

## SOFRALIK FERMENTE ZEYTİNLERDEN (*OLEA EUROPAEA L.*) İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİN VE BAZI METABOLİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Merih KIVANÇ<sup>1,\*</sup>, Şerife Yelda ERİKÇİ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir, Türkiye

### ÖZET

Dünyada ve ülkemizde yaygın olarak tüketilen zeytin (*Olea europaea L.*) beslenme açısından büyük öneme sahiptir. Doğal gıdalara yönelişin arttığı günümüzde önemi gittikçe artmaktadır. Bu çalışmada ülkemizde üretilen fermente olmuş ticari ve evde üretilen zeytin örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktivitesi ile bazı metabolik özellikleri belirlenmiştir. On sofralık yeşil zeytin ve 10 sofralık siyah zeytin örneklerinden 50 laktik asit bakterisi izole edilmiştir. Bu izolatların antimikrobiyal etkisi agar difüzyon yöntemi ve sandvic overlay yöntemi ile belirlenmiştir. Etkili izolatlar tanımlanarak bunların laktik asit, hidrojen peroksit ve proteolitik aktivitesi belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktiviteye sahip 6 izolattan SZ5 *L.plantarum*, DZ2 *E. faecium*, EZ8, BZ1, SZ1 ve BZ4 izolatları *L. brevis* olarak tanımlanmıştır. Laktik asit bakterilerinin pH aralığı 5.3-6.8 arasında, laktik asit miktarları 0.261- 1.818 mg/mL arasında saptanmıştır. Proteolitik aktivite miktarları 0.003-0.011 tirozin mg/mL arasında ve hidrojen peroksit miktarları ise 0.218-0,96mg/mL arasında değişiklik göstermiştir.

Sonuç olarak *L. brevis* SZ1, *E. faecium*DZ2 ve *L. brevis* BZ1 izolatları yüksek tuz konsantrasyonlarında ve düşük pH da gelişebilmeleri ve yüksek laktik asit üretmeleri nedeniyle starter kültür olmaya aday izolatlar olarak belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Zeytin, Laktik asit bakterileri, Antimikrobiyal aktivite

## DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND SOME METABOLIC PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM TABLE FERMENTED OLIVES (*OLEA EUROPAEA L.*)

### ABSTRACT

The olive (*Olea europaea L.*) is consumed extensively in the world and in our country; it has great value for nutrition. Today, the importance of the olive is increasing with the trend towards of natural food. In this study, the antimicrobial activity and some metabolic properties of lactic acid bacteria isolated from fermented commercial and home product olive samples produced in our country were determined. Fifty lactic acid bacteria were isolated from ten green table olives and 10 black table olives. The antimicrobial effect of these isolates was determined by the agar diffusion method and the sandwich overlay method. Effective isolates were identified and their lactic acid, hydrogen peroxide and proteolytic activities were determined. Six isolates had antimicrobial activity, from those SZ5 was identified as *L. plantarum*, DZ2 as *E. faecium*, EZ8, BZ1, SZ1 and BZ4 isolates were identified as *L. brevis*. The pH range of lactic acid bacteria was 5.3 to 6.8 and the lactic acid levels ranged from 0.261 to 1.818 mg / mL. Amounts of proteolytic activity varied between 0.003-0.011 tyrosine mg / mL and hydrogen peroxide levels varied between 0.218-0.96mg / mL.

In conclusion, *L. brevis* SZ1, *E. faecium* DZ2 and *L. brevis* BZ1 isolates were identified as candidates for starter culture due to their ability to grow in high salt concentrations and low pH and their property to produce high lactic acid.

**Keywords:** Olive, Lactic acid bacteria, Antimicrobial activity

## 1. GİRİŞ

Dünyada ve ülkemizde yaygın olarak tüketilen zeytin (*Olea europaea* L.) içerdiği yağ ve proteinler nedeniyle insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir [1]. Zeytin işleme teknikleri ülkelere göre önemli ölçüde değişmektedir. Dünya çapında 2014/2015 sezonunda zeytin üretimi 2595.500 tona ulaşmıştır [2]. Ülkemiz zeytin üretimi açısından dünyada ilk sıralarda yer almaktadır. Son ürünün kalitesini, lezzetini ve güvenliğini üzerinde taşıdığı mikrobiota önemli ölçüde etkilemektedir. Zeytin fermantasyonunda esas olarak laktik asit bakterileri (LAB) önemli bir rol oynamaktadır. Azda olsa buna *Saccharomyces*, *Candida*, *Debaryomyces* ve *Pichia* gibi mayalar da eşlik etmektedir [3]. Zeytin fermantasyonu uzun süren bir fermantasyondur. Günümüzde kaliteli bir ürün için fermantasyonun kontrol edilmesi önerilmektedir. Bunu sağlamak için de starter kültür ilavesi tavsiye edilmektedir [4, 5].

Çeşitli besinlerin elde edilmesinde laktik asit fermentasyonu büyük rol oynamaktadır. Bunların bir bölümünde yalnızca laktik asit fermentasyonu esas alınırken, diğer bir bölümünde bu fermentasyon yanında ikinci derecede de olsa diğer fermentasyonlar rol oynamaktadır. Böylece bu sebzelerin bol ve ucuz oldukları mevsimlerde uygulanan yöntemlerle, taze olarak bulunmaları sağlanabilmektedir.

