.niger*) daha iyi etki ettiklerini belirtmektedir. Bu durumda *A.niger*'in inhibisyonunda kullanılacak koruyucu maddelerin ortamda bulunan veya eklenen bileşikler ile kombinasyonlarında dikkat edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Çizelge 4.20. 500 mg/L K-Sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında *Lactobacillus plantarum*'un suşlarının (I-II) *Aspergillus niger* üzerinde oluşturduğu ortalama koloni çapı (mm)

		500 ppm K-Sorbit						
		Gün						
NaCl (mg/L)	L.A.B	1	2	3	4	5	6	7
0	<i>L.pl. I</i>	-	4	0	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	2	0	0	0	0	0
500	<i>L.pl. I</i>	-	2	0	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	2	0	0	0	0	0
1000	<i>L.pl. I</i>	-	8	0	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	6	0	0	0	0	0

Çizelge 4.21. 500 mg/L K-Sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında *Lactobacillus plantarum*'un suşlarının (I-II) *Aspergillus niger* üzerinde oluşturduğu ortalama minimum inhibisyon konsantrasyonu (%)

		500 ppm K-Sorbit						
		Gün						
NaCl (mg/L)	L.A.B	1	2	3	4	5	6	7
0	<i>L.pl. I</i>	-	4,44	0	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	0	0	0	0	0	0
500	<i>L.pl. I</i>	-	4,44	0	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	2,22	0	0	0	0	0
1000	<i>L.pl. I</i>	-	8,89	0	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	6,67	0	0	0	0	0

4.3.4. *L.plantarum* suşlarının (I-II) 750 mg/L K-sorbit ve farklı NaCl Konsantrasyonlarında *Aspergillus niger* üzerindeki etkisi

750 mg/L K-Sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında *L. plantarum*'un iki ayrı suşunun (I-II) *A. niger* üzerinde oluşturduğu ortalama zon çapları Çizelge 4.22'de incelendiğinde artan K-sorbit oranının çok az değişimler haricinde dikkat çekecek bir farklılık yaratmadığı ancak suşlardan birinin 4.güne kadar zon çapı verdiği görülmektedir.

Çizelge 4.22. 750 mg/L K-Sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında *Lactobacillus plantarum*'un suşlarının (I-II) *Aspergillus niger* üzerinde oluşturduğu ortalama koloni çapı (mm)

		750 ppm K-Sorbit						
		Gün						
NaCl (mg/L)	L.A.B	1	2	3	4	5	6	7
0	<i>L.pl. I</i>	-	2	0	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	2	0	0	0	0	0
500	<i>L.pl. I</i>	-	6	6	4	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	4	2	0	0	0	0
1000	<i>L.pl. I</i>	-	10	4	2	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	8	0	0	0	0	0

Çizelge 4.23. 750 mg/L K-Sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında *Lactobacillus plantarum*'un suşlarının (I-II) *Aspergillus niger* üzerinde oluşturduğu ortalama minimum inhibisyon konsantrasyonu (%)

		750 ppm K-Sorbit						
		Gün						
NaCl (mg/L)	L.A.B	1	2	3	4	5	6	7
0	<i>L.pl. I</i>	-	2,22	0	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	2,22	0	0	0	0	0
500	<i>L.pl. I</i>	-	6,67	6,67	4,44	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	4,44	2,22	0	0	0	0
1000	<i>L.pl. I</i>	-	11,11	4,44	2,22	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	8,88	0	0	0	0	0

NaCl katılmaksızın 750 mg/L K-sorbat ile hazırlanan denemelerde her iki suşun da 2.gün 2 mm koloni çapı verdiği diğer günler ise zonun kaybolduğu tespit edilmiştir.

L.plantarum II suşu 500 mg/L ve 1000 mg/L NaCl'de 4.güne kadar zon çapını azalarak da olsa koruyabilmiş ancak 5.günden itibaren *A.niger* bu zon bölgesinde gelişmeye devam etmiştir.

Artan K-sorbat oranına rağmen *A.niger*'in laktik asit bakterileri ile engellenmesi sağlanamamıştır. 750 mg/L K-sorbat ile belirlenen konsantrasyonlardaki NaCl'ün de MİK değerlerinde etkili olmadığı görülmektedir. K-sorbat miktarının artmasına karşı küflerin bu konsantrasyonlarda K-sorbat'a dayanıklılık gösterebileceği gibi metabolize edebilme yeteneği olduğu düşünülmektedir. Finol ve ark. (1982) farklı konsantrasyonlarda K-sorbat ile hazırlanan besiyerlerine inoküle ettikleri küflerin gelişimini ve besiyerinde kalan potasyum sorbat miktarını tespit etmişlerdir. Başlangıç oranı 3000 ppm olan besiyerinde küflerin inokülasyonundan 6 gün sonra K-sorbat miktarının %90 azaldığı ölçülmüştür.

Yapılan çalışmada kullanılan 750 mg/L K-sorbat'ın farklı NaCl konsantrasyonları ile kombinasyonlarında *L.plantarum*'un yeterli olmadığı, *Aspergillus niger*'in agresif bir gelişim gösterdiği gözlemlenmektedir. Tropcheva ve ark., (2014) *L.brevis*'in bir suşunun *Aspergillus* cinsine ait bazı küf türlerinin gelişimini tamamen durdururken *A.niger*'i ancak 5 güne kadar engelleyebildiği görülmektedir.

Dirençli küf türlerini inhibe etmede koruyucuların konsantrasyonlarının dikkatli ayarlanması ve diğer parametrelerin değiştirilmesinin mevcut antifungal aktiviteyi artırabileceği düşünülmektedir.

