

ÖZET

SİNERJİK ANTİMİKROBİYAL ETKİ

- 5 Mevcut buluş, biyokoruma alanıyla ve bilhassa *Lactobacillus rhamnosus* suşu ve/veya *Lactobacillus paracasei* suşunu içeren bir antimikrobiyal bileşimle ilgilidir. İlaveten mevcut buluş, bu tür bir antimikrobiyal bileşimin kullanımıyla, bu tür bir antimikrobiyal bileşimi içeren gıda, yem ve farmasötik ürünlerle, bu tür gıda, yem ve farmasötik ürünlerin imal edilmesi yöntemiyle ve bu tür gıda, yem
- 10 ve farmasötik ürünlerdeki istenmeyen mikroorganizma içeriğinin indirgenmesine yönelik bir yöntemle ilgilidir.

İSTEMLER

1. Bir antimikrobiyal bileşim olup, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilen en az bir suşu içermektedir:

5

DSM24616 erişim numarası altında Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu'na (DSMZ) tevdi edilen *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697, DSM24652 erişim numarası altında Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu'na (DSMZ) tevdi edilen *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226, ve DSM24651 erişim numarası altında Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu'na (DSMZ) tevdi edilen *Lactobacillus paracasei* CHCC12777.

10

2. En az bir *Lactobacillus rhamnosus* suşunu ve en az bir *Lactobacillus paracasei* suşunu içeren, İstem 1'e göre antimikrobiyal bileşim.

15

3. En az bir *Lactobacillus paracasei* suşunun, DSM24651 erişim numarasına sahip *Lactobacillus paracasei* CHCC12777'den oluşan gruptan seçildiği, İstem 2'ye göre antimikrobiyal bileşim.

20

4. Bir gıda, yem veya farmasötik ürünün hazırlanmasında önceki istemlerden herhangi birine göre antimikrobiyal bileşimin kullanımı.

5. Bir farmasötik ürün olarak istemler 1 ila 3'ten herhangi birine göre antimikrobiyal bileşimin terapötik olmayan kullanımı.

25

6. İstemler 1 ila 3'ten herhangi birine göre antimikrobiyal bileşimi içeren bir gıda, yem veya farmasötik ürün.

30

7. Gıda ürününün, meyveler ve meyvelerden türetilen ürünler, sebzeler ve sebzeden türetilen ürünler, tahıl ve tahıldan türetilen ürünler, süt ürünleri, et,

kümes hayvanları ve deniz mahsulleri ve bunların karışımlarından oluşan gruptan seçildiği, İstem 6'ya göre gıda ürünü.

5 8. Farmasötik ürünün İstemler 1 ila 3'ten herhangi birine göre bileşimi içeren bir birim dozaj biçimi olduğu, İstem 6'ya göre bir farmasötik ürün.

9. İstemler 1 ila 3'ten herhangi birine göre antimikrobiyal bileşimin gıda, yem veya farmasötik ürüne ilave edilmesi adını içeren, bir gıda, yem veya farmasötik ürünün, özellikle istemler 6 ila 8'den herhangi birine göre gıda, yem veya 10 farmasötik ürünün imal edilmesine yönelik bir yöntem.

10. İstem 9'a göre yöntem olup, aşağıdakileri içermektedir:

15 (a) en az bir *Lactobacillus rhamnosus* suşu ve en az bir *Lactobacillus paracasei* suşunun konsantrasyonunun her biri, gıda, yem veya farmasötik ürünün en az 1×10^6 cfu/g veya en az 1×10^6 cfu/ml'si veya gıda, yem veya farmasötik ürünün yüzeyinin en az 1×10^5 cfu/cm²'si olacak şekilde, gıda, yem veya farmasötik ürün imalatı sırasında İstemler 1 ila 3'ten herhangi birine göre antimikrobiyal bileşimin ilave edilmesi, ve

20 (b) en az bir *Lactobacillus rhamnosus* suşu ve en az bir *Lactobacillus paracasei* suşunun konsantrasyonu artacak veya sabit kalacak şekilde, imalat sırasında imalat parametrelerinin kontrol edilmesi.

25 11. Yöntemin bir veya daha fazla fermantasyon adımı içerdiği, İstemler 9 ila 10'dan herhangi birine göre yöntem.

30 12. DSM24616 erişim numarası altında Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu'na (DSMZ) tevdi edilmiş olan *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697.

13. DSM24652 erişim numarası altında Alman Mikroorganizma ve Hücre

24946.35

Kültürleri Koleksiyonu'na (DSMZ) tevdi edilmiş olan *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226.

14. DSM24651 erişim numarası altında Alman Mikroorganizma ve Hücre
5 Kültürleri Koleksiyonu'na (DSMZ) tevdi edilen *Lactobacillus paracasei* CHCC12777.

TARİFNAME

SİNERJİK ANTİMİKROBİYAL ETKİ

5 TEKNİK ALAN

Mevcut buluş, biyokoruma alanıyla ve bilhassa *Lactobacillus rhamnosus* suşu ve/veya *Lactobacillus paracasei* suşunu içeren bir antimikrobiyal bileşimle ilgilidir. İlâveten mevcut buluş, bu tür bir antimikrobiyal bileşimin kullanımıyla, 10 bu tür bir antimikrobiyal bileşimi içeren gıda, yem ve farmasötik ürünlerle, bu tür gıda, yem ve farmasötik ürünlerin imal edilmesi yöntemiyle ve bu tür gıda, yem ve farmasötik ürünlerdeki istenmeyen mikroorganizma içeriğinin indirgenmesine yönelik bir yöntemle ilgilidir.

15 ÖNCEKİ TEKNİK

Biyokoruyucu kültürler, farklı gıda uygulamalarında kimyasal koruyuculara alternatif olarak kullanılmaktadır. Sür ürünlerinde, maya ve küflerle olan kontaminasyon, süt ürünlerinin raf ömrünü sınırlayabilmektedir. Ciddi maya ve 20 küf kontaminasyon sorunlarını deneyimleyen bir ürün alanı ise taze peynirleri içermektedir.

Bu sorunların üstesinden gelinmesine yönelik biyokoruyucu çözümler, süt endüstrisi tarafından geliştirilmiştir. Piyasada en iyi bilinen ve muhtemelen en 25 yaygın olarak kullanılan bazı antifungal biyokoruyucu çözümler, her ikisi de *Propionibacteria* ve *Lactobacillus* alt türlerinin kombinasyonlarını ihtiva eden, Danisco'dan HOLDBAC™ YM-b ve HOLDBAC™ YM-C kültürleridir.

Mikroorganizmaların inhibisyonuna yönelik laktik asit bakterileriyle birlikte 30 propiyonik asit bakterilerinin kullanımı, US 2005/0095318, WO 2004/041305 ve EP 852 114 numaralı patent başvurularında açıklanmıştır.

Propionibacteria ssp. suşlarının esasen propiyonik asit üretimi vasıtasıyla, ancak aynı zamanda asetik asit ve diğer metabolitlerin de üretimi vasıtasıyla antifungal aktivitesine katkıda bulunduğu inanılmaktadır.

5

Ancak, bu türlerin endüstriyel ölçekte üretimi nispeten masraflı olmakta ve propiyonik asidin üretimi, nihai süt ürünlerinde istenmeyen duyuşsal özelliklere sebep olabilmektedir.

10 Süt ürünlerine ilişkin piyasadaki diğer antifungal biyokoruyucu çözümler, SACCO şirketinin Lyofast LPRA ürününü ve aynı zamanda BIOPROX şirketinin Aroma-Prox®RP80 isimli ürününü içermektedir. Bu ürünlerin her ikisi, *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus rhamnosus* kombinasyonlarını ihtiva etmektedir.

15

Tharmaraj ve Shah (2009), peynir bazlı dip soslara ilişkin biyokoruyucu laktik asit bakteriyel adayların taranmasını tarif etmektedir. Tek suşlar şeklinde test edilen *Lactobacillus rhamnosus* ve *Lactobacillus paracasei* suşlarının tamamı, mayalara ve küflere karşı maksimum engelleyici etki sergilemiştir. Ancak, hiçbir
20 *Lactobacillus rhamnosus* ve *Lactobacillus paracasei* kombinasyonu incelenmemiştir.

25

Dolayısıyla, antifungal etkililiği tehlikeye sokmaksızın *Propionibacteria* ssp. suşunu dışarıda tutan gelişmiş biyokoruyucu çözümlerin geliştirilmesine yönelik bir endüstriyel ihtiyaç bulunmaktadır.

BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Birinci yönde, mevcut buluş, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilen en az bir suşu
30 içeren antimikrobiyal bileşimle ilgilidir:

DSM24616 erişim numarası altında Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu'na (DSMZ) tevdi edilen *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697,

5 DSM24652 erişim numarası altında Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu'na (DSMZ) tevdi edilen *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226, ve

DSM24651 erişim numarası altında Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu'na (DSMZ) tevdi edilen *Lactobacillus paracasei* CHCC12777.

10

Mevcut buluşun bileşimleri, örneğin insanlarda ve hayvanlarda ve gıda, yem ve farmasötik ürünlerde, mantar, bakteri ve bunların karışımlarından seçilen istenmeyen mikro organizmaların inhibe edilebilmesi avantajını sağlamaktadır. Mayalar ve küfler gibi mantarların büyümesinin önlenmesi ve/veya inhibe edilmesi, özellikle öngörülmektedir. Dolayısıyla, tercih edilen bir yapılandırmada, "antimikrobiyal" terimi, "antifungal" şeklinde anlaşılacaktır.

15

Dolayısıyla, mevcut buluşun ikinci yönü, bir gıda, yem veya farmasötik ürün preparatında birinci yönün antimikrobiyal bileşimlerin birinin kullanımına yöneliktir.

20

Mevcut buluşun üçüncü yönü, mantar, bakteri ve bunların karışımlarından oluşan gruptan seçilen istenmeyen mikro organizmaların büyümesinin inhibe edilmesine yönelik birinci yönün antimikrobiyal bileşimlerinin birinin kullanımıyla ilgilidir.

25

Özellikle, mevcut buluşun bileşimleri, süt endüstrisi işlemlerinde, örneğin süt fermantasyon işlemlerinde yaygın olarak bilinen kirletici maddeler olan mantar ve bakterilerin büyümesinin inhibe edilmesi ve/veya önlenmesi için kullanılacaktır.

30

Mevcut buluşun dördüncü yönü, farmasötik ürün olarak birinci yönün antimikrobiyal bileşimlerinin birinin kullanımıyla ilgilidir. Farmasötik ürün, tercihen, bakteri veya mantar, daha tercihen küfler vasıtasıyla bir deneğin

enfeksiyonunun tedavi edilmesinde kullanılmaktadır.

Mevcut buluşun beşinci yönü, mevcut buluşun birinci yönüne göre antimikrobiyal bileşimlerin birini içeren bir gıda, yem veya farmasötik ürünle ilgilidir.

5

Mevcut buluşun altıncı yönü, mevcut buluşun beşinci yönüne göre gıda, yem veya farmasötik ürünün imal edilmesine yönelik bir yöntemle ilgili olmakta ve söz konusu yöntem, gıda, yem veya farmasötik ürünün imalatı sırasında mevcut buluşun birinci yönüne göre antimikrobiyal bileşimlerin birinin ilave edilmesini içermektedir. Yöntemin *Lactobacillus paracasei* suşuyla kombinasyon halinde *Lactobacillus rhamnosus* suşunu içeren bir antimikrobiyal bileşimin ilave edilmesini içerdiği durumlarda, söz konusu bileşim, en az bir *Lactobacillus rhamnosus* suşu ile en az bir *Lactobacillus paracasei* suşunun her birinin konsantrasyonu, 1×10^6 cfu/g, tercihen 5×10^6 cfu/g, veya her biri gıda, yem veya farmasötik ürünün 1×10^6 cfu/ml, tercihen 5×10^6 cfu/ml'si, veya her biri, gıda, yem veya farmasötik ürünün yüzeyinin en az 1×10^5 cfu/cm², tercihen 1×10^7 cfu/cm²'si, olacak şekilde ilave edilmekte ve en az bir *Lactobacillus rhamnosus* suşu ve en az bir *Lactobacillus paracasei* suşunun konsantrasyonu, artacak veya sabit kalacak şekilde imalat sırasında imalat parametreleri kontrol edilmektedir.

20

Mevcut buluşun yedinci yönü, DSM24616 erişim numarası kapsamında Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu'na (DSMZ) tevdi edilen *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 ile ilgilidir.