Laktik asit bakterileri uzun yıllardır gıda fermentasyonlarında geleneksel olarak kullanılmaktadır. Bu bakteriler laktik, asetik ve formik asit gibi organik asit, hidrojen peroksit, diasetil, bakteriosin ve bakteriyosin benzeri bileşiklerin üretimiyle diğer mikroorganizmaları inhibe etme özelliğine sahip bakterilerdir. Asetik asit ve laktik asit patojenik gram negatif türleri de içeren birçok bakterinin gelişimini inhibe etmektedir. Laktik asit bakterilerinin bakteriyosinleri veya bakteriyosin benzeri maddeleri *Listeria*, *Staphylococcus*, *Clostridia*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* gibi Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyel etkiye sahiptirler [6-8].

Heterofermentatif, mezofil laktik asit bakteri türleri turşu, zeytin gibi besinlerin hazırlanmasında önemli rol oynamaktadırlar. Laktik asit fermentasyonunu içeren gıdalarda başlıca koruma ve inhibisyon hızlı pH düşüşü ile sağlanmaktadır.

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler (EPS) yeni ürünlerin gelişimi için önemli polimerlerdir. Son yıllarda, insan sağlığını koruma özelliği, antitumor, antiülser ya da kolesterol düşürücü özellikleri nedeniyle EPS üzerinde yoğun olarak çalışılmaktadır. EPS üretimi türden türe farklılık göstermektedir. Hatta suşlar arasında bile farklılık görülmektedir. Mikroorganizmaların salgıladıkları EPS molekülleri, fagositoz ve faj ataklarına, antibiyotiklere, toksik maddelere, ozmotik strese karşı hücreleri korumaktadır [9].

Ülkemizde çok miktarda tüketilen zeytinin kalitesinin yükseltilmesi ve fazla miktarda üretim koşullarına doğal floradan ileri gelebilecek fermantasyon risklerinin önüne geçilmesi için kontrollü koşullarda fermantasyonun yapılması gerekmektedir. Bu da ancak starter kültür kullanımı ile mümkün olabilecektir. Bu çalışmada sofralık zeytinlerden izole edilen laktik asit bakterilerinin antibakteriyel aktivitesi ile bazı metabolik özellikleri belirlenerek starter kültür olarak kullanılabilir laktik asit bakterilerinin belirlenmesine çalışılmıştır.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

### 2.1. Patojen Test Bakterileri

Laktik asit bakterilerinin gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterip göstermediği Tablo 1 de temin edildikleri kaynaklar ile birlikte verilmiş olan test bakteriler kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmalar sırasında kullanılan test mikroorganizmaları (Tablo 1) uzun vadede %20'lik gliserol içerisinde -85 °C' de saklanmıştır. Kullanılan bütün test mikroorganizmaları, analizlerden önce stoktan çıkarılarak canlandırılmış, saflık kontrolü yapılmış ve daha sonra testlerde kullanılmıştır.

**Tablo 1.** Test Mikroorganizmaları (NRRL: Northern Regional Research Laboratory of the USDA, Peoria, Illinois, USA. ATCC: American Type Culture Collection, USA).

Mikroorganizma	Kültürün Temin Edildiği Yer
<i>Bacillus cereus</i>	NRRL B-3711
<i>Bacillus subtilis</i>	NRLL B-744
<i>Escherichia coli</i>	NRRL B-3704
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC-7644
<i>Proteus vulgaris</i>	NRRL B-123
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Salmonella Typhimurium</i>	NRRL B-4420
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gazi Üniv. Fen Fakültesi
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NRRL B-4496
<i>Lactobacillus buchneri</i>	NRRL B-1837
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	NRRL B-548
<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi
<i>Streptococcus lactis</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi
<i>Candida albicans</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi
<i>Candida glabrata</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi

## 2.2. Laktik Asit Bakteri İzolasyonu ve Tanımlanması

Piyasadan ve evlerde hazırlanan fermente olmuş sofralık zeytinler steril kavanozlar içinde +4°C'de laboratuvara getirilerek izolasyon işlemine başlanmıştır. Sofralık zeytin örnekleri stomakerda homojenize edilerek dilüsyonları hazırlanmış ve de Man Rogasa Sharp (MRS) Agar ile M17 Agara ekim yapılmıştır. Petriler 24-48 saat 35-42 °C'de sıcaklıklarda aerob ve %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda anaerob olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda tipik laktik bakteri koloni özelliği (küçük, mat, krem renginde muntazam olmayan bir yapı) gösteren koloniler seçilerek MRS veya M17 Agara ekilerek 35°C'de 18-24 saat süre ile %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilmiştir. Saflaştırılan izolatlar Gram boyama yapılarak ve katalaz aktivitelerine bakılarak ileriki testlerde kullanılmak üzere - 85 °C'de % 20'lik gliserol içerisinde stoklanmıştır[10].