Küflerin gelişimi üzerine etki eden ortamın pH ve su aktivitesi üzerinde durulması gereken parametrelerdir. Earle ve Putt (1984) uygun pH düzeyinin sorbik asit etkisini maksimuma kadar yükseltebileceğini belirtmektedir.

Nispeten yüksek pH değerlerine (5,5) sahip gıdalarda potasyum sorbat kullanımının, düşük su aktivitesi (0,80) ile uygulanmasının küflerin inhibisyonunda daha etkili

olabileceği ifade edilmektedir. *Aspergillus* türlerinin ürünün su aktivitesinin 0,86'dan düşük olması durumunda pH 4,5 değerinde potasyum sorbat oranının %0,25'e kadar düşürülebileceği tespit edilmiştir. Bununla beraber su aktivitesinde değişiklik yapmadan pH 4,5 değerinde K-sorbat'ın inhibisyon oranının pH 5,5 değerine göre daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. (Guynot ve ark., 2005a-b).

A.niger gibi dayanıklı küf türlerinin gelişiminin engellenmesinde K-sorbat gibi koruyucu maddelerin miktarı artırabilir, su aktivitesi üzerinde değişiklik yapmak ve küf gelişimini geciktirmek için NaCl gibi bileşikler ilave edilebilmektedir. Ancak K-sorbat ve benzeri koruyucuların küf gelişimini teşvik etmesi farklı koruyucu maddelerinin aranmasını gerektirmektedir. Katkı maddelerinin azaltılmasına yönelik tüketici isteği göz önünde bulundurulduğunda kimyasal koruyucuların miktarını azaltmak önemli bir konudur. Bu durumda var olan koruyucu yöntemlere yeni uygulamalar getirilmesi veya farklı yöntemler üretilmesi gerektiği düşünülmektedir.

4.3.5. *L.plantarum* suşlarının (I-II) 1000 mg/L K-sorbat ve farklı NaCl Konsantrasyonlarında *Aspergillus niger* üzerindeki etkisi

Denenen dozlar arasında 1000 mg/L K-sorbat'ın farklı NaCl konsantrasyonlarında laktik asit bakterilerinin verdiği zon çapları ve minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) çizelgelerde gösterilmektedir (Çizelge 4.24 ve 4.25).

NaCl katılmaksızın 1000 mg/L K-sorbat düzeyinde denemelerde *L.plantarum* suşlarının her ikisinin de 7.güne kadar zon vermeye devam ettiği kaydedilmiştir. 500 mg/L ve 1000 mg/L NaCl konsantrasyonlarında 2.gün nispeten yüksek sonuçlar alınmış ancak 3.günden itibaren hızlı bir düşüş yaşanarak *A.niger*'in gelişiminin artarak ilerlediği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.24. 1000 mg/L K-Sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında *Lactobacillus plantarum*'un suşlarının (I-II) *Aspergillus niger* üzerinde oluşturduğu ortalama koloni çapı (mm)

		1000 ppm K-Sorbit						
		Gün						
NaCl (mg/L)	L.A.B	1	2	3	4	5	6	7
0	<i>L.pl. I</i>	-	22	20	18	16	12	8
	<i>L.pl.II</i>	-	20	16	12	12	12	6
500	<i>L.pl. I</i>	-	16	2	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	14	2	0	0	0	0
1000	<i>L.pl. I</i>	-	14	2	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	12	0	0	0	0	0

Çizelge 4.25. 1000 mg/L K-Sorbit ve farklı NaCl konsantrasyonlarında *Lactobacillus plantarum*'un suşlarının (I-II) *Aspergillus niger* üzerinde oluşturduğu ortalama minimum inhibisyon konsantrasyonu (%)

		1000 ppm K-Sorbit						
		Gün						
NaCl (mg/L)	L.A.B	1	2	3	4	5	6	7
0	<i>L.pl. I</i>	-	24,44	22,22	20,00	17,78	13,33	8,89
	<i>L.pl.II</i>	-	22,22	17,78	13,33	13,33	13,33	6,67
500	<i>L.pl. I</i>	-	17,78	2,22	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	15,56	2,22	0	0	0	0
1000	<i>L.pl. I</i>	-	15,56	2,22	0	0	0	0
	<i>L.pl.II</i>	-	13,33	0	0	0	0	0

1000 mg/L K-sorbat düzeyi *A.niger* üzerinde *L.plantarum* suşlarının NaCl katılmayan besiyerinde oluşturduğu en yüksek koloni çaplarının ölçüldüğü doz olduğu tespit edilmiştir. *L.plantarum* I suşunun zon çapı 2. Gün 22 mm, *L.plantarum* II suşunun 20 mm olarak ölçülmüştür. Şekil 2’de 1000 ppm K-sorbat varlığında *A.niger*’in 14.gün sonunda petri kabındaki görünümü verilmektedir. Burada laktik asit bakterilerinin *A.niger*’in gelişimini engelleyemediği gözlemlenmektedir.

Şekil 4.2. 1000 ppm K-sorbat varlığında *L.plantarum* suşlarının ve *A.niger*’in 14.günde petri kabındaki görüntüsü



Artan NaCl oranının 1000 mg/L K-sorbat varlığında laktik asit bakterilerinin zon çapı ve MİK üzerinde belirgin bir gerilemeye sebep olduğu görülmektedir. *A.niger*’in NaCl varlığında gelişiminin gecikmesi beklenirken uygulanan konsantrasyonları tolere edebildiği tespit edilmiştir.