25

Mevcut buluşun sekizinci yönü, DSM24652 erişim numarası kapsamında Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu'na (DSMZ) tevdi edilen *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 ile ilgilidir.

30

Mevcut buluşun dokuzuncu yönü, DSM24651 erişim numarası kapsamında Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu'na (DSMZ) tevdi edilen *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 ile ilgilidir.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

5 **ŞEKİL 1**, tek başına başlatıcı kültürle (referans, birinci kolon), *Lb. rhamnosus* CHCC12697 ile birlikte (ikinci kolon) *Lb. paracasei* CHCC12777 ile birlikte (üçüncü kolon) veya *Lb. rhamnosus* CHCC12697 ve *Lb. paracasei* CHCC12777 kombinasyonu ile birlikte (dördüncü kolon) fermente edilen sütten hazırlanan plakalarda mayaların ve küflerin büyümesini göstermektedir. Hedef kirletici maddeler, soldan sağa doğru metinde bahsedildiği şekilde

10 konsantrasyonlara ilave edilmiştir: sırasıyla plakaların üst sırasında *K. marxianus*, *P. fermentans*, *Y. lipolytica* ve *C. sake*. İkinci plaka sırasında, *P. nalgiovensis* üste ilave edilmiş, *Cladospodium* spp. alttan sola doğru ilave edilmiş ve *P. commune* alttan sağa doğru ilave edilmiştir. Son plaka sırasında, *Mucor* ssp. tek başına ilave edilmiştir. Plakalar 17 gün boyunca $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de

15 inkübe edilmiştir.

ŞEKİL 2, tek başına başlatıcı kültür CHN-19 (içi dolu baklava şekli) veya aşağıdaki suşlarla birlikte enjekte edilmiş tam yağlı süte ilave edilen *Yarrowia lipolytica* izolatının hücre sayımını göstermektedir: HOLDBAC™ YM-B (içi boş

20 kare), HOLDBAC™ YM-C (içi boş baklava şekli), *Lb. paracasei* CHCC12777 (içi dolu kare), *Lb. rhamnosus* CHCC12697 (içi dolu üçgen) veya *Lb. paracasei* CHCC12777 ve *Lb. rhamnosus* CHCC12697 kombinasyonu (içi dolu daire), bunların tamamı, 4.65 ± 0.05 'lik pH değerine ulaşılan dek $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de fermantasyondan önce ilave edilmiştir.

25

ŞEKİL 3, tek başına başlatıcı kültürle (referans, birinci kolon), *Lb. rhamnosus* CHCC14226 ile birlikte (ikinci kolon) *Lb. paracasei* CHCC12777 ile birlikte (üçüncü kolon) veya *Lb. rhamnosus* CHCC14226 ve *Lb. paracasei* CHCC12777 kombinasyonu ile birlikte (dördüncü kolon) fermente edilen

30 sütten hazırlanan plakalarda mayaların ve küflerin büyümesini göstermektedir. Hedef kirletici maddeler, soldan sağa doğru metinde bahsedildiği şekilde

5 konsantrasyonlara ilave edilmiştir: sırasıyla plakaların üst sırasında *K. marxianus*, *P. fermentans*, *Y. lipolytica* ve *C. sake*. Alt plaka sırasında, *P. nalgiovense* üste ilave edilmiş, *Cladospodium* spp. alttan sola doğru ilave edilmiş ve *P. commune* alttan sağa doğru ilave edilmiştir. Plakalar, 15 gün boyunca $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir.

10 **ŞEKİL 4**, tek başına başlatıcı kültür CHN-19 (içi dolu baklava şekli) veya aşağıdaki suşlarla birlikte enjekte edilmiş tam yağlı süte ilave edilen *Klyveromyces marxianus* izolatının hücre sayımını göstermektedir: HOLDBAC™ YM-B (içi boş kare), HOLDBAC™ YM-C (içi boş baklava şekli), *Lb. paracasei* CHCC12777 (içi dolu kare), *Lb. rhamnosus* CHCC14226 (içi dolu üçgen) veya *Lb. paracasei* CHCC12777 ve *Lb. rhamnosus* CHCC14226 kombinasyonu (içi dolu daire), bunların tamamı, 4.65 ± 0.05 'lik pH değerine ulaşılan dek $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de fermantasyondan önce ilave edilmiştir.

15 **ŞEKİL 5**, tek başına başlatıcı kültürle (referans, birinci resim), *Lb. paracasei* CHCC14676 ile (ikinci resim), *Lb. rhamnosus* CHCC5366 ile (üçüncü resim) veya *Lb. paracasei* CHCC14676 ve *Lb. rhamnosus* CHCC5366 kombinasyonu ile (dördüncü resim) fermente edilen süttten hazırlanan plakalarda mayaların ve küflerin büyümesini göstermektedir. Hedef kirletici maddeler, sol üstten sağ alta doğru metinde bahsedildiği şekilde konsantrasyonlara ilave edilmiştir: sırasıyla *Penicillium nalgiovese*, *Penicillium commune*, *Aspergillus versicolor* ve *Penicillium crustosum*. Plakalar, 12 gün boyunca $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir.

25 **ŞEKİL 6**, tek başına başlatıcı kültürle (referans, birinci resim), *Lb. paracasei* CHCC14676 ile (ikinci resim), *Lb. rhamnosus* CHCC14226 ile (üçüncü resim) veya *Lb. paracasei* CHCC14676 ve *Lb. rhamnosus* CHCC14226 kombinasyonu ile (dördüncü resim) fermente edilen süttten hazırlanan plakalarda mayaların ve küflerin büyümesini göstermektedir. Hedef kirletici maddeler, sol üstten sağ alta doğru metinde bahsedildiği şekilde konsantrasyonlara ilave edilmiştir: sırasıyla *Penicillium nalgiovese*, *Penicillium*

commune, *Aspergillus versicolor* ve *Penicillium crustosum*. Plakalar, 12 gün boyunca $7\pm 1^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir.

5 **ŞEKİL 7**, tek başına başlatıcı kültürle (referans, birinci resim), *Lb. paracasei* CHCC12777 ile (ikinci resim), *Lb. rhamnosus* CHCC14226 ile (üçüncü resim) veya *Lb. paracasei* CHCC12777 ve *Lb. rhamnosus* CHCC14226 kombinasyonu ile (dördüncü resim) fermente edilen süttten hazırlanan plakalarda mayaların ve küflerin büyümesini göstermektedir. Hedef kirlenici maddeler, sol üstten sağ alta doğru metinde bahsedildiği şekilde

10 konsantrasyonlara ilave edilmiştir: sırasıyla *Penicillium nalgiovese*, *Penicillium commune*, *Aspergillus versicolor* ve *Penicillium crustosum*. Plakalar, 12 gün boyunca $7\pm 1^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir.

15 **ŞEKİL 8**, *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 ile ekşi kremaya ilişkin yükleme çalışmasının sonuçlarını göstermektedir. *P. commune* (M6), *A. versicolor* (M7), *P. brevicompactum* (M1), *P. crustosum* (M10) ve *P. glabrum* (M8) suşlarının yalnızca başlatıcı kültürle (üst sıra) veya başlatıcı kültür ve HOLDBAC™ YM-B kültürüyle (orta sıra) fermente edilmiş süttten yapılmış ekşi kremada iyi bir şekilde büyüdüğü gösterilmiştir. Bunun aksine, süt

20 fermantasyonu sırasında *Lactobacillus paracasei* CHCC12777'nin mevcut olması durumunda (alt sıra), test edilen küflerin tamamının büyümesi inhibe edilmiştir.

25 **ŞEKİL 9**, *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 ile tvarog'a ilişkin bir yükleme çalışmasını göstermektedir. *Mucor* ssp.'nin yalnızca başlatıcı kültür CHN-19 ile (Ref.) fermente edilen süttten yapılmış tvarogta iyi büyüdüğü gösterilmiştir. Küf, aynı zamanda başlatıcı kültürle ve HOLDBAC™ YM-B kültürüyle fermente edilmiş süttten yapılmış tvarogta da iyi büyümekte ve başlatıcı kültürle ve HOLDBAC™ YM-C kültürüyle fermente edilmiş süttten yapılmış tvarogta ise daha az ölçüde büyümektedir. Ancak, *Lactobacillus rhamnosus* suşu CHCC12697'nin süttün fermantasyonu sırasında mevcut

30

olması durumunda, *Mucor* ssp'nin daha belirgin büyüme inhibisyonu gözlemlenmektedir.

ŞEKİL 10, *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 ile yoğurt üzerinde yapılan yükleme çalışmasını göstermektedir. *P. brevicompactum* (M1), *P. commune* (M6), *A. versicolor* (M7) ve *P. crustosum* (M10), yalnızca başlatıcı kültür YF-L901 (üst sıra) ile veya başlatıcı kültür ve HOLDBAC™ YM-B kültürüyle (orta sıra) fermente edilmiş sütten yapılmış yoğurtta iyi büyümektedir. Bunun aksine, *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 suşunun süt fermantasyonu sırasında mevcut olması (alt sıra) durumunda, test edilen küflerin tamamı inhibe edilmiştir.

ŞEKİL 11, tvaroğta *K. lactis*'e karşı *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 ve *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 suşlarının engelleyici etkilerinin kantitatif olarak belirlenmesini göstermektedir. *K. lactis* büyümesinin fermantasyondan önce başlatıcı kültür CHN-19 ile birlikte aşıl原因 *Lactobacillus paracasei* suşu CHCC12777 mevcudiyetinde ve *Lactobacillus rhamnosus* suşu CHCC12697 mevcudiyetinde inhibe edildiği gösterilmiştir. Her iki suş, yani *Lactobacillus paracasei* suşu CHCC12777 ve *Lactobacillus rhamnosus* suşu CHCC12697, ticari kültür HOLDBAC™ YM-B'ye kıyasla çarpıcı bir şekilde daha yüksek inhibisyona sebep olmuştur.

ŞEKİL 12, yoğurtta *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 suşunun *Debaromyces hansenii*'ye karşı olan engelleyici etkisinin kantitatif olarak belirlenmesini göstermektedir. *D. hansenii* büyümesi, fermantasyondan önce başlatıcı kültür YF-L901 ile birlikte aşıl原因 *Lactobacillus rhamnosus* suşu CHCC14226 mevcudiyetinde inhibe edilmiştir. Suş, ticari kültür HOLDBAC™ YM-B'ye kıyasla çarpıcı bir şekilde daha yüksek inhibisyona sebep olmuştur.

30

BULUŞUN AYRINTILI AÇIKLAMASI

Tanımlar

Burada kullanıldığı gibi, “laktik asit bakterisi”, baskın olarak üretilen asit olarak
 5 laktik asit dahil asitlerin üretimiyle şekerleri fermente eden gram-pozitif, mikroaerofilik veya anaerobik bakteriyi belirtmektedir. Endüstriyel olarak en kullanışlı laktik asit bakterileri, *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudoleuconostoc* spp., *Pedi-ococcus* spp., *Brevibacterium* spp. ve *Enterococcus* spp.’yi içeren “Laktobacillaleler” cinsinde
 10 bulunmaktadır. Bunlar, tek başına gıda kültürleri olarak veya diğer laktik asit bakterileriyle kombinasyon halinde sıklıkla kullanılmaktadır.

Lactobacillus sp. ve *Streptococcus thermophilus* bakteri türleri dahil, laktik asit bakterileri, genellikle fermente süt ürünü veya peynir gibi süt ürününün üretilmesi
 15 amacıyla bir fermantasyon kabına veya teknesine doğrudan aşılması amaçlanan yığın başlatıcı çoğaltmasına ilişkin dondurulmuş veya dondurularak kurutulmuş kültürler veya “Direct Vat Set” (DVS) kültürü olarak adlandırılan kültürler şeklinde süt endüstrisine tedarik edilmektedir. Bu tür laktik asit bakteriyel kültürler, genellikle “başlatıcı kültürler” veya “başlatıcılar” olarak ifade
 20 edilmektedir.

Burada “mezofil” terimi, en iyi ılımlı sıcaklıklarda (15°C ila 40°C) gelişen mikro organizmaları ifade etmektedir. Endüstriyel olarak en kullanışlı mezofilik bakteriler, *Lactococcus* spp. ve *Leuconostoc* spp.’yi içermektedir. Burada
 25 “mezofilik fermantasyon” terimi, takriben 22°C ile takriben 35°C arasındaki bir sıcaklıkta olan fermantasyonu ifade etmektedir. “Mezofilik olarak fermente edilmiş süt ürünü” terimi, mezofilik başlatıcı kültürünün mezofilik fermantasyonu vasıtasıyla hazırlanan fermente süt ürünlerini ifade etmekte ve tereyağı, ekşimiş (kesilmiş) süt, kültürü yapılmış süt, kaymak, ekşi krema ve kuark, tvarog ve krem
 30 peynir gibi taze peynir şeklindeki bu tür fermente süt ürünlerini içermektedir.