Zeytin örneklerinden izole edilmiş olan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olan izolatlar için identifikasyon testleri yapılmıştır. Bu izolatlar için Gram boyama ve katalaz aktivitesi başta olmak üzere farklı sıcaklıklarda gelişim ( 4, 8, 10, 15, 45 °C) , farklı tuz konsantrasyonlarında (%6.5, 7.0.0, 10.0) ve pH 3,9 da gelişim, hidrojen sülfür oluşturma, arjininden amonyak oluşumu (NH<sub>3</sub>) testleri yapılmıştır[11, 12, 13]. Ayrıca etkili bulunan izolatların API CHL50 (bioMerieux) kitleri ile yönetici talimatları doğrultusunda karbondhidrat fermantasyon testleri gerçekleştirilmiş ve daha sonra seçilen izolatların Riboprinter Sistem ile tür tanımlamaları gerçekleştirilmiştir. İdentifikasyon işlemleri spesifik kitler aracılığıyla, kullanıcı talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

## 2.3. Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi

Antimikrobiyal etki agar difüzyon yöntemi ve sandvic overlay yöntemi ile belirlenmiştir. Sandvic overlay yönteminde laktik asit bakterilerinin 24 saatlik aktif kültürlerinin 10µL'si ayrı ayrı MRS agar ve BHI agar içeren petrilere spotlanarak 30-42 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra aktifleştirilmiş olan test bakterilerinin 8µl'si (ml'de yaklaşık 10<sup>7.0</sup> hücre içeren) 8 mL yumuşak MRS agar içeren tüplere inokule edilerek iyice karıştırılmış ve spotlanmış laktik kültürleri içeren petri yüzeyine yayılarak 35°C'de 24 saat inkübasyondan sonra laktik kültürlerin etraflarında oluşan zon çaplarına ölçülerek değerlendirilmiştir [14].

Agar difüzyon yönteminde patojen test mikroorganizmaları Beyin Kalp İnfüzyon (BHI) brotha ekilerek 37.0°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Steril petri plaklarına aktif test mikroorganizmalarından mililitrede 10<sup>6</sup> kob/mL olacak şekilde aktarılarak üzerlerine 20 ml 45 °C'ye kadar soğutulmuş nutrient agar besiyeri konularak karıştırılmış ve agar donduktan sonra agarda 6 mm çapında steril mantar delici ile çukurlar açılmıştır. Antibakteriyal aktiviteleri tespit edilecek olan laktik asit bakterileri MRS Broth veya M17.0 Brotha ekilerek 48 saat 35°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda anaerob olarak inkübe edildikten sonra 15.000 rpm'de 4 °C de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatantları alınmış ve dört şekilde kullanılmıştır. (I) direkt olarak 0.1 ml alınarak MRS agar üzerindeki çukurlara aktarılmış, (II) Steril süpernatanta 5N NaOH eklenerek asitliği nötralize edildikten sonra çukurlara ilave edilmiş, (III) hidrojen peroksit'in inhibitör etkisini uzaklaştırmak için 25 °C'de 30 dk katalaz ile muamele edilmiş (IV) süpernatant üzerine 0,5µg/mL proteinaz K ilave edilerek 37.0°C de 4 saat bekletildikten sonra her örnekten 0,1 mL alınarak MRS agar üzerindeki kuyucuklara aktarılmıştır. Bir süre oda sıcaklığında bekletildikten sonra petripler 24 saat süre ile 35°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kuyucukların etrafında oluşan zonlar ölçülmüştür [15, 7].

#### **2.4. Laktik Asit Miktarının Belirlenmesi**

Laktik asit bakterileri izolatları 30°C'de 24 saat süre ile inkübe edilerek aktif hale getirildikten sonra 25 ml.'lik % 10 oranında yağsız süt içeren besiyerine % 2 oranında aşılansak 30°C'de 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örneklerden 10 ml. alınıp, 90 ml. distile su içeren cam erlenlere aktarılarak üzerine 2-3 damla fenol fitalein indikatörü damlatılmış ve 0,1 N NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir [16].

#### **2.5. Hidrojen Peroksit Miktarının Belirlenmesi**

%10'luk yağsız süt tozu besiyeri hazırlanarak 30'ar ml koyu renkli şişelere dağıtılıp, 110°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Laktik asit bakterileri MRS sıvı besiyerinde 30°C'de 24 saat aktifleştirildikten sonra %2 oranında, yağsız süt tozu besiyerine inokule edilerek 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, örnekler 30 ml'ye distile su ile tamamlanmış ve 5000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı kısım alınarak Whatman 42 filtre kağıdından karanlık bir ortamda süzölmüş ve süzölen kısımdan 8'er ml alınarak, üzerlerine sırası ile 1 ml sülfirik asit, 1 ml amonyum molibden ve 1 ml potasyum iyodür çözeltileri ilave edilerek karıştırılıp 350 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür.

Ölçülen örnek değerleri, standart hidrojen peroksit eğrisi ile karşılaştırılarak, bakterilerin oluşturduğu hidrojen peroksit üretimleri µg/ml olarak saptanmıştır [17].