Cuppers ve ark. (1997) artan NaCl oranlarının küfler üzerindeki etkisini araştırdıkları bir çalışmada *A.niger*’in %3,4 NaCl konsantrasyonunda gelişme gösterebildiği kaydedilmiştir.

500 mg/L NaCl düzeyinde 2. gün *L.plantarum* I ve II’nin oluşturduğu koloni çapları sırasıyla 16 ve 14 mm olarak belirtilmiştir. Her iki suşun da 3.günden itibaren zon bölgeleri üzerinde *A.niger* gelişimi gözlenmiştir.

1000 mg/L K-sorbat ve 1000 mg/L NaCl dozlarında laktik asit bakterileri 2.gün nispeten yüksek engelleme sağlamış, ancak 3.günden itibaren engellenmenin durduğu tespit edilmiştir.

L.plantarum I-II suşlarının yalnızca NaCl katılmaksızın 1000 mg/L K-sorbat şartlarında 7.güne kadar inhibisyon zonunu koruduğu %6,67 ve 8,89 MİK değerleri ölçülmüştür. Bununla beraber Dallagnol ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada *L.plantarum* CRL 778 suşunun *A.niger* üzerinde 7. günde %46,9 oranında bir inhibisyon kaydetmişlerdir. Bu durum yapılan çalışmada kullanılan *L.plantarum* suşlarının *A.niger*'i inhibe etmede yeterli olmadığını ortaya koymaktadır. Wei ve ark., (2018), küflerin sorbik asit ve K-sorbat ile inhibe edilmesi mikroorganizmanın cinsine, türüne ve suşuna göre değişkenlik gösterebileceğini belirtmektedir. Bununla beraber Magnusson ve ark. (2003)'nın yapmış olduğu çalışmada bazı antifungal laktik asit bakterilerinin zamanla aktivitelerini yitirebileceklerini belirtmektedir. Bu durumun laktik asit bakterisinin ürettiği organik asitin yetersizliğinden veya pH değerine bağlı değişkenlik gösteren antifungal bileşiklerden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir (Muynck ve ark., 2004).

Artan NaCl konsantrasyonlarının tümünü tolere edebilen *A.niger* için denenen K-sorbat oranlarının yeterli olmadığı anlaşılmaktadır. Liewen ve Marth (1982) yaptıkları çalışmada *Aspergillus niger* de dahil *Aspergillus* cinsine ait küflerin ancak 2000 ppm potasyum sorbat varlığında engellenebildiğini kaydetmişlerdir. Bu da elde edilen verilerle uyumlu olduğunu göstermektedir.

Farklı potasyum sorbat konsantrasyonları içeren yenilebilir gıda paketlenmesi için kullanılacak gluten filmlerinin küfler üzerine etkilerini araştıran Türe ve ark. (2012) bu filmlerin *A.niger* üzerinde 2.9-3,1 mm kadar bir inhibisyon zonu oluşturduğunu tespit etmiştir. *A.niger* üzerinde yüksek inhibisyon zonu oluşumu için potasyum sorbat konsantrasyonunun en az %10 olması gerektiğini kaydetmişlerdir. Aynı çalışmada K-Sorbat içeren gluten filmlerinin yavaş gelişen küf türlerine (*Fusarium incarnatum*) hızlı gelişen küf türlerinden (*A.niger*) daha iyi etki ettiklerini belirtmektedir.

L.plantarum suşlarının *A.niger* üzerinde, *P.roqueforti*'ye göre daha az antifungal etki gösterdiği kaydedilmiştir. Denenen küf türlerinden en dirençli suşun *A.niger*'e ait olduğu tespit edilmiştir. *A.niger*'in hücre içermeyen kontrol petripleriyle yakın sonuçlar verdiği görülmektedir. Laktik asit bakterilerine direnç gösteren *A.niger*'in, K-sorbat ve NaCl konsantrasyonlarını da tolere ederek gelişmeye devam ettiği gözlemlenmiştir. Weng ve Chen (1997) tarafından yapılan bir çalışma ile de sorbik anhidridin *Penicillium* türleri üzerindeki inhibisyon etkisinin *A.niger*'e etkisinden daha fazla olduğu desteklenmiştir.

A.niger'in uygulanan K-sorbat-NaCl kombinasyonlarında ve laktik asit bakterileri varlığında gelişmeye devam etmesinin oluşturduğu bir direnç mekanizmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Mikroorganizmaların seçilmiş şartlar altında antimikrobilyellere karşı direnç göstermesi beklenen bir durumdur. Bazı koruyucu ve dezenfektanların uzun süreli kullanımı küfler üzerinde bu kimyasallara karşı bir direnç mekanizması oluşturmasına neden olabilmektedir (Levinskaite, 2012).

Küflerin direnç mekanizmalarını etkileyen genleri araştırılması üzerine yaptıkları çalışmada Plumridge ve ark. (2010) *Aspergillus* cinsine ait bazı küf türlerinin PasdA1 ve OhbA1 adlı genlerine bağlı olarak sorbik asiti dekarboksile ettiklerini tespit etmişlerdir. *A.niger* tarafından sorbik asitin dekarboksilasyon kapasitesinin yüksek olduğu ve bu durumun küfün aktif bir dayanıklılık mekanizmasına sahip olmasını sağladığı belirtilmektedir. Bazı *Penicillium* türlerinin de yüksek potasyum sorbat konsantrasyonlarında degradasyon sonucu küfler için toksik etkisi olmayan uçucu 1,3-pentadien oluşturduğu bildirilmiştir (Fadda ve ark., 2015).