“Termofil” terimi, burada en iyi 43°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda gelişen mikro organizmaları ifade etmektedir. Endüstriyel olarak en kullanışlı termofilik bakteriler, *Streptococcus* spp. ve *Lactobacillus* spp.'yi içermektedir. “Termofilik fermantasyon” terimi burada, takriben 35°C ila takriben 45°C gibi 35°C'nin
5 üzerindeki bir sıcaklıkta olan fermantasyonu ifade etmektedir. “Termofilik olarak fermente edilmiş süt ürünü” terimi, bir termofilik başlatıcı kültürün termofilik fermantasyonu vasıtasıyla hazırlanan fermente süt ürünlerini ifade etmekte ve süzme yoğurt, çırpılmış yoğurt ve ayran (kefir) gibi bu tür fermente süt ürünlerini içermektedir.

10

“Süt” terimi, inekler, koyunlar, keçiler, bufalolar veya develer gibi herhangi bir memelinin sağılması vasıtasıyla elde edilen lakteal sekresyon şeklinde anlaşılmaktadır. Tercih edilen bir yapılandırmada, süt, inek sütü olmaktadır. Süt terimi, aynı zamanda örneğin soya sütü gibi bitki malzemelerinden yapılmış
15 protein/yağ solüsyonlarını içermektedir.

“Süt substratı” terimi, mevcut buluşun yöntemine göre fermantasyon işlemine sokulabilen herhangi bir ham ve/veya işlenmiş süt malzemesi olabilmektedir. Dolayısıyla kullanışlı süt substratları, bununla sınırlı olmamak üzere, tam veya az
20 yağlı süt, yağsız süt, tereyağı, yeniden yapılandırılmış süt tozu, koyulaştırılmış süt, süt tozu, peynir altı suyu, peynir altı suyu süzüntüsü, laktoz, laktozun kristalleştirilmesinden elde edilen ana sıvı, peynir altı suyu protein konsantresi veya krema gibi herhangi bir süt veya süt benzeri ürünün solüsyonunu/süspansiyonunu içermektedir. Açıkçası, süt substratı, herhangi bir
25 memeliden kaynaklanabilmekte, örneğin büyük ölçüde saf memeli sütü veya yeniden yapılandırılmış süt tozu olabilmektedir.

Fermantasyondan önce, süt substratı, teknikte bilinen yöntemlere göre homojenize ve pastörize edilebilmektedir.

30

“Homojenize etme” terimi, burada kullanıldığı gibi, çözünebilir süspansiyon veya

emülsiyon elde etmek için yoğun karıştırma yapılması anlamına gelmektedir. Homojenleştirme işleminin fermantasyondan önce gerçekleştirilmesi durumunda, süt yağının süttten artık ayrılmayacak şekilde daha küçük boyutlar halinde parçalanması için gerçekleştirilebilmektedir. Bu işlem, süttün küçük ağzların
5 içinden yüksek basınçta ittirilmesi vasıtasıyla gerçekleştirilebilmektedir.

"Pastörize etme" terimi, burada kullanıldığı gibi, mikro organizmalar gibi canlı organizmaların mevcudiyetinin indirgenmesi veya ortadan kaldırılması için süt substratının işlenmesi anlamına gelmektedir. Tercihen, pastörizasyon işlemi,
10 belirtilen bir süre boyunca belirtilen bir sıcaklığın korunması vasıtasıyla elde edilmektedir. Belirtilen sıcaklık, genellikle ısıtma işlemi vasıtasıyla elde edilmektedir. Sıcaklık ve süre, zararlı bakteriler gibi belirli bakterileri öldürmek veya etkisiz hale getirmek için seçilebilmektedir. Bunu hızlı bir soğutma adımı takip edebilmektedir.

15 Mevcut buluşun yöntemlerindeki "fermantasyon", mikro organizmanın etkisi vasıtasıyla karbonhidratların alkollere veya asitlere dönüştürülmesi anlamına gelmektedir. Tercihen, mevcut buluşun yöntemlerindeki fermantasyon, laktozun laktik aside dönüştürülmesini içermektedir.

20 Süt ürünlerinin üretiminde kullanılacak fermantasyon işlemleri, iyi bilinmekte ve teknikte uzman kişiler, sıcaklık, oksijen, mikro organizmanın(ların) miktarı veya karakteristik özellikleri ve işlem süresi gibi uygun işlem koşullarının nasıl seçileceğini bilecektir. Açıkçası, fermantasyon koşulları, mevcut buluşun elde
25 edilmesini desteklemek, diğer bir ifadeyle katı (peynir gibi) veya sıvı biçimde (fermente süt ürünü gibi) süt ürünü elde etmek için seçilmektedir.

Burada "istenmeyen mikro organizmalar" terimi, patojenik olan ve/veya gıda, yem veya farmasötik ürünleri bozabilen mayalar gibi bakteriler ve mantarlar gibi
30 mikro organizmaları ifade etmektedir.

İstenmeyen mikro organizmalarla ilgili olan "inhibe etmek" ve "inhibe edici"

5 terimleri, örneğin antimikrobiyal bileşim içeren gıda ürünlerinde ve/veya gıda ürünlerinin yüzeyinde istenmeyen mikro organizmaların konsantrasyonunun veya sayısının veya büyümesinin, bu tür antimikrobiyal bileşim içermeyen gıda ürünlerinde ve/veya gıda ürünlerinin yüzeyinde daha düşük olması anlamına gelmektedir.

Mevcut bağlamda, “mutant” terimi, örneğin genetik mühendisliği, radyasyon ve/veya kimyasal işlem vasıtasıyla mevcut buluşun bir suşundan türetilen bir suş şeklinde anlaşılmalıdır. Mutantın fonksiyonel olarak muadil bir mutant olması, 10 örneğin ana suşla büyük ölçüde aynı veya gelişmiş özelliklere (örneğin diasetil üretimi, viskozite, jel katılığı, ağız kaplaması, aroma, post-asidifikasyon, asidifikasyon hızı ve/veya faj sağlamlığı bakımından) sahip olan bir mutant olması tercih edilmektedir. Özellikle “mutant” terimi, mevcut buluşun bir suşunun etan metan sülfonat (EMS) veya N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidin (NTG), UV ışığı 15 dahil konvansiyonel olarak kullanılan herhangi bir mutajen oluşturma işlemine sokulması vasıtasıyla elde edilen bir suşu veya kendiliğinden meydana gelen bir mutantı ifade etmektedir. Bir mutant, birçok mutajen oluşturma işlemine (tek işlem, bir mutajen oluşturma adımını takiben bir tarama/seleksiyon adımı şeklinde anlaşılmalıdır) sokulmuş olabilmekte, ancak halihazırda 20'den daha az veya 10'dan 20 daha az veya 5'ten daha az işlemin (veya tarama/seleksiyon adımının) gerçekleştirilmesi tercih edilmektedir. Halihazırda tercih edilen bir mutantta, bakteriyel genomdaki nükleotidlerin %5'inden daha azı, veya %1'inden daha azı veya hatta %0.1'inden daha azı diğer nükleotidle değiştirilmiş olmakta veya ana suşa kıyasla silinmiş olmaktadır.

25

Mevcut buluşun tarif edilmesi bağlamında (özellikle aşağıdaki istemler bağlamında) “bir” terimi ve benzeri göndergelerin kullanımının, aksi burada belirtilmedikçe veya bağlam açıkça aksini belirtmedikçe hem tekil hem de çoğul anlamı kapsadığı şeklinde yorumlama yapılmalıdır. “İçeren”, “sahip olan”, 30 “barındıran” ve “ihtiva eden” terimler, aksi belirtilmedikçe açık uçlu terimler (diğer bir ifadeyle “bununla sınırlı olmamak üzere ...’yı içeren” anlamına gelen)

şeklinde yorumlanmalıdır. Burada değer aralıklarının anlatılması, sadece aksi belirtilmedikçe aralığın kapsamına giren her bir ayrı değere ayrı ayrı atıf yapılmasına yönelik stenografi yöntemi olarak görev yapması amaçlanmakta ve her bir ayrı değer, burada ayrı ayrı belirtilmiş şekilde tarifnameye dahil edilmektedir. Burada tarif edilen yöntemlerin tamamı, aksi belirtilmedikçe veya bağlam açıkça aksini belirtmedikçe herhangi uygun bir düzende gerçekleştirilebilmektedir. Örneklerin herhangi biri ve tamamı veya örnekleyici bir dilin (örneğin “gibi”) kullanımı burada sağlanmaktadır.

10 Mevcut buluşun uygulanması ve yönleri

Mevcut buluş sahipleri, küfler ve mayalar gibi istenmeyen mikro organizmalara karşı verimli olan iki farklı laktik asit bakteri suşunun birini veya bir karışımını içeren bir antimikrobiyal bileşim sağlamak amacıyla kapsamlı tarama ve araştırma yapmıştır.

Mevcut buluş sahipleri, mayalar ve küfler gibi çok sayıda mikro organizmalara karşı en verimli tek veya iki suş kombinasyonlarını bulmak amacıyla 200 *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* ve *Lactobacillus rhamnosus* adayı arasında tarama yapmıştır.

Taramalar, ilgili başlatıcı kültürün biyokoruyucu adaylar olsun veya olmasın ilave edildiği ve mezofilik fermente süt ürünleriyle ilgili koşullar altında fermente edilen mezofilik fermente süt ürünleri ve aynı zamanda olası süt bazlı besiyerini taklit eden bir model deneyinde gerçekleştirilmiştir. Hedef organizmalar, mezofilik fermente süt ürünlerinden izole edilmiştir. Hem Danisco A/S, Danimarka'dan HOLDBAC™ kültürlerinden ve aynı zamanda hem laktik asit bakterileri hem de propiyonik asit bakterilerini ihtiva eden tam HOLDBAC™ YM-B ve HOLD-BAC™ YM-C kültürlerinden saflaştırılan laktik asit bakterileri, referans işareti olarak kullanılmıştır.

Lactobacillus paracasei ve *Lactobacillus rhamnosus* suşları arasındaki on yedi adayın genellikle 25°C’de test edildiğinde referans işareti laktik asit bakterilerinden daha iyi veya daha fazla 12 gösterge mantarı inhibe ettiği keşfedilmiştir. Dolayısıyla, birinci yönde, mevcut buluş, yukarıda tarif edilen en az bir *Lactobacillus rhamnosus* veya *Lactobacillus paracasei* suşunu içeren bir antimikrobiyal bileşimle ilgilidir.

Tanımlanan aday suşlarının dokuzu, aynı zamanda soğuk koşullar altında test edildiğinde referans işareti laktik asit bakterileriyle aynı aralıkta aktiviteler sergilemiş ve özellikle aşağıdaki üç suşun çok verimli olduğu gösterilmiştir:

10 DSM24651 erişim numarasına sahip *Lactobacillus paracasei* CHCC12777, DSM24616 erişim numarasına sahip *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 ve DSM24652 erişim numarasına sahip *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226. Bu üç suş, Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonuna (DSMZ) tevdi edilmiştir.

15 Tek suşların HOLDBAC™ kültürlerine kıyasla, şişe deneyi olarak adlandırılan deneyde test edildiğinde, farklı mayalara karşı etki konusunda daha iyi veya kıyaslanabilir olduğu görünmüştür. Dolayısıyla, bu tek suşlar, antimikrobiyal maddeler olarak kullanılmak için oldukça uygun olmaktadır. Dolayısıyla tercih edilen bir yönde, mevcut buluş, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilen en az bir suşu içeren bir antimikrobiyal bileşim sağlamaktadır:

25 DSM24616 erişim numarası kapsamında Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu’na (DSMZ) tevdi edilen *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697,

30 DSM24652 erişim numarası kapsamında Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu’na (DSMZ) tevdi edilen *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226,

DSM24651 erişim numarası kapsamında Alman Mikroorganizma ve Hücre

Kültürleri Koleksiyonu'na (DSMZ) tevdi edilen *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 ve

5 bunların mutant suşları, burada mutant suşları, başlangıç malzemesi olarak tevdi edilen suşun kullanılması vasıtasıyla elde edilmektedir.

Özellikle tercih edilen bir yapılandırmada, mevcut buluşun antimikrobiyal bileşimi, antimikrobiyal aktivite uygulayan tek madde olarak yukarıdaki suşların birini içermektedir.