#### **2.6. Proteolitik Aktivitenin Belirlenmesi**

Proteolitik aktivitenin tespiti için, oluşan aminoasitlere eş değer tirozin aminoasidi esas alınarak tespit edilmiştir. Laktik asit bakterilerine ait kültürler MRS broth besiyerinde aktifleştirilmiş ve daha sonra aktif suşlar, 110°C'de 15 dakika otoklavlanarak 5 ml.'lik % 10 oranında skim milk içeren besiyerine % 1 oranında aşılansak 30 °C'de 42 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra örnek üzerine 1 ml. distile su ilave edilmiş ve bunun üzerine de 10 ml 0.72 N trikloro asetik asit (TCA) ilave edilerek karıştırılmıştır. On dakika bekletildikten sonra örnekler Whatman 1 nolu filtre kağıdı ile süzölerek süpernatantlardan 5 ml alınmış ve üzerine 10 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> çözeltisinden konup karıştırılmıştır. Bu işlem sonunda örnekler 4500 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüj edilerek üstte kalan mavi berrak kısım alınarak spektrofotometrede 650 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Standart eğri için, 0.02: 0.2: 0.4: 0.6: 0.8: 1 mg tirozin/ml olacak şekilde tirozin standart çözeltisinden 5 ml'lik steril yağsız süt besiyerine ilave edilmiştir. Bu çözeltiler için de işlemler aynen uygulanmış ve bulunan değerlere göre standart eğri çıkarılmıştır. Strainlerden elde edilen değerler standart eğride yerleştirilerek proteolitik aktivite miktarları hesaplanmıştır[16].

## 2.7. Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi

İzolatların ekzopolisakkarit üretim yeteneğine sahip olup olmadığının belirlenmesi için Kongo kırmızısı agar kullanılmıştır. MRS broth ortamında aktifleştirilmiş taze kültürlerden hazırlanmış olan farklı şekerleri içeren Kongo kırmızısı agara ekim yapılmıştır. Petri kutuları 35°C de 24- 48 saat süre ile inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon süresi sonunda gelişen kültürlerin morfolojik görünimleri incelenmiştir. İzolatlardan siyah renkli koloniler pozitif, renk değiştirmemiş olan sarı renkli koloniler negatif olarak belirlenmiştir [18].

## 3. BULGULAR ve TARTIŞMA

On sofralık yeşil zeytin ve 10 sofralık siyah zeytin örneklerinden yapılan ekimlerden 50 izolat elde edilmiştir. Bu izolatların hepsi Gram pozitif ve katalaz negatif özellik göstermiştir. Öncelikle izolatların antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. İzolatların antimikrobiyal aktivitelerine bakıldığında sandvic overlay yönteminde BHI agarda izolatların hiç birinin etrafında zon oluşumu gözlenmemiştir. MRS agarda ise sofralık yeşil zeytinde 16 izolat, sofralık siyah zeytinde ise 6 izolat bir veya daha fazla bakteriye karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Bu izolatlar ve kaynakları Tablo 2 de verilmiştir. İzolatların hiç biri *Enterococcus faecalis* *Proteus vulgaris* *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus* ve *Lactobacillus buchneri* ye karşı antimikrobiyal etki göstermemiştir (Tablo 2 de verilmemiştir). SZ1, DZ2, BZ1 ve BZ4 izolatları test edilen *Candida albicans* ve *Candida glabrata* karşı inhibe edici etki göstermişlerdir. Bu izolatlara ait süpernatantların antimikrobiyal aktivitesine bakıldığında süpernatantlardan 6 sı bir veya daha fazla patojene karşı inhibe edici etki göstermiştir (Tablo 3).

Peres ve ark.(19) evde ve ticari olarak fermente edilen zeytinlerden izole ettikleri laktobasillerin özellikle *Escherichia coli* ve *Salmonella Typhimurium* üzerine yüksek antibakteriyel etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Benzer olarak Obadina ve ark (20) *L. plantarum* izolatlarının *E. coli* ve *S. Typhimurium* ve *Staphylococcus aureus* üzerine antogonistik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Karasu (21) tarafından yapılan bir çalışmada yeşil zeytinden izole edilen *Lactobacillus pentosus*, *P.vulgaris*'e, *Lactobacillus sake* , *Listeria monocytogenes* ve *Enterococcus faecium*'a etkili iken, *E. coli*, *Aeromonas hydrophila* ve *P. vulgaris*'e etkili olmadığı bildirmiştir. Rubia-Soria ve arkadaşları (22) parakende olarak satılan zeytinlerden izole ettikleri 195 izolatın *Listeria innocua*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *E. faecalis* ve *E. coli* 'ye karşı antimikrobiyal aktivitesini incelemişler ve izolatlardan 86 'sının antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

