



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**ET VE FERMENTE ET ÜRÜNLERİNDEN İZOLE EDİLEN *Lactobacillus sake* ve
Lactobacillus curvatus SUŞLARININ MOLEKÜLER VE BİYOKİMYASAL
İDENTİFİKASYONU VE BAZI TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Aykut GÜLEREN

(DOKTORA TEZİ)

Bursa-2008



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

ET VE FERMENTE ET ÜRÜNLERİNDEN İZOLE EDİLEN *Lactobacillus sake* ve
Lactobacillus curvatus SUŞLARININ MOLEKÜLER VE BİYOKİMYASAL
İDENTİFİKASYONU VE BAZI TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Aykut GÜLEREN

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Mustafa TAYAR

Bursa-2008

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı tarafından TAGEM/GY/03/11/01/099 proje numarasıyla desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	II
İNGİLİZCE ÖZET	III
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER	4
Et Fermentasyonu	4
Fermente Sucuk	5
Starterler.....	6
Laktik Asit Bakterileri	8
Laktobasillerin Taksonomisi	12
PCR.....	13
GEREÇ ve YÖNTEM	16
Araştırma Planı.....	16
Mikrobiyolojik Analiz Yöntemleri	17
PCR analizleri.....	21
BULGULAR	32
TARTIŞMA ve SONUÇ	48
KAYNAKLAR.....	51
TEŞEKKÜR	58
ÖZGEÇMİŞ	59

ÖZET

Bu çalışmayla, ülkemizde çiğ etlerdeki ve geleneksel yöntemlerle üretilen fermente et ürünlerindeki laktik asit bakterilerinin izolasyonu ile moleküler ve biyokimyasal tekniklerle identifikasyonu sağlayarak mikroorganizmaların karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

Türkiye'nin çeşitli illerinden (Adapazarı, Afyon, Ankara, Balıkesir, Bursa, Çankırı, Diyarbakır, Edirne, Eskişehir, İstanbul, İzmir, Kayseri, Kocaeli, Kütahya, Manisa, Mardin, Mersin, Muğla, Şırnak, Tekirdağ ve Yalova) temin edilen sucuk, pastırma ve çiğ et numunelerinden izole edilen 234 adet izolata Mini API'de tür tayini analizi uygulandı. İzolatların 174 adedi daha sonra moleküler Real Time PCR ile türe spesifik primerler kullanılarak olarak test edildi. *Lactobacillus brevis* (74 izolat) en yaygın tür olarak identifiye edilirken, *Lactobacillus plantarum* (46 izolat) ve *Lactobacillus pentosus* (8 izolat) diğer laktobasil türleri olarak tanımlandı. Laktobasillerle birlikte *Pediococcus pentosaceus* (9 izolat), ve *Pediococcus acidilactici* (2 izolat) her iki teknikle de (API and PCR) tanımlanan izolatlar oldu.

Key words: *Lactobacillus*, fermente et, PCR, sucuk

SUMMARY

Moleculer and Biochemical Idenfication of *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus curvatus* Strains and Determinations of Some Technological Properties

This research was carried out in order to izolation of the lactic acid bacterias special for traditional Turkish fermented meat product's and raw meat's microflora; then identification with moleculer and biochemical technics.

234 izolates were obtained from three kind of samples (raw meat, soudjuck and pastirma) of Turkey from the following provincial locations: Adapazarı, Afyon, Ankara, Balıkesir, Bursa, Çankırı, Diyarbakır, Edirne, Eskişehir, İstanbul, İzmir, Kayseri, Kocaeli, Kütahya, Manisa, Mardin, Mersin, Muğla, Şırnak, Tekirdağ and Yalova. After Mini API carbohydrat tests were performed; 176 izolates were analysed with Real Time PCR (Cepheid Smart Cyclor) by using spesific primers for each microorganism species. *Lactobacillus brevis* was identified as the most common microorganism species (74 izolates). Other *lactobacillus* species were *Lactobacillus plantarum* (46 izolates) and *Lactobacillus pentosus* (8 izolates). *Pediococcus pentosaceus* (9 izolates), and *Pediococcus acidilactici* (2 izolates) were also identified with both (API and PCR) techniques.

Key words: *Lactobacillus*, meat fermentation, PCR, soudjuck

GİRİŞ

Gıda maddelerinin fermantasyon işlemine tabi tutularak işlenmesi çok eski zamanlardan beri bilinen ve kullanılan bir tekniktir. Et, süt, bitkisel ürünler, balıklar, sebzeler ve unlu mamüllerin dayanımını, lezzetini ve besleyici değerini arttırmak amacıyla dünyanın değişik kısımlarında fermantasyon bakterileri olarak adlandırılan mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Fermente ürünlerden yoğurdun fermantasyonunda daha ziyade *Streptococcus thermophilus* (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*), *Lactobacillus bulgaricus* (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), *Bifidobacterium bifidus* gibi mikroorganizmalar kullanılırken; peynirlerde *Lactococcus lactis*, tereyağlarında ise *Lactococcus lactis* var *diacetylactis* ile *Leuconostoc mesenteroides* istenen diasetil aromasının şekillenmesi için kullanılmaktadır (1, 2).

Benzer şekilde oda sıcaklığında fermente olan et ürünlerinde en sık görülen mikroorganizmalardan *Lactobacillus sake* ve *Lactobacillus curvatus*'un istenen kalitede ürün elde edilmesi için starter olarak kullanılan başlıca mikroorganizmalar olduğu görülmektedir (3).

Starter kültür üretiminde yurdumuzda en yaygın olarak kullanılan Laktobasiller, mikroskop altında çoğunlukla uzun zincirler halinde görülmekle birlikte tek tek de bulunabilirler. Genellikle hareketsiz, çoğu mikroaerofilik veya anaerobik olup homofermentatif ve heterofermentatif türleri bulunmaktadır (4).

Bitki ve hayvansal materyal üzerinde ve çeşitli gıdalarda (hububat, et ve süt ürünleri, bira, şarap meyve ve meyve suyu, hamur, turşu ve zeytin) yaygın olarak bulunurlar. Bazıları fermente süt ürünlerinin üretiminde önemlidir. Pek çoğu laboratuarda vitamin ve amino asit tayininde ve et ürünlerinin işlenmesinde starter kültür olarak kullanılırlar. Bu cins içinde *Betabacterium*, *Streptobacterium*, *Thermobacterium* olmak üzere 3 farklı grup bulunmaktadır. Zorunlu heterofermentatif *Lactobacillus* türlerinin (örneğin, *Lactobacillus brevis*) hepsi *Betabacterium* içinde yer almaktadır. Homofermentatif ve fakültatif heterofermentatif *Lactobacillus* türleri ise *Streptobacterium* ve *Thermobacterium* grubu içindedir. *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* *Thermobacterium* grubunda yer alır, 40 °C'de optimum gelişirler, %3 veya daha yüksek miktarda laktik asit üretirler. *Lactobacillus casei*, *Streptobacterium* grubu içindedir, optimum gelişme sıcaklığı 30 °C' dir ve %1,5 veya daha yüksek miktarda laktik asit üretirler (5).

Fermente et ürünlerinin ana hammaddesi olan çiğ et gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalar ile kontamine olabilmekte ve uygulanan işlemlere göre fermente et ürünü bu patojen mikroorganizmaları içermektedir. Fermente et ürünlerinde starter kültürlerin kullanımı sağladıkları avantajlar nedeniyle gittikçe yaygınlaşmaktadır(6).

Bu avantajlardan biri de patojenler üzerine inhibisyon etki göstermeleridir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen laktik asitin pH'ı düşürmesi, bazı laktik asit bakterilerinin salgıladığı bakteriosinler, besin maddeleri için rekabet ve küf starterlerinin oluşturduğu antimikrobiyel maddeler patojenleri inhibe etmektedir (7, 8).

Laktobasiller çoğu taze ve fermente etlerin mikroflorasına hakimdirler (9). İstenen özelliklere sahip *Lactobacillus* suşlarının temini ancak biyolojik açıdan çeşitlilik gösteren ve sayısal olarak zengin mikroorganizma koleksiyonları içerisinde aranan niteliklere sahip suşların araştırılmasıyla mümkündür. Bu konu hakkında gerekli tedbirleri zamanında alan ülkeler sadece kendi ülkelerindeki biyolojik çeşitliliği değil, aynı anda dünyanın değişik bölgelerindeki çeşitlilikleri de kendi koleksiyonlarına katarak zenginliklerini arttırmışlardır. Bugün dünyada değişik enstitü ve araştırma birimlerinde 100'e yakın laktik asit bakteri koleksiyonu oluşturulmuştur. Bu suşların elde edilmesi oldukça sıkı koşullara bağlanmıştır. Ülkemizde ise özellikle et ürünlerinin fermantasyonunda kullanılan mikroorganizmaların korunması üzerindeki çalışmalar yeterli değildir. Bu nedenle mevcut biyolojik zenginliğimizin korunması TÜBİTAK'a (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu) bağlı TÜBA (Türkiye Bilimler Akademisi) tarafından öncelikli araştırma alanlarından biri olarak belirlenmiştir.

Laktik asit bakterileri; faj savunma sistemleriyle, rekombinant protein ekspresyonundaki rolleriyle ve bunlara ilaveten, belki daha önemli olarak vücuda zarar vermemeleriyle vücutta ekspresyonları açısından yaygın şekilde kullanılmakta olup, bu konuda dünya çapında pek çok patent alınmıştır. Ülkemizde ise özellikle gıda sanayinde kullanılan ve laktik asit bakterilerinden elde edilen kültürler yurt dışından ithal edilmektedir (10).

Bu sayede ülkemiz hem yurt dışına maddi kaynak aktarımı yapmakta, hem de, ithal edilen kültürler sayesinde gün geçtikçe kendi yerel kaynaklarımız azalarak yok olma noktasına doğru gitmektedir. Ülkelerin bakteriyel mikroflorası bir diğerinden farklı olup değişik coğrafik bölgelere bağlı olarak, birbirinden farklı mikroorganizma suşları bulunmaktadır. Bunlar yalnızca farklı ülkelerde değil, aynı devletin farklı bölgelerinde dahi değişik özelliklere sahip olabilmektedirler. Fermente et ürünleri üretiminde -yurtdışından kültür ithal edenler hariç tutulursa - lokal suşlar kullanılmaktadır (11).

Bilimde önde giden ülkeler yaptıkları çalışmalarla kendi ülkelerindeki suşların koleksiyonunu oluşturmuşlar, bunların değişik özelliklerini belirlemişler ve teknolojik olarak kullanılabilir olanlarına patent almışlardır. Şu aşamada kendi ülkeleri dışındaki mikroorganizmalar ile ilgilenmeye başlamış olup, bunlardan istenilen bilimsel özelliklere sahip olanlarını tespit edip patentini aldıkları takdirde, suşu ülkesinde bulduran ülkenin bunu kullanabilmesi için patent alan ülkeye patent ücreti ödemekten başka çaresi kalmamaktadır. Bu yüzden laktik asit bakterilerinin koleksiyonunun oluşturularak genetik çeşitliliğimizin korunması, ülkemize özgü starter kültür bakterileri mikroflorasının tanınması, Türkiye'nin genetik kaynakları olan yerel fermantasyon bakterilerinin et ürünlerinde endüstriyel olarak kullanılmasına giden yolun açılması, ülkemizin döviz kaynaklarının dışarıya akmaması ve genetik zenginliğimizin koruma altına alınmasının gerekliliği aşikardır. Bu sayede, her biri ayrı birer genetik zenginlik olan fermantasyon bakterileri koleksiyonu ile, ilerideki aşamalarda bilimsel ve teknolojik açıdan önem arz eden yeni gen ürünleri elde edilebilmesinde gerekli olan ilk adım atılması ayrı bir önem taşımaktadır.

GENEL BİLGİLER

1. Et Fermentasyonu

Fermente et ürünlerinin üretiminde birçok kimyasal, biyokimyasal ve mikrobiyolojik değişiklikler meydana gelmekte ve ürüne has tat, koku, aroma ve renk gelişimleri gerçekleşmektedir (12). Meydana gelen bu değişikliklerin oluşumu birbirleriyle etkileşen birçok karmaşık reaksiyonlara bağlıdır . Etin fermentasyonu esnasında gerçekleşen lipoliz, proteoliz ve glikoliz reaksiyonları urune kendine has tat, koku ve lezzeti vermektedir (13). Rigor mortis devresinden önce et, kana esdeger lezzet ve aromaya sahip olup, aynı zamanda lezzet bileşenlerinin ön-maddelerini de (peptidler, serbest yağ asitleri, indirgen şekerler ve nükleotidler gibi) içermektedir (14). Bu bileşenler ve onların yıkım ürünleri birbirleriyle reaksiyona girerek uçucu bileşenleri oluştururlar (15,16). Fermente et ürüne özgü koku, tada etki eden uçucu olmayan bileşenler ve hem tada hem de lezzete etki eden uçucu bileşenler şeklindeki çok sayıda bileşiklerin harmanlanmasıyla oluşur (12,17). Karbonhidrat, protein ve lipitler, amino asitler ve yağ asitleri parçalanarak lezzet oluşur (17). Asetik asit, peroksitlerin oluşumu, pH düşüşü, D- laktik asit, aromanın gelişimi, lipoliz ve proteoliz fermentasyonun ilk günlerinde başlamakta ve ve daha sonra devam etmektedir (18,19). Starter kültür kompozisyonu; lipit ve karbonhidrat metabolizmalarında etkili olarak, fermente et ürününü etkilemektedir (20,21). Ayrıca aromadan daha çok lezzet üzerine etkili olan sınırlı bir amino asit degradasyonu meydana gelmektedir. (22). Fermente et ürünlerinde laktik asit bakterileri yaygındırlar. Starter kültür olarak *Lactobacillus* türlerinden *L plantarum*, *L pentosus*, *L. sake*, *L. curvatus*, *L lactis* ve *L. casei* kullanılır. *P. acidilactici* ve *P. pantosaceus*, laktobasillerden daha az asit oluştururlar (23). Karbonhidrat parçalanması, fermente et ürünlerinde önemli bir reaksiyon zinciri olup, asitlerin oluşumu üründeki şekerlerin tipine ve konsantrasyonuna bağlıdır (24). Asetik asit, homofermentatif laktik asit bakterileri ve stafilokoklar tarafından üretilir (23). İgunlaşma süresince proteinler polipeptidre, peptidlere ve amino asitlere parçalanırlar .Hidroperoksitlerin parçalanmasıyla arasında aldehit, alkan, alken ve alkoller oluşmaktadır(12).Aldehitler önemli bir lezzet bileşimidir ve buldukları gıdaya sebzemsi lezzet kazandırır (25) Ancak sucuktaki benzaldehit badem, cuminaldehit kimyon lezzetine sahiptir (12).Yağların oksidasyonu sonucu oluşan ketonlar da fermente ette mantarimsı lezzeti oluşturmaktadır (12,25).

Nitriller, nitroalkanlar gibi azotlu bileşenler lipit oksidasyonu reaksiyonuna katılırlar (26). Lipit oksidasyonu, homoheterofermentasyon ve heterofermentasyon sonucunda: formik, asetik, propiyonik, butirik, izobutirik, valerik gibi asitler oluşabilmektedir(26,27). Lipit parçalanması ile orta ve uzun zincirli asitleri oluşur (27).Kısa zincirli yağ asitleri peynirimsi lezzetler oluşturmaktadır (12). Fermente et ürünlerinde etil esterler mikrobiyel faktörlere bağlı olarak az miktarlarda oluşabilmektedir (26). Fermente et ürünlerinde 24 farklı terpen izole edilmiş olup, üretimde kullanılan baharatlar terpenlerin temel kaynağıdır (28,29).