10

Bu suşların istenmeyen mikro organizmalara karşı olan inhibe edici etkisi, şişelerin aşağıdaki Örnekler kısmında tarif edildiği gibi uygun bir depolama süresi boyunca uygun bir sıcaklıkta depolanması vasıtasıyla belirlenebilmektedir.

15

Genellikle, bu yöntemin gerçekleştirilmesi gereken uygun sıcaklık, spesifik gıda, yem veya farmasötik ürünün normalde depolandığı ve/veya imal edildiği sıcaklığa bağımlı olmaktadır. Şişelerin genellikle depolandığı sıcaklıklar, 5°C ile 26°C arasında olmakta ve tercihen sıcaklık, takriben 8°C olmaktadır.

20

Sıcaklıktaki depolama süresi, gıda, yem veya farmasötik ürünün normalde depolandığı süreye (raf ömrü) bağımlıdır. Depolama süresi, genellikle 7 ila 28 gün olmakta, tercihen depolama süresi takriben 21 gün olmaktadır.

25

2 suşlu kombinasyonlar halinde test edildiğinde, en etkili tek suşların kombinasyonlarının ilave edilen hücrelerin toplam konsantrasyonları tek suşların ve 2 suşlu kombinasyonların test edilmesine ilişkin olarak eşit olması durumunda bile tek başına suşların herhangi birinden daha da iyi olduğu şaşırtıcı bir şekilde keşfedilmiştir. *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 ve *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 veya *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 ve *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 kombinasyonları, HOLDBAC™ YM-B ve Danisco, Danimarka'dan HOLDBAC™ YM-C referans işareti kültürlerinden daha etkili

olduğu görünmüştür.

Buna bağlı olarak, mevcut buluşun tercih edilen yapılandırması, en az bir *Lactobacillus rhamnosus* suşu ve en az bir *Lactobacillus paracasei* suşunu içeren bir antimikrobiyal bileşimle ilgili olmakta, burada en az bir *Lactobacillus rhamnosus* suşu, DSM24616 erişim numarasına sahip *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697, DSM24652 erişim numarasına sahip *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226'den oluşan gruptan seçilmektedir.

Diğer tercih edilen yapılandırmada, en az bir *Lactobacillus paracasei* suşu, DSM24651 erişim numarasına sahip *Lactobacillus paracasei* CHCC12777'den oluşan gruptan seçilmektedir.

İlave yapılandırmalarda, mevcut buluş, en az bir *Lactobacillus rhamnosus* suşu ve en az bir *Lactobacillus paracasei* suşunu içeren antimikrobiyal ve daha tercihen antifungal bileşimleriyle ilgili olmakta, burada

en az bir *Lactobacillus rhamnosus* suşu, DSM24616 erişim numarasına sahip *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697, DSM24652 erişim numarasına sahip *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226'dan oluşan gruptan seçilmektedir; ve

en az bir *Lactobacillus paracasei* suşu, DSM24651 erişim numarasına sahip *Lactobacillus paracasei* CHCC12777'den oluşan gruptan seçilmektedir.

En az *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 ve *Lactobacillus paracasei* CHCC12777'yi içeren bir antimikrobiyal bileşim özellikle tercih edilmektedir. Benzer şekilde, en az *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 ve *Lactobacillus paracasei* CHCC12777'yi içeren bir antimikrobiyal bileşimi, özellikle mevcut buluşa göre tercih edilmektedir.

Antimikrobiyal bileşim, tipik olarak, örneğin en az 10^5 cfu/g, örneğin en az 10^6 cfu/g, örneğin en az 10^7 cfu/g, örneğin en az 10^8 cfu/g, örneğin en az 10^9 cfu/g,

örneğin en az 10^{10} cfu/g, örneğin en az 10^{11} cfu/g gibi, bir gram bileşim başına en az 10^4 cfu dahil, bir gram bileşim başına 10^4 ila 10^{12} cfu (koloni oluşturan birim) aralığında olan canlı hücre konsantrasyonuna sahip dondurulmuş, kurutulmuş veya dondurularak kurutulmuş konsantre maddeler dahil konsantre biçimdeki bakterileri içermektedir. Dolayısıyla, mevcut buluşun antimikrobiyal bileşimi, tercihen dondurulmuş, kurutulmuş veya dondurularak kurutulmuş biçimde, örneğin Direct Vat Set (DVS) kültürü şeklinde mevcut olmaktadır. Ancak, burada kullanıldığı gibi, antimikrobiyal bileşim, aynı zamanda su veya PBS tamponu gibi bir sıvı besiyerinde dondurulmuş, kurutulmuş veya dondurularak kurutulmuş hücre konsantrelerinin süspansiyonundan sonra elde edilen bir sıvı da olabilmektedir. Mevcut buluşun antimikrobiyal bileşiminin bir süspansiyon olması durumunda, canlı hücrelerin konsantrasyonu, örneğin en az 10^5 cfu/ml, örneğin en az 10^6 cfu/ml, örneğin en az 10^7 cfu/ml, örneğin en az 10^8 cfu/ml, örneğin en az 10^9 cfu/ml, örneğin en az 10^{10} cfu/ml, örneğin en az 10^{11} cfu/ml gibi bir ml bileşim başına en az 10^4 cfu dahil bir ml bileşim başına 10^4 ila 10^{12} cfu (koloni oluşturan birim) aralığında olmaktadır.

Bileşim, ilaveten ek bileşenler olarak, maya ekstraktları, şekerler ve vitaminler, örneğin A, C, D, K vitamini veya B vitamini familyasının vitaminleri gibi besin maddeleri dahil kriyoprotektanlar ve/veya konvansiyonel katkı maddelerini ihtiva edebilmektedir. Mevcut buluşun bileşimlerine ilave edilebilen uygun kriyoprotektanlar, mannitol, sorbitol, sodyum tripolifosfat, ksilitol, gliserol, rafinoz, maltodekstrin, eritritol, treitol, trehaloz, glukoz ve früktoz gibi mikroorganizmaların soğuk toleransını geliştiren bileşenlerdir. Diğer katkı maddeleri, örneğin karbonhidratlar, aroma maddeleri, mineraller, enzimleri (örneğin peynir mayası, laktaz ve/veya fosfolipaz) içerebilmektedir.

Lactobacillus rhamnosus suşunu ve *Lactobacillus paracasei* suşunu içeren mevcut buluşun antimikrobiyal bileşimlerinde, *Lactobacillus rhamnosus* suşu ile *Lactobacillus paracasei* suşu arasındaki oran, örneğin *Lactobacillus rhamnosus* bakterilerinin sayısı veya konsantrasyonu ile *Lactobacillus paracasei* bakterilerinin

sayısı veya konsantrasyonunun oranı, tercihen 1:100 ila 100:1, tercihen 1:10 ila 10:1 olmaktadır.

5 Mevcut buluşun antimikrobiyal bileşimi, mayalarla ve küflerle kontaminasyona ve/veya mikrobiyal bozulmaya yatkın olan herhangi bir gıda, yem ve farmasötik ürünle bağlantılı olarak kullanılabilir. Bunlar, bununla sınırlı olmamak üzere, türev ürünleri, tahıl ve tahıldan türetilmiş ürünler, süt ürünleri, et, kümes hayvanları ve deniz mahsulleri dahil meyve ve sebzeleri içermektedir. Tercih edilen bir yapılandırmada, mevcut buluşun bileşimleri, yoğurt, tvarog, ekşi krema, 10 krem peynir ve benzeri gibi süt ürünlerinin hazırlanmasında bir katkı maddesi olarak kullanılmaktadır.

Mevcut buluşa göre antimikrobiyal bileşim, aynı zamanda mantarlar ve bakteriler ve bunların karışımlarından oluşan gruptan seçilen istenmeyen 15 mikroorganizmaların inhibe edilmesi için kullanılabilir. Mevcut buluşun bileşimleri, özellikle süt fermantasyon işlemlerinde olduğu gibi, süt endüstrisi işlemlerinde yaygın olarak bilinen kirletici maddeler olan mantarlar ve bakterilerin büyümesinin inhibe edilmesi ve/veya önlenmesi için kullanışlı olmaktadır.

20 Tercih edilen bir yapılandırmada, mevcut buluşun antimikrobiyal bileşimleri, mayalar ve küfler gibi mantarlara karşı kullanılmaktadır. Bu, bileşimlerin süt endüstrisi işlemlerinde, özellikle süt fermantasyon işlemlerinde kontaminasyona sebep olan mantarların büyümesinin inhibe edilmesi ve/veya önlenmesi için 25 kullanılması anlamına gelmektedir. Mevcut buluşun antimikrobiyal bileşimleri, örneğin *Klyveromyces* (örneğin, *K. marxianus*, *K. lactis*), *Pichia* (örneğin, *P. fermentans*), *Yarrowia* (örneğin, *Y. lipolytica*), *Candida* (örneğin, *C. sake*), ve benzeri cinsi mayalar gibi mayalar; veya *Penicillium* (örneğin, *P. nalgiovense*, *P. commune*, *P. crustosum*, *P. brevicompactum*, *P. glabrum*), *Mucor* spp., 30 *Cladosporium* ssp., *Aspergillus* (örneğin, *A. versicolor*), *Debaromyces* (örneğin, *D. hansenii*), ve benzeri cinsi küfler gibi küflerin büyümesinin inhibe edilmesi

ve/veya önlenmesi için kullanılabilir. Özellikle *Kluyveromyces marxianus*,
Yarrowia lipolytica, *Penicillium nalgiovense*, *Cladosporium ssp.*, *Penicillium*
commune, *Mucor ssp.*, *Penicillium brevicompactum*, *Aspergillus versicolor*,
5 *Penicillium crustosum*, *Kluyveromyces lactis*, ve/veya *Debaromyces hansenii*
türlerinin büyümesinin inhibe edilmesi ve/veya önlenmesi için mevcut buluşun
antimikrobiyal bileşimlerinin kullanılması tercih edilmektedir.

Mevcut buluşun birinci yönüne göre antimikrobiyal bileşim, aynı zamanda
patojenik mantarlarla, tercihen patojenik mayalarla olan enfeksiyonların tedavi
10 edilmesine yönelik bir farmasötik ürün olarak da kullanılabilir.

Yukarıda da bahsedildiği gibi, mevcut buluş, bir yönde, mevcut buluşun birinci
yönündeki antimikrobiyal bileşimleri içeren bir gıda, yem veya farmasötik ürüne
yöneliktir.

15 Tercih edilen bir yapılandırmada, bu tür bir gıda ürünü, meyve ve meyvelerden
türetilen ürünler, sebze ve sebzeden türetilen ürünler, tahıl ve tahıldan türetilen
ürünler, süt ürünleri, et, kümes hayvanları ve deniz mahsulleri ve bunların
karışımlarından oluşan gruptan seçilmektedir.

20 Daha tercih edilen bir yapılandırmada, gıda ürünü, bir süt ürünü, tercihen taze
peynir, yoğurt, ekşi krema veya tvarog gibi mezofilik veya termofilik fermente süt
ürünü olmaktadır.

25 Diğer tercih edilen yapılandırmada, gıda ürünü et veya kümes hayvanları
olmaktadır.

Tercih edilen bir yapılandırmada, farmasötik ürün, mevcut buluşun birinci yönüne
göre antimikrobiyal bileşimin patojenik mikroorganizmaları inhibe etmek
30 amacıyla bir insana veya bir hayvana uygulanması ve patojenik
mikroorganizmalarla ilgili semptomların yatıştırılması için kullanışlı olan bir

üründür. Bu tür semptom örnekleri, maya enfeksiyonuyla ilgili semptomları içermektedir. Bu tür bir yapılandırmada, farmasötik ürün, antimikrobiyal bileşimi içeren bir birim dozaj biçimi olabilmektedir. Tercihen, birim dozaj biçimi, bir kapsül veya bir tablet olmaktadır. Ancak, birim dozaj biçimi, aynı zamanda mukozaya veya cilde uygulanmak için de uygun olabilmekte ve dolayısıyla macun, krem, merhem ve benzeri biçimde olabilmektedir.

Mevcut buluşun diğer yönü, gıda, yem veya farmasötik ürün imalatı sırasında mevcut buluşun beşinci yönüne göre antimikrobiyal bileşimin ilave edilmesini içeren, mevcut buluşun beşinci yönüne göre bir gıda, yem veya farmasötik ürünün imal edilmesine ilişkin bir yöntemle ilgilidir.