A.niger ve *P.roqueforti* gibi koruyuculara direnç gösteren ve/veya metabolize edebilen küf türlerini inhibe etmede laktik asit bakterisi suşlarından antifungal etkisinin güçlü olanların seçilmesi gerektiği düşünülmektedir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda antifungal etkisi test edilen suşlardan bu potansiyele sahip olanlarının daha iyi anlaşılabilmesi için

diğerlerinden ayrılarak yakından incelenmelerinin önemli olduğu ifade edilmektedir (Ruggirello ve ark., 2019).

Son yıllarda kullanımı artan moleküler genetik ve rekombinant gen teknolojisi uygulamaları biyokoruyucu olarak kullanılacak mikroorganizmaların etkinliğinin artırılması konusunda gelecek vaat etmektedir.

Bu konuda yapılan çalışmalardan bazıları laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosinler üzerinde örnekler ortaya koymaktadır. Engeller teknolojisi kapsamında laktik asit bakterilerinin inhibisyon spektrumunun artırılması ve diğer doğal antimikrobiyellerle kombine edilmesi ile bakteriyosinlerin aktivitesinin geliştirilebileceği rapor edilmiştir (Field ve ark., 2018). Bununla beraber sentetik biyoloji çalışmalarının yardımı ile genetik sistem düzenlemelerinin nisin üretiminin artışı sağladığı Kong W ve ark., (2014) yaptıkları araştırmada belirtilmiştir. Martinez ve ark., (2018) yaptıkları çalışmada üzerindeki rekombinant gen teknolojisi uygulamaları ile *E.coli*'nin ürettiği nisin miktarının arttırılabileceğini ve aktivitesinin genişletilebileceğini tespit etmişlerdir.

Gelişen teknoloji ile laktik asit bakterilerinin suşlarından inhibisyon yeteneği daha iyi olanların belirlenmesi ve incelenmesi ile ilerde yapılacak analizler için yol gösterici olabileceği düşünülmektedir.

Laktik asit bakterilerinin antifungal olarak kullanımı etkin bir uygulama olarak görünse de dirençli küfler üzerindeki etkileri konsantrasyonlarına, ortamın pH değerine ve suşuna göre değişiklik gösterebileceği görülmektedir.

Antifungal suşların fermentasyonlarda starter olarak uygun olup olmadıkları ve son ürünün kalitesi üzerindeki etkileri her zaman göz önünde bulundurulmalıdır (Dal Bello ve ark., 2007). Ekmek fermentasyonunda *A.niger* gelişiminin, ilave edilen *L.plantarum*'un hücre konsantrasyonunu artırarak önüne geçilebildiği ancak bunun da fırıncılık endüstrisinde ürünün özellikleri üzerinde iyi sonuçlar vermediği nakledilmiştir (Ryan ve ark., 2008). Laktik asit bakterileri ve mayalar küf gelişimini kontrol altına

alabilen mikroorganizmalardır. Bununla birlikte çok sayıda mikroorganizmaların arasından en etkin suşun seçilmesi önemlidir (Ruggirello ve ark., 2019).

Tüketicilerin gıdalarda doğal koruyucuların kullanılmasına ve kimyasal koruyucuların azaltılmasına yönelik taleplerine de dikkat ederek uygun antifungal seçimine önem verilmelidir. Farklı konsantrasyonların kombinasyonu, yeni bileşiklerin ilave edilmesi, yeni yöntemlerin eklenmesi veya üretilmesi, bununla beraber gıda güvenliğinin de gözetilmesi ileride yapılacak çalışmalar için tavsiye edilmektedir.

A.niger için 7.gün sonunda varyans analizi yapılabilecek uygun değerler kaydedilememesi sebebiyle istatistiksel değerlendirilme uygulanamamıştır.

5. SONUÇ

Yapılan çalışmada deney materyali küfler *Penicillium roqueforti* ve *Aspergillus niger*'in farklı K-sorbat ve NaCl konsantrasyonlarında laktik asit bakterisi *Lactobacillus plantarum* suşları ile etkileşiminde farklı sonuçlar gözlenmiştir. Sonuçlar yakından incelendiğinde K-sorbat ve NaCl konsantrasyonlarının artan miktarlarıyla laktik asit bakterilerinin küfler üzerinde oluşturduğu zon çaplarının arttığı gözlemlenmiştir. Ancak bu artış miktarının belli bir düzey üzerine çıktığında zon çaplarının azaldığı kaydedilmiştir.

Yapılan çalışmada 250 ve 750 ppm K-sorbat varlığında 7 güne kadar laktik asit bakterilerinin *P.roqueforti* üzerinde oluşturduğu zon bölgesinin azaldığı tespit edilmiştir. K-sorbat'ın 1000 ppm olduğu durumlarda en yüksek MİK değerleri kaydedilmiştir. NaCl katılmaksızın 1000 mg/L K-sorbat varlığında *P.roqueforti*'nin *L.plantarum* varlığında 14 güne kadar gelişiminin engellendiği gözlemlenmiştir.

K-sorbat ile birlikte artan NaCl konsantrasyonunun belirli dozlarında *L.plantarum* suşlarının *A.niger* ve *P.roqueforti* üzerinde oluşturduğu zonlarda artış gösterdiği, konsantrasyonun yükselmesiyle bu artışın azaldığı tespit edilmiştir. Bu durumun küflerin yüksek miktarda NaCl'ü tolere edip gelişimlerini sürdürebilme yetenekleri olabileceği düşünülmektedir.