2. Fermente Sucuk

Fermente bir ürün olan sucuk, çok eski bir et ürünü olup günlük alınan yiyecekler arasında önemli bir yer tutmaktadır. Çok eski yıllara kadar uzanan bir geçmişi olan sucuk yapımında hammadde olarak sığır, koyun, keçi, manda etleri ve kuyruk yağının yanı sıra katkı ve yardımcı maddeler olarak da nitrat veya nitrit, şeker, baharat ve tuz kullanılır (30).Bu maddelerin homojen olarak karıştırılması ile elde edilen "sucuk hamuru" doğal ya da suni bağırsaklara doldurularak olgunlaştırılır (31). Ülkemizde fermente et ürünleri üretiminin önemli bölümünü fermente sucuklar oluşturmakta ve et ürünleri içindeki payı %42'ye kadar çıkmaktadır (31). Ülkemizde yılda yaklaşık 84 bin ton et üretimi olmaktadır (32). Türk Standartları 1070'e göre Türk Sucuğu; kasaplık büyük baş hayvan gövde etlerinden hazırlanan hamurun, doğal veya yapay kılıflara doldurulması ve bir süre bekletilerek olgunlaştırılmasıyla elde edilen et ürünüdür (33). Sucuk veya sucuk benzeri ürün; et ve yağın parçalanarak, katkı maddeleri ile karıştırılıp, kılıflara doldurulması ve olgunlaştırılması ile elde edilen fermente kuru et ürünüdür (34). Ülkemizde geleneksel yöntemlerle üretilen sucuklar, starter kullanılmadan üretildiğinden asitleşme ve kuruma düzeyleri değişik olur ve mikrobiyolojik özellikleri farklı şekillenir. Sucuk üretiminde hijyenik kurallara dikkat edilmelidir (35-37). Sucuğun olgunlaşması sırasında bir çok karmaşık reaksiyon birbirini etkileyerek ürünün tipik lezzetini oluşturur (27).Et ve et ürünleri mikroorganizmaların çoğalmaları için ideal bir ortamdır. Etin dayanıklı hale getirilmesinde temel amaç; mikrobiyolojik açıdan stabil ve güvenilir ürünler elde etmektir (36). Fermantasyon sırasında biyojen amin oluşumu, starter kültür olarak laktik asit bakterilerinin kullanılmasıyla engellenebilir. Starter laktik asit bakterileri, olgunlaşmanın son basamakları sırasında starter olmayan bakteriler ile yarışarak biyojen amin oluşumunu

engelleyebilir (38, 39). Starter kültür olarak *L. sake*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus* ve *Micrococcus varians* kullanılmaktadır (40). Türk tipi fermente sucuk üretimi, genellikle en uygun olduğu sonbahar aylarında yapılır ve üretilen sucuklar 15-20 gün sonra olgunlaşarak tüketime hazır hale getirilir (41-43). Ancak, bu şekilde her zaman aynı kalite ve standartta sucuk üretimi mümkün olmamaktadır (41). Bu nedenle fermente sucuklarda olgunlaşma süresini azaltmak, dayanıklılığı artırmak, ürüne lezzet kazandırmak amacıyla starter kültürlerden faydalanılmaktadır. Ayrıca, starter kültürler sucuklarda istenilmeyen patojen, toksinojen ve bozulmada etkili olan saprofit türü mikroorganizmaların gelişmelerini engellemektedirler (3,7,43-48). Çağdaş işletmelerde, fermente sucuk üretimi sıcaklık, hava akımı ve rutubeti ayarlanabilen yapay koşullarda yılın her mevsiminde yapılabilmektedir (42). Ülkemizde sucuklar ısı işlemi uygulanarak “pastörize sucuk” şeklinde de üretilenler (49).

3.Starterler

Mikrobiyal olarak olgunlaşan gıdaların mümkün olduğunca aynı standartlara haiz olması amacıyla starter kültürlerden yararlanılmaktadır (43,50). Starterler kullanıldıkları gıdalarda olumlu değişikliklere neden olan canlı bakteri, küf ve mantarlarlardır. Starter kültürlerin patojen ve toksik etkileri olmadığı testlerle doğrulanır(49). Starter kültürlerin fermente et ürünlerinde kullanılmaları 20. Yüzyılın başlarından itibaren gittikçe artan bir öneme sahiptir ve bu konuda ilk patent 1919 yılında çıkarılmıştır(51-53). Fermente et ürünlerinde arzu edilmeyen mikroorganizmaları kontrol altında tutmak, pH değerinin asitliğini arttırmak, istenilen aromayı şekillendirmek ve arzu edilen renk oluşumunu kalıcı kılmak gibi nedenler ile starter kültür kullanımına yol açmaktadır (46,54,55). Et ürünlerinin fermentasyonunda laktobasiller, pediokoklar, mikrokok ve stafilokoklar gibi mikroorganizmalar ve mikroorganizma enzimleri ile küf ve mayalar rol oynar (46,55) Et ürünlerinde kullanılacak olan starter kültürler; sağlığa zarar vermemeli, et substratına uyumlu olmalı, fermentasyon esnasındaki üreme hızı arzu edilmeyen mikroorganizmalardan daha fazla olmalı, tuz konsantrasyonlarında üreyebilmeli, metabolik aktiviteleri düşük ısılarda da sürmeli, üründe tüketicinin istediği özellikleri oluşturmalıdır.(56,57). Fermente et ürünlerinde en fazla kullanılan mikroorganizmalar *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Pediococcus acidilacti*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus carnosus*,

Staphylococcus xylosus , *Micrococcus varians* , *Debarromyces hansenii* ve *Penicillium nalgiovense* şeklinde sıralanabilir (56,58). Avrupa’da stater kültür olarak en çok laktik asit bakterilerinin mikrokok ve stafilokok kombinasyonları kullanılırken, Amerika’da tüketicinin ekşimsi lezzetteki fermente sucukları tercih etmesi nedeniyle *P.acidilacti* kullanılmaktadır (52,56,59).Et ürünlerinde starter olarak homofermentatif laktik asit bakterileri kullanılarak,laktobasillerin asit üretimi sonucu pH düşmesiyle et proteinleri koagüle olur, jel oluşur, ve aside duyarlı, bozulmaya yol açan mikroorganizmalara karşı da koruyucu bir etki oluşur (51,55-57,60,61). Asit üretimi veya pH düşmesi şekerin tipi, miktarı,laktik asit bakterilerinin sayısı ve ısı gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (56,61). Laktik asit bakterileri tuza toleranslıdır. *L.plantarum* 30-35 °C’ler arasında ürer, fakat *L.sake* ve *L.curvatus* daha düşük üreme ısılarına uyum sağlayabilir (47,51,56). Laktobasillerin gıdalarda bozulmaya neden olan mikroorganizmalar üzerine; laktik asit formasyonu ve bakteriosinlere bağlı olan inhibe edici bir etkisi vardır. Sucuklarda pH’ın 5.3’e düşmesi Staph. aureus ve S.typhimirium’u inhibe eder (62). Şeker katılmadan üretilen sucuklarda Salmonella`ya karşı laktobasillerin kullanılabilceği ve *L.sake*’nin salmonellara karşı inhibe edici etkisi belirtilmiştir(62,63). Çoğu laktik asit bakterileri bakteriosin üretmektedir (56). Orta Avrupa’da *S.carnosus*, *S. xylosus* ve *M.varians* gibi türler starter kültür olarak kullanılır (51,56).Mikrokoklar nitrat redüktaz enzimine ile nitratı nitrite dönüştürürler:böylece sucuklar arzu edilen kırmızı rengi kazanır (55,56).Mikrokoklar lipolitik aktiviteleri ile lezzet oluşumuna katkıda bulunurlar (64,65). Küfler tarafından oluşturulan proteazlar proteinleri aminoasitlere, lipazlar ise lipidleri yağ asitlerine indirgeyerek aroma oluştururlar. Bu enzimler genelde ortamda besin maddeleri azaldığı zaman üretilir(56,58,63).Starter kültür olarak kullanılan *P.nalgiovense* mikotoksin oluşumunu engeller (63).Tekinşen ve arkadaşları (66), Türk tipi fermente kuru sucuğa, starter kültür ve antioksidant ilave edilmediğinde mikrobiyal bozulma süresinin kısalacağını bildirmişlerdir .Karakaya ve Kılıç (67), yoğurt kültürlerini (*L bulgaricus* ve *S. thermophilus*) fermente sucuk imalatında kullanmışlardır. Nazlı, fermente Türk sucuklarından izole ettiği *S. carnosus* + *L. plantarum* kombinasyonunu sucuk imalatında kullanmıştır (68).Alperden ve Özay (41), sucuklarda starter kültür olarak *S. carnosus* + *L plantarum*, *S. carnosus* + *P. acilactici* *S. carnosus* + *L plantarum* + *P. pentosaceus* ; *S. carnosus* + *L. plantarum* + *P. acidilacti* , *L. plantarum* + *S. carnosus* + *P. pentosaceus* kombinasyonlarını önermişlerdir.Özdemir (69), sucuklardan izole ettiği 252 adet laktobasil suşunun 207’sini *L. sake*, 20’sini *L. curvatus*, 7’sini *L. plantarum*, 7’sini *L. viridescens*, bir suşu *L. carnis*, bir suşu *L. casei subsp. rhamnosus* olarak belirtmiştir.

4. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri su ve toprakta çok az bulunmakta, süt, et, hububat ve sebzeler ile bitki ve bitki atıklarında, memelilerin ağız, bağırsak ve vajina florasında bulunmaktadır (70). Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılmasında morfoloji, glikoz fermantasyonu biçimi, farklı sıcaklıklarda üreme, asit veya alkali toleransı ve DNA bazları yapısı, yağ asidi kompozisyonu ve hücre duvarının bileşenleri esas alınmaktadır (71,72). Laktik asit bakterileri, Gram pozitif, ve katalaz negatif, reaksiyon veren genellikle hareketsiz ve spor oluşturmeyen, fakültatif anaerobik, şekerleri fermente ederek karakteristik fermantasyon ürünü olan laktik asiti üreten, kok. kokobasil veya çubuk şeklindeki bakterilerdir (73-75).

Laktik asit bakterilerinin en önemli fonksiyonu şekerlerden hızlı ve güveniler bir şekilde laktik asit üretmeleridir. Laktik asit bakterileri, şekeri parçalayarak laktik asit oluşturlar. *Laktobasiller*, sucukta olgunlaşmanın başlangıcından 24-48 saat sonra yüksek seviyelere ulaşarak hakim florayı teşkil etmektedir (70,76-77). Laktik asit bakterileri havanın oksijeninde üreyebilmek, katalaz enzimleri olmaksızın aerob koşullarda gelişebilen nadir bakteriler arasındadırlar. Bazı laktobasiller hareketli ve endospor oluşturur ve bazı *Pediococcus* türleri katalaz negatif reaksiyon verirler (78). Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında yöntemler kullanılmaktadır. Ancak, genotipik özelliklere dayanan metodlar bakterilerin etkin bir şekilde tanımlanmasında etkilidir (79,80). Sütte fermantasyona ve koagülasyona sebep olan bakteriler de laktik asit bakterileri olarak tanımlanır (81). Et ve et ürünlerinden *L. brevis*, *Lactobacillus buncnherii*, *L. curvatus*, *Lactobacillus carnis*, *Lactobacillus divergens* ve *Lactobacillus hilgardi* adlı laktik asit bakterileri izole edilmiştir (82). *Lactobacillus plantarum* asite en dayanıklı tür olması nedeniyle tüm fermantasyon boyunca baskındır ve çoğu kez fermantasyon bu bakterinin etkinliğiyle tamamlanmaktadır (83). Fermantasyonun başlarında laktik asit bakterilerinin bozulmaya sebep olan mikroorganizmalara baskın olmasını sağlamak saf laktobasil kültürlerinin eklenmesi tavsiye edilir (84,85). Laktik asit bakterileri, antimikrobiyel bileşikler üreterek gıda güvenliğini artırır, faydalı enzimler üreterek probiyotik özellikler gösterir (85). Starter kültür kullanımı ile fermente gıda üretiminde az zamanda, yüksek kalitede ürün elde etmek mümkündür (86). Laktik asit bakterileri organik asit, H₂O₂, asetaldehit, CO₂, diasetil, ethanol ile bakteriosin ve benzeri ürünler oluşturarak, gıdayı bozucu mikroorganizmalara karşı antagonistik aktivite gösterir (87,88).

Laktik asit bakterileri glukozu parçalamasına göre homofermantatif ve heterofermantatif olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (85,89). Laktik asit bakterileri oksijen varlığında H₂O₂ üretebilirler. Bu bileşiğe gram negatif bakteriler en duyarlı bakterilerdir (90). Heterofermantatif laktik asit bakterilerinin karbonhidratları fermente etmesi sonucu CO₂, oluşur. Gıda kaynaklı aerobik mikroorganizmalara karşı toksik etkilidir (36, 38). CO₂'nin küfler üzerine etkisi de vardır (82).*Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* ve *Pediococcus* tarafından üretilen diasetil, Gram negatifler için öldürücü, Gram pozitifler için ise genellikle gelişmeyi durdurucu özelliktedir (81). Diasetilin düşük konsantrasyonu bile etkilidir (90). Heterofermantatif laktik asit bakterileri tarafından üretilen alkol mikroorganizmalar üzerine bakterisit etkilidir (89). Mikroorganizmalar bakteriyosin denilen antimikrobiyal protein üretirler (91). Bakteriyosinler genellikle olarak Gram pozitif bakterilere etkilidir (92). Laktik asit bakterilerinin tüm cinsleri bakteriyosin üretmektedir (81). Bakteriyosinler, K⁺ iyonunun ve ATP'nin kaybına meydan veren membran potansiyelini değiştirir (4). Laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosinlerin çok azı Gram negatif bakterilere etki göstermektedir (92). Endüstride laktik asit bakterileri probiyotik olarak da kullanılmaktadır. Probiyotikler, insan sağlığına çeşitli yararları olan ve intestinal sistemde naturel olarak bulunan, mikrobiyal dengeyi gözetten canlı gıda katkılarıdır (93, 94). Probiyotik olarak *L.acidophilus*, *L.casei subsp. rhamnosus*, *L.johnsonii*, *L.fermentum*, *L.plantarum*, *L.brevis*, *L.helveticus* ve *L.delbrueckii* türleri kullanılır (95). Turşu ve zeytin fermentasyonunda son basamaklarda baskın florayı oluşturan *L. plantarum* patojenlere karşı etkilidir (96). Laktik asit bakteri plazmidleri endüstriyel açıdan önemlidir. Çünkü bu yapılar aktarım işlemlerinde kullanılabilir (97-100). Laktobasiller 0-6 arasında plazmid DNA içermekte olup boyutları 2-100 kb arasında değişmektedir. Laktokoklar 2-82 kb büyüklüğünde, 2-14 arası sayıda plazmid, leuconostoclar 1-7 arasında, pediokoklar ise 3-6 arasında plazmid içermektedir (98, 99). Laktik asit bakterileri karbonhidratlardan laktik asit ve asetik asit üretebilmektedir. Gıda kaynaklı patojenler bu asitlere karşı hassastır (101).

4.1. Laktobasiller

Lactobacillus 'lar düzgün veya kıvrımlı uzun çubuk şeklinde, spor oluşturmeyen, katalaz negatif, Gram pozitif olarak kabul edilmekle birlikte eski kültürlerde Gram negatif hücreler oluşturan bakterilerdir. Mikroskop altında çoğunlukla uzun zincirler halinde görülmekle birlikte tek tek de bulunabilirler. Genellikle hareketsiz, çoğu mikroaerofilik veya anaerobik olup homofermentatif ve heterofermentatif türleri bulunmaktadır. Bitki ve hayvansal materyal ve çeşitli gıdalarda (hububat, et ve süt ürünleri, bira, şarap meyve ve meyve suyu, hamur, turşu ve zeytin) yaygın olarak bulunurlar. Bazıları fermente süt ürünlerinin üretiminde önemlidir. Pek çoğunun gelişmesi çok belirgin olduğu için laboratuvarlarda vitamin ve amino asit tayininde ve et ürünlerinin işlenmesinde starter kültür olarak kullanılırlar. Laktobasiller, gıda mikrobiyolojisinde yararlı gruba girmekle beraber zararlı olmaları da söz konusudur. Bunlar içinde *Betabacterium*, *Streptobacterium*, *Thermobacterium* olmak üzere 3 farklı gruba bulunmaktadır. Zorunlu heterofermentatif *Lactobacillus* 'lar (örneğin *L. brevis*) *Betabacterium* içinde yer almaktadır. Homofermentatif ve fakültatif heterofermentatif *Lactobacillus* türleri ise *Streptobacterium* ve *Thermobacterium* grubu içindedir. *L. acidophilus* ve *L. bulgaricus* *Thermobacterium* grubunda yer alır, 40 °C'de optimum gelişirler, %3 veya daha yüksek miktarda laktik asit üretirler. *L. casei*, *Streptobacterium* grubu "içindedir, optimum gelişme sıcaklığı 30 °C' dir ve % 1,5 veya daha yüksek miktarda laktik asit üretirler. Laktobasiller fermantasyon esnasında oluşturdukları metabolitler sayesinde sucuğun olgunlaşmasında rol oynamaktadırlar. Bunlardan laktatin oluşması oksidasyon sonucu hidrojen peroksit oluşturmaları nedeniyle arzu edilmez.(6) .

Çiğ etler fermantasyon sonucunda kendilerine özgü tekstür, renk ve koku kazanarak olgunlaşırlar. Bu esnada hakim olan mikroorganizmalar laktik asit bakterileri olup, başlıcaları *lactobacilli*, *staphylococc* , *pediococc* ve *micrococc* olarak sayılabilir. *Lactobacillus* 'lardan 25°C altındaki fermantasyon sıcaklığında en fazla *L. sake* ve *L. curvatus* hakimdir, fakat *L. plantarum* da (25 °C üstünde) görülebilir (102).

L. brevis; çubuk şeklinde glikozdan gaz, asetat, etanol ve laktik asit oluşturan heterofermentatif ve *Betabacterium* grubu laktobasildir. DNA sındaki G+C oranı %42,7-46,4 tür (4).

L. casei; kısa çubuk şeklinde ribozdan gaz, laktik asit ve asetik asit oluşturan homofermentatif ve *Streptobacterium* grubu laktobasildir. DNA sındaki G+C oranı % 46,4 tür.(4)

L. plantarum ; uçları yuvarlak, çubuk şeklinde, ribozdan laktik asit ve asetik asit oluşturan anaerobik ve Streptobacterium grubu laktobasildir. DNA sındaki G+C oranı % 45'tir(4). *L. plantarum* 1959 suşunda yapılan çalışmalarda 6 plazmid, tespit edilmiştir. Altı adet *L. plantarum* izolatının plazmid DNA profillerini belirlenmiş ve suşların 1 ile 6 arasında plazmid içerdiğini tespit edilmiştir. *L. plantarum* *L. monocytogenes* 'e karşı genelde orta ve düşük aktiviteli suşlara sahiptir (103). *L. plantarum* , *Yersinia enterocolitica* 'ya karşı inhibitör etki gösterir.(78) Sucukdan izole edilen *L. plantarum* suşları *Y. enterocolitica* 'ya karşı %48'inin düşük, %36'sının orta derecede inhibitör etkili, %16'sı etkisizdir.(103)

L. sake; DNA sındaki G+C oranı % 42,2 dir.(4)

4.2. Pediococcuslar

P. acidilactici; kok şekilli, galaktoz, arabinoz, ksiloz ve trehalozdan asit oluşturan laktik asit bakterisidir. DNA sındaki G+C oranı % 44 tür.(4)

Pediococcus pentosaceus; kok şekilli, galaktoz, arabinoz, maltoz ve ksilozdan asit oluşturan laktik asit bakterisidir. DNA sındaki G+C oranı % 38dir (4).