Tercih edilen bir yapılandırmada, en az bir *Lactobacillus rhamnosus* veya *Lactobacillus paracasei* suşunun konsantrasyonu, 1×10^6 cfu/g, tercihen en az 5×10^5 cfu/g, en çok tercihen en az 1×10^8 cfu/g, veya en az 1×10^6 cfu/ml, tercihen en az 5×10^6 cfu/ml, en çok tercihen en az 1×10^8 cfu/ml, gıda, yem veya farmasötik ürün, veya gıda, yem veya farmasötik ürünün yüzeyinin 1×10^5 cfu/cm², tercihen en az 1×10^5 cfu/cm², en çok tercihen en az 1×10^7 cfu/cm²'si olmaktadır.

Gıda, yem veya farmasötik ürünün en az bir *Lactobacillus rhamnosus* suşunu ve en az bir *Lactobacillus paracasei* suşunu içeren bir bileşimin ilave edilmesi vasıtasıyla imal edildiği durumda, en az bir *Lactobacillus rhamnosus* suşu ve en az bir *Lactobacillus paracasei* suşu konsantrasyonunun her biri en az 1×10^6 cfu/g veya her biri en az 1×10^6 cfu/ml gıda, yem veya farmasötik ürün veya her biri gıda, yem veya farmasötik ürünün yüzeyinin en az 1×10^5 cfu/cm²'si olmaktadır. Tercihen, en az bir *Lactobacillus rhamnosus* suşu ve en az bir *Lactobacillus paracasei* suşu konsantrasyonunun her biri en az 5×10^6 cfu/g veya her biri en az 5×10^6 cfu/ml gıda, yem veya farmasötik ürün, veya her biri gıda, yem veya farmasötik ürünün yüzeyinin en az 5×10^5 cfu/cm²'si olmaktadır. İlave bir yapılandırmada, en az bir *Lactobacillus rhamnosus* suşu ve en az bir *Lactobacillus paracasei* suşu konsantrasyonunun her biri en az 1×10^8 cfu/g veya her biri en az 1×10^6 cfu/ml

24946.35

gıda, yem veya farmasötik ürün, veya her biri, gıda, yem veya farmasötik ürünün yüzeyinin 1×10^7 cfu/cm²'si olmaktadır.

5 Tercih edilen yapılandırmada, imalat parametreleri, imalat sırasında kontrol edilmekte, bu şekilde, en az bir *Lactobacillus rhamnosus* suşu ve en az bir *Lactobacillus paracasei* suşu konsantrasyonu, artmakta veya sabit kalmaktadır.

10 Mevcut buluşa göre bir antimikrobiyal bileşim, halihazırda en çok harmanlanabilir gıda, yem veya farmasötik ürünle karıştırılarak ve/veya bu ürünlerin üzerine uygulanarak kullanılmakta, ancak aynı zamanda katı gıda ürünlerinin yüzeyinin veya örneğin enjeksiyon vasıtasıyla bu tür ürünlerin içinin işlenmesi de etkili olmaktadır. Yine diğer yapılandırmalarda, bileşim, zeytinyağlı salamura, pane, baharat ile ovma, jöle ile kaplama, renklendirici karışım ve benzeri şekilde de uygulanabilmekte ve buradaki kilit kriter, antimikrobiyal bileşimin mayalarla ve 15 küflerle kontaminasyona ve bakteriyel bozulmaya maruz kalan yüzeyde sağlanmasıdır. Yine diğer yapılandırmalarda, bileşim, bileşimin gıda ambalajına uygulanması ve sonrasında ambalajın gıda yüzeyine uygulanması vasıtasıyla gıda yüzeyiyle dolaylı olarak temas halinde yerleştirilebilmektedir. Kullanılacak optimum miktar, işlenecek belirli bir gıda ürününün bileşimine ve bileşimin gıda yüzeyine 20 uygulanmak için kullanılan yöntemle bağımlı olmakla birlikte basit bir deney vasıtasıyla da belirlenebilmektedir.

Bu tür tercih edilen yapılandırmada, yöntem, bir veya daha fazla fermantasyon adımı içermekte ve antimikrobiyal bileşim, bu tür bir veya daha fazla 25 fermantasyon adımından önce veya sonra veya bu adım sırasında gıda, yem veya farmasötik ürüne ilave edilebilmektedir

Hatta daha da tercih edilen bir yapılandırmada, yöntem, bir süt substratının *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc*'tan seçilen cinsin en az 30 bir suşunu örneğin en az bir *Lactobacillus bulgaricus* suşu ve en az bir *Streptococcus thermophilus* suşu veya örneğin en az bir *Lactococcus lactis* suşunun alt türü *lactis*

suşu, en az bir *Leuconostoc mesenteroides* suşunun alt türü *cremoris* suşu ve en az bir *Lactococcus lactis* suşunun alt türü *diacetylactis* suşunu içeren bir başlatıcı kültürle fermente edilmesini içermektedir.

- 5 Mevcut buluşun son yönleri, DSM24616 erişim numarası kapsamında Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu'na (DSMZ) tevdi edilen *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697, DSM24652 erişim numarası kapsamında Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu'na (DSMZ) tevdi edilen *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 ve DSM24651 erişim numarası
- 10 kapsamında Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu'na (DSMZ) tevdi edilen *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 ile ilgilidir.

ÖRNEKLER

- 15 **Örnek 1:** *Lb. paracasei* CHCC12777 ve *Lb. rhamnosus* CHCC12697 suşlarının farklı maya ve küf kirletici maddelerine karşı tek başına veya kombinasyon halindeki inhibe edici etkisinin yarı kantitatif olarak belirlenmesi.

20 *Lb. paracasei* CHCC12777 ve *Lb. rhamnosus* CHCC12697 suşlarının tek başına ve kombinasyon halindeki inhibe edici etkisinin yarı kantitatif olarak incelenmesine yönelik, taze peynir ürününün imalat işlemine benzeyen bir agar-testi kullanılmıştır:

25 Tam yağlı (ağırlık/hacim cinsinden %3.5) homojenize süt, 20 saniye boyunca $79\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de ısı ile işlenmiş ve hemen soğutulmuştur. Bir ticari başlatıcı kültür (FDVS CHN-19, Chr. Hansen A/S şirketinden elde edilebilir, Danimarka), 0.1 u/L'de aşılınmış, ve aşılınmış süt, 220 ml'lik şişelerin içine dağıtılmıştır. Farklı şişelere 5×10^6 CFU/ml'lik toplam konsantrasyonlarda *Lb. paracasei* CHCC12777 ve/veya *Lb. rhamnosus* CHCC12697 aşılınmış ve bir şişe, referans olarak kullanılmış ve

30 yalnızca başlatıcı kültür aşılınmıştır. İlaveten, %5 oranında bromkresol moru ve bromkresol mavisi pH göstergesi, asidifikasyon göstergesi almak ve hedef

mayaların ve küflerin büyümesinin daha kolay bir şekilde tespit edilmesini sağlayacak mavi/yeşil besiyeri rengi elde etmek amacıyla ilave edilmiştir. Şişelerin tamamı $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de su banyosunda inkübe edilmiş ve 4.60 ± 0.1 pH değeri elde edilene dek bu koşullarda fermente edilmiştir. Fermantasyondan sonra, 5 şişeler buzda hemen soğutulmuş ve pıhtıları çözmek için hızlı bir şekilde çalkalanmıştır. Daha sonra fermente süt, 40°C 'lik bir sıcaklıkta ısıtılmış ve eritilmiş ve 60°C 'ye soğutulmuş olan 40 ml %5 steril agar solüsyonuna ilave edilmiştir. Bu fermente süt ve agar solüsyonu, daha sonra steril Petri kaplarına dökülmüş ve plakalar, 30 dakika boyunca LAF kabinde kurutulmuştur.

10

Seçilen mayalar ve küfler, sırasıyla *Klyveromyces marxianus*, *Pichia fermentans*, *Yarrowia lipolytica* ve *Candida sake* mayalarına ilişkin olarak 10^4 , 10^3 ve 10^2 CFU/nokta'lık konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Tam olarak büyümüş spor süspansiyonları, sırasıyla *Penicillium nalgiovense*, *Mucor ssp.*, *Penicillium commune* ve *Cladosporium ssp.*, küfleri için 1000, 100, 10 kat seyreltilmiş veya seyreltilmeden kullanılmıştır. Plakalar, $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiş ve mayaların ve küflerin büyümesi bakımından düzenli olarak incelenmiştir.

Agar testinin sonuçları, test edilen mayaların ve küflerin tamamının yalnızca 20 başlatıcı kültürle (referans) fermente edilen süttten yapılan agar plakalarında iyi büyüdüğünü gösteren Şekil 1'de sunulmaktadır. Ancak, süt fermantasyonu sırasında *Lb. paracasei* CHCC12777 veya *Lb. rhamnosus* CHCC12697'nin mevcut olması durumunda, ortaya çıkan plakalar, konsantrasyonların tamamına ilave edilen *K. marxianus* ve *Y. lipolytica*'nın büyümesini önlemiştir. İlâveten, süt 25 fermantasyonu sırasında *Lb. paracasei* CHCC12777 veya *Lb. rhamnosus* CHCC12697 suşlarının mevcut olması durumunda, plakalara tevdi edilen küflerin tamamına ilişkin çarpıcı bir inhibisyon gözlemlenmiştir. Yine, *Lb. paracasei* CHCC12777 ve *Lb. rhamnosus* CHCC12697 suşlarının tek suşlar olarak ilave edilmesi durumunda, bu suşların *P. fermentans* veya *C. sake* suşları üzerinde 30 herhangi bir inhibe edici etkiye sebep olduğu görünmektedir. Ancak, *Lb. paracasei* CHCC12777 ve *Lb. rhamnosus* CHCC12697 suşlarının her ikisinin de süt

fermantasyonu sırasında mevcut olması durumunda, *P. fermentas* büyüme inhibisyonu, 10^2 ve 10^3 CFU/nokta'lık düşük konsantrasyonlarda tespit edilmesi durumunda gözlemlenmiş ve *Cladospodium* ssp. ve aynı zamanda *Mucor* ssp. küfleri, *Lb. paracasei* CHCC12777 veya *Lb. rhamnosus* CHCC12697 suşlarının tek başına ilave edilmesine kıyasla daha fazla inhibe edilmiştir. Bu sonuçlar, *Lb. paracasei* CHCC12777 ve *Lb. rhamnosus* CHCC12697 suşlarının bazı sinerjik antifungal etkisini göstermektedir.

Örnek 2: *Lb. paracasei* CHCC12777 ve *Lb. rhamnosus* CHCC12697 suşlarının *Yarrowia lipolytica* maya suşuna karşı tek başına veya kombinasyon halindeki inhibe edici etkisinin kantitatif olarak belirlenmesi.

Lb. paracasei CHCC12777 ve *Lb. rhamnosus* CHCC12697 suşlarının tek başına ve kombinasyon halindeki inhibe edici etkisinin kantitatif olarak incelenmesine yönelik, taze peynir ürününün imalat işlemine benzeyen bir test kullanılmıştır:

Tam yağlı (ağırlık(hacim cinsinden %3.5) homojenize süt, 20 saniye boyunca $79\pm 1^\circ\text{C}$ 'de ısı ile işlenmiş ve hemen soğutulmuştur. Bir ticari başlatıcı kültür (F-DVS CHN-19, Chr. Hansen A/S şirketinden elde edilebilir, Danimarka), 0.1 u/L'de aşılınmış, ve aşılınmış süt, 1 L'lik şişelerin içine dağıtılmıştır. Farklı şişelere 5×10^6 CFU/ml'lik toplam konsantrasyonlarda *Lb. paracasei* CHCC12777 ve/veya *Lb. rhamnosus* CHCC12697 aşılınmış ve bir şişe, referans olarak kullanılmış ve yalnızca başlatıcı kültür aşılınmıştır. İlâveten, 2 şişeye, CHN-19 başlatıcı kültürle birlikte HOLDBAC™ YM-B (50DCU/100L; Danisco A/S, Danimarka) veya HOLDBAC™ YM-C (20 DCU/100L; Danisco A/S, Danimarka) aşılınmıştır. Şişelerin tamamı $29\pm 1^\circ\text{C}$ 'de su banyosunda inkübe edilmiş ve 4.65 ± 0.05 pH değeri elde edilene dek bu koşullarda fermente edilmiştir. Fermantasyondan sonra, şişeler buzda hemen soğutulmuş ve pıhtıları çözmek için hızlı bir şekilde çalkalanmıştır.