SZ1 ve BZ1 izolatlarına ait süpernatantlar *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivite gösterirken, *B. cereus* ve *Bacillus subtilis*'e karşı sadece BZ1 izolatına ait süpernatant antimikrobiyel etki göstermiştir. *S.Typhimurium*'a ise sadece SZ1 izolatının süpernatantı antibakteriyel etkili olmuştur. . BZ1 izolatının süpernatantı *S. aureus* hariç diğer bakteriler üzerine etkili olarak bulunmuştur. BZ1 izolatına ait süpernatant nötralize edildiğinde hiç bir test mikroorganizmasına karşı etkinliği kalmamıştır (Tablo 3). Bu izolatın antimikrobiyel aktivitesi büyük bir ihtimalle oluşturduğu organik asitler ile ilgilidir. EZ8 izolatına ait süpernatant hariç diğer izolatların (SZ1, DZ2, BZ1, BZ4 ve SZ5) süpernatantları *L. monocytogenes*'e inhibe edici etki göstermiştir. EZ8 izolatı ise *S. aureus* üzerine inhibe edici etki göstermiştir. SZ1 izolatına ait süpernatant nötralize edildiğinde *L. monocytogenes* hariç diğer izolatlara karşı etkili olmamıştır. SZ1, DZ2, BZ4 ve SZ5 izolatlarının süpernatantlarına proteaz K ilavesi ile süpernatantın *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal aktivitesini kaybettiği görülmüştür. Bu izolatların antimikrobiyal aktivitesi büyük ihtimalle protein yapısında bir bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri bir madde nedeni iledir. BZ4 ve SZ5 izolatlarının antilisterial özellik göstermiştir. SZ5 izolatının antibakteriyel özelliği üretmiş olduğu hidrojen peroksit nedeniyle olabilir. *C. albicans* ve *C. glabrata* ya karşı SZ1, DZ2 ve BZ1 izolatlarının süpernatantları antifungal aktivite göstermiştir. Bunların etkinliği de üretilen organik asitler nedeniyle olabilir (Tablo 3). Laktik asit bakterilerinin

antimikrobiyal etkilerinin asitlik, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya bakteriyosin yada bakteriyosin benzeri maddeler nedeniyle olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından da vurgulanmıştır [7, 8, 15, 22].

**Tablo 2.** Sandvic overlay yönteminde antibakteriyal aktivite gösteren laktik asit bakterileri izolatları elde edildikleri ürünler

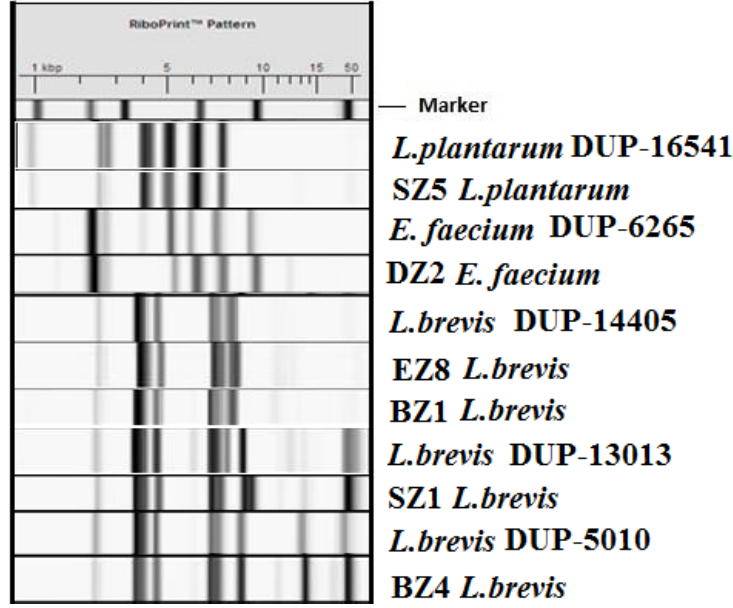
Kaynak	Yer	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. hydrophyla</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	
SZ1	Siyah zeytin (piyasa)	Eskişehir	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
SZ2	Siyah zeytin (piyasa)	Eskişehir	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
SZ3	Siyah zeytin (piyasa)	Eskişehir	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SZ4	Siyah zeytin (piyasa)	Eskişehir	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
SZ5	Siyah zeytin (piyasa)	Eskişehir	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
SZ6	Siyah zeytin (piyasa)	Eskişehir	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
DZ1	Yeşil zeytin (ev)	Edremit	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
DZ2	Yeşil zeytin (ev)	Edremit	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
DZ3	Yeşil zeytin (ev)	Edremit	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
YZ3	Yeşil zeytin	Eskişehir	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
YZ4	Yeşil zeytin	Eskişehir	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
BZ1	Yeşil zeytin	Mersin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BZ2	Yeşil zeytin	Mersin	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
BZ3	Yeşil zeytin	Mersin	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
BZ4	Yeşil zeytin	Mersin	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
EZ1	Yeşil zeytin	öğüt	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
EZ2	Yeşil zeytin	Söğüt	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
EZ3	Yeşil zeytin	Söğüt	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
EZ4	Yeşil zeytin	Söğüt	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
EZ5	Yeşil zeytin	Söğüt	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
EZ6	Yeşil zeytin	Söğüt	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
EZ8	Yeşil zeytin	Söğüt	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

**Tablo 3.** Seçilen laktik asit bakteri izolatlarına ait süpernatantlar ile nötralize edilen , katalaz ve proteinaz ile muamele edilen süpernatantların test mikroorganizmaları üzerine etkisi (mm).