A.niger'in *P.roqueforti*'ye kıyasla daha dirençli bir küf olduğu, artan K-sorbat ve NaCl miktarlarını tolere edebildiği ve *L.plantarum* suşlarının bu küf türünü gerilemediği tespit edilmiştir.

A.niger üzerindeki gerilemenin en yüksek olduğu kombinasyonun NaCl katılmaksızın hazırlanan besiyerinde 1000 mg/L K-sorbat varlığında olduğu gözlemlenmiştir.

Yapılan çalışmada seçilen *L.plantarum* suşlarının (I-II) belirli konsantrasyonlarda K-sorbat ve NaCl kombinasyonları ile deneme materyali *P.roqueforti* ve *A.niger* küflerinin gelişimlerini geciktirebildiği ancak tamamen durduramadığı belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Al Tamie, M.S.S., 2016.** Sodium Chloride Stress Induced Morphological Changes in Some Halotolerant Fungi. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 62: 109-126.
- Anonim, 2016.** Salt Reduction. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salt-reduction> (30.06.2016)
- Anonim, 2018.** Salt. Food Standart Agency. www.food.gov.uk/business-guidance/salt- (29.10.2018)
- Batish, V.K., Lai, R., Grover, S. 1990.** Studies on environmental and nutritional factors on production of antifungal substance by *Lactobacillus acidophilus* R. *Food Microbiology*, 7: 199-206.
- Belz, M.C.E., 2016.** Reduction of salt in yeasted wheat bread: impact on bread quality and solutions using sourdough fermented by functional lactic acid bacteria strains. *PhD thesis*, School of Food and Nutritional Sciences, The National University Of Ireland, Cork, Ireland Republic.
- Bianchini A., Bullerman L.B., 2009.** Biological Control of Molds and Mycotoxins in Foods: Mycotoxin Prevention and Control in Agriculture, Ed.: Trucksess, M.W., Kendra, D.F., Lincoln, NE, ABD, pp: 1-16.
- Bianchini, A. 2015.** Lactic acid bacteria as antifungal agents: Advances in Fermented Foods and Beverages, Ed: Holzapfel, W., University of Nebraska–Lincoln, Lincoln, NE, USA, pp. 333-353.
- Carocho, M., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R., 2015.** Natural food additives: *Quo vadis? Trends in Food Science & Technology*, 45:284-295.
- Casado, F.J., Sánchez, A.H., Rejano, L., de Castro, A., Montaña, A., 2010.** Stability of sorbic and ascorbic acids in packed green table olives during long-term storage as affected by different packing conditions, and its influence on quality parameters. *Food Chemistry*, 122: 812-818.
- Chen, A.W., 1964.** Soil Fungi with High Salt Tolerance. *Transactions of the Kansas Academy of Science*, 67: 36-40.
- Crowley, S., Mahonya, J., van Sinderen, D., 2013.** Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 33: 93-109.
- Cuppers, H.G.A.M., Oomes, S., Brul S., 1997.** A Model for the Combined Effects of Temperature and Salt Concentration on Growth Rate of Food Spoilage Molds. *Applied And Environmental Microbiology*, 63: 3764–3769.
- Dal Bello, F., Clarke, C.I., Ryan, L.A.M., Ulmer, H., Schober, T.J., Ström, K., Sjögren, J., van Sinderen, D., Schnürer, J., Arendt, E.K., 2007.** Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *Journal of Cereal Science*, 45:309–318.
- Dalié D.K.D., Deschamps A.M., Richard-Forget F., 2010.** Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21: 370-380.
- Dalié, D.K.D., Deschamps, A.M., Richard-Forget, F., 2010.** Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21: 370-380.
- Dallagnol, A.M., Bustos, A.Y., Martosa, G.I., Font de Valdeza, G., Gerez, C.L., 2018.** Antifungal and antimycotoxigenic effect of *Lactobacillus plantarum* CRL 778 at different wateractivity values. *Revista Argentina de Microbiología*, 51: 164-169.

- De Muynck, C., Leroy, A.I.J., De Maeseneire, S., Arnaut, F., Soetaert, W., Vandamme, E.J., 2004.** Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiological Research*, 159: 339-346.
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Pietro, A.D., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G.D. 2012.** The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13: 414–430.
- Dehghan, P., Mohammadi, A., Mohammadzadeh-Aghdash, H., Dolatabadi, J.E.N., 2018.** Pharmacokinetic and toxicological aspects of potassium sorbate food additive and its constituents. *Trends in Food Science & Technology*, 80: 123–130.
- Fadda, A., Barberis, A., D'Aquino, S., Palma, A., Angioni, A., Lai, F., Schirra, M., 2015.** Residue levels and performance of potassium sorbate and thiabendazole and their co-application against blue mold of apples when applied as water dip treatments at 20 or 53°C. *Postharvest Biology and Technology* 106: 33-43.
- Fernandez, B., Vimont, A., Desfossés-Foucault, E., Daga, M., Arora, G., Fliss, I., 2017.** Antifungal activity of lactic and propionic acid bacteria and their potential as protective culture in cottage cheese. *Food Control*, 78: 350-356.
- Field, D., Ross, R.P., Hill, C., 2018.** Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives. *Current Opinion in Food Science*, 20:1–6.
- Filtenborg, O., Frisvad, J.C., Thrane, U. 1996.** Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 85-102.
- Finol, M.L., Marth, E.H., Lindsay R.C., 1982.** Depletion of Sorbate from Different Media During Growth of *Penicillium* Species. *Journal of Food Protection*, 45: 398-404.
- Gagiu, V., Israel-Roming, F., Belc, N., Dima, R., 2013.** Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* strains and calcium propionate on spoilage fungi. *Romanian Biotechnological Letters*, 18: 8214-8220.
- Gálvez, A., Abriouel, H., Benomar, N., Lucas, R. 2010.** Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Current Opinion in Biotechnology*, 21: 142-148.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Omar, N.B. 2007.** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120: 51-70.
- Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerie, L., Frotte, N., Baroncelli, R., Deniel, F., Coton, E., Mounier, J. 2017.** Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 241: 191–197.
- Gerez, L.,C., Torino, M., I., Rollan, G., Font de Valdez, G., 2009.** Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control*, 20: 144–148.
- Gougouli, M., Koutsoumanis, P.K., 2012.** Modeling germination of fungal spores at constant and fluctuating temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*: 152: 153–161.
- Greenland, A.,J., Mateos, A.M.F., 2003.** Antifungal composition. *United States Patent*, No: 6599514 tarih 29.07.2003.
- Gupta, R., Srivastava, S. 2014.** Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage. *Food Microbiology*, 42: 1-7.
- Guynot, M.E., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2005b.** An attempt to optimize potassium sorbate use to preserve low pH (4.5–5.5) intermediate moisture bakery