5. Laktobasillerin Taksonomisi*

Tablo 1: Fakültatif heterofermentatif Laktobasillerin Fizyolojik ve Biyokimyasal Karakteristikleri

Tür	Peptidoglikan tipi	Techoic asit	Electrophoretic hareketlilik D-LDH	Electrophoretic hareketlilik L-LDH	Allosteric L-LDH	%Mol G+C	Laktik Asit İzomerleri	15°C de üreme	Argininden gelen NH ₃
<i>L.agilis</i>	mDAP-Direct	yok	1.40	1.20	-	43-44	L	-	-
<i>L.alimentarius</i>	Lys-DAsp	yok	0.80	1.10	-	36-37	L(D)	+	-
<i>L.bavaricus</i>	Lys-DAsp	yok	-	1.60	+	41-43	L	+	-
<i>L.casei subsp. casei</i>	Lys-DAsp	yok	1.22	0.93	+	45-47	L	+	-
<i>L.casei subsp. pseudoplantatum</i>	Lys	yok	1.04	0.93	+	45-47	DL	+	-
<i>L.casei subsp. rhamnosus</i>	Lys-DAsp	yok	0.75	0.93	+	45-47	L	+	-
<i>L.casei subsp. tolerans</i>	Lys-DAsp	yok	-	0.93	+	45-47	L	+	-
<i>L.conyniformis subsp. conyniformis</i>	Lys-DAsp	yok	0.38	-	-	45	D(L)	+	-
<i>L.conyniformis subsp. torquens</i>	Lys-DAsp	yok	0.38	-	-	45	D	+	-
<i>L.curvatus</i>	Lys-DAsp	yok	1.20	1.60	+	42-44	DL	+	-
<i>L.homohiochii</i>	Lys-DAsp	Glycerol	Belirsiz	Belirsiz	-	35-38	DL	+	-
<i>L.maltaromicus</i>	mDAP-Direct	yok	Belirsiz	Belirsiz	-	36	L	+	Belirsiz
<i>L.murinus</i>	Lys-DAsp	yok	-	0.92	+	43-44	L	-	-
<i>L.plantarum</i>	mDAP-Direct	Glycerol veya ribitol	1.44	1.28	-	44-46	DL	+	-
<i>L.sake</i>	Lys-DAsp	yok	1.20	1.60	+	42-44	DL	+	-

*Bergey's Manual. 1994

Tablo 2: Fakultatif heterofermentatif Laktobasillerin Karbonhidratları Fermentasyonu

	<i>L. agilis</i>	<i>L. alimentarius</i>	<i>L. bavaricus</i>	<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>	<i>L. casei</i> subsp. <i>pseudoplantarii</i>	<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	<i>L. casei</i> subsp. <i>tolerans</i>	<i>L. conyiformis</i> subsp. <i>conyiformis</i>	<i>L. conyiformis</i> subsp. <i>torquens</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. homohiochii</i>	<i>L. maltaromicus</i>	<i>L. murinus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. sake</i>
amygdalin	+	o	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	d	+	+
arabinose	-	d	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	+	d	+
cellobiose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	d	+	+	+	+
esculin	+	+	+	+	+	+	-	d	-	+	o	o	+	+	+
fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
gluconate	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	o	-	+	+
lactose	+	-	+	d	+	+	+	d	+	d	-	+	+	+	+
maltose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
mannitol	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	d	+	-
mannose	+	+	+	+	+	+	-	+	d	+	+	+	+	+	+
melezitose	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	d	-
melibiose	+	-	+	-	-	-	-	d	-	-	-	+	+	+	+
rafinose	+	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	+	+	+	+
rhamnose	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ribose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
salicin	+	+	+	+	+	+	-	d	-	+	d	+	d	+	+
sorbitol	d	-	-	+	+	+	-	d	-	-	-	+	-	+	-
sucrose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
trehalose	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	d	+	d	+	+
xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-

*Bergey's Manual, 1994

6. PCR

1983 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilen PCR aygıtı, adını DNA parçasını invitro enzimatik tepkime ile çoğaltmaya yarayan DNA polimerase enziminden almıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR); DNA'nın hedef sequencine özgü DNA parçasının, yapay primer ile amplifikasyonu ilkesine dayanmaktadır. PCR aygıtının çalışması için az miktarda DNA örneği yeterlidir (104). Bu amaçla, çoğaltılması hedeflenen DNA örneği, hedeflenen bölgeye uygun bir çift sentetik primer, bu DNA primerlerine bağlanarak nükleotidler ile sentezi sağlayan yüksek ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi, sentezde kullanılacak olan deoksiniükleotidler (Adenin, Guanin, Sitozin ve Timin), polimeraz enzimine uygun pH ve iyon koşullarındaki buffer gerekmektedir (104).

PCR reaksiyonu ile çoğaltılacak olan DNA önce 90 -98°C'de 10 ila 300 saniye süreyle yüksek ısıya maruz bırakıldıktan sonra sıcaklık 50°C ile 70°C arasında bir değere düşürülür; bu sayede primerler tek zincirli hale getirilen DNA'ya bağlanabilirler. Bu primerler sentetik oligonükleotidlerdir ve çoğaltılacak olan DNA parçasının uçlarındaki tamamlayıcı dizilere bağlanılarak hibridizasyon oluştururlar. DNA polimerazın ısıya dayanıklı bir formu (Taq polimeraz) ve ortamdaki dNTP'ler sayesinde ise DNA sentezi 70-75°C arasındaki

sıcaklıklarda gerçekleşerek polimerizasyon ve çift iplikli DNA'ların sentezi oluşur. Yukarıda belirtilen döngüler 30 ila 55 kez tekrar edilebilse de 40'tan fazlası tavsiye edilmez.

6.1.1.Real Time PCR

Real-time PCR tekniği gelişmiş bir PCR tekniğidir ve diğer PCR cihazlarına göre en büyük avantajı amplifikasyon ürün oluşumunun eş zamanlı "real-time" izlenebilmesidir. Cihaz, bu fonksiyonu fluorensansa dayanan iki metotla gerçekleştirir:

- DNA bağlayıcı boya (intercalating dyes) (SYBR Green I, Etidium Bromide gibi)
- Hibridizasyon problemleri (TaqMan problemleri, Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) problemleri gibi)

6.1.2.DNA bağlayıcı boya SYBR Green I

SYBR Green I boyası çift sarmal DNA'ya bağlanabilmektedir. Ayrıca uzun süre dayanıklı olup 10 ile 25 amplifikasyon döngüsü sırasında aktivitesini kaybetmeden kullanılabilir. 30 amplifikasyon döngüsü sonunda aktivitesinin yalnızca % 6.0'sını kaybetmektedir. Uyarılma ve ışık saçma dalga boyları real-time PCR cihazlarının optik filtre setine uymaktadır. Amplifikasyon öncesi reaksiyon karışımı denatüre edilmiş DNA'yı, primerleri ve boyayı içerir. Bağlanmamış olan boya az miktarda fluorensans yayarak, daha sonraki bilgisayar analizlerinden çıkartılan, minimum fluorensans sinyalini oluşturur. Primerlerin tutunmasıyla az sayıdaki boya molekülü çift sarmal DNA'ya bağlanır. DNA'ya bağlanması, SYBR Green I moleküllerinin uyarılma sonucu ışık saçmalarının etkili şekilde artmasına neden olur. Uzama aşaması esnasında çift sarmal DNA oluştuğunda, daha fazla sayıda boya molekülleri bağlanır. Reaksiyon devamlı denetlenerek, fluorensandaki artış eş zamanlı olarak izlenir. Diğer döngünün ısıtma basamağında DNA denatüre edildiğinde boya molekülleri serbest kalır, böylelikle DNA'ya bağlı boya moleküllerinin oranı azaldığından fluorensans sinyali düşer.

6.1.3.Erime Eğrisi Analizi

SmartCycler cihazı, amplifikasyon aşamasından sonra oluşan PCR ürünlerinin ayrıntılı erime eğrisi analizini yürütebilmektedir. Bir DNA fragmentinin erime noktası uzunluğuna ve G/C içeriğine bağlı olarak değişir. Buna göre DNA fragmentlere özel erime

noktaları tayin edilerek, amplifikasyon ürünleri karakterize edilebilir. Erime eğrisi analizi ile, kullanılan metoda göre (SYBR Green I) ürün hakkında bilgi alınabilir. Erime eğrisi grafiğinde Y-ekseni fluoresansı, X-ekseni ısıyı belirtir (105).

GEREÇ ve YÖNTEM

1. GEREÇ

Bu çalışmada Türkiye'deki çeşitli illerde üretilerek satışı ve tüketimi yapılan sucuklar , pastirmalar ve çiğ etler ana materyal olarak seçildi.

1. Araştırma Planı:

Araştırma Eylül 2002'de başlayıp Aralık 2007' ye kadar süren dönemde yürütülerek, Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden (Adapazarı, Afyon, Ankara, Balıkesir, Bursa, Çankırı, Diyarbakır, Edirne, Eskişehir, İstanbul, İzmir, Kayseri, Kocaeli, Kütahya, Manisa, Mardin, Mersin, Muğla, Şırnak, Tekirdağ ve Yalova) sağlanan numuneler, LBS agarda (Lactobacillus Sensitive Agar) üreyen bakterilere, daha sonra Mini API de (Analytical Profile Index) tür tayini analizi uygulanarak izolatların 229 adedi tanımlendi (159 sucuk , 53 pastırma ve 17 çiğ et). API karbonhidrat testleri sonucunda , *L. sake* hiç gözlenmemiş olup, *L. curvatus* ise sadece oniki adet saptandı. Bu nedenle en çok görülen türlerden 174 tanesine Real Time PCR da DNA diziliminin 16S bölgesine dayalı tür konfirmasyonu yapıldı.

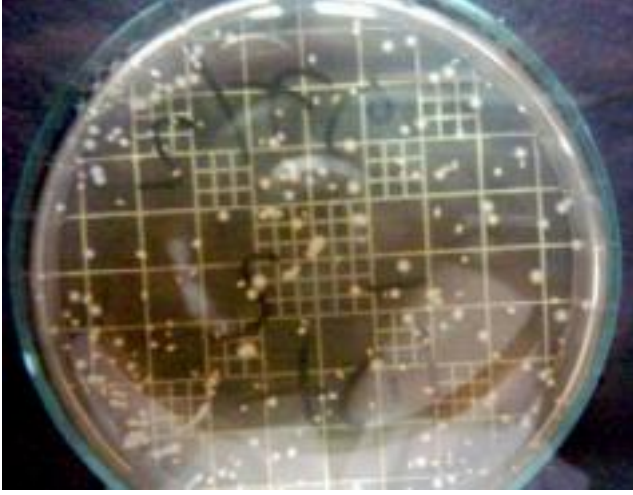


Şekil 1: Numune alınan iller

2. YÖNTEM

1.1. Mikrobiyolojik Analiz Yöntemleri:

Sucuk, pastırma ve çiğet numuneleri steril koşullarda 10 gram tartılarak 90 ml steril pepton bufferda (Oxoid CM0509) 5 dakika bekletildikten sonra 1/100, 1/1000, 1/10000, ve 1/100000 oranında sulandırmalar yapılarak, LBS Agara dökme tarzında, paralel ekimler yapıldı, daha sonra 37 ± 2 °C'de 72 saat anaerobik jarda, GENbox microaer (Biomerieux 96 125) generator kullanılarak inkübasyona bırakıldı, ve LBS agarda üreyen bakterilerin sayımı yapıldı.



Şekil 2 : LBS agarda üreyen laktik asit bakterileri



Şekil 3: LBS agarda üreyen laktik asit bakterilerinin mikroskopik görünümü

LBS agarda üreyen tipik bir koloni pastör pipetiyle alınarak içinde MRS broth (Oxoid CM0359B) (De Man Rogosa Sharpe) bulunan steril tüplere inoküle edildi ve $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 48 saat inkübe edildi.

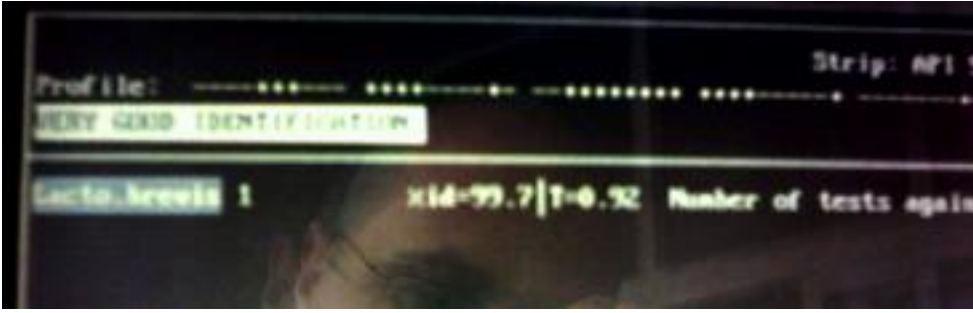
48 saat sonra tüplerde üreyen bakteri kolonisi öze ile alınarak LBS Agara ekim yapıldı ve $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 72 saat anaerobik jarda inkübasyona bırakılarak, Mini API'de yapılacak tür tayininin daha doğru bir sonuç vermesi için tek bir bakteri kolonisinin üremesi sağlandı. Daha sonra *Lactobacillus* cinsi olarak tanımlanan izolatların türünün belirlenmesi için; API 50 CH test kitlerinden (BioMerieux) ve Mini-API aygıtından yararlanıldı. API 50 CH *Lactobacillus* tanımlama kiti; farklı biyokimyasal test substratlarını içeren ve mikroorganizmaların karbonhidrat metabolizmasının çalışmasını sağlayan 49 adet mikrotüpten ve 1 adet kontrol tüpünden oluşmaktadır. Bu kitin içerdiği kullanıma hazır 10 ml hacimdeki steril suspansiyon mediumuna (API 50 CHL medium) LBS agar'da üreyen bakteri kültüründen aktarma yapılarak bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu solüsyonun dansitesi 2 McFarland olarak ayarlandı ve 50 mikrotüpe, steril pastör pipeti kullanılarak tek tek inokülasyonlar yapıldı. Daha sonra bu kuyucukların üst kısmı mineral oil (BioMerieux) kullanılarak kapatıldı ve $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda indikatör içeren mikrotüplerdeki besi ortamı renginin söz konusu karbonhidrat fermantasyonuna ve ortam içinde yer alan bir pH indikatörü aracılığıyla saptanan asit üretimine bağlı olarak mordan sarıya dönüşmesi durumunda sonuç pozitif, rengin aynı kalması durumunda ise negatif olarak değerlendirildi. Sonuçlar "API Identification Yazılımı (API Lab Plus Program, BioMerieux)" programına aktarıldı ve izolatlar bu bilgisayar yazılımı yardımıyla tür düzeyinde tanımlandı. Tür tanımlama sonuçları yüzde olarak verilmekte ve bazen özellikle mor-sarı renk arasındaki oluşumların olduğu durumlarda birden fazla seçenek önerilmektedir.



Şekil 4: Mini API Strip



Şekil 5: McFarland ayarlanması



Şekil 6: Mini API ile tür düzeyinde tanımlama

API 50 CHL medium içeriği:

- | | |
|--------------------------------------|---------------------|
| • Polipepton | 10 g |
| • Maya ekstresi | 5 g |
| • Tween 80 | 1 ml |
| • Dipotasyum fosfat | 2 g |
| • Sodyum asetat 3H ₂ O | 2 g |
| • Diamonyum sitrat | 2 g |
| • Magnezyum sülfat 7H ₂ O | 0.20 g |
| • Manganez sülfat 4H ₂ O | 0.05 g |
| • Bromkresol moru | 0.17 g |
| • Demineralize su | 1000ml (Tamamlanır) |



Şekil 7: -20 °C’ de saklanan gliserol içindeki mikroorganizmalar

Mini-API aygıtında kullanılan karbonhidrat testleri:

Çalışmada identifikasyon amacıyla izole edilen laktik asit bakterileri için API test stribi ve yardımcı malzemeleri (bioMerieux) kullanıldı. Elde edilen sonuçlar Mini API yardımıyla değerlendirildi. Bu test sistemi 49 farklı karbonhidrat kaynağının kullanılmasının ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Glycerol, erythritol ,D-arabinoz, L-arabinoz, Riboz, D-xylose, L-xylose, Adonitol, B-ethyl-d-xylose, Galaktoz, Glukoz, Fruktoz, Mannoz, Sorbose, Rhamnose, Dulcitol, İnositol, Mannitol, Sorbitol, Maltoz, Laktoz, Celiobiose, Salicin, Esculin, Arbutin, Amygdalin, N-acetyl -glucosamine, a-metil -D-glucoside, a-metil -D-mannoside, Melibiose, Sucrose, Trehalose, inulin, Melezitose, Rafinose, Starch, Glycogen, Xylitol, Gentibiose, D-turanose, D-Lyxlose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol, Gluconate, 2-keto gluconate, 5-keto gluconate.