30

Her bir şişenin içeriği, taze peynir ürününden bir kirletici madde olarak daha

önceden izole edilen bir *Yarrowia lipolytica* maya suşunun aşılınması için daha küçük plastik bardaklara dağıtılmıştır. İki ayrı bardağa yaklaşık 1×10^2 CFU/g'lik fermente süt ürünüde nihai *Y. lipolytica* kontaminasyonu elde etmek amacıyla hacim/ağırlık cinsinden %1 hacim aşılınmıştır. Plastik bardakların sızdırmazlığı sağlanmış ve $8 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de depolanmıştır. Fermente süt numunelerinden Maya Glukoz Kloramfenikol (YGC) agar üstünde salin peptonda yapılan uygun 10 kat dilüsyonların kaplanması ve sonrasında 5 gün boyunca 25°C 'de aerobik inkübasyon işlemi yapılması vasıtasıyla *Y. lipolytica* kontaminasyonu için düzenli olarak numune alınmıştır. İlâveten, çeşitli fermente süt numunelerinin pH değeri, depolama süresi boyunca düzenli olarak ölçülmüştür.

Şekil 2'de gösterildiği gibi, *Y. lipolytica* büyümesi, fermantasyondan önce başlatıcı kültür CHN-19 ile birlikte tek suş olarak kullanıldığında, *Lb. paracasei* CHCC12777 ve *Lb. rhamnosus* CHCC12697 suşlarının her ikisinin mevcudiyetinde inhibe edilmiştir. Her iki suş, HOLDBAC™ YM-B ve HOLDBAC™ YM-C'ye kıyasla çarpıcı bir şekilde daha yüksek inhibisyona sebep olmuştur. İlâveten, bir sinerjik engelleyici etki, her bir suşun tek başına kullanılırken oluşturduğu inhibe edici etkiye kıyasla, *Lb. paracasei* CHCC12777 ve *Lb. rhamnosus* CHCC12697 suşlarının kombinasyon halinde kullanılması durumunda bulunmuştur. Kombinasyon halinde kullanıldığında, *Lb. paracasei* CHCC12777 ve *Lb. rhamnosus* CHCC12697 suşları, fermente süt ürünüde *Y. lipolytica* maya suşuna ilişkin elde edilen maksimum hücre sayımını ve aynı zamanda gecikme fazını dramatik ölçüde etkilemiş ve bu sinerjik etki, bu tip ürünlerin raf ömrünün uzatılmasına katkı sağlayabilmektedir.

25

Örnek 3: *Lb. paracasei* CHCC12777 ve *Lb. rhamnosus* CHCC14226 suşlarının farklı maya ve küf kirletici maddelerine karşı tek başına veya kombinasyon halindeki inhibe edici etkisinin yarı kantitatif olarak belirlenmesi.

Lb. paracasei CHCC12777 ve *Lb. rhamnosus* CHCC14226 suşlarının tek başına ve kombinasyon halindeki inhibe edici etkisinin yarı kantitatif olarak

incelenmesine yönelik, taze peynir ürününün imalat işlemine benzeyen bir agar-testi kullanılmıştır:

Tam yağlı (ağırlık/hacim cinsinden %3.5) homojenize süt, 20 saniye boyunca
 5 79±1°C'de ısı ile işlenmiş ve hemen soğutulmuştur. Bir ticari başlatıcı kültür (F-DVS CHN-19), 0.1 u/L'de aşılınmış, ve aşılınmış süt, 220 ml'lik şişelerin içine dağıtılmıştır. Farklı şişelere 5x10⁶ CFU/ml'lik toplam konsantrasyonlarda *Lb. paracasei* CHCC12777 ve/veya *Lb. rhamnosus* CHCC14226 aşılınmış ve bir şişe, referans olarak kullanılmış ve yalnızca başlatıcı kültür aşılınmıştır. İlâveten, %5
 10 oranında bromkresol moru ve bromkresol mavisi pH göstergesi, asidifikasyon göstergesi almak ve hedef mayaların ve küflerin büyümesinin daha kolay bir şekilde tespit edilmesini sağlayacak mavi/yeşil besiyeri rengi elde etmek amacıyla ilave edilmiştir. Şişelerin tamamı 29±1°C'de su banyosunda inkübe edilmiş ve 4.60±0.1 pH değeri elde edilene dek bu koşullarda fermente edilmiştir.
 15 Fermantasyondan sonra, şişeler buzda hemen soğutulmuş ve pıhtıları çözmek için hızlı bir şekilde çalkalanmıştır. Daha sonra fermente süt, 40°C'lik bir sıcaklıkta ısıtılmış ve eritilmiş ve 60°C'ye soğutulmuş olan 40 ml %5 steril agar solüsyonuna ilave edilmiştir. Bu fermente süt ve agar solüsyonu, daha sonra steril Petri kaplarına dökülmüş ve plakalar, 30 dakika boyunca LAF kabinde kurutulmuştur.

20 Seçilen mayalar ve küfler, sırasıyla *Klyveromyces marxianus*, *Pichia fermentans*, *Yarrowia lipolytica* ve *Candida sake* mayalarına ilişkin olarak 10⁴, 10³ ve 10² CFU/nokta'lık konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Tam olarak büyümüş spor süspansiyonları, sırasıyla *Penicillium nalgiovense*, *Mucor ssp.*, *Penicillium commune* ve *Cladospodium ssp.*, küfleri için 1000, 100, 10 kat seyreltilmiş veya
 25 seyreltilmeden kullanılmıştır. Plakalar, 7±1°C'de inkübe edilmiş ve mayaların ve küflerin büyümesi bakımından düzenli olarak incelenmiştir.

30 Agar testinin sonuçları, test edilen mayaların ve küflerin tamamının yalnızca başlatıcı kültürle (referans) fermente edilen süttten yapılan agar plakalarında iyi büyüdüğünü gösteren Şekil 3'te sunulmaktadır. Ancak, süt fermantasyonu

sırasında *Lb. paracasei* CHCC12777'nin mevcut olması durumunda, ortaya çıkan plakalar, konsantrasyonların tamamına ilave edilen *K. marxianus* ve *Y. lipolytica*'nın büyümesini önlemiştir. Aynı zamanda *Lb. rhamnosus* CHCC14226 suşuna ilişkin olarak, ortaya çıkan plakalar, yine ilave edilen konsantrasyonların tamamında *K. marxianus* büyümesini ve aynı zamanda ilave edilen iki en düşük *Y. lipolytica* konsantrasyonunun büyümesini önlemiştir. *Lb. paracasei* CHCC12777 veya *Lb. rhamnosus* CHCC14226 suşlarının tek suş şeklinde ilave edilmesi durumunda, bunlar yine ilave edilen daha düşük *P. fermentans* konsantrasyonlarında hafif engelleyici etkiye sebep olduğu görülmektedir. Ancak, süt fermantasyonu sırasında hem *Lb. paracasei* CHCC12777 hem de *Lb. rhamnosus* CHCC14226 suşunun mevcut olması durumunda, *P. fermentans* büyümesi, 10^2 CFU/nokta'lık en düşük konsantrasyonlarda ilave edildiğinde önlenmiştir. Küflere ilişkin olarak, süt fermantasyonu sırasında *Lb. paracasei* CHCC12777 veya *Lb. rhamno-sus* CHCC14226 suşunun mevcut olması durumunda çarpıcı bir inhibisyon gözlemlenmiştir. *Lb. paracasei* CHCC12777 ve *Lb. rhamnosus* CHCC14226 kombinasyonunun kullanılması durumunda, *Cladospodium* ssp. büyümesi, *Lb. paracasei* CHCC12777 veya *Lb. rhamnosus* CHCC14226 suşlarının tek başına ilave edilmesine kıyasla daha fazla inhibe edilmiştir. Bu sonuçlar, *Lb. paracasei* CHCC12777 ve *Lb. rhamnosus* CHCC14226 suşlarının bazı sinerjik antifungal etkisini göstermektedir.

Örnek 4: *Lb. paracasei* CHCC12777 ve *Lb. rhamnosus* CHCC14226 suşlarının *Klyveromyces marxianus* maya suşuna karşı tek başına veya kombinasyon halindeki inhibe edici etkisinin kantitatif olarak belirlenmesi.

Lb. paracasei CHCC12777 ve *Lb. rhamnosus* CHCC14226 suşlarının tek başına ve kombinasyon halindeki inhibe edici etkisinin yarı kantitatif olarak incelenmesine yönelik, taze peynir ürününün imalat işlemine benzeyen bir test kullanılmıştır:

Tam yağlı (ağırlık/hacim cinsinden %3,5) homojenize süt, 20 saniye boyunca

79±1°C'de ısı ile işlenmiş ve hemen soğutulmuştur. Bir ticari başlatıcı kültür (F-DVS CHN-19), 0.1 u/L'de aşılansmış, ve aşılansmış süt, 1 L'lik şişelerin içine dağıtılmıştır. Farklı şişelere 5x10⁶ CFU/ml'lik toplam konsantrasyonlarda *Lb. paracasei* CHCC12777 ve/veya *Lb. rhamnosus* CHCC14226 aşılansmış ve bir şişe, referans olarak kullanılmış ve yalnızca başlatıcı kültür aşılansmıştır. İlâveten, 2 şişeye, CHN-19 başlatıcı kültürle birlikte HOLDBAC™ YM-B (50DCU/100L) veya HOLDBAC™ YM-C (20 DCU/100L) aşılansmıştır. Şişelerin tamamı 29±1°C'de su banyosunda inkübe edilmiş ve 4.65±0.05 pH değeri elde edilene dek bu koşullarda fermente edilmiştir. Fermantasyondan sonra, şişeler buzda hemen soğutulmuş ve pıhtıları çözmek için hızlı bir şekilde çalkalanmıştır.

Her bir şişenin içeriği, taze peynir ürününden bir kirletici madde olarak daha önceden izole edilen bir *Klyveromyces marxianus* maya suşunun aşılansması için daha küçük plastik bardaklara dağıtılmıştır. İki ayrı bardağa yaklaşık 1x10² CFU/g'lik fermente süt ürününde nihai *K. marxianus* kontaminasyonu elde etmek amacıyla %1 (ağırlık/hacim cinsinden) hacim aşılansmıştır. Plastik bardakların sızdırmazlığı sağlanmış ve 8±1°C'de depolanmıştır. Fermente süt numunelerinden Maya Glukoz Kloramfenikol (YGC) agar üstünde salin peptonda yapılan uygun 10 kat dilüsyonların kaplanması ve sonrasında 3 ila 5 gün boyunca 25°C'de aerobik inkübasyon işlemi yapılması vasıtasıyla *K. marxianus* kontaminasyonu için düzenli olarak numune alınmıştır. İlâveten, çeşitli fermente süt numunelerinin pH değeri, depolama süresi boyunca düzenli olarak ölçülmüştür.

Şekil 4'te gösterildiği gibi, *K. marxianus* büyümesi, fermantasyondan önce başlatıcı kültür CHN-19 ile birlikte tek suş olarak kullanıldığında, *Lb. paracasei* CHCC12777 ve *Lb. rhamnosus* CHCC14226 suşlarının her ikisinin mevcudiyetinde inhibe edilmiştir. Örnek 2'de görüldüğü gibi, *Lb. paracasei* CHCC12777, aynı zamanda HOLDBAC™ YM-B ve HOLDBAC™ YM-C kültürlerine kıyasla çarpıcı bir şekilde daha yüksek *K. Marxianus* inhibisyonuna sebep olurken *Lb. rhamnosus* CHCC14226 suşunun sebep olduğu inhibisyonun HOLDBAC™ kültürleriyle aynı seviyede olduğu keşfedilmiştir. Bir sinerjik

engelleyci etki, her bir suşun tek başına kullanılırken oluşturduğu inhibe edici etkiye kıyasla, *Lb. paracasei* CHCC12777 ve *Lb. rhamnosus* CHCC14226 suşlarının kombinasyon halinde kullanılması durumunda bulunmuştur. Kombinasyon halinde kullanıldığında, *Lb. paracasei* CHCC12777 ve *Lb.*
 5 *rhamnosus* CHCC14226 suşları, fermente süt ürününde *K. marxianus* maya suşunun daha yavaş büyümesine yol açmış ve böylelikle, bu tip ürünlerin raf ömrünün uzatılmasına katkı sağlayabilmektedir.

Örnek 5: *Lb. paracasei* CHCC14676 ve *Lb. rhamnosus* CHCC5366 suşlarının farklı küf kirletici maddelerine karşı tek başına veya kombinasyon halindeki
 10 inhibe edici etkisinin yarı kantitatif olarak belirlenmesi.