- products by modelling *Eurotium* spp., *Aspergillus* spp. and *Penicillium corylophilum* growth. *International Journal of Food Microbiology*, 101: 169-177.
- Guynot, M.E., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S., 2005a.** Study of benzoate, propionate, and sorbate salts as mould spoilage inhibitors on intermediate moisture bakery products of low pH (4.5–5.5). *International Journal of Food Microbiology*, 101: 161-168.
- Gyawali, R., İbrahim, S.A. 2014.** Nutraceuticals and Food Additives. *Food Control*. 46: 412-429.
- Halkman A.K., 2013.** Mikroorganizma Analiz Yöntemleri: Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları, Editörler: Halkman A.K., Başak Matbaa, Ankara.
- Hassan, Y.I., Bullerman, L.B., 2008.** Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* isolated from a sourdough bread culture. *International Journal of Food Microbiology*, 121: 112–115.
- Huang Y., Begum, M., Chapman, B., Hocking A.D., 2010.** Effect of reduced water activity and reduced matric potential on the germination of xerophilic and non-xerophilic fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 140: 1–5.
- İrkin R., Korukluoglu M., 2009.** Control of Some Filamentous Fungi and Yeasts by Dehydrated *Allium* Extracts. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 4: 3-6.
- Junqueira-Gonçalves, M.P., Alarcón, E., Niranjanc, K., 2016.** The efficacy of potassium sorbate-coated packaging to control postharvest gray mold in raspberries, blackberries and blueberries. *Postharvest Biology and Technology*, 111: 205–208.
- Kaiser, C., van der Merwe, R., Bekker, T.F., Labuschagne, N., 2005.** *In-vitro* inhibition of mycelial growth of several phytopathogenic fungi, including *Phytophthora cinnamomi* by soluble silicon. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, 28: 70-74.
- Kalyoncu, F. 2008.** Gıda sanayinde sıklıkla kullanılan antifungal katkı maddeleri. *e-Journal of Food Science Academy*. 3: 465-473.
- Kurita, N., Koike, S., 1982.** Synergistic Antimicrobial Effect of Sodium Chloride and Essential Oil Components. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46:159-165.
- Kurita, N., Koike, S., 1983.** Synergistic Antimicrobial Effect of Ethanol, Sodium Chloride, Acetic Acid and Essential Oil Components. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47:67-75.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., Gobbetti, M., 2000.** Purification and Characterization of Novel Antifungal Compounds from the Sourdough *Lactobacillus plantarum* Strain 21B. *Applied And Environmental Microbiology*, 66: 4084–4090.
- Le Lay, C., Coton, E., Le Blay, G., Chobert, J.M., Haertlé, T., Choiset, Y., Van Long, N. N., Meslet-Cladière, L., Mounier, J., 2016.** Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria and propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 239:79–85.
- Le Lay, C., Mounier, J., Vasseur, V., Weill, A., Le Blay, G., Barbier, G., Coton, E. 2015.** *In vitro* and *in situ* screening of lactic acid bacteria and propionibacteria antifungal activities against bakery product spoilage molds. *Food Control*, 60: 247-255.
- Leistner, L., 1992.** Food preservation by combined methods. *Food Research International* 25: 151-158.