İzolat Numaraları	Uygulama	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>
SZ1	Süpernatant	-	-	11.5	8.0.5	11.0	-	10.0	-	9.0	9.0
	Nötralize	-	-	-	-	-	-	7.0	-	-	-
	Katalaz	-	-	-	-	-	-	8.0	-	8.0	7.0
	Proteinaz K	-	-	-	-	-	-	-	-	7.0	7.0
DZ2	Süpernatant	-	-	-	10.0	-	-	15.0	-	9.0	8.0
	Nötralize	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-
	Katalaz	-	-	-	7.0	-	-	8.0	-	7.0	7.0
	Proteinaz K	-	-	-	-	-	-	-	-	7.0	7.0
BZ1	Süpernatant	9.0	9.0	12.0	10.0	-	-	8.5	11.0	8.0	-
	Nötralize	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Katalaz	7.0.0	7.0	8.0	8.0	-	-	8.0	-	7.0	7.0
	Proteinaz K	7.0	7.0	9.0	8.0	-	-	-	-	7.0	7.0
EZ8	Süpernatant	-	-	-	-	-	10.5	-	-	-	-
	Nötralize	-	-	-	-	-	9.5	-	-	-	-
	Katalaz	-	-	-	-	-	9.0	-	-	-	-
	Proteinaz K	-	-	-	-	-	9.0	-	-	-	-
BZ4	Süpernatant	-	-	-	-	-	-	10.0	-	-	-
	Nötralize	-	-	-	-	-	-	9.0	-	-	-
	Katalaz	-	-	-	-	-	-	8.0	-	-	-
	Proteinaz K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SZ5	Süpernatant	-	-	-	-	-	-	10.0	8.0	-	-
	Nötralize	-	-	-	-	-	-	8.0	7.0	-	-
	Katalaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Proteinaz K	-	-	-	-	-	-	7.0	7.0	-	-

Süpernatantları bir yada daha fazla patojen bakteriye karşı etkili olarak bulunan altı izolatın 5 i basil biri kok şeklinde olup katalaz negatiftir. İzolatların hiçbiri 4°C de gelişmemiştir. SZ5 izolatı hariç diğer izolatlar 45°C'de gelişme göstermemiştir. Bütün izolatlar argininden amonyak oluşturmuştur. %10 tuzda gelişmişlerdir (Tablo 4). Antimikrobiyal aktivite gösteren izolatların %10 NaCl de gelişebilmeleri zeytin fermantasyonu için istenilen bir özellik olduğundan zeytin fermantasyonu açısından önem taşımaktadır. Ülkemizde geleneksel yöntemle fermente edilen zeytinlerde tuz oranı %10 un üstündedir. Zeytin fermantasyonunda tuz konsantrasyonu, fermantasyonu sağlayan mikroorganizmaların tip ve sayılarını önemli ölçüde etkilemektedir. Buna bağlı olarak son ürün özellikleride değişmektedir [23]. Yeşil zeytinden izole edilen *L. pentosus* 15°C'de gelişirken 10 °C ve 15°C de gelişmediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada bu izolatın pH 3.0-4.0 te ve %3-6.5 tuzda geliştiği saptanmıştır[21].

Otomatik riboprinter ile tanımlamada ise SZ5 *L.plantarum*, DZ2 *E. faecium*, EZ8, BZ1, SZ1 ve BZ4 izolatları *L. brevis* olarak tanımlanmıştır (Şekil 1). Zeytin fermantasyonunda başlangıçta *L. mesenteroides* hakimken [1, 24] ilerleyen süreçte homofermantatiflerden *L. plantarum*, heterofermantatiflerden ise *L. brevis* hakim olmaktadır [1, 25]. Salamura siyah zeytinlerden *L. plantarum*, *L.brevis* ve *Leuconostoc mesenteriodes* supsp. *mesenteriodes/dextranicum* izole edilmiştir [26]. Tassou ve ark (27) doğal olarak fermente olmuş siyah zeytinlerde *L.mesenteroides* (23%), *L. brevis* (13%), *L. plantarum* (29%), *L. pentosus* (30%) tanımladıklarını bildirmişlerdir. *L. pentosus* ve *L. plantarum* zeytin fermantasyonunda en sık görülen bakterilerdir [3, 28]. Ülkemizde Edincik ve Gemlik zeytinlerinde *L.plantarum* [23], taze zeytinlerde *L. plantarum*, *L.brevis*, *L. mesenteroides*, *L. lactis ssp. lactis* *P. damnosus* [29], Gemlik doğal siyah zeytinden *L. brevis*, *L. cremoris*, *L. paramesenteroides* izole edilmiştir [30].



Şekil 1. Zeytinden izole edilen laktik asit bakterilerinin riboprinter profil bantları