Mini API analizine paralel olarak mikroorganizmalar %20 lik gliserol içinde -20 °C de 2 mililitrelik tüplerde saklandı. Gliserol viskoz olduğundan %80 oranında ayarlandı (1 hacim su 4 hacim gliserol hazırlanarak) ve “cryotubes” tüplere 500 uL olarak konuldu ve otoklavda sterilize edildi. MRS broth (Oxoid CM0359B) (De Man Rogosa Sharpe) içinde 37 ± 1 °C’de 48 saat inkübe edilerek üremesi sağlanan bakteri kolonisi steril pastör pipetleriyle alınarak cyrotublere 1500 uL (bir birim gliserol solusyonu 3 birim MRS broth olacak şekilde) konularak besi yerindeki konsantrasyonu %20 olması sağlandı. Bu haliyle -20 °C de saklandı.

1.2. PCR analizleri

1.2.1. İzolasyon ekstraksiyon

İzolasyon için “r-biopharm” şirketinin SureFood PREP Animal X (Art no: S1004) kiti kullanıldı.

1.2.1.1. SureFood PREP Animal X Kit İçeriği:

Lysis Buffer 20 mL

Binding Buffer 10 mL

Pre-wash Buffer 60 mL

Wash Buffer 60 mL

Elution Buffer 10mL

Proteinase K

H₂O PCR grade 1,3 mL

1.2.1.2. Numunenin Homojenizasyonu

Gliserol içinde -20 °C de saklanan bakteriler oda sıcaklığına getirildikten sonra 200 mikrolitre alınarak UV lamba ışığına önceden 30 dakika maruz bırakılan receiver tüplerine aktarıldı. 10,000 rpm devirde 2 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki gliserollü supernatant uzaklaştırıldı.



Sekil 8: Santrifugasyon

1.2.1.3. Bakterilerin liziz işlemine tabi tutulması

Her receiver tüpüne 400'er µl Lysis Buffer (Kit Code L) eklenerek 65 °C de 30 dakika çalkalamalı termomikserde inkübe edildi.



Şekil 9: Termomixerde inkübasyon

2.1.1.4. Lizatın süzülmesi:

Önceden UV lamba ışığına 30 dakika maruz bırakılan bulunan yeni ve sarı bir receiver tüpüne spin filtre yerleştirildi ve inkübe edilen lysat filtreye aktarıldı ve 12,000 rpm de 2 dakika santrifüj edildi. Daha sonra 200 µl Binding Buffer (Kit Code B) ilave edilerek vortekslendi.

2.1.1.5. DNA'nın spin filtreye bağlanması

Önceden UV lamba ışığına 30 dakika maruz bırakılan yeni ve sarı bir receiver tüpüne spin filtre yerleştirildi ve binding bufferlı solüsyon filtreye aktarıldı. Oda sıcaklığında bir dakika bekleddikten sonra 12,000 rpm de 2 dakika santrifüj edildi. Filtreden süzülen filtrat ayrılıp filtre tekrar receiver tüpe yerleştirildi.

2.1.1.6. Spin filtrenin Pre-Wash Buffer ile yıkanması

Spin filtreye 550 µl Pre-wash Buffer eklenerek (Kit Code P) 12,000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Daha sonra filtreden süzülen filtrat ayrılıp filtre tekrar receiver tübe geri

yerleştirildi.

2.1.1.7. Spin filtrenin Wash Buffer ile yıkanılması

Spin filtreye 550 µl Wash Buffer eklenerek (Kit Code W) 12,000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Daha sonra filtreden süzülen filtrat ayrılıp filtre tekrar receiver tübe geri yerleştirildi. Bir kez daha spin filtreye 550 µl Wash Buffer eklenerek (Kit Code W) 12,000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Daha sonra filtreden süzülen filtrat ayrılıp filtre tekrar receiver tübe geri yerleştirildi.

2.1.1.8. Spin filtrenin Kurutulması

Spin filtre 12,000 rpm de 2 dakika santrifüj edilerek wash buffer tamamen uzaklaştırıldı

2.1.1.9. DNA'nın elusyonu:

Önceden UV lamba ışığına 30 dakika maruz bırakılan yeni ve beyaz bir receiver tüpüne spin filtre yerleştirildi ve 100 µl 65 °C sıcaklığındaki preheated Elution Buffer (Kit Code E) eklenerek oda sıcaklığında üç dakika bekledikten sonra 10,000 rpm de 2 dakika santrifüj edildi. Elusyon işlemi yapılan süzüntü etiketlenerek PCR analizleri için -20 °C de muhafazaya alındı.

1.2.2. Cepheid Smart Cycler Real Time PCR



Sekil 10: Cepheid smart cycler real time PCR

1.2.2.1.GEN-IAL First – Beer PCR kit *L. brevis* (art no PP1 0050)

Analizi yapılacak numune başına Premix 13,5 mikro litre, Primer mix 1,5 mikro litre, su 5,0 µl alınarak mastermiks hazırlandı. 20 µl mastermikse numuneler 5,0 µl olarak eklendi

PCR protokolü:

Aşama 1: DNA nın Denatürasyonu

Stage 1		
Hold		
Temp	Secs	Optics
94.0	300	Off

Aşama 2: DNA nın amplifikasyonu

Stage 2			
Repeat	47	cycles	
2. Temperature Cycle			
Deg/Sec	Temp	Secs	Optics
NA	95	7	Off
NA	55	80	Off
NA	72	40	On

Aşama 3: Hold

Stage 3		
3. Hold		
Temp	Secs	Optics
75	15	Off

Aşama 4: Erime Eğrisi

Stage 4		
4.Melt Curve		
Start	End	Deg/Sec
75	95	0.2

1.2.2.2GEN-IAL First – *L. plantarum* (art no PLP0050)

Analizi yapılacak numune başına Premix 13,5 mikro litre, Primer mix PLP 1,5 mikro litre, su 5,0 µl alınarak mastermiks hazırlandı. 20 µl mastermikse numuneler 5,0 µl olarak eklendi.

PCR protokolü:

Aşama 1: DNA nın Denatürasyonu

Stage 1		
Hold		
Temp	Secs	Optics
94.0	300	Off

Aşama 2: DNA'nın amplifikasyonu

Stage 2			
Repeat	45	cycles	
2. Temperature Cycle			
Deg/Sec	Temp	Secs	Optics
NA	95	10	Off
NA	55	85	Off
NA	72	35	On

Aşama 3: Hold

Stage 3		
3. Hold		
Temp	Secs	Optics
75	15	Off

Aşama 4: Erime Eğrisi

Stage 4		
4.Melt Curve		
Start	End	Deg/Sec
75	95	0.2

1.2.2.3.GEN-IAL First – *Lactobacillus pentosus* (art no PLPENB0050)

Analizi yapılacak numune başına Premix 13,5 mikro litre, Primer mix PLB 1,5 mikro litre, su 5,0 µl alınarak mastermix hazırlandı. 20 µl mastermixe numuneler 5,0 µl olarak eklendi.

PCR protokolü:

Aşama 1: DNA'nın Denatürasyonu

Stage 1		
Hold		
Temp	Secs	Optics
94.0	300	Off

Aşama 2: DNA'nın amplifikasyonu

Stage 2			
Repeat	47	cycles	
2. Temperature Cycle			
Deg/Sec	Temp	Secs	Optics
NA	95	15	Off
NA	55	85	Off
NA	72	55	On

Aşama 3: Hold

Stage 3		
3. Hold		
Temp	Secs	Optics
75	15	Off

Aşama 4: Erime Eğrisi

Stage 4		
4.Melt Curve		
Start	End	Deg/Sec
75	95	0.2

1.2.2.4.GEN-IAL First – *P. acidilactici* (art no PPA0050)

Analizi yapılacak numune başına Premix 13,5 mikro litre, Primer mix PAC 1,5 mikro litre, su 5,0 µl alınarak mastermikse hazırlandı. 20 µl mastermikse numuneler 5,0 µl olarak eklendi.

PCR protokolü:

Aşama 1: DNA'nın Denatürasyonu

Stage 1		
Hold		
Temp	Secs	Optics
95.0	300	Off

Aşama 2: DNA'nın amplifikasyonu

Stage 2			
Repeat	50	cycles	
2. Temperature Cycle			
Deg/Sec	Temp	Secs	Optics
NA	95	5	Off
NA	58	20	Off
NA	72	70	On

Aşama 3: Hold

Stage 3		
3. Hold		
Temp	Secs	Optics
75	15	Off

Aşama 4: Erime Eğrisi

Stage 4		
4.Melt Curve		
Start	End	Deg/Sec
75	95	0.2

1.2.2.5.GEN-IAL First – *P.pentosaceus* (art no PPP0050)

Analizi yapılacak numune başına Premix 13,5 mikro litre, Primer mix PPP 1,5 mikro litre, su 5,0 µl alınarak mastermiks hazırlandı. Numuneler mastermiks üzerine 5,0 µl olarak eklendi.

PCR protokolü:

Aşama 1: DNA'nın Denatürasyonu

Stage 1		
Hold		
Temp	Secs	Optics
95.0	300	Off

Aşama 2: DNA'nın amplifikasyonu

Stage 2			
Repeat	55	cycles	
2. Temperature Cycle			
Deg/Sec	Temp	Secs	Optics
NA	95	5	Off
NA	58	20	Off
NA	72	80	On

Aşama 3: Hold

Stage 3		
3. Hold		
Temp	Secs	Optics
75	15	Off

Aşama 4: Erime Eğrisi

Stage 4		
4.Melt Curve		
Start	End	Deg/Sec
75	95	0.2

1.2.2.6.GEN-IAL First – *L. casei* (art no PLC0050)

Analizi yapılacak numune başına Premix 13,5 mikro litre, Primer mix PLC 1,5 mikro litre, su 5,0 µl magnezyum klorür 1,2 µl µl alınarak mastermiks hazırlandı. 20 µl mastermixe numuneler 5,0 µl olarak eklendi.

PCR protokolü:

Aşama 1: DNA nın Denatürasyonu

Stage 1		
Hold		
Temp	Secs	Optics
95.0	300	Off

Aşama 2: DNA'nın amplifikasyonu

Stage 2			
Repeat	50		cycles
2. Temperature Cycle			
Deg/Sec	Temp	Secs	Optics
NA	95	10	Off
NA	57	35	Off
NA	72	45	On

Aşama 3: Hold

Stage 3		
3. Hold		
Temp	Secs	Optics
75	30	Off

Aşama 4: Erime Eğrisi

Stage 4		
4.Melt Curve		
Start	End	Deg/Sec
75	95	0.2

BULGULAR

1. Numuneler:

Sucuk, pastırma, çiğ et örneklerinden elde edilen izolatlar Mini API aygıtında yapılan karbonhidrat testlerine göre 83 tanesi *L. brevis*, 53 tanesi *L. plantarum*, 13 tanesi *L. pentosus*, 5 tanesi *P. acidilactici*, 16 tanesi *Pediococcus pentosaceus* ve 4 tanesi *Lactobacillus paracasei* olarak tanımlandı. Bunlardan Real Time PCR ile 74 tanesi *L. brevis* 46 tanesi *L. plantarum* 8 tanesi *L. pentosus* 2 tanesi *P. acidilactici*, 9 tanesi *Pediococcus pentosaceus* olarak konfirme edildi.

API Test Kiti Kullanılarak Laktik Asit Bakterilerinin Tanısı

Yapılan değerlendirmeler sonucunda tanımlanan izolatlar aşağıdaki tabloda sunulmuştur (Tablo3).

Tablo 3. API Sonuçlarına Göre Tanımlanan Bakteriler

İzolat	API
<i>L. acidophilus</i>	4
<i>L. brevis</i>	83
<i>L. cellobiosus</i>	4
<i>L. coprophilus</i>	2
<i>L. curvatus</i>	12
<i>L. delbrueckii subsp. delbrueckii</i>	1
<i>L. fermentum</i>	2
<i>L. helveticus</i>	2
<i>L. lindneri</i>	1
<i>L. paracasei subsp. paracasei</i>	4
<i>L. pentosus</i>	13
<i>L. plantarum</i>	53
<i>L. rhamnosus</i>	3
<i>L. salivarius</i>	2
<i>L. lactis subsp. lactis</i>	13
<i>L. lactis</i>	1
<i>L. mesenteroides subsp. cremoris</i>	1
<i>L. mesenteroides subsp. mesenteroides / dextranicum</i>	2
<i>P. acidilacti</i>	5
<i>P. damnosus</i>	1
<i>P. pentosaceus</i>	16
<i>S. salivarius subsp. thermophilus</i>	4
Toplam	229

Çalışmada, L-Xylose, Adonitol, Erythritol, Inositol, Methyl-D Mannositol, Amidon, Glycogene, Xylitol, D-Fucose, L-Fucose, D-Arabitol, Arabitol, 2 ceto-gluconate, ve 5 ceto-gluconate karbon kaynaklarının hiçbir test organizması tarafından kullanılmadığı, D-glucose kaynağının ise tüm mikroorganizmalar tarafından kullanıldığı tespit edildi. Glycerol, D-Arabinose, Methyl-xyloside, L-Sorbose, Dulcitol,

Methyl-D-glucoside, Inuline, D-Lyxose, birer ; Rhamnose iki; L-Arabinose, D-Xylose, D-Raffinose, Gluconate üçer; Melezitose ve D-Turanose dörder; Mannitol, Sorbitol, Melibiose beşer; Amygdaline ve Arbutine sekizer; Gentiobiose dokuz; Ribose, Salicine, Cellobiose onar; Esculine ve Lactose onbirer; Saccharose ve Trehalose onikişer; Galactose ve D-Mannose onbeşer; N Acetyl-glucosamine ve Maltose onaltışar, D-Fructose kaynağının ise ondokuz mikroorganizma tarafından kullanıldığı tespit edildi (Tablo 4).

API Sonuçlarına göre 49 sucuk, 5 çiğ et, ve 29 pastırma numunesinden 83 adet *L. brevis* izolatu ; 45 sucuk, 3 çiğ et, 5 pastırma numunesinden 53 adet *L. plantarum* izolatu; 2 Çiğ et, 6 Pastırma, 8 sucuk numunesinden 16 adet *P. pentosaceus* izolatu; 1 çiğ et, 4 pastırma, 8 Sucuk numunesinden 13 adet *Lc.lactis subsp. lactis* izolatu; 6 sucuk, 2 çiğ et, 5 pastırma numunesinden 13 adet *L. pentosus* izolatu; 2 çiğ et, 10 sucuk numunesinden 12 adet *L.curvatus* izolatu, 3 sucuk , 2 pastırma numunesinden 5 adet *P. acidilacti* izolatu; 2 sucuk 2 pastırma numunesinden 4 adet *L.acidophilus* izolatu; 4 sucuk numunesinden 4 adet *L.cellobiosus* izolatu; 2 sucuk, 2 çiğ et numunesinden 4 adet *L. paracasei* izolatu; 4 sucuk numunesinden 4 adet *Str. saliv. thermop.* izolatu; 3 sucuk numunesinden 3 adet *L. rhamnosus* izolatu; 2 sucuk numunesinden 2 adet *Leuconostoc mesenteroides subsp.mesenteroides/ dextranicum* izolatu; ikişer sucuk numunesinden ikişer adet *L.fermentum*, *L.salivarius*, *L.helveticus* ve *L.coprophilus* izolatları; birer sucuk numunesinden ise birer adet *L.Lindneri*, *L. delbrueckii*, *L. mesenteroides subsp.cremoris*, *L. lactis* ve *P.damnosus* izolatları elde edildi (Tablo 5).

İzolatlarının illere göre dağılımı ise ; *L. brevis*: 14 Afyon, 7 Balıkesir, 21 Bursa, 14 İstanbul, 3 Yozgat, 1 Şırnak, 2 Sakarya, 1 Muğla, 4 Kütahya, 3 Kayseri, 2 İzmir, 1 Eskişehir, 1 Edirne, 2 Çankırı, 2 Antalya, ve 5 Ankara; *L. plantarum*: 5 Afyon, 6 Balıkesir, 24 Bursa, 6 İstanbul, , 2 Kütahya, 3 Kayseri, 2 İzmir, 3 Edirne, 1 Antalya, 1 Mersin; *P. pentosaceus*: 1 Antalya, 3 Balıkesir, 6 Bursa, 4 Çankırı, 2 İstanbul; *L .lactis subsp. lactis*:1 Bolu, 6 Bursa, 1 Çankırı, 4 İstanbul, 1 Mardin; *L.pentosus*: 2 Afyon, 6 Balıkesir, 3 Bursa, 2 İstanbul; *L.curvatus*: 3 Afyon, 2 Balıkesir, 2 Bursa, 3 İstanbul, 2 Kayseri; *P. acidilacti*: 2 Çankırı, 1 Balıkesir, 1 Kayseri, 1 İzmir; *L. acidophilus*: 3 Bursa, 1 Antalya; *L.cellobiosus*: 2 İstanbul,1 Bursa, 1 Afyon; *L. paracasei subsp. paracasei* :2 Bursa, 1 Balıkesir, 1 Kırklareli; *S. Salivarius subsp. thermophilus* :2 Kocaeli, 1 Ankara 1 İstanbul; *L. rhamnosus*: 2 Ankara, 1 Mersin; *L. mesenteroides subsp.mesenteroides/dextranicum*: Balıkesir, Bursa; *L .fermentum*: Eskişehir, Mardin; *L.salivarius*: Bursa, Balıkesir; *L. helveticus*: İzmir, Bursa; *L. coprophilus*: Bolu, Afyon; *L. lindneri*: Balıkesir; *L. delbrueckii*

subsp. delbrueckii: Kayseri; *L. mesenteroides subsp.cremoris*: Bursa ; *L. lactis*: Balıkesir;
ve *P.damnusus*: İzmir şeklinde tespit edildi (Tablo 6).