Lb. paracasei CHCC14676 ve *Lb. rhamnosus* CHCC5366 suşlarının tek başına ve kombinasyon halindeki inhibe edici etkisinin yarı kantitatif olarak incelenmesine
 15 yönelik, yoğurt ürününün imalat işlemine benzeyen bir agar-testi kullanılmıştır:

Homojenize süt (ağırlık/hacim cinsinden %1,5 yağ), beş dakika boyunca 95°C'de ısı ile işlenmiş ve hemen soğutulmuştur. Bir ticari başlatıcı kültür (F-DVS YC-350, Chr. Hansen A/S şirketinden elde edilebilir, Danimarka), %0,02'de aşılınmış,
 20 ve süt, 220 ml'lik şişelerin içine dağıtılmıştır. Şişelere ilaveten 1×10^7 CFU/ml'lik toplam konsantrasyonlarda sırasıyla *Lb. paracasei* CHCC14676, *Lb. rhamnosus* CHCC5366 ve iki suşun kombinasyonu aşılınmıştır. Başlatıcı kültürden daha fazla aşılama yapılmayan bir şişe, referans olarak kullanılmıştır. İlaveten, %5 oranında bromkresol moru ve bromkresol mavisi pH göstergesi, asidifikasyon
 25 göstergesi almak ve hedef mayaların ve küflerin büyümesinin daha kolay bir şekilde tespit edilmesini sağlayacak mavi/yeşil besiyeri rengi elde etmek amacıyla ilave edilmiştir. Şişelerin tamamı $43 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de su banyosunda inkübe edilmiş ve 4.60 ± 0.1 pH değeri elde edilene dek bu koşullarda fermente edilmiştir. Fermantasyondan sonra, şişeler buzda hemen soğutulmuş ve pıhtıları çözmek için
 30 hızlı bir şekilde çalkalanmıştır. Daha sonra fermente süt, 40°C 'lik bir sıcaklıkta ısıtılmış ve eritilmiş ve 60°C 'ye soğutulmuş olan 40 ml %5 steril agar solüsyonuna

ilave edilmiştir. Bu solüsyon, daha sonra steril Petri kaplarına dökülmüş ve plakalar, 30 dakika boyunca LAF kabinde kurutulmuştur.

5 Seçilen *Penicillium nalgiovese* (10x), *Penicillium commune* (100x), *Aspergillus versicolor* (100x) ve *Penicillium crustosum* (100x) küflerinin uygun dilüsyonlarındaki tam büyümüş spor süspansiyonları, plakalar üstünde tespit edilmiştir. Plakalar, 7°C'de inkübe edilmiş ve küflerin büyümesine ilişkin olarak uygun, düzenli aralıklarda incelenmiştir.

10 Agar testinin sonuçları, test edilen mayaların ve küflerin tamamının yalnızca başlatıcı kültürle (referans) fermente edilen süttten yapılan agar plakalarında iyi büyüdüğünü gösteren Şekil 5'te sunulmaktadır. Ancak, süt fermantasyonu sırasında *Lb. paracasei* CHCC14676 veya *Lb. rhamnosus* CHCC5366'nın mevcut olması durumunda, ortaya çıkan plakalar, küflerin tamamının büyümesini önlemiştir. İlâveten, süt fermantasyonu sırasında *Lb. paracasei* CHCC14676 veya *Lb. rhamnosus* CHCC5366 suşlarının mevcut olması durumunda, plakalarda tespit edilen *Penicillium commune*, *Aspergillus versicolor* ve *Penicillium crustosum* küflerinin tamamına ilişkin çarpıcı bir inhibisyon gözlemlenmiştir.

20 **Örnek 6:** *Lb. paracasei* CHCC14676 ve *Lb. rhamnosus* CHCC14226 suşlarının farklı küf kirletici maddelerine karşı tek başına veya kombinasyon halindeki inhibe edici etkisinin yarı kantitatif olarak belirlenmesi.

25 *Lb. paracasei* CHCC14676 ve *Lb. rhamnosus* CHCC14226 suşlarının tek başına ve kombinasyon halindeki inhibe edici etkisinin yarı kantitatif olarak incelenmesine yönelik, yoğurt ürününün imalat işlemine benzeyen bir agar-testi kullanılmıştır:

30 Homojenize süt (ağırlık/hacim cinsinden %1.5 yağ), beş dakika boyunca 95°C'de ısı ile işlenmiş ve hemen soğutulmuştur. Bir ticari başlatıcı kültür (F-DVS Yoflex® Mild, Chr. Hansen A/S şirketinden elde edilebilir, Danimarka), %0.02'de

- aşlanmış, ve süt, 220 ml'lik şişelerin içine dağıtılmıştır. Şişelere ilaveten 1×10^7 CFU/ml'lik toplam konsantrasyonlarda sırasıyla *Lb. paracasei* CHCC14676, *Lb. rhamnosus* CHCC14226 ve iki suşun kombinasyonu aşlanmıştır. Başlatıcı kültürden daha fazla aşılama yapılmayan bir şişe, referans olarak kullanılmıştır.
- 5 İlaveten, %5 oranında bromkresol moru ve bromkresol mavisi pH göstergesi, asidifikasyon göstergesi almak ve hedef mayaların ve küflerin büyümesinin daha kolay bir şekilde tespit edilmesini sağlayacak mavi/yeşil besiyeri rengi elde etmek amacıyla ilave edilmiştir. Şişelerin tamamı $43 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de su banyosunda inkübe edilmiş ve 4.60 ± 0.1 pH değeri elde edilene dek bu koşullarda fermente edilmiştir.
- 10 Fermantasyondan sonra, şişeler buzda hemen soğutulmuş ve pıhtıları çözmek için hızlı bir şekilde çalkalanmıştır. Daha sonra fermente süt, 40°C 'lik bir sıcaklıkta ısıtılmış ve eritilmiş ve 60°C 'ye soğutulmuş olan 40 ml %5 steril agar solüsyonuna ilave edilmiştir. Bu solüsyon, daha sonra steril Petri kaplarına dökülmüş ve plakalar, 30 dakika boyunca LAF kabinde kurutulmuştur.
- 15 Seçilen *Penicillium nalgiovese* (10x), *Penicillium commune* (100x), *Aspergillus versicolor* (100x) ve *Penicillium crustosum* (100x) küflerinin uygun dilüsyonlarındaki tam büyümüş spor süspansiyonları, plakalar üstünde tespit edilmiştir. Plakalar, 7°C 'de inkübe edilmiş ve küflerin büyümesine ilişkin olarak
- 20 uygun, düzenli aralıklarda incelenmiştir.
- Agar testinin sonuçları, test edilen mayaların ve küflerin tamamının yalnızca başlatıcı kültürle (referans) fermente edilen süttten yapılan agar plakalarında iyi büyüdüğünü gösteren Şekil 6'da sunulmaktadır. Ancak, süt fermantasyonu
- 25 sırasında *Lb. paracasei* CHCC14676 veya *Lb. rhamnosus* CHCC14226'nın mevcut olması durumunda, ortaya çıkan plakalar, küflerin tamamının büyümesini önlemiştir. İlaveten, süt fermantasyonu sırasında *Lb. paracasei* CHCC14676 veya *Lb. rhamnosus* CHCC14226 suşlarının mevcut olması durumunda, plakalarda tespit edilen *Penicillium commune*, *Aspergillus versicolor* ve *Penicillium crustosum*
- 30 küflerinin tamamına ilişkin çarpıcı bir inhibisyon gözlemlenmiştir.

Örnek 7: *Lb. paracasei* CHCC12777 ve *Lb. rhamnosus* CHCC14226 suşlarının farklı küf kirletici maddelerine karşı tek başına veya kombinasyon halindeki inhibe edici etkisinin yarı kantitatif olarak belirlenmesi.

- 5 *Lb. paracasei* CHCC12777 ve *Lb. rhamnosus* CHCC14226 suşlarının tek başına ve kombinasyon halindeki inhibe edici etkisinin yarı kantitatif olarak incelenmesine yönelik, yoğurt ürününün imalat işlemine benzeyen bir agar-testi kullanılmıştır:
- 10 Homojenize süt (ağırlık/hacim cinsinden %1.5 yağ), beş dakika boyunca 95°C’de ısı ile işlenmiş ve hemen soğutulmuştur. Bir ticari başlatıcı kültür (F-DVS YC-350, Chr. Hansen A/S şirketinden elde edilebilir, Danimarka), %0.02’de aşılınmış, ve süt, 220 ml’lik şişelerin içine dağıtılmıştır. Şişelere ilaveten 1×10^7 CFU/ml’lik toplam konsantrasyonlarda sırasıyla *Lb. paracasei* CHCC12777, *Lb. rhamnosus*
- 15 CHCC14226 ve iki suşun kombinasyonu aşılınmıştır. Başlatıcı kültürden daha fazla aşılama yapılmayan bir şişe, referans olarak kullanılmıştır. İlaveten, %5 oranında bromkresol moru ve bromkresol mavisi pH göstergesi, asidifikasyon göstergesi almak ve hedef mayaların ve küflerin büyümesinin daha kolay bir şekilde tespit edilmesini sağlayacak mavi/yeşil besiyeri rengi elde etmek amacıyla
- 20 ilave edilmiştir. Şişelerin tamamı $43 \pm 1^\circ\text{C}$ ’de su banyosunda inkübe edilmiş ve 4.60 ± 0.1 pH değeri elde edilene dek bu koşullarda fermente edilmiştir. Fermantasyondan sonra, şişeler buzda hemen soğutulmuş ve pıhtıları çözmek için hızlı bir şekilde çalkalanmıştır. Daha sonra fermente süt, 40°C ’lik bir sıcaklıkta ısıtılmış ve eritilmiş ve 60°C ’ye soğutulmuş olan 40 ml %5 steril agar solüsyonuna
- 25 ilave edilmiştir. Bu solüsyon, daha sonra steril Petri kaplarına dökülmüş ve plakalar, 30 dakika boyunca LAF kabinde kurutulmuştur.

Seçilen *Penicillium nalgiovese* (10x), *Penicillium commune* (100x), *Aspergillus versicolor* (100x) ve *Penicillium crustosum* (100x) küflerinin uygun

30 dilüsyonlarındaki tam büyümüş spor süspansiyonları, plakalar üstünde tespit edilmiştir. Plakalar, 7°C ’de inkübe edilmiş ve küflerin büyümesine ilişkin olarak

uygun, düzenli aralıklarda incelenmiştir.

Agar testinin sonuçları, test edilen mayaların ve küflerin tamamının yalnızca başlatıcı kültürle (referans) fermente edilen süttten yapılan agar plakalarında iyi büyüdüğünü gösteren Şekil 7’de sunulmaktadır. Ancak, süt fermantasyonu sırasında *Lb. paracasei* CHCC12777 veya *Lb. rhamnosus* CHCC14226’nın mevcut olması durumunda, ortaya çıkan plakalar, küflerin tamamının büyümesini önlemiştir. İlâveten, süt fermantasyonu sırasında *Lb. paracasei* CHCC12777 veya *Lb. rhamnosus* CHCC14226 suşlarının mevcut olması durumunda, plakalarda tespit edilen küflerin tamamına ilişkin çarpıcı bir inhibisyon gözlemlenmiştir.

10

Örnek 8: Ekşi kremada *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 ile yapılan yükleme çalışması.

Lactobacillus paracasei suşu CHCC12777’nin tek suş olarak *P. commune*, *A. versicolor*, *P. brevicompactum*, *P. crustosum* ve *P. glabrum* gibi farklı küfler üzerindeki inhibe edici etkisinin görsel olarak incelenmesi için ekşi krema hazırlanmıştır:

Pastörize çok yağlı süte %0.01’de heterofermentatif ticari başlatıcı kültür (F-DVS DSG-2000, Chr. Hansen A/S şirketinden elde edilebilir, Danimarka) aşılanmıştır. Süte ilâveten HOLD-BAC™ YM-B (10DCU/100L) veya *Lactobacillus rhamnosus* suşu CHCC12777 (5×10^6 CFU/g) aşılanmış ve bir parti, referans olarak kullanılmış ve yalnızca başlatıcı kültür aşılanmıştır.

Süt, 4.60 ± 0.05 ’lik pH değerine ulaşılan dek $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ’de fermente edilmiş ve daha sonra ekşi krema işlenmiştir. Ekşi krema, karıştırılmış ve $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ’ye soğutulmuş ve $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ’de depolanmıştır.

Ekşi kremanın hazırlanmasından bir gün sonra, 100 spor/nokta’lık bir hedefle yoğurdun yüzeyinde bir noktada birden fazla yoğurt kabındaki yüzey kirletici maddeleri olarak farklı küfler aşılanmıştır. Küflerin büyümesi, 45 gün boyunca

7°C±1°C'de depolandıktan sonra görsel olarak değerlendirilmiştir.