- Levinskaitė, L., 2012.** Susceptibility of food-contaminating *Penicillium* genus fungi to some preservatives and disinfectants. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19:85-89.
- Li, J., Lei, H., Song, H., Lai, T., Xu, X., 2017.** 1-methylcyclopropene (1-MCP) suppressed postharvest blue mold of apple fruit by inhibiting the growth of *Penicillium expansum*. *Postharvest Biology and Technology*, 125: 59-64.
- Liewen M.B., Marth E.H. 1983.** Inhibition of *Penicillia* and *Aspergilli* by Potassium Sorbate. *Journal of Food Protection*, 47: 554-556.
- Liewen M.B., Marth E.H. 1984.** Growth of Sorbate-Resistant and -Sensitive Strains of *Penicillium roqueforti* in the Presence of Sorbate. *Journal of Food Protection*, 48: 525-529.
- Lo´pez-Malo A., Alzamora, S.M., Palou, E., 2002.** *Aspergillus flavus* dose–response curves to selected natural and synthetic antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology*, 73: 213– 218.
- Luz, C., Ferrer, J., Mañes, J., Meca, G., 2018.** Toxicity reduction of ochratoxin A by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 112:60–66.
- Luz, C., Saladino, F., Luciano, F.B., Manes, J., Meca, G., 2017.** *In vitro* antifungal activity of bioactive peptides produced by *Lactobacillus plantarum* against *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium expansum*. *Food Science and Technology*, 81:128-135.
- Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J., Schnürer, J., 2003.** Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 219:129–135.
- Marín, S., Guynot, M.E., Neira, P., Bernadó, M., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2002.** Risk assessment of the use of sub-optimal levels of weak-acid preservatives in the control of mould growth on bakery products. *International Journal of Food Microbiology*, 79: 203-211.
- Mark, R., Lyu, X., Lee, J.J.L., Parra-Saldívar, R., Chen, W.N., 2019.** Sustainable production of natural phenolics for functional food applications. *Journal of Functional Foods*, 57:233–254.
- Marth, E.H., Capp, C.M., Hasenzahl, L., Jackson, H.W., Hussong, R.V., 1966.** Degradation of Potassium Sorbate by *Penicillium* Species. *Journal of Dairy Science*, 49: 1197-1205.
- Martínez, B., García, P., Rodríguez, A., 2018.** Swapping the roles of bacteriocins and bacteriophages in food biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 56:1–6.
- Matei A., Cornea, C.P., Matei, G.M., 2015.** Antifungal activity of lactic acid bacteria strains against *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* isolated from brined vegetables. *Journal of Biotechnology*, 208: 79-79.
- Mohammadzadeh-Aghdash, H., Sohrabi, Y., Mohammadi, A., Shanehbandi, D., Dehghan, P., Dolatabadi, J.E.N., 2018.** Safety assessment of sodium acetate, sodium diacetate and potassium sorbate food additives. *Food Chemistry*, 257:211–215.
- Mohapatra, D., Kumar, S., Kotwaliwale, N., Kumar Singh, K. 2017.** Critical factors responsible for fungi growth in stored food grains and non-Chemical approaches for their control. *Industrial Crops & Products*, 108: 162-182.
- Moldes, A.B., Vecino, X., Cruz J.M. 2017.** Nutraceuticals and Food Additives: Current developments in biotechnology and bioengineering, Ed.: Pandey, A., Du, G., Sanromán, M., Socol, M., Dussap, C.D, University of Vigo, Vigo-Pontevedra, SPAIN, pp: 143-164.

- Montaño, A., Sánchez, A.H., Casado, F.J., Beato, V.M., Castro, A., 2013.** Degradation of ascorbic acid and potassium sorbate by different *Lactobacillus* species isolated from packed green olives. *Food Microbiology*, 34: 7-11.
- Nikkhah M., Hashemi M., Najafi, M.B.H., Farhoosh R., 2017.** Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 257: 285-294
- Oliveira, P.M., Brosnan, B., Coffey, A., Zannini, E., Arendt, E.K., 2015.** Lactic acid bacteria bioprotection applied to the malting process. Part I: Strain characterization and identification of antifungal compounds. *Food Control*, 51: 433-443.
- Omar, S.A., Abdel-Sater, M, Khallil A.M., Abd-Alla, M.H., 1994.** Growth and Enzyme Activities of Fungi and Bacteria in Soil Salinized with Sodium Chloride. *Folia Microbiologica*, 39: 23-28.
- Peyer, L.C., Axel, C., Lynch, K.M. , Zannini, E., Jacob, F., Arendt, E.K., 2016.** Inhibition of *Fusarium culmorum* by carboxylic acids released from lactic acid bacteria in a barley malt substrate. *Food Control*, 69:227-236.
- Pisoschi, A.M., Pop, A., Georgescu, C., Turcuş, V., Olah, N.K., Mathe, E., 2018.** An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry* 143: 922-935
- Plumridge, A., Melin, P., Stratford, M., Novodvorska, M., Shunburne, L., Dyer, P.S., Roubos, J.A., Menke, H., Stark, J., Stam, H., Archer, D.B., 2010.** The decarboxylation of the weak-acid preservative, sorbic acid, is encoded by linked genes in *Aspergillus* spp. *Fungal Genetics and Biology*, 47: 683-692.
- Quattrini, M., Lianga N., Grazia Fortinab M., Xianga S., Curtisa J. M., Gänzlea, M., 2018.** Exploiting synergies of sourdough and antifungal organic acids to delay fungal spoilage of bread. *International Journal of Food Microbiology*, 302: 8-14.
- Razzavi-Rohani, S.M., Griffiths, M.W., 2007.** Antifungal effects of sorbic acid and propionic acid at different pH and NaCl conditions. *Journal of food safety*, 19: 109-120.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Andrade, M.J., Córdoba, J.J. 2015.** Detection of filamentous fungi in foods. *Current Opinion in Food Science*, 5: 36-42.
- Romanazzi, G., Smilanick, J.L., Feliziani, E., Droby, S. 2016.** Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biology and Technology*, 113: 69-76.
- Ruggirello, M., Nucera, D., Cannoni, M., Peraino, A., Rosso, F., Fontana, M., Cocolin, L., Dolci, P., 2019.** Antifungal activity of yeasts and lactic acid bacteria isolated from cocoa bean fermentations. *Food Research International*, 115:519–525.
- Russell A.D., Furr J.R., 1996.** Biocides: mechanisms of antifungal action and fungal resistance. *Science Progress*, 79 (1): 27-48.
- Russell N, Gould, G.W., 2003.** Food preservatives. New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 74-75.
- Russo, P., Pia Arena, M., Fiocco, D., Capozzi, V., Drider, D., Spano, G., 2017.** *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *International Journal of Food Microbiology*, 247: 48–54.
- Samapundo S., Deschuyffeleer N., Van Laere D., De Leyn, I., Devlieghere F., 2010.** Effect of NaCl reduction and replacement on the growth of fungi important to the spoilage of bread. *Food Microbiology*, 27: 749-756.