Tablo.4. API Sonuçlarına Göre Tanımlanan Bakterilerin Kullandığı Karbonhidrat Kaynakları

	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. cellulosus</i>	<i>L. coprophilus</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>L. lindneri</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. salivarius</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. lactis</i>	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> / <i>dextranicum</i>	<i>P. acidilacti</i>	<i>P. dammosus</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	
Kontrol																							
Glycerol																							
Erythritol																							
D-Arabinose																							
L-Arabinose																							
Ribose																							
D-Xylose																							
L-Xylose																							
Adonitol																							
Methyl-xyloside																							
Galactose																							
D-Glucose																							
D-Fructose																							
D-Mannose																							
L-Sorbose																							
Rhamnose																							
Dulcitol																							
Inositol																							
Mannitol																							
Sorbitol																							
Methyl-D-mannoside																							
Methyl-D-glucoside																							
N Acetyl glucosamine																							
Amygdaline																							
Arbutine																							
Esculine																							
Salicine																							
Cellobiose																							
Maltose																							
Lactose																							
Melibiose																							
Saccharose																							
Trehalose																							
Inuline																							
Melezitose																							
D-Raffinose																							
Amidon																							
Glycogene																							
Xylitol																							
Gentiobiose																							
D-Turanose																							
D-Lyxose																							
D-Tagatose																							
D-Fucose																							
L-Fucose																							
D-Arabitol																							
Arabitol																							
Gluconate																							
2 ceto-gluconate																							
5 ceto-gluconate																							

Tablo.5. API Sonuçlarına Göre Tanımlanan Bakterilerin Numunelere Göre Dağılımı

	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. cellobiosus</i>	<i>L. coprophilus</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. delbrueckii subsp. delbrueckii</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>L. lindneri</i>	<i>L. paracasei subsp. paracasei</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. salivarius</i>	<i>L. lactis subsp. lactis</i>	<i>L. lactis</i>	<i>L. mesenteroides subsp. cremoris</i>	<i>L. mesenteroides subsp. mesenteroides / dextranicum</i>	<i>P. acidilacti</i>	<i>P. damnosus</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>S. salivarius subsp. thermophilus</i>	TOPLAM
Sucuk	2	49	4	2	10	1	2	2	1	2	6	45	3	2	8	1	1	2	3	1	8	4	159
Pastırma	2	29									5	5			4				2		6		53
Çiğ et		5			2					2	2	3			1						2		17
Toplam	4	83	4	2	12	1	2	2	1	4	13	53	3	2	13	1	1	2	5	1	16	4	229

Tablo.6. API Sonuçlarına Göre Tanımlanan Bakterilerin İllere Göre Dağılımı

	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. cellobiosus</i>	<i>L. coprophilus</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. delbrueckii subsp. delbrueckii</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>L. lindneri</i>	<i>L. paracasei subsp. paracasei</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. salivarius</i>	<i>L. lactis subsp. lactis</i>	<i>L. lactis</i>	<i>L. mesenteroides subsp. cremoris</i>	<i>L. mesenteroides subsp. mesenteroides / dextranicum</i>	<i>P. acidilacti</i>	<i>P. damnosus</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>S. salivarius subsp. thermophilus</i>	TOPLAM
Afyon		14	1	1	3						2	5											26
Bursa	3	21	1		2			1		2	3	24		1	6		1	1			6		72
Bahkesir		7			2				1	1	6	6		1				1			3		30
İstanbul		14	2		3						2	6			4						2	1	34
Yozgat		3																					3
Şirnak		1																					1
Sakarya		2																					2
Muğla		1																					1
Kütahya		4										2											6
Kayseri		3			2	1						3							1				10
İzmir		2						1				2							1	1			7
Eskişehir		1					1																2
Edirne		1										3											4
Çankırı		2													1				2		4		9
Antalya	1	2										1									1		5
Ankara		5											2									1	8
Mersin												1	1										2
Bolu				1											1								2
Mardin							1								1								2
Kırklareli										1													1
Kocaeli																						2	2
Toplam	4	83	4	2	12	1	2	2	1	4	13	53	3	2	13	1	1	2	5	1	16	4	229

1.2.Real Time PCR analiz sonuçları

1.2.1. *L. brevis*

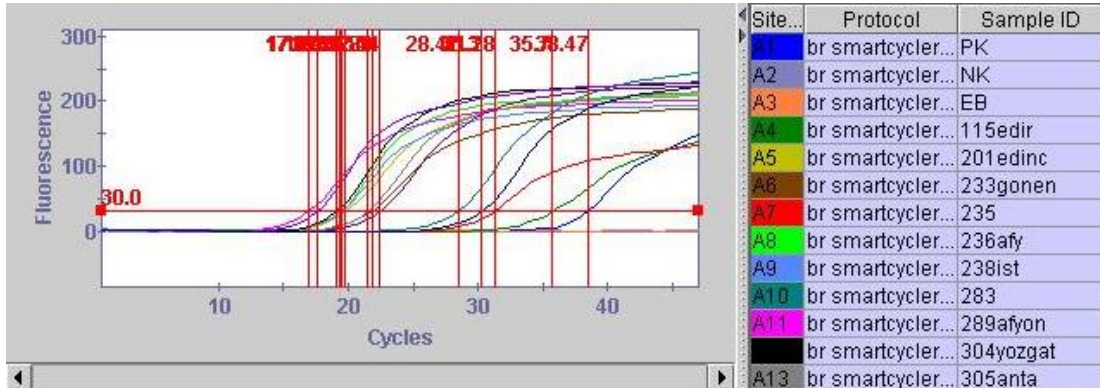
L. brevis'in real time PCR ile analizinde erime noktası 86,0 ile 88,26 arasında; eşik değeri ise 12,13 ile 25,16 arasında farklılık gösterdi.. Mini API sonucunda *L. brevis* olarak tanımlanan S25, S50, S115,S135,S149,P265,P267,P300,ve S336 kodlu izolatlarda real Time PCR ile yapılan analizde bir büyüme eğrisi gözlenmesine karşın bu izolatların erime noktası (melting point) olması gereken sıcaklıktan farklı olduğu için negatif olarak tanımlandı. (Tablo 7)

Tablo 7: *L. brevis* ' in analiz sonuçları

KOD	YERLEŞİM	LBS Agar (kob/g)	Mini API	PCR		
				SyG Ct	Melting	Sonuç
P2	Kayseri	3,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	12,13	88,26	<i>L. brevis</i>
S18	Bursa	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	26,58	87,67	<i>L. brevis</i>
S19	Bursa	4,0x10 ³	<i>L. brevis</i>	20,14	88,02	<i>L. brevis</i>
S21	Sakarya	4,0x10 ³	<i>L. brevis</i>	19,81	87,90	<i>L. brevis</i>
S23	Kütahya	5,0x10 ⁴	<i>L. brevis</i>	24,81	88,01	<i>L. brevis</i>
S25	Afyon	2,0x10 ⁴	<i>L. brevis</i>	34,19	78,68	
S30	İstanbul	8,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	26,35	87,13	<i>L. brevis</i>
S32	Kayseri	4,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	30,40	86,63	<i>L. brevis</i>
S36	Bursa	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	15,86	88,36	<i>L. brevis</i>
S37	Bursa	6,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	12,31	87,99	<i>L. brevis</i>
S49	Eskişehir	9,8x10 ³	<i>L. brevis</i>	19,79	86,02	<i>L. brevis</i>
S50	Kütahya	1,1x10 ⁴	<i>L. brevis</i>	28,14	79,58	
C53	Bursa	4,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	13,69	86,33	<i>L. brevis</i>
C54	Bursa	9,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	27,36	86,04	<i>L. brevis</i>
C57	Bursa	8,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	14,80	86,96	<i>L. brevis</i>
P62	İstanbul	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	16,71	87,36	<i>L. brevis</i>
P63	İstanbul	3,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	20,24	87,68	<i>L. brevis</i>
P64	Bursa	8,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	12,54	86,71	<i>L. brevis</i>
P65	Ankara	2,4x10 ³	<i>L. brevis</i>	17,52	87,56	<i>L. brevis</i>
Ç72	Bursa	1,8x10 ³	<i>L. brevis</i>	31,46	86,53	<i>L. brevis</i>
P77	Ankara	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	21,74	87,00	<i>L. brevis</i>
P78	Bursa	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	20,69	88,03	<i>L. brevis</i>
P80	Bursa	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	22,81	87,32	<i>L. brevis</i>
P81	Bursa	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	20,88	87,79	<i>L. brevis</i>

P82	Bursa	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	21,15	87,89	<i>L. brevis</i>
P83	Bursa	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	20,45	87,87	<i>L. brevis</i>
Ç86	Balıkesir	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	20,70	88,03	<i>L. brevis</i>
S90	İstanbul	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	14,50	88,13	<i>L. brevis</i>
S101	Sakarya	2,4x10 ³	<i>L. brevis</i>	14,57	87,74	<i>L. brevis</i>
S102	Afyon	4,2x10 ³	<i>L. brevis</i>	20,48	87,96	<i>L. brevis</i>
S111	Afyon	2,6x10 ³	<i>L. brevis</i>	21,50	86,23	<i>L. brevis</i>
S113	İstanbul	3,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	23,39	87,35	<i>L. brevis</i>
S115	Edirne	1,8x10 ³	<i>L. brevis</i>	30,73	80,82	
S116	Afyon	3,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	19,33	87,05	<i>L. brevis</i>
S124	Bursa	5,8x10 ³	<i>L. brevis</i>	23,28	87,90	<i>L. brevis</i>
S135	Balıkesir	1,3x10 ³	<i>L. brevis</i>	27,90	87,11	
S149	İstanbul	3,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	33,59	81,64	
S155	Muğla	6,8x10 ³	<i>L. brevis</i>	26,41	88,37	<i>L. brevis</i>
S158	Bursa	2,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	25,16	87,80	<i>L. brevis</i>
S159	Afyon	1,4x10 ³	<i>L. brevis</i>	18,27	87,50	<i>L. brevis</i>
S160	Afyon	1,3x10 ³	<i>L. brevis</i>	16,72	87,92	<i>L. brevis</i>
S164	Bursa	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	15,68	87,95	<i>L. brevis</i>
S172	Bursa	3,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	20,48	87,96	<i>L. brevis</i>
S174	Ankara	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	18,51	87,75	<i>L. brevis</i>
S180	Afyon	2,6x10 ³	<i>L. brevis</i>	19,26	87,66	<i>L. brevis</i>
S201	Balıkesir	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	17,11	87,81	<i>L. brevis</i>
S214	İstanbul	3,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	19,18	86,73	<i>L. brevis</i>
S218	Balıkesir	1,2x10 ³	<i>L. brevis</i>	29,10	86,59	<i>L. brevis</i>
S223	Balıkesir	1,8x10 ³	<i>L. brevis</i>	33,18	86,91	<i>L. brevis</i>
P226	İstanbul	1,1x10 ³	<i>L. brevis</i>	21,64	86,49	<i>L. brevis</i>
P227	İstanbul	3,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	21,77	88,11	<i>L. brevis</i>
P228	İstanbul	7,2x10 ³	<i>L. brevis</i>	22,72	87,20	<i>L. brevis</i>
P230	Afyon	3,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	21,23	87,63	<i>L. brevis</i>
S232	Balıkesir	2,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	21,71	86,84	<i>L. brevis</i>
S233	Balıkesir	3,0x10 ³	<i>L. brevis</i>	18,31	87,01	<i>L. brevis</i>
P234	Afyon	7,0x10 ³	<i>L. brevis</i>	15,90	86,78	<i>L. brevis</i>
P235	Afyon	4,0x10 ³	<i>L. brevis</i>	15,35	87,68	<i>L. brevis</i>
P236	Afyon	1,4x10 ³	<i>L. brevis</i>	21,24	86,85	<i>L. brevis</i>
P238	İstanbul	1,6x10 ³	<i>L. brevis</i>	14,37	87,44	<i>L. brevis</i>
P243	Kayseri	5,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	19,46	86,89	<i>L. brevis</i>
P260	Ankara	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	22,34	87,46	<i>L. brevis</i>
P261	Bursa	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	23,30	87,02	<i>L. brevis</i>
P265	İzmir	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	35,19	80,85	
P267	İzmir	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	36,23	79,76	
P270	Bursa	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	22,00	87,33	<i>L. brevis</i>
P271	Kütahya	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	12,38	87,49	<i>L. brevis</i>
P273	Çankırı	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	18,68	88,13	<i>L. brevis</i>

S283	Kütahya	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	31,41	86,31	<i>L. brevis</i>
S289	Afyon	4,3x10 ³	<i>L. brevis</i>	12,35	86,38	<i>L. brevis</i>
P291	Bursa	3,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	19,18	86,57	<i>L. brevis</i>
S293	İstanbul	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	12,88	87,89	<i>L. brevis</i>
P300	Ankara	1,9x10 ⁴	<i>L. brevis</i>	31,44	85,80	
S304	Yozgat	3,0x10 ⁻¹	<i>L. brevis</i>	19,14	87,12	<i>L. brevis</i>
S305	Antalya	3,5x10 ²	<i>L. brevis</i>	21,53	86,98	<i>L. brevis</i>
S311	İstanbul	8,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	18,61	87,58	<i>L. brevis</i>
S312	Afyon	1,3x10 ⁴	<i>L. brevis</i>	26,68	86,00	<i>L. brevis</i>
S313	Yozgat	1,2x10 ³	<i>L. brevis</i>	14,68	88,00	<i>L. brevis</i>
S314	Antalya	2,2x10 ³	<i>L. brevis</i>	18,81	87,58	<i>L. brevis</i>
S315	Afyon	9,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	17,43	86,98	<i>L. brevis</i>
S320	Yozgat	1,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	21,65	87,16	<i>L. brevis</i>
S330	Çankırı	3,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	22,44	88,30	<i>L. brevis</i>
S334	İstanbul	4,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	17,59	88,38	<i>L. brevis</i>
S336	Şırnak	7,0x10 ²	<i>L. brevis</i>	30,88	80,83	
Melting point ortalaması (numuneler)		86,7	DNA (<i>L. brevis</i>)	20,09	86,84	



Şekil 11 : *L. brevis* 'in SmartCycler Real Time PCR'daki büyüme eğrisi

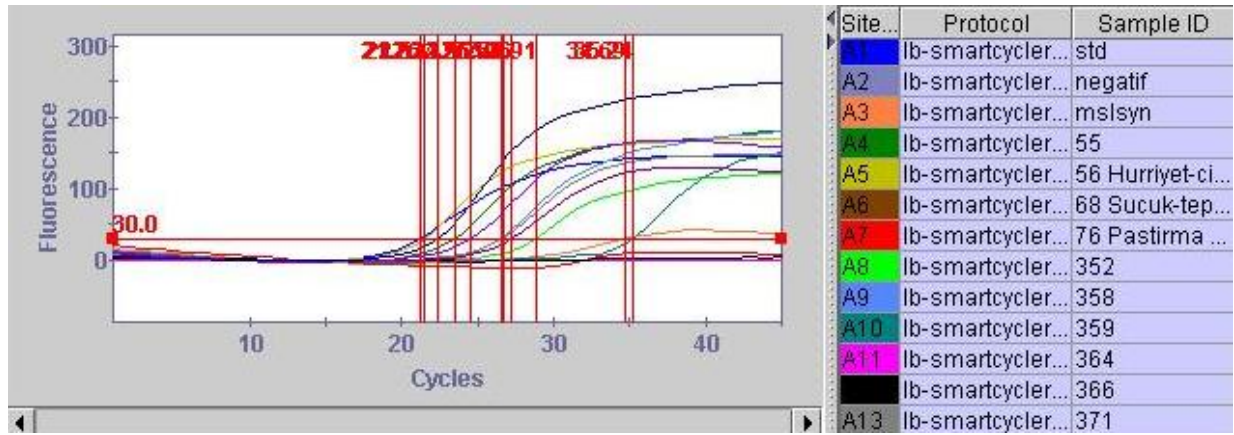
1.2.2. *L. plantarum*

L. plantarum'un real time PCR ile analizinde erime noktası 85,04 ile 86,07 arasında; eşik değeri ise 35.24 ile 15.24 arasında farklılık gösterdi. Mini API sonucunda *L. plantarum* olarak identifiye edilen S156, S351, S353, ve S360 kodlu izolatlarda Real Time PCR ile yapılan analizde bir büyüme eğrisi gözlenmesine karşın bu izolatların erime noktası (melting point) olması gereken sıcaklıktan farklı olduğu için negatif olarak tespit edildi. P76, S342, ve S357 kodlu izolatlarda ise bir büyüme eğrisi gözlenmedi. (Tablo 8)