Tablo 4. Seçilen izolatlara ait fizyolojik ve biyokimyasal bazı özellikler

İzolat Numaraları	Temin Edildiği Ürün	Gram Boyama	Hücre Morfolojisi	Katalaz	4 ° C'de Gelişim	8 ° C'de Gelişim	15°C'de Gelişim	45°C'de Gelişim	Argininden amonyak üretimi	% 6 NaCl'de Gelişim	% 7,0,5 NaCl'de Gelişim	% 10 NaCl'de Gelişim	pH 3,9'da Gelişim	H <sub>2</sub> S Üretimi
SZ1	Siyah zeytin	+	basil	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
DZ2	Yeşil zeytin	+	kok	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
BZ1	Yeşil zeytin	+	basil	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
EZ8	Yeşil zeytin	+	basil	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
BZ4	Yeşil zeytin	+	basil	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SZ5	Siyah zeytin	+	basil	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Laktik asit bakterilerinin pH aralığı 5.3-6.8 arasında, laktik asit miktarları 0.261- 1.818 mg/mL arasında saptanmıştır. Proteolitik aktivite suşa göre değişmiştir (Tablo 5 ). En yüksek aktivite *E. faecium* DZ2 ile *L. brevis* SZ1 de görülmüştür. Proteolitik aktivite miktarları 0.003-0.011 tirozin mg/mL arasında ve hidrojen peroksit miktarları ise 0.218-0,96mg/mL arasında değişiklik göstermiştir. En yüksek hidrojen peroksit miktarı *L. brevis* BZ4 te saptanmıştır. Fermantasyon sırasında laktik asit üretimi sonucu pH düşmektedir. Bu durumda ürünün depolanması sırasında mikrobiyolojik kalitesinin değişmeden kalmasına yardım etmektedir [25]. Yeşil zeytinden izole edilen *L. pentosus*'un proteolitik aktivitesi 0.060mg/mL tirozin olarak saptanmıştır. pH 3.42-3.95 te gelişirken, %1.60- %2-05 arasındaki asitlik değerlerinde değiştiği saptanmıştır.

EPS üretimine bakıldığında SZ1, DZ2, BZ1 izolatlarının EPS üretmediği EZ 8 izolatının ise kullanılan bütün şekerlerde biyofilm oluşturduğu, BZ4 ve SZ5 ise sükröz da EPS ürettiği görülmüştür.

Zeytin üretiminde fermantasyonun başlangıcında *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri olan Gram (-) bakteriler hakimdir [25]. Fermantasyonun başlaması ile *L.mesenteroides* gelişirken [1, 24]. Gram (-)



bakteriler azalır, laktik asit bakteri ve maya sayısı artmaya başlar. Özellikle homofemantatif *L.plantarum* ve heterofermantatiflerden *L.brevis ortama* hakim hale gelir [1, 25]. Bozulmaya neden olan mikroorganizmaların gelişmesinin önlemek için araştırmacılar zeytin fermantasyonunda başlangıçta salamuranın asitliğini organik asit ile düşürülerek saf laktobasil kültürlerinin eklenmesini önermektedirler [25]. Benincasa ve ark. (31) 3 farklı zeytin çeşidinde *L. plantarum*'un starter kültür olarak kullanılabilirliğini araştırmışlar ve son ürünün kalitesi ve güvenliği için laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak kullanılmasını önermişlerdir. Araştırmacılar fermantasyon süresince laktik asit bakterilerin ortamda kaldığını stafilkokların ve koliform bakterilerin sırasıyla 30 ve 90 gün sonra kaybolduğunu bildirmişlerdir (31).

**Tablo 5.** Seçilen laktik asit bakterilerinin ürettiği laktik asit, proteolitik aktivite ve hidrojen peroksit miktarı

İzolat	pH	Laktik asit mglml	Proteolitik aktivite Tirozin mglml.	Hidrojen Peroksit mglml
SZ1	5,9	1,818	0,010	0,218
DZ2	5,8	1,783	0,011	0,374
BZ1	5,3	1,233	0,004	0,236
EZ8	6,3	0,765	0,009	0,252
BZ4	6,8	0,396	0,009	0,962
SZ5	6,1	0,261	0,003	0,689

Sonuç olarak *L. brevis* SZ1, *E. faecium*DZ2 ve *L. brevis* BZ1 izolatları yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişmesi, düşük pH da gelişebilmeleri ve yüksek laktik asit üretmeleri nedeniyle starter kültür olmaya aday izolatlardır. Ancak zeytin fermantasyonunda kullanılabilmesi için ek verilere ihtiyaç vardır. Bu bakterilerin probiyotik olup olmadığının da belirlenmesi, probiyotik olarak ta kullanılabilme imkanını ortaya çıkaracaktır. Gelecekte, bu çalışmada tespit edilen izolatlar gibi yeni izolatların, zeytin fermantasyonunda kullanılarak değerlendirildiği çalışmaların yapılması gerekmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu proje Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- [1] Aktan N. ve Kalkan H. Sofralık Zeytin Teknolojisi, Ege Üniversitesi Ege Meslek Yüksek Okulu Yayınları, No:23, İzmir, 2000.
- [2] IOC (International Olive Oil Council), world table olives figures. <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/132-world-table-olive-figures>, 2015.
- [3] Hurtado A, Reguant C, Bordons A, and Rozès N. Lactic acid bacteria from fermented table olives. Food Microbiol 2012; 31(1):1–8.
- [4] Nychas G-JE, Panagou EZ, Parker ML, Waldron KW, Tassou CC. Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. Lett Appl Microbiol 2002; 34:173–177.
- [5] Heparcan D. Microbiota of table olive fermentations and criteria of selection for their use as starters. Front Microbiol 2013; 4 (143):1–11.
- [6] Dinçer E, Kıvanç M. ve Karaca H. (2010), Biyokoruyucu olarak laktik asit bakterileri ve bakteriyosinler. Gıda 2010; 35(1):55-62.