- Samapundo, S., Devlieghere, F., Vroman A., Eeckhout, M., 2016.** Antifungal properties of fermentates and their potential to replace sorbate and propionate in pound cake. *International Journal of Food Microbiology*, 237: 157–163.
- Sathe1, S.J., Nawani1, N.,N., Dhakephalkar P.K., Kapadnis, B.P., 2007.** Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2622–2628.
- Schnürer, J., Magnusson, J., 2005.** Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science and Technology*, 16: 70-78.
- Siedler, S., BaltiR., Neves, A.R., 2019.** Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. *Current Opinion in Biotechnology*, 56:138–146.
- Stanojevic, D., Comic, L., Stefanovic, O., Solujic-Sukdolak, S., 2009.** Antimicrobial effects of sodium benzoate, sodium nitrite and potassium sorbate and their synergistic action in vitro. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 15: 307-311.
- Stopforth, J.D., Sofos, J.N., Busta, F.F., 2005.** Sorbic acid and sorbates. Ed.: Davidson, M., Sofos, J.N., Branen L.A. *Antimicrobials in Food*. CRC Press. USA.49-75/681. Boca Raton. Florida.
- Stratford, M., Anslow, PA., 1998.** Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic 'weak acid preservative'. *Letters In Applied Microbiology*, 27 (4): 203-206.
- Sukorini, H., Sangchote, S., Khewkhom, N., 2013.** Control of postharvest green mold of citrus fruit with yeasts, medicinal plants, and their combination. *Postharvest Biology and Technology*, 79: 24-31.
- Topal, Ş. 1984.** Gıda maddelerinden izole edilen ve identifiye edilen küfler üzerinde araştırmalar. *Tübitak MAE*, 5: 253-261.
- Tournas, V.H., Heeres, J., Burgess, L., 2006.** Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiology*, 23: 684–688.
- Tresner H.D., Hayes J.A., 1971.** Sodium Chloride Tolerance of Terrestrial Fungi. *Applied Microbiology*, 22: 210-213.
- Tropcheva, R., Nikolova, D., Evstatieva, Y., Danova, S., 2014.** Antifungal activity and identification of Lactobacilli, isolated from traditional dairy product “katak”. *Anaerobe*, 28:78-84.
- Türe, H., Gällstedt, M., Hedenqvist, M.S., 2012.** Antimicrobial compression-moulded wheat gluten films containing potassium sorbate. *Food Research International*, 45: 109-115
- Türkkan, M., 2013.** Antifungal Effect of Various Salts Against *Fusarium oxysporum* f.sp.cepae, the Causal Agent of Fusarium Basal Rot of Onion. *Journal of Agricultural Sciences*, 19: 178-187.
- Van Long, N.N., Vasseur, V., Coroller, L., Dantigny, P., Le Panse, S., Weill, A., Mounier J., Rigalma, K., 2017.** Temperature, water activity and pH during conidia production affect the physiological state and germination time of *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 241: 151-160.
- Wei, Q., Wang, X., Chenga, J.H., Zenga, G., Sun, D.W., 2018.** Synthesis and antimicrobial activities of novel sorbic and benzoic acid amide derivatives. *Food Chemistry*, 268:220–232.
- Wen, L.S., Philip, K., Ajam, N., 2016.** Purification, characterization and mode of action of plantaricin K25 produced by *Lactobacillus plantarum*. *Food Control*, 60: 430-439.

- Weng, Y.M., Chen, M.J., 1997.** Sorbic Anhydride as Antimycotic Additive in Polyethylene Food Packaging Films. *Lebensmittel-Weissenschaft und- Technologie*, 30: 485-487.
- Yiğit, A., Korukluoğlu, M., 2007.** The effect of potassium sorbate, NaCl and pH on the growth of food spoilage fungi. *Annals of Microbiology*, 57 (2): 209-215.
- Yin, M., Tsao, S., 1999.** Inhibitory effect of seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology*, 49: 49-56.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Yasemin Şefika KÜÇÜKATA
Doğum Yeri ve Tarihi : Osmangazi/ 29.10.1992
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Yalova Anadolu İmam Hatip Lisesi (2006-2010)
Lisans : Atatürk Üniversitesi (2010-2014)
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi (2015-2019)

İletişim (e-posta) : yaseminkucukata10@gmail.com

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

Yazar Adı Soyadı	Yasemin Şefika KÜÇÜKATA
Tez Adı	LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN ANTİFUNGAL ETKİSİ
Enstitü	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Gıda Mühendisliği
Tez Türü	Yüksek Lisans Tezi
Tez Danışman(lar)ı	Prof. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU
Çoğaltma (Fotokopi Çekim) izni	<input type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimin sadece içindekiler, özet, kaynakça ve içeriğinin % 10 bölümünün fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input checked="" type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin vermiyorum
Yayımlama izni	<input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin veriyorum

Hazırlamış olduğum tezimin belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Bursa Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

Tarih : 21.10.2019

İmza :