Tablo 8: *L. plantarum*'un analiz sonuçları

KOD	YERLEŞİM	LBS Agar (kob/g)	Mini API	PCR		
				SyG Ct	Melting	sonuç
S16	Kayseri	7,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	27.30	86.18	<i>L. plantarum</i>
S22	Kütahya	1,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	16,62	85,15	<i>L. plantarum</i>
S35	Bursa	4,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	15,76	86,94	<i>L. plantarum</i>
S45	Edirne	6,7x10 ³	<i>L. plantarum</i>	32.37	85.08	<i>L. plantarum</i>
S46	Edirne	1,5x10 ³	<i>L. plantarum</i>	16,70	85,90	<i>L. plantarum</i>
S47	Edirne	2,8x10 ³	<i>L. plantarum</i>	15,79	86,96	<i>L. plantarum</i>
C55	Bursa	9,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	23.47	83.93	<i>L. plantarum</i>
C56	Bursa	1,8x10 ³	<i>L. plantarum</i>	21.52	84.91	<i>L. plantarum</i>
P61	İstanbul	1,3x10 ³	<i>L. plantarum</i>	23.30	85.69	<i>L. plantarum</i>
P66	Kayseri	1,3x10 ³	<i>L. plantarum</i>	15,86	86,63	<i>L. plantarum</i>
S68	İstanbul	7,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	15,86	86,63	<i>L. plantarum</i>
Ç73	Bursa	1,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	16,26	86,69	<i>L. plantarum</i>
P75	Kayseri	1,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	15,6	86,76	<i>L. plantarum</i>
P76	İstanbul	1,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	0	78.91	
S88	İstanbul	1,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	16,44	86,67	<i>L. plantarum</i>
S95	İstanbul	4,2x10 ³	<i>L. plantarum</i>	15,98	86,58	<i>L. plantarum</i>
S97	Bursa	1,4x10 ³	<i>L. plantarum</i>	15,48	87,00	<i>L. plantarum</i>
S98	Bursa	4,3x10 ³	<i>L. plantarum</i>	16,20	86,72	<i>L. plantarum</i>
S99	Bursa	4,6x10 ³	<i>L. plantarum</i>	17.36	85.84	<i>L. plantarum</i>
S104	Afyon	1,1x10 ³	<i>L. plantarum</i>	15,79	86,89	<i>L. plantarum</i>
S106	Balıkesir	1,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	16,41	85,88	<i>L. plantarum</i>
S110	Balıkesir	1,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	15,91	86,87	<i>L. plantarum</i>
S120	Bursa	3,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	26.46	84.47	<i>L. plantarum</i>
S121	Kütahya	2,4x10 ³	<i>L. plantarum</i>	16,44	86,04	<i>L. plantarum</i>
S126	Bursa	6,1x10 ³	<i>L. plantarum</i>	15,24	87,12	<i>L. plantarum</i>
S127	Bursa	4,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	15,47	87,02	<i>L. plantarum</i>
S129	Afyon	3,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	16,30	86,34	<i>L. plantarum</i>
S130	Afyon	1,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	16,31	87,09	<i>L. plantarum</i>
S131	İzmir	9,6x10 ³	<i>L. plantarum</i>	16,64	86,92	<i>L. plantarum</i>
S156	Bursa	3,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	17,78	85,50	<i>L. plantarum</i>
P276	Afyon	1,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	16,31	87,08	
S303	Afyon	9,8x10 ³	<i>L. plantarum</i>	16,74	86,78	<i>L. plantarum</i>
S337	Antalya	2,8x10 ³	<i>L. plantarum</i>	29.72	85.46	<i>L. plantarum</i>
S338	İstanbul	1,7x10 ⁴	<i>L. plantarum</i>	16,13	86,95	<i>L. plantarum</i>
S341	Bursa	1,9x10 ³	<i>L. plantarum</i>	27.82	85.78	<i>L. plantarum</i>
S342	Bursa	4,8x10 ³	<i>L. plantarum</i>	0	0	
S346	Bursa	5,3x10 ³	<i>L. plantarum</i>	24.56	85.97	<i>L. plantarum</i>

S348	Bursa	1,2x10 ⁴	<i>L. plantarum</i>	16,93	86,66	<i>L. plantarum</i>
S351	Bursa	8,3x10 ³	<i>L. plantarum</i>	15,97	87,10	
S352	Mersin	4,4x10 ³	<i>L. plantarum</i>	28,91	85,75	<i>L. plantarum</i>
S353	Balıkesir	3,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	14,96	87,15	
S356	Bursa	2,2x10 ³	<i>L. plantarum</i>	20,14	85,32	<i>L. plantarum</i>
S357	Bursa	7,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	0	0	
S358	Bursa	4,1x10 ³	<i>L. plantarum</i>	26,53	84,99	<i>L. plantarum</i>
S359	Balıkesir	2,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	35,24	85,77	<i>L. plantarum</i>
S360	Balıkesir	4,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	38,40	79,11	
S361	Bursa	8,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	24,16	85,04	<i>L. plantarum</i>
S362	Bursa	3,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	20,16	85,43	<i>L. plantarum</i>
S364	Bursa	1,4x10 ³	<i>L. plantarum</i>	21,91	85,48	<i>L. plantarum</i>
S366	Balıkesir	3,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	21,71	85,15	<i>L. plantarum</i>
S371	İzmir	7,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	26,67	86,07	<i>L. plantarum</i>
S372	Bursa	6,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	32,21	85,75	<i>L. plantarum</i>
S373	Bursa	1,0x10 ²	<i>L. plantarum</i>	27,26	85,97	<i>L. plantarum</i>
Melting point ortalaması:86,0013 (numuneler)			DNA (<i>L. plantarum</i>)	18,47	85,91	



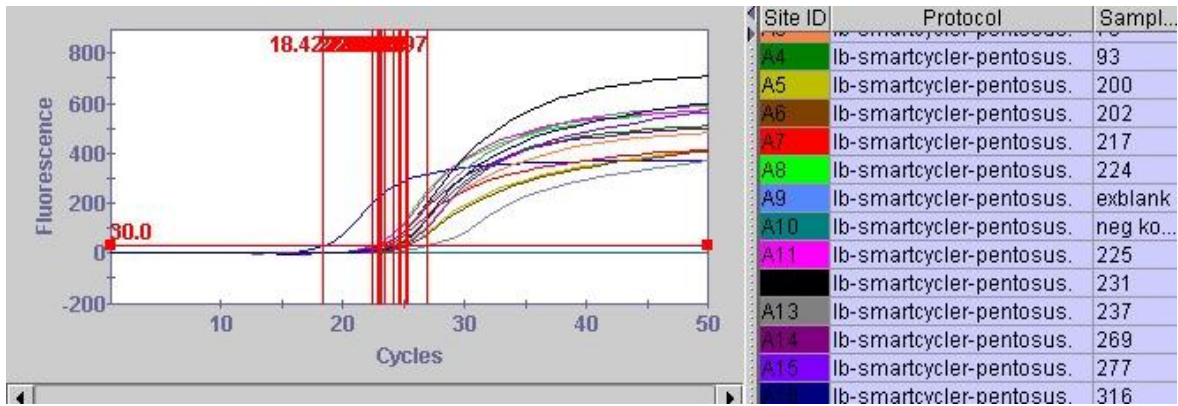
Şekil 12: *L. plantarum* 'un SmartCycler Real Time PCR'daki büyüme eğrisi

1.2.3. *L.pentosus*

L. pentosus' un real time PCR ile analizinde erime noktası 85,09 ile 85,82 arasında; eşik değeri ise 22,93 ile 41,61 arasında farklılık gösterdi. Mini API sonucunda *L.pentosus* olarak identifiye edilen S93, S200, S202, ve S225 kodlu izolatlarda real Time PCR ile yapılan analizde bir büyüme eğrisi gözlenmesine karşın bu izolatların erime noktası (melting point) olması gereken sıcaklıktan farklı olduğu için negatif olarak tespit edildi. Ç60 kodlu izolatta ise bir büyüme eğrisi gözlenmedi. (Tablo 9)

Tablo 9: *L.pentosus*'un analiz sonuçları

KOD	YERLEŞİM	LBS Agar (kob/g)	Mini API	PCR		
				SyG Ct	Melting	sonuç
Ç60	Balıkesir	1,8x10 ³	<i>L. pentosus</i>	0	0	
Ç79	İstanbul	1,0x10 ²	<i>L. pentosus</i>	16,62	85,15	<i>L. pentosus</i>
S93	Balıkesir	4,8x10 ³	<i>L. pentosus</i>	21,90	80,28	
S200	Balıkesir	1,0x10 ²	<i>L. pentosus</i>	20,56	80,88	
S202	Balıkesir	1,0x10 ²	<i>L. pentosus</i>	48,40	0	
P217	Afyon	4,0x10 ²	<i>L. pentosus</i>	36,92	85,76	<i>L. pentosus</i>
S224	Balıkesir	4,0x10 ²	<i>L. pentosus</i>	41,61	85,74	<i>L. pentosus</i>
S225	Balıkesir	3,0x10 ²	<i>L. pentosus</i>	17,93	81,39	
P231	Afyon	4,0x10 ²	<i>L. pentosus</i>	22,93	85,82	<i>L. pentosus</i>
P237	İstanbul	5,8x10 ³	<i>L. pentosus</i>	23,10	85,50	<i>L. pentosus</i>
P269	Bursa	1,0x10 ²	<i>L. pentosus</i>	23,14	85,62	<i>L. pentosus</i>
P277	Bursa	1,0x10 ²	<i>L. pentosus</i>	24,84	85,09	<i>L. pentosus</i>
S316	Bursa	7,0x10 ²	<i>L. pentosus</i>	24,22	85,21	<i>L. pentosus</i>
Melting point ortalaması:86,70 (numuneler)			DNA (<i>L. pentosus</i>)	20,09	86,84	



Şekil 13: *L. pentosus*'un SmartCycler Real Time PCR'daki büyüme eğrisi

1.2.4. *P. acidilactici*

P. acidilactici'nin real time PCR ile analizinde erime noktası 80,28 ile 80,88 arasında; eşik değeri ise 20,56 ile 21,9 arasında farklılık gösterdi. Mini API sonucunda *P. acidilactici* olarak tanımlanan S206, P275, S282, S335, ve S336 kodlu izolatların real Time PCR ile yapılan analizde bir büyüme eğrisi gözlenmesine karşın bu izolatların erime noktası (melting point) olması gereken sıcaklıktan farklı olduğu için negatif olarak tespit

edildi. PS29 kodlu izolatta ise bir büyüme eğrisi gözlenmedi. (Tablo 10)

Tablo 10: *P. acidilactici* 'nin analiz sonuçları

KOD	YERLEŞİM	LBS Agar (kob/g)	Mini API	PCR		
				SyG Ct	Melting	sonuç
S29	Çankırı	1,0x10 ²	<i>P.acidilacti</i>	0	0	
S206	Balıkesir	1,0x10 ²	<i>P.acidilacti</i>	16,62	85,15	
P268	Kayseri	2,0x10 ²	<i>P.acidilacti</i>	21,90	80,28	<i>P. acidilacti</i>
P272	İzmir	1,0x10 ²	<i>P. acidilacti</i>	20,56	80,88	<i>P. acidilacti</i>
P275	Bursa	4,0x10 ²	<i>Pediococcus spp</i>	48,40	0	
S282	Çankırı	1,0x10 ²	<i>P. acidilacti</i>	36,92	85,76	
S335	İstanbul	3,0x10 ²	<i>Pediococcus spp.</i>	41,61	85,74	
S336	İstanbul	7,0x10 ²	<i>Pediococcus spp.</i>	17,93	81,39	
Melting point ortalaması:80,58 (numuneler)			DNA (<i>P. acidilacti</i>)	39,25	80,71	



Şekil 14 : *P. acidilactici* 'nin SmartCycler Real Time PCR'deki büyüme eğrisi

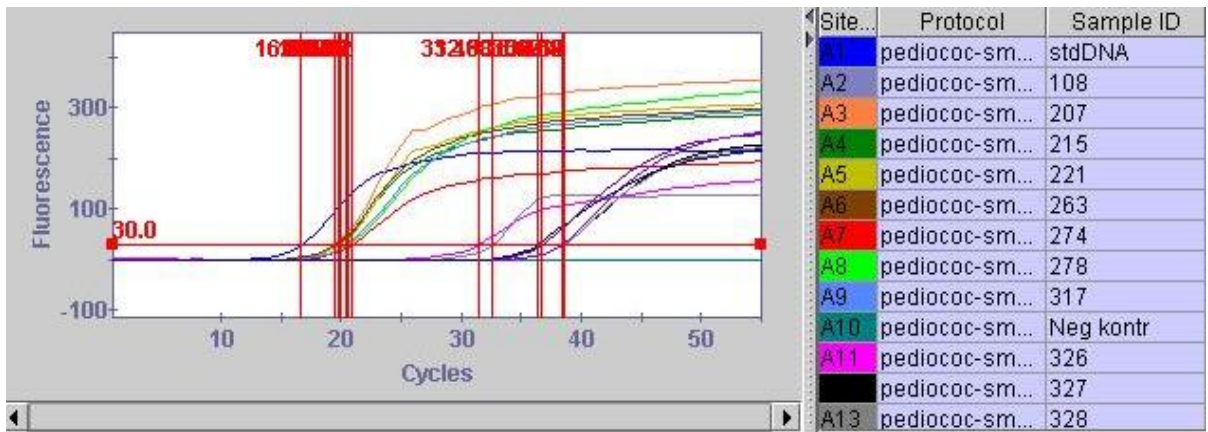
1.2.5. *P.pentosaceus*

P.pentosaceus' un real time PCR ile analizinde erime noktası 87,9 ile 86,73 arasında; eşik değeri ise 19,45 ile 20,92 arasında farklılık gösterdi. Mini API sonucunda *P. pentosaceus* olarak tanımlanan S326,S327,S328,S329,S333, S339 ve S340 kodlu izolatlarda real Time PCR ile yapılan analizde bir büyüme eğrisi gözlenmesine karşın bu izolatların erime noktası (melting point) olması gereken sıcaklıktan farklı olduğu için

negatif olarak tespit edildi. (Tablo 11)

Tablo 11: *P.pentosaceus*'un analiz sonuçları

KOD	YERLEŞİM	LBS Agar (kob/g)	Mini API	PCR		
				SyG Ct	Melting	sonuç
Ç91	Bursa	1,0x10 ²	<i>P.pentosaceus</i>	19,84	87,52	<i>P. pentosaceus</i>
S207	Bursa	1,0x10 ²	<i>P. pentosaceus</i>	19,45	87,33	<i>P. pentosaceus</i>
P215	İstanbul	7,0x10 ²	<i>P. pentosaceus</i>	19,84	87,23	<i>P. pentosaceus</i>
Ç221	Balıkesir	1,8x10 ³	<i>P. pentosaceus</i>	19,93	87,26	<i>P. pentosaceus</i>
P239	İstanbul	3,0x10 ²	<i>P. Pentosaceus</i>	19,86	87,90	<i>P. pentosaceus</i>
P263	Balıkesir	1,0x10 ²	<i>P. pentosaceus</i>	19,49	87,31	<i>P. pentosaceus</i>
P274	Bursa	1,0x10 ²	<i>P. pentosaceus</i>	20,92	87,00	<i>P. pentosaceus</i>
P278	Bursa	1,0x10 ²	<i>P. pentosaceus</i>	20,53	86,73	<i>P. pentosaceus</i>
P317	Bursa	8,0x10 ²	<i>P. pentosaceus</i>	20,36	86,75	<i>P. pentosaceus</i>
S326	Çankırı	4,0x10 ²	<i>P. pentosaceus</i>	31,48	85,89	
S327	Bursa	3,0x10 ²	<i>P. pentosaceus</i>	38,59	77,66	
S328	Çankırı	2,0x10 ²	<i>P. pentosaceus</i>	38,62	78,38	
S329	Çankırı	2,0x10 ²	<i>P. pentosaceus</i>	36,67	79,90	
S333	Çankırı	1,0x10 ²	<i>P. pentosaceus</i>	38,38	80,11	
S339	Antalya	2,8x10 ³	<i>P. pentosaceus</i>	36,40	78,91	
S340	Balıkesir	1,2x10 ³	<i>P. pentosaceus</i>	19,33	83,98	
Melting point ortalaması:83,97 (numuneler)			DNA (<i>P. pentosaceus</i>)	17,48	87,55	



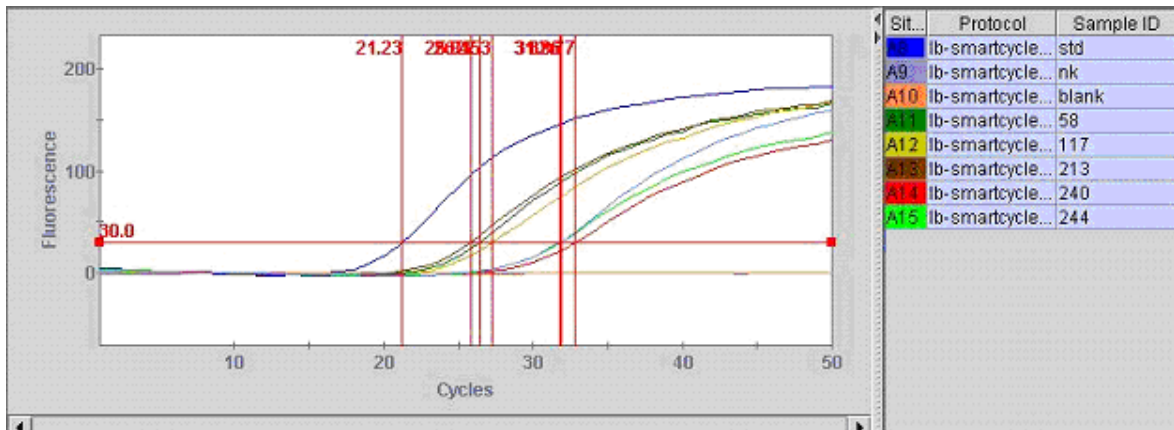
Şekil 15: *P.pentosaceus*'un in SmartCycler Real Time PCR'daki büyüme eğrisi

1.2.6. *L.paracasei*

Mini API sonucunda *L. paracasei* olarak identifiye edilen izolatların hiçbirini real Time PCR ile yapılan analizde *L. paracasei* olarak konfirme edilmedi. (Tablo 12)

Tablo 12: *L.paracasei* 'nin analiz sonuçları

KOD	YERLEŞİM	LBS Agar (kob/g)	Mini API	PCR		
				SyG Ct	Melting	sonuç
S117	Kırklareli	1,6x10 ²	<i>L. paracasei</i>	27.30	81.59	<i>L. casei</i>
S213	Balıkesir	2,0x10 ²	<i>L. paracasei</i>	25.81	81.00	<i>L. casei</i>
Ç240	Bursa	8,0x10 ³	<i>L. paracasei</i>	32.77	81.86	<i>L. casei</i>
Ç244	Bursa	9,8x10 ³	<i>L. paracasei</i>	31.86	81.88	<i>L. casei</i>
Melting point ortalaması:81,58 (numuneler)			DNA (<i>L.casei</i>)	21.23	81.68	



Şekil 16: *L. casei* 'in SmartCycler Real Time PCR'daki büyüme eğrisi

Sonuç olarak Mini API'de identifiye edilen 174 adet izolatın sadece 139 tanesi Real Time PCR ile konfirme oldu (Tablo 13).