- [7] Kivanc M, Yilmaz M, Cakir E. Isolation and identification of lactic acid bacteria from boza, and their microbial activity against several reporter strains Turkish J Biol 2011; 35 (3): 313-324.
- [8] Kıvanç M. and Yapıcı, E. Kefir as a probiotic dairy beverage: determination lactic acid bacteria and yeast. Int Food Eng, 2015; 1(1) : 55-60.
- [9] Cerning J, Bouillanne C, Landon M, Desmazeaud M. Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. J Dairy Sci 1992;75: 692-699.
- [10] Aponte M, Ventrino V, Blaiotta G, Volpe G, Farina V, Avellone G. Study of green Sicilian table olive fermentations through microbiological, chemical and sensory analyses. Food Microbiol 2010; 27:162-170.
- [11] Castele SV, Vanheuverzwijn T, Ruysen T, Assche VP, Swings J, Huys G. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. Int. Dairy 2006; 16: 1470-1476.
- [12] Schillinger U, Lucke FK. Identification of lactobacilli from meat and meat products. Food Microbiol 1987; 4: 199–208.
- [13] Stiles ME, Holzapfel WH. Review article: Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. Food Microbiol 1997; 36: 1-29
- [14] Klaenhammer, T.R.1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochemie 1988; 7: 337-349
- [15] Carminati D, Giraffa G. and Bassi MG. Bacteriocin-Like Inhibitors of Streptococcus lactis Against Listeria monocytogenes. J Food Prot 1989; 52 (9):614-617.
- [16] Aslım B. Lactobacillus bulgaricus ve Streptococcus thermophilus bakterilerinin metabolik ve antimikrobiyal aktiviteleri üzerine bazı fiziksel ve kimyasal mutajenlerin etkisi, Doktora Tezi, Gazi Üniv., Ankara.1994.
- [17] Mumcu Z N. Kefirden izole edilen bazı laktik asit bakterilerinin metabolik, antimikrobiyal ve plazmit DNA larının incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.1997.
- [18] Kaiser TDL, Pereira EM, Dos Santos KRN, Maciel ELN, Schuenck RP, Nunes APF. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by Staphylococcus epidermidis. Diagnostic Microbiol Infect Dis 2013; 75(3): 235–9.
- [19] Peres CM, Alves M, Hernandez-Mendoza A, Morerira L, Silva S, Bronze MR, Vilas-BoasL, Peres C, Malcata FX. Novel isolates of lactobacilli from fermented Portuguese olive as potential probiotics. LTW- Food Sci Tech 2014;59: 234-246.
- [20] Obadina AO, Oyewole OB, Sanni LO, Tomlins KI. Bio-preservative activities of Lactobacillus plantarum strains in fermenting Cassava ‘fufu’. African J Biotech 2006; 5: 620-623.
- [21] Karasu N. Turşu ve zeytinden antagonistic ve probiyotik özellikte laktik starter kültür eldesi. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Denizli. 2006.

- [22] Rubia-Soria A, Abriouel H, Lucas R, Omar NB, Martinez-Canamero M, Galvez A. Production of antimicrobial substances by bacteria isolated from fermented table olives. *World J Microbiol Biotech* 2006; 22:765-768.
- [23] Özay G, Borcaklı M, Alperden İ, Özsan E, Erdek Y. Farklı iki tipo zeytin (Gemlik ve Edincik) fermantasyonlarının kimyasal ve mikrobiyolojik yönden incelenmesi *Gıda* 1994; 19:37-43.
- [24] Brenes M. Olive Fermentation and Processing: Scientific and Technological Challanges, *Fermentation Technology*, 12 th. World Congress of Food Science and Technology, *J Food Sci* 2004; 69: 33-34.
- [25] Panagou EZ and Katsaboxakis KZ. Effect of different brining treatments on the fermentation of cv. *conservolea* green olives processed by the spanish-method. *Food Microbiol* 2006; 23: 199-204.
- [26] Akyar G. Salamura Siyah Zeytinin (*Olea europaea*) Mikrobiyolojik olarak incelenmesi ve starter kültür eldesi. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Bornova-İzmir, Türkiye, 2008.
- [27] Tassou CC, Panagou EZ, Katsaboxakis KZ, Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in brines. *Food Microbiol* 2002; 19:605-615.
- [28] Randazzo CL, Ribbera A, Pitino I, Romeo FV & Caggia C. Diversity of bacterial population of table olives assessed by PCR-DGGE analysis. *Food Microbiol* 2012; 32: 87–96.
- [29] Korukluoğlu M, Gurbuz O, Sahin İ. Identification of lactic acid bacteria in fresh olive microflora (Turkish) *Turkish J Biol* 2002; 8: 109–113.
- [30] Kumral A, Basoglu F, Sahin İ. Effect of the use of different lactic starters on the microbiological and physicochemical characteristics of naturally black table olives of Gemlik cultivar. *J Food Process Preservat* 2009; 33: 651-664.
- [31] Benincasa C, Muccilli S, Amenta M, Perri E, Romeo FV. Phenolic trend and hygienic quality of green table olives fermented with *Lactobacillus plantarum* starter culture. *Food Chem* 2015; 186: 271–276.