Tablo 13 : Sonuç Özeti

İzolat	API	PCR	%
<i>L. paracasei</i>	4	0	0
<i>P. acidilacti</i>	5	2	1.43
<i>L. pentosus</i>	13	8	5.75
<i>P. pentosacceus</i>	16	9	6.47
<i>L. plantarum</i>	53	46	33.09
<i>L. brevis</i>	83	74	53.23
Toplam*	174	139	

* *L. casei* hesaplamaya katılmamıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden (Adapazarı, Afyon, Ankara, Balıkesir, Bursa, Çankırı, Diyarbakır, Edirne, Eskişehir, İstanbul, İzmir, Kayseri, Kocaeli, Kütahya, Manisa, Mardin, Mersin, Muğla, Şırnak, Tekirdağ ve Yalova) sucuk, pastırma ve çiğ et numuneleri temin edildi. Bu numunelerin 234 adedine Mini API'de tür tayini analizi uygulandı. 159 sucuk, 53 pastırma ve 17 çiğ numunesinden Mini API karbonhidrat testleri sonucunda teşhis edilen 229 mikroorganizmanın en çok görülen türlerden 174 tanesine (*L. brevis* 83, *L. plantarum* 53, *L. pentosus* 13, *L. paracasei* 4, *P. pentosaceus* 16 ve *P. acidilactici* 5) real Time PCR da DNA diziliminin 16S bölgesine dayalı tür confirmasyonu yapıldı.

Bunun sonucunda *L. brevis* 74, *L. plantarum* 46, *P. Pentosaceus* 9, *L. pentosus* 8 ve *P. Acidilacti* 2 adet olarak konfirme edildi.

Bu sonuçlara göre mikro floraya hakim olan mikroorganizmalar yaklaşık % 74 gibi bir oranla *L. brevis* ve *L. plantarum* olarak ortaya çıkmaktadır.

Bu sonuçlar, araştırmanın ve doktora tezinin başlığı ile uyum içinde değildir. Daha önceki araştırmalarda; düşük sıcaklıkta fermente edilen sucuklarda hakim olan mikroorganizmaların *L. sake* ve *L. curvatus* olduğu; yüksek sıcaklıklardaki (25-30 °C üstü) fermantasyonlarda ise *L. plantarum* 'un hakim mikroorganizma olduğu belirtilmiştir (2, 3, 8, 102).

Anar, (3) sucuklarda 30 °C altındaki fermantasyon sıcaklığında *L. sake* ve *L. curvatus* türlerinin daha iyi ürediğini belirterek, fermente et ürünlerinde *L. sake*'nin starter olarak kullanılmasının *Salmonella* türleri üzerinde inhibe edici etkisi olduğunu belirtmiştir (3).

Özdemir ve Arkadaşları (8) 25 °C de 3 haftalık periyot boyunca olgunlaştırılan Türk fermente sucuklarından izole edilen toplam 80 laktobasil suçundan % 85 'inin *L. sake* ve *L. curvatus* olarak tanımlanmış olduğunu belirtmiştir (8).

Yapılan çalışmalarda, düşük asiditeye sahip sucuklarda %17.6; %40.2 ve %45.6 oranında *L. plantarum* tanımlanmıştır (106-108).

Lactococcus lactis subsp. *lactis* sucuklarda, %4.9, ve %1 oranında tanımlanmıştır . Diğer bazı çalışmalarda izolatların %13.3'nün, %17.6'sının ve %4.3'ün *L. curvatus* olduğu belirlenmiştir (106, 107).

Araştırmalar arasındaki farkın muhtemel nedeni; bu araştırmada ticari olarak markalı ve kitle halinde üretilen ürünlerin değil de kasapların kendilerinin kesip ürettiği, köylerden temin edilen veya ailelerin kendi tüketimleri için ürettikleri, içinde starter kültür kullanılmayan fermente ürünlerin temel alınması, sucuğun üretim teknolojisi, olgunlaştırma ve muhafaza şartlan ile fermantasyon sıcaklıklarındaki değisiklikler ve diğer araştırmalarda kullanılan sucukların yerel özellikler taşıması olarak tanımlanabilir (80,102,106-112, 114).

Örneğin Özdemir ve arkadaşları (102) .Ü. Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi A.B.D. Et Ünitesinde deneysel olarak üretilen sucukları kullanmışlardır. Bu nedenle çalışmalarında elde edilen bulgular Ankara'ya özgüdür, Türkiye geneline ait bir veri değildir (102).

Aquilantila (109) ise yaptıkları çalışmada ota İtalya'daki Ciauscolo isimli İtalyan fermente salamına hakim olan mikroorganizmaları *L. curvatus*, *L. plantarum* ve *Staphylococcus xylosus* olarak bulmaları ise İtalya'nın belli bir bölgesine özgüdür.

Hugas ve Arkadaşlarının (110) on beş farklı üreticiden temin edilen fermente sosislerden izole ettikleri 254 lactobacilli izolatının; *L. sake* %55, *L. curvatus* %26, *Lactobacillus bavaricus* %11 ve *L. plantarum* %8 şeklinde dağılım göstermeleri İspanya'ya özgü bir sonuçtur.

Santos ve Arkadaşları (111) İspanya'da chorizo adlı fermente sosisten elde edilen 516 laktik asit bakterisinin *L.* %68.8, *L. curvatus* %16.47, ve *Pediococcus* spp. %8.52 olarak dağılım göstermesi; numunelerin temin edildiği İspanyanın Burgos, Segovia ve Salamanca bölgelerini temsil eden bir sonuçtur.

Aymerich ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, düşük asiditeli sucuklarda %17 oranında, Toksoy ve arkadaşları %40 oranında Drosinos ve arkadaşları ise %45 oranında *Lactobacillus plantarum* identifiye etmişlerdir (107,108,112).

Lücke yaptığı çalışmada (113), izole ettiği laktik asit bakterilerinin %10'unu *L. curvatus subsp. curvatus* olarak tanımlanmıştır.

Comi ve arkadaşları (114), yaptıkları çalışmada izole ettikleri 150 laktik asit bakterisinden, 54 izolatın *L. curvatus subsp. curvatus* olduğunu tespit etmişlerdir.

Greco ve arkadaşları elde edilen izolatların %13.3'nün, Aymerich ve arkadaşları %17.6'sının, Drosinos ve arkadaşları ise %4.3'nün *L. curvatus subsp. curvatus* olduğunu belirlemişlerdir (80, 106, 107)

Baruzzi ve arkadaşları (115), yaptıkları çalışmada, isimli İtalya'nın güneyinde geleneksel olarak üretilen sucukta (Salame di semse) *Lactobacillus* türlerinin mikrofloraya hakim olduğunu saptamışlardır.

.Sohier ve arkadaşları (116), tür seviyesinde bakterilerin tanımlanmasında, türler arasındaki ayrımı ortaya koymada ve karakterize etmede; fenotipik veya biyokimyasal yöntemlerin genotipik yöntemlerle genotipik yöntemlerle desteklenmesinin daha etkili olduğu sonucuna varmışlardır.

Conter ve arkadaşları (79), starter kültür kullanmadan üretilen İtalyan fermente sucuklardan elde edilen izolatların tanımlanmasında tek başına API yönteminin yeterli olmadığını belirtmiştir.

Sonuç olarak, Mini API ve Real Time PCR teknikleri birlikte kullanıldığında; ülkemizde geleneksel yöntemlerle ve starter kültür kullanılmadan üretilen fermente et ürünlerinde hakim mikrofloranın *L. brevis* (%53) olduğu tespit edildi. Diğer mikroorganizmalar ise *L. plantarum* (%33) *P. pentosaceus* (%6), *L. pentosus* (%5) ve *P. acidilacti* (%1) olarak belirlendi.

KAYNAKLAR

1. KARAKUŞ M. Effect of starter composed of various species of lactic bacteria on quality and ripening of turkish white pickled cheese , Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie Volume 28, Issue 4, Pages 404-409, 1995.
2. GÖZÜBÜYÜK S. Ticari Starter Kültürlerin Fermente Türk Sucuklarının Organoleptik Kalite Niteliklerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi 2004 – Ankara
3. ANAR, Ş. Fermente Et Ürünlerinde Kullanılan Starter Kültürler ve Başlıca Fonksiyonları U.U. Veteriner Fakültesi Dergisi 1-2-3, 16, 1997.
4. KILIÇ S. Süt endüstrisinde laktik asit bakterileri Ege üniversitesi ziraat fakültesi yayınları. Sayfa 37-59, 2001.
5. YÜKSEKDAĞ Z. Kefir mikroflorası ile laktik asit bakterilerinin metabolik, antimikrobiyal ve genetik özellikleri, Orta online Mikrobiyoloji Dergisi, Cilt1 Sayı 02 Sayfa 49-63, 2003
6. ÖZDEMİR H. Türk fermente sucuğundan izole edilen laktobasillerin H₂O₂ ve H₂S oluşturma özelliklerinin saptanması Gıda 27(4)311-314, 1996.
7. COŞANSU S. Fermente et ürünlerinde starter kültür kullanımı ile patojenlerin inhibisyonu gıda 23(2)99-103, 1998.
8. ÖZDEMİR H. Türk fermente sucuklarından izole edilen laktobasillerin antibakteriyel etkilerinin saptanması , Gıda 27(6)539-544, 2002.
9. EROL İ. Dumanlanmış ve vakumla paketlenmiş fermente sucuklarda H₂S oluşum nedeni olarak özelliklerinin *Lactobacillus curvatus* izolasyonu Gıda 19(4)271-275, 1994
10. VURAL H. Türk sucuklarında ticari starter kültür kullanımı üzerine araştırmalar, Gıda 17(1)53-54, 1992.
11. SEZGİN E. Yerli ve yabancı starter kullanılarak yapılan yoğurtların kaliteleri üzerine bir araştırma. Gıda 13(1) s 5-11, 1988.
12. ERCOSKUN, H. Farklı Starter Kültürler Kullanılarak Üretilen Sucukların Bazı Özellikleri Ve Uçucu Aroma Bileşikleri, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 100 s. Denizli. 1999.
13. SHAHİDİ, F. Assesment of Lipid Oxidation and Off- flavors Development in Meat, Meat Products and Seafood. In Flavor of Meat, Meat Products and Seafood. Ed. by F. Shahidi. 2nd Edt. Blackie Acedemic and Proffessional. London. p429. England, 1998.
14. MACLEOD, G. The Flavour of Meat. In Flavor of Meat, Meat Products and Seafood. Ed. By F. Shahidi. 2nd Edt. Blackie Academic and Professional. London. p429. England, 1998.
15. MOTTRAM, D. S. The Chemistry of Meat Flavour. In Flavor of Meat, Meat Products and Seafood. Ed. By F. Shahidi. 2nd Edt. Blackie Academic and Professional. London. p429. England, 1998.
16. CHEN, J AND HO, T. The Flavour of Pork. in Flavor of Meat, Meat Products and Seafood. Ed. By F. Shahidi. 2nd Edt. Blackie Academic and Professional. London p429. England, 1998.
17. JOHANSSON, G., BERDAGUE, J. L., LARSSON, M., TRAN, N. AND BORCH, E. Lipolysis, Proteolysis and Formation of Volatile Components During Ripening of a Fermented Sausage with *Staphylococcus xylosus* as Starter Culture. Meat Sci., 38, 203-218, 1994.
18. ERGINKAYA, Z. Fermente Sucuklarda Organik Asit Miktarının Belirlenmesi. Gıda, 18(6), 373-376, 1993.

19. SAMELIS, J., AGGELIS, G. AND METAXOPOULOS, J. Lipolytic and Microbial Changes During the Natural Fermentation and Ripening of Greek Dry Sausage. *Meat Sci.*, 35,371-385, 1993.
20. BERGER, R.G., MACKU, C. AND GERMAN, J.B. Isolation and Identification of Dry Salami Volatiles. *J. of Food Sci.*, 55(5), 1239-1242, 1990.
21. MORRİSEY, R. A., SHEEYH, R. J. A., GALVİN, K., KERRY, J. R AND BUCKLEY, D. J. Lipid Stability in Meat and Meat Products. *Meat Sci.*, 49(1), 73-86, 1998.
22. BERDAGUE, L.J., MONTEIL, R, MONTEL, M.C. AND TALON, R. Effects of Starter Cultures on the Formation of Flavour Compounds in Dry Sausage. *Meat Sci.*, 35, 275-287, 1993.
23. NYCHAS, G. J. E. AND ARKOUELOS, J.S. Staphylococci: Their Role in Fermented Sausage. *J. of Applied Bacteriology Symposium Supplement.* 167-188, 1990.
24. MONTEL, M.C., TALON, R., BERDAGUE, J.L. AND CANTONNET, M. Effects of Starter Cultures on the Biochemical Characteristics of French Dry Sausages. *Meat Sci.*, 35(1), 229-240, 1993.
25. HO, T. AND CHEN, Q. Lipids in Food Flavours: An Overview. *American Chemical Society Symposium Series 558 Lipids in Food Flavors.* 2-14. Denver, Colorado, U.S.A, 1994.
26. Stahnke, L. H. Dried Sausages Fermented with *Staphylococcus xylosus* at Different Temperatures and with Different Ingredient Levels. Part II. Volatile Components. *Meat Sci.*, 41 (2), 193-209, 1995.
27. ERTAŞ, A.H. Fermente sosislerde lezzet oluşumu. *Gıda*, 24(5), 309-317, 1999.
28. EKUNDAYO, O., LAAKSO, L., ADEGBOLA, R. M., OGUNTIMEIN, B., SOFOVVARA, A., AND HİLTUNEN, R.. Essential Oil Constituents of Ashanti Pepper (*Piper guineense*) Fruits. *J of Agric. and Food Chem.*, 36,880-882, 1988.
29. GUADAYOL, J. M., CAIXACH, J., CABANAS, J., AND RİVERA, J. Extraction, Separation and Identification of Volatile Organic Compounds from Paprika Oleoresin. *J. of Agric. and Food Chem.*, 45,1868-1872, 1997.
30. ÇÖN AH. Türkiye pazarındaki sucukların bazı kimyasal ve mikrobiyolojik nitelikleri *Gıda* 23(5)347-355, 1998
31. ERGİNKAYA Z. Sucukların olgunlaşmasında micrococcaceae familyası ait bazı bakteriler ile bazı mayaların birbirleri ile olan karşılıklı ilişkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, s 43,1998
32. Anonim. T.C. Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu, Hayvancılık İstatistikleri Veri Tabanı, 2006.
33. TS 1070. Sucuk Benzeri Et Ürünü - Isıl İşlem Görmüş.1984
34. GÖKALP, H.Y., Kaya, M ve Zorba, Ö., Et Ürünleri İşleme Mühendisliği. Atatürk Üniversitesi Yayın No: 786. Ziraat Fakültesi Yayın No: 320. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset tesisi, 562s, Erzurum., 2004.
35. GÖKALP, H.Y. Fermente et ürünleri sucuk üretim teknolojisi. *Standard*, 34 (Özel Sayı), 48-55, 1995..
36. KAYA, M., Sucuk, pastırma ve kavurmanın sağlık açısından irdelenmesi. *Standard*, 34 (Özel Sayı), 65-68, 1995..
37. TURANTAŞ, F. ve Öksüz, A., Balık ve balık ürünlerinde biyojenik aminler ve amin üretiminde rol oynayan bakteriler. *Gıda Teknolojisi*, 5, 58-65, 1998.
38. KOMPRDA, T., Neznalova, J., Standara, S. and Bover-Cid, S.,. Effects of starter culture and storage temperature on the content of biogenic amines in dry fermented sausage polican. *Meat Science*, 59, 267-276, 2001.

39. SUZZI, G. and GARDINI, F., Biogenic amines in dry fermented sausages: A Review. *International Journal of Food Microbiology*, 88(1), 41-54, 2003.
40. MASSON, F., Eclache, L., Compte, T., Talon, R. and Montel, M.C., Screening of microbial strains producing amines and isolated from meat products. *Meat for the Consumer N-16. 42nd ICoMST*. 546-547.
41. ALPERDEN, L., Özay, G. Fermentation Technologies in Food Production. *Nato - Tu Fermentech. Project Report*, 1996.
42. YILDIRIM, Y., Ülgen, M.T., Özeren, T. Yerli Sucukların Üretim Yöntemleri Üzerine Araştırmalar. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.*; 25: 85-98, 1978.
43. ALPERDEN, L., Nazlı, B. Gıda Teknolojisinde Starter Kültürlerin Önemi, *istanbul Univ. Vet. Fak. Derg.*; 15: 97-108, 1989.
44. AKBULUT, N., Kınık, Ö. Starter Kültürlerin Gıda ve Süt Endüstrisindeki Koruyucu Rollerini. *Gıda* ; 18: 397-401, 1993.
45. ANDERSEN, L. Bioproduktive Culture for Fresh Sausage. *Bactoferm Bulletin No. 7*. 1997.
46. DİNÇER, B. Olgunlaşma Sırasında Sucukların Besin Öğelerindeki Değişiklikler. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.* 1985; 32: 178-186.
47. YURTYERİ, A., EROL, I., ÇELİK, T.H. Starter Kültürlerin Gıdalarımızda ve Özellikle Çeşitli Et Ürünlerinde Kullanılma Olanakları. *Et Balık Endüstri. Derg.* 9: 7-24, 1988.
48. MOTLAGH, A.M., Monty, C.J., Bibek, R. Viability Loss of Foodborne Pathogens by Starter Culture Metabolites. *J. Food Protec.* 1991; 54: 873-878.
49. YILDIRIM, Y. Et endüstrisi. *Kozan Ofset*, Ankara, 192-446, 130-235, 1996.
50. NAZLI, B. Et Ürünlerinde Starter Kültürlerin Kullanımı Ve Önemi. *Türk-Alman Günleri*, 28 Nisan-1 Mayıs. İstanbul, 1993.
51. LUCKE, F.K., HECHLMANN, H. Starter Cultures For Dry Sausages And Raw Ham. *Fleischwirtsch.* 67(3), 307-314, 1987.
52. KİR, M., TEKELİ, M. İNAL, T. Doğal Koşullarda Sucuk Üretiminde Starter Kültür Kullanımı. *Gıda Sanayi Derg.* 20, 1991.
53. İNAL, T. Besin Hijyeni, Hayvansal Gıdaların Sağlık Kontrolü, *Final Ofset*. İstanbul, 130-135, 1992.
54. FREY, W. Starter Cultures For Raw Sausage Manufacture, *Fleischerei.*, 30 (2), 87-89, 1979.
55. UĞUR, M. Starter Kültür Kullanarak Türk Sucuklarında Kalitenin Geliştirilmesi Üzerine Araştırmalar. *İ.Ü. Vet. Fak. Derg.* 10(1), 41-52, 1984.
56. GIESEN, R., LUCKE, F.K., KROCKEL, L. Starter And Protective Cultures For Meat And Meat Products. *Fleischwirtsch.* 72(6), 896-898, 1992.
57. FİLİZ, N. Yüksek Isı Uygulaması İle Üretilen Türk Sucuklarında Starter Kültür Kullanımı Üzerine Araştırmalar. *U.Ü. Sağlık Bil. Ens. Doktora Tezi*, 1996.
58. WEBER, H. DRY SAUSAGE MANUFACTURE, The Importance Of Protective Cultures And Their Metabolic Products. *Fleischwirtsch.* 74 (3), 278-282, 1994.
59. DEMEYER, D.I., VERPLAETSE, A., GISTELİNCK, M. Meat Processing Fermented Products. *Fermentation Of Meat: An Integrated Process. Belgian Journal Of Food Chemistry And Biotechnology.* 41(5), 131-139, 1986.
60. LIEPE, U.H., PFEIL, E., POROBIC, R. Influence Of Sugars And Bacteria On Dry Sausage Souring. *Fleischwirtsch.* 70(2), 18-58, 1990.
61. Bacus, J.N., Brown, W. Use Of Microbial Cultures Meat Products. *Food Tech.* 35, 1, 74-78, 1984.

62. SCHILLINGER,U., LUCKE,F.K.Use Of Lactic Acid Bacteria As Protective Cultures In Meat Products. *Mittlungsblatt-Der-Bundesanstalt- Fur-Fleischforschung.* 200-207, 1989.
63. SCHILLINGER,U., LUCKE,F.K. Inhibiting Salmonella Growth In Fresh Spreadable Mettwurst (Dry Sausage Eaten Relatively Fresh) Made Without Sugar. *Fleischwirtsch.* 50-55(1) ,1990.
64. LEISTNER,L. Fermented And Intermediate Moisture Products. 36.Th. Intern. Congress Of Meat Science And Technology. August 27- September ,1. Havana (1990)
65. COMI,G., CITTERO,B.MNZANO,M. Et All.Evaluation And Characterization Of Micrococcaea Strains In Italian Dry Fermented Sausages.*Fleischwirtsch,* 72 (12), 1679-1683, 1992.
66. TEKİNŞEN, O.C., DİNÇER, B., KAYMAZ, Ş., YÜCEL, A. Türk Sucuğunun Olgunlaşması Sırasında Mikrobiyel Flora ve Organoleptik Niteliklerdeki Değişimler. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.;* 29: 111-130, 1982.
67. KARAKAYA, A., KILIÇ, A. Yoğurt Bakterilerinin (*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*) Sucuğun Fermentasyon Üzerine Etkisi. *Gıda.;* 19: 97-101, 1994
68. NAZLI, B. Researches on the Ripening of Turkish Fermented Sausage Using a Local Starter Culture Combination. *Türk. J. Vet. Anim. Sci.;* 22: 393-397, 1998.
69. ÖZDEMİR, H. Türk Fermente Sucuğunun Florasındaki Dominant Laktobasil Türlerinin Sucuğun Organoleptik Nitelikleri ile ilişkisi. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.;* 46: 189 -199, 1999.
70. YENİEL N. *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* Suşlarının Melas, Peynir Altı Suyu Ve Pancar Suyunda Ekzopolisakkarit (Eps) Ve Laktik Asit Üretimlerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara, 2006.
71. MADIGAN MT, MARTİNKO JM, PARKER J. *Biology of Microorganisms*, 8th Ed., Prentice Hall International, Inc, 1997.
72. DEDE F. PCR-Based Typing Studies on *L. plantarum* Strains. In partial Fulfillment of The Requirements For The Degree of Master of Science in The Department of Biochemistry Ankara, 2002.
73. SOYKUT A. *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* Virülent Fajlarının Replikasyon Parametreleri, Kapsid Protein Profilleri ve Restriksiyon Endonükleaz Analizleri Esas Alınarak Tanımlanmaları ve Sınıflandırılmaları. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği.
74. ÇON AH. Sucukdan Bakteriosin Benzeri Antimikrobiyal Metabolit Üreten Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyon ve İdentifikasyonu ve Çeşitli Gıda Zararlısı ve/veya Gıda Kaynaklı Patojen Bakterilere Karşı Antagonistik Aktivite Araştırılması. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi Erzurum, 1995.
75. STİLES ME, HOLZAPFEL WH. Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy. *International Journal of Food Microbiology;* 36, 1-29, 1997.
76. LÜCKE FK. Utilization of Microbes to Process and Preserve Meat. *Meat Sci;* 56(2), 105-115, 2000.
77. KANG DH, FUNG DY. Stimulation of Starter Culture for Further Reduction of Foodborne Pathogens During Salami Fermentation. *J Food Protect;* 63 (1 1), 1492-1495, 2000.
78. WİLLEM MV. Gene Expression Systems For Lactic Acid Bacteria. *Current Opinion Microbiology;* 2 (3), 289-295, 1999.

79. CONTER M, MUSCARIELLO T, ZANARDI E, GHIDINI S, VERGARA A, CAMPANINI G, LANIERI A. Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated From an Italian Dry Fermented Sausage. Ann Fac Medic Vet Di Parma, Vol XXV. Pag. 167- 174, 2005.
80. GRECO M, MAZZETTE R, DE SANTIS EPL, CORONA A, COSSEDDU AM. Evolution and Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated During the Ripening of Sardinian Sausages. Meat Science; 69, 733-739, 2005.
81. ÇON, A.H. VE GÖKALP, H.Y. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Metabolitleri ve Etki Şekilleri. Türk Mikrobiyal Cem Dergisi. 30: 180-190 ,2001.
82. SANTOS, M.H.S. Biogenic Amines: their importance in foods. International Journal of Food Microbiology, 29, 213-231, 1996..
83. DAESCHEL, M.A., FLEMMING, H.P. AND MCFETTERS, R.F. Mixed Cultures Fermentation of Cucumber Juice with *L. plantarum* and Yeasts, Journal of Food Science, 53: 862-868, 1988.
84. ÖZYILDIZ, F. Turşunun Olgunlaştırılmasında Kullanılan *L.plantarum*'un En iyi Gelişim Ortamının Sağlanması, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 100s, 2001.
85. LEROY, F., DE VUYST, L. Lactic Acid Bacteria as Functional Starter Cultures for the Food Fermentation Industry, Trends in Food Science&Technology, 15: 67-78, 2004.
86. TOLONEN, M., RJANIEMI, S., PIHLAVA, J.M., JOHANSSON, T., SARIS. P.E.J. AND RYHANEN, E.L. Formation of Nisin Plant-Derived Biomolecules and Antimicrobial Activity in Starter Culture Fermentations of Sauerkraut. Food Microbiology, 21: 167-179, 2004.
87. ÇON, A.H. VE GÖKALP, H.Y. Gıda Mikrobiyolojisi, Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Notları, Yayın No:007, sayfa 169, 2002.
88. CAPLICE, E. AND FITZGERALD, F.G. Food Fermentations: Role of Microorganisms in Food Production and Preservation. International Journal of Food Microbiology, 50: 131-149, 1999.
89. CARR, J.F., CHILL, D. AND MIADA, N. The Lactic Acid Bacteria:A Literature Survey. Critical Reviews in Microbiology, 28(4): 281-370, 2002.
90. ADAMS, M.R. AND NICOLAIDES, L. Review of the Sensitivity of Different Foodborne Pathogens to Fermentation. Food Control, 8 (5-6): 227-239, 1997.
91. ROSS, R.P., MORGAN, S. AND HILL, C. Preservation and Fermentation: Past, Present and Future, International Journal of Food Microbiology, 79: 3-16, 2002.
92. TODOROV, S.D. AND DICKS, L.M.T. *L. plantarum* Isolated From Molasses Produces Bacteriocins Active Against Gram-negative Bacteria. Enzyme and Microbial Technology, 36: 318-326, 2005.
93. MTTILA-SANDHOLM, T., MYLLÄRINEN, P., CRITTENDEN, R., MOGENSEN, G., FONDÉN, R. AND SAARELA, M. Technological Challenges for Future Probiotic Foods, International Dairy Journal, 12(2-3): 173-182, 2002.
94. CAN, A. VE ÖZÇELİK, B. Probiyotik Süt Ürünleri ve İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri, Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu Bildiriler Kitabı, Bildiri No: P64, 257-261, 2003.
95. COLLINS, J.K., THORNTON, G. AND SULLIVAN, G.O. (1998) Selection of Probiotic Strains for Human Applications. International Dairy Journal, 8: 487-490.
96. CEBECİ, A. AND GÜRAKAN, C. Properties of Potential Probiotic *Lactobacillus plantarum* Strains. Food Microbiology, 20: 511-518, 2003.
97. BEYATLI, Y. Bazı Laktik Asit Bakterilerinde Tespit Edilen Plazmid DNA'ların Fonksiyonları. Kükem Dergisi, 17(1): 51-59, 1994.

98. MCKAY, L.L. Functional Properties of Plasmids in Lactic Streptococci. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49: 259-274, 1983.
99. POUWELS, H.P. AND LEER, R. J. Genetics of *Lactobacilli*; Plasmid and Gene Expression, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 64: 85-107, 1993.
100. VENEMA, G. Molecular Biology and Genetic Modification of *Lactococci*. *Journal of Dairy Science*, 76 (8) : 2133-2144, 1993.
101. LEWUS, C. B., KAİSER, A., MONTVILLE, T.J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Env. Microbiol.*, 57: 1683-1687 ,1991.
102. ÖZDEMİR H. Yüksek sıcaklık derecesinde olgunlaştırılan Türk fermente sucuklarında laktobasillerin seyir, izolasyon ve identifikasyonu, *Gıda*21(6)465-470, 1996
103. ÇON, A.H. AND GÖKALP, H.Y. (2000) Production of Bacteriosin like Metabolites by Lactic Acid Cultures Isolated from Sucuk Samples. *Meat Science*, 55: 89-96.
104. AKAR, N. Prof. Dr. Klinik moleküler patolojiye giriş , Genişletilmiş ikinci baskı, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antip A.Ş. Yayınları. Ankara, 1999
105. SmartCycler II, Operator Manual, 2003.
106. AYMERICH T, MARTIN B, GARRİGA M, VİDAL-CAROU MC, BOVER-CİD S, HUGAS M. Safety Properties and Molecular Strain Typing of Lactic Acid Bacteria from Slightly Fermented Sausages. *Journal of Applied Microbiology*; 100(1), 40-49, 2006.
107. DROSİNOS EH, MATARAGAS M, XİRAPHİ N, MOSCHONAS G, GAİTİS F, METAXOPOULOS J. Characterization of the Microbial Flora from A Traditional Greek Fermented Sausage. *Meat Science*; 69 (2), 307-317, 2005.
108. TOKSOY A, Beyath Y, Aslım B. Sucuk ve Sosislerden İzole Edilen *Lactobacillus plantarum* Suşlarının Bazı Metabolik ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi. *Türk J Vet Anim Sci*; 23, 533-540' 1999.
109. AQUILANTIA L. The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. *International Journal of Food Microbiology* ,Volume 120, Issues 1-2, Pages 136-145, 2007.
110. HUGAS M. Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* Volume 18, Issue 2, Pages 107-113, 1993
111. SANTOS, E.M., FERNANDEZ, G, JAIME, I, ROVIRA, J., Comparative study of lactic acid bacteria house flora isolated in different varieties of 'chorizo'. *International Journal of Food Microbiology* Volume 39, Issues 1-2, Pages 123-128, 1998
112. AYMERICH T, MARTİN B, GARRİGA M, HUGAS M. Microbial Quality and Direct PCR Identification of Lactic Acid Bacteria and Nonpathogenic Staphylococci from Artisanal Low-acid Sausages. *Appl Environ Microbiol* 69, p4583-4594, 2003.
113. LÜCKE FK. Mikrobiologische Vorgänge bei der Herstellung von Rohwurst und Rohschinken In: *Mikrobiologie und Qualität von Rohwurst und Rohschinken*. Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach, page 85-102; 1985.
114. COMİ G, URSO R, LACUMİN L, RANTSİOU K, CATTANEO P, CANTONİ C, COCOLİN L. Characterisation of Naturally Fermented Sausages Produced in the North East of Italy. *Meat Science*; 69, 381-392, 2005.

115. BARUZZI F, MATARANTE A, CAPUTO L, MOREA M. Molecular and Physiological Characterization of Natural Microbial Communities Isolated from a Traditional Southern Italian Processed Sausage. *Meat Science* 2006; 72, 261-269.
116. SOHIER D, JOANA C, FUNEL AL. Molecular Identification of *Lactobacillus hilgardii* and Genetic Relatedness with *Lactobacillus brevis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*; 49, 1075-1081, 1999.

TEŞEKKÜR

Danışmanım Prof. Dr. Mustafa TAYAR ve Doç. Dr. Recep ÇIBIK hocalarıma, Bursa Gıda Kontrol ve Merkez Araştırma Enstitüsü müdürü Kemal BAYRAKTAR'a ve eski müdür Şeref TEPE'ye, Mikrobiyoloji Bölümündeki arkadaşlarım Mehmet M. ÇİFTÇİ, Ümit ERER, ve Ümit Cemil ESER'e Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Bölümündeki ve HPLC laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarıma, yürekten teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

1964 yılında Mustafakemalpaşa'da doğdum. İlköğretimimi Züferbey İlkokulu'nda, ortaöğrenimimi Susurluk Ortaokulunda ve Mustafakemalpaşa Lisesinde yaptım. 1981 yılında girdiğim Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden mezun olduktan sonra 1989 yılında memuriyet hayatıma başlayarak sırasıyla Mardin, Afyon, Bursa illerinde çalışmamı takiben 1994 yılında o zamanki adıyla Bursa Gıda Teknolojisi Araştırma Enstitüsü'ne Veteriner Hekim olarak atandım. 2002 yılında Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimime başladım. Halen şimdiki adıyla Bursa Gıda Kontrol ve Merkez Araştırma Enstitüsü'nde Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Bölümü'nde Bölüm Başkanı olarak görev yapmaktayım.