Ekşi krema testinin sonuçları, yalnızca başlatıcı kültürle (üst sıra) veya başlatıcı kültür ve HOLDBAC™ YM-B kültürüyle (orta sıra) fermente edilen süttten yapılan ekşi kremada *P. commune* (M6), *A. versicolor* (M7), *P. brevicompactum* (M1), *P. crustosum* (M10) ve *P. glabrum* (M8) küflerinin iyi bir şekilde büyüdüğünü gösteren Şekil 8'de sunulmaktadır. Buna karşılık, süt fermantasyonu sırasında *Lactobacillus paracasei* CHCC12777'nin mevcut olması durumunda (alt sıra), test edilen küflerin tamamının büyümesi inhibe edilmiştir.

10

Örnek 9: Tvarogta *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 ile yapılan yükleme çalışması.

Lactobacillus rhamnosus suşu CHCC12697'nin tek suş olarak *mucor* ssp. üzerindeki inhibe edici etkisinin görsel olarak incelenmesi için tvarog hazırlanmıştır:

Pastörize az yağlı süte %0.01'de ticari başlatıcı kültür (F-DVS CHN-19, Chr. Hansen A/S şirketinden elde edilebilir, Danimarka) aşılanmıştır. Süte ilaveten HOLD-BAC™ YM-B (5DCU/100L) veya *Lactobacillus rhamnosus* suşu CHCC12697 (5x10⁶ CFU/g) aşılanmış ve bir parti, referans olarak kullanılmış ve yalnızca başlatıcı kültür aşılanmıştır.

Süt, 4.60±0.05'lik pH değerine ulaşılan dek 28°C±1°C'de fermente edilmiştir. Haşlama sıcaklığı, 38 ila 40°C civarı olmuştur. Süzdürme işleminden sonra kesmik, 1 bar'lık basınçla 30 dakika boyunca preslenmiştir.

Tvarogun hazırlanmasından bir gün sonra, 100 spor/nokta'lık bir hedefle tvarog yüzeyinde (100 g) üç noktaya pipetle aktarmak suretiyle kopya halindeki yüzey kirletici maddeleri olarak *Mucor* ssp. aşılanmıştır. Küflerin büyümesi, 18 gün boyunca 7°C±1°C'de depolandıktan sonra görsel olarak değerlendirilmiştir.

Tvarog testinin sonucu, yalnızca başlatıcı kültür CHN-19 (Ref.) ile fermente edilen süttten yapılan tvarogta *Mucor* ssp.'nin iyi bir şekilde büyüdüğünü gösteren Şekil 9'da sunulmaktadır. Küf, aynı zamanda başlatıcı kültür ve HOLDBAC™ YM-B kültürüyle fermente edilen süttten yapılan tvarogta iyi bir şekilde büyümekte ve başlatıcı kültür ve HOLDBAC™ YM-C kültürüyle fermente edilen süttten yapılan tvarogta ise daha az ölçüde büyümektedir. Ancak, süttün fermantasyonu sırasında *Lactobacillus rhamnosus* suşu CHCC12697'nin mevcut olması durumunda, *Mucor* ssp.'nin büyümesinin çarpıcı bir şekilde daha belirgin bir şekilde inhibe edildiği gözlemlenmektedir.

Örnek 10: Yoğurtta *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 ile yapılan yükleme çalışması.

Lactobacillus rhamnosus suşu CHCC14226'nın tek suş olarak *P. brevicompactum*, *P. commune*, *A. versicolor* ve *P. crustosum* gibi farklı küfler üzerindeki inhibe edici etkisinin görsel olarak incelenmesi için, %1.5 yağlı yoğurt hazırlanmıştır:

Homojenize süt (%1,5 yağ), su banyosunda 1 L'lik şişeler halinde 5 dk. boyunca 95°C±1°C'de ısı ile işlenmiş ve hemen soğutulmuştur. Bir ticari başlatıcı kültür (F-DVS YF-L901, Chr. Hansen A/S şirketinden elde edilebilir, Danimarka) %0.02'de aşılacaktır. Süte ilaveten HOLD-BAC™ YM-B (20DCU/100L) veya *Lactobacillus rhamnosus* suşu CHCC14226 (1x10⁷ CFU/ml) aşılacaktır ve bir şişe, referans olarak kullanılmış ve yalnızca başlatıcı kültür aşılacaktır.

25

Süt, 4.60±0.05'lik pH değerine ulaşılan dek 43°C±1°C'de fermente edilmiştir. Ortaya çıkan yoğurt, bardaklara (100 g) dökülmüş ve 7°C±1°C'de depolanmıştır.

Yoğurdun hazırlanmasından bir gün sonra, 100 spor/nokta'lık bir hedefle yoğurdun yüzeyinde bir noktada birden fazla yoğurt kabındaki yüzey kirletici maddeleri olarak farklı küfler aşılacaktır. Küflerin büyümesi, 45 gün boyunca

7°C±1°C'de depolandıktan sonra görsel olarak değerlendirilmiştir

Yoğurt testinin sonuçları, yalnızca başlatıcı kültür YF-L901 ile (üst sıra) veya başlatıcı kültür ve HOLDBAC™ YM-B kültürüyle (orta sıra) fermente edilen sütün yapılan yoğurttan *P. brevicompactum* (M1), *P. commune* (M6), *A. versicolor* (M7) ve *P. crustosum* (M10) küflerinin iyi bir şekilde büyüdüğünü gösteren Şekil 10'da sunulmaktadır. Buna karşılık, süt fermantasyonu sırasında *Lactobacillus paracasei* CHCC14226'nın mevcut olması durumunda (alt sıra), test edilen küflerin tamamının büyümesi inhibe edilmiştir.

10

Örnek 11: *Lactobacillus paracasei* CHCC12777'nin tvarogta *K. lactis*'e karşı inhibe edici etkisinin kantitatif olarak belirlenmesi.

Lactobacillus paracasei suşu CHCC12777'nin tek suş olarak *K. lactis* üzerindeki inhibe edici etkisinin kantitatif olarak belirlenmesi için tvarog hazırlanmıştır:

Pastörize az yağlı süte %0.01'de ticari başlatıcı kültür (F-DVS CHN-19, Chr. Hansen A/S şirketinden elde edilebilir, Danimarka) aşılanmıştır. Süte ilaveten HOLD-BAC™ YM-B (20DCU/100L) veya *Lactobacillus rhamnosus* suşu CHCC12777 (5×10^6 CFU/g) aşılanmış ve bir parti, referans olarak kullanılmış ve yalnızca başlatıcı kültür aşılanmıştır.

Süt, 4.60±0.05'lik pH değerine ulaşılan dek 28°C±1°C'de fermente edilmiştir. Haşlama sıcaklığı, 38 ila 40°C civarı olmuştur. Süzdürme işleminden sonra kesmik, 1 bar'lık basınçla 30 dk. boyunca preslenmiştir.

25

Tvarogun hazırlanmasından bir gün sonra, yaklaşık 10 g'lık numune tvarog blokları kesilerek çıkarılmış ve Stomacher poşetlerine yerleştirilmiştir. Bloklara daha sonra ince bir iğne ile tvarogun içine mayanın enjekte edilmesi suretiyle, 10.000 CFU/ml'de 0.1 ml maya aşısı ile kopya halinde aşılama yapılmıştır. Poşetler, tvarog etrafında sarılmış ve bantlanarak kapatılmıştır.

30

Numuneler, 7°C±1°C'de depolanmış ve Maya Glukoz Kloramfenikolde (YGC) salin peptonda yapılan ilave uygun 1 kat dilüsyonlar ve 1 g tvarogun yerleştirilmesi ve 5 gün boyunca 25°C'de yapılan aerobik inkübasyon vasıtasıyla *K. lactis* kontaminasyonuna ilişkin olarak uygun aralıklarda analiz edilmiştir.

5

Şekil 11'de gösterildiği gibi, *K. lactis* büyümesi, fermantasyondan önce başlatıcı kültür CHN-19 ile birlikte aşılması durumunda *Lactobacillus paracasei* suşu CHCC12777'nin mevcudiyetinde inhibe edilmiştir. *Lactobacillus paracasei* suşu CHCC12777, ticari kültür olan HOLDBAC™ YM-B'ye kıyasla çarpıcı bir şekilde daha yüksek seviyede inhibisyona sebep olmuştur.

10

Örnek 12: *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697'nin tvarogta *K. lactis*'e karşı inhibe edici etkisinin kantitatif olarak belirlenmesi.

15

Lactobacillus rhamnosus suşu CHCC12697'nin tek suş olarak *K. lactis* üzerindeki inhibe edici etkisinin kantitatif olarak belirlenmesi için tvarog hazırlanmıştır:

20

Pastörize az yağlı süte %0.01'de ticari başlatıcı kültür (F-DVS CHN-19, Chr. Hansen A/S şirketinden elde edilebilir, Danimarka) aşılanmıştır. Süte ilaveten HOLD-BAC™ YM-B (5DCU/100L) veya *Lactobacillus rhamnosus* suşu CHCC12697 (5x10⁶ CFU/g) aşılanmış ve bir parti, referans olarak kullanılmış ve yalnızca başlatıcı kültür aşılanmıştır.

25

Süt, 4.60±0.05'lik pH değerine ulaşılan dek 28°C±1°C'de fermente edilmiştir. Haşlama sıcaklığı, 38 ila 40°C civarı olmuştur. Süzdürme işleminden sonra kesmik, 1 bar'lık basınçla 30 dk. boyunca preslenmiştir.

30

Tvarogun hazırlanmasından bir gün sonra, yaklaşık 10 g'lık numune tvarog blokları kesilerek çıkarılmış ve Stomacher poşetlerine yerleştirilmiştir. Bloklara daha sonra ince bir iğne ile tvarogun içine mayanın enjekte edilmesi suretiyle,

24946.35

10.000 cfu/ml'de 0.1 ml maya aşısı ile kopya halinde aşılama yapılmıştır. Poşetler, tvarog etrafında sarılmış ve bantlanarak kapatılmıştır.

5 Numuneler, $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de depolanmış ve Maya Glukoz Kloramfenikolde (YGC) salin peptonda yapılan ilave uygun 1 kat dilüsyonlar ve 1 g tvarogun yerleştirilmesi ve 5 gün boyunca 25°C 'de yapılan aerobik inkübasyon vasıtasıyla *K. lactis* kontaminasyonuna ilişkin olarak uygun aralıklarda analiz edilmiştir.

10 Şekil 11'de gösterildiği gibi, *K. lactis* büyümesi, fermantasyondan önce başlatıcı kültür CHN-19 ile birlikte aşılama durumunda *Lactobacillus rhamnosus* suşu CHCC12697'nin mevcudiyetinde inhibe edilmiştir. Suş, ticari kültür olan HOLD-BAC™ YM-B'ye kıyasla çarpıcı bir şekilde daha yüksek seviyede inhibisyona sebep olmuştur.

15 **Örnek 13:** *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226'nın yoğurtta *Debaromyces hansenii*'ye karşı inhibe edici etkisinin kantitatif olarak belirlenmesi.

20 *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226'nın tek suş olarak *D. hansenii* üzerindeki inhibe edici etkisinin kantitatif olarak belirlenmesi için, yoğurt, aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

25 Homojenize süt (%1.5 yağ), su banyosunda 1 L'lik şişeler halinde 5 dakika boyunca $95^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de ısı ile işlenmiş ve hemen soğutulmuştur. Bir ticari başlatıcı kültür (F-DVS YF-L901, Chr. Hansen A/S şirketinden elde edilebilir, Danimarka) %0.02'de aşılama yapılmıştır. Süte ilaveten HOLD-BAC™ YM-B (20DCU/100L) veya *Lactobacillus rhamnosus* suşu CHCC14226 (1×10^7 CFU/g) aşılama yapılmış ve bir şişe, referans olarak kullanılmış ve yalnızca başlatıcı kültür aşılama yapılmıştır.

30 Süt, 4.60 ± 0.05 'lik pH değerine ulaşılan dek $43^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de fermente edilmiştir. Ortaya çıkan yoğurt, bardaklara (100 g) dökülmüş ve $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de depolanmıştır.

Yoğurdun hazırlanmasından bir gün sonra, bardaklara kopya halinde 20 CFU/g'lık bir hedefle 1,00 ml/bardak'lık maya aşılacaktır. Maya, yoğurt içinde eşit ölçüde dağıtılmıştır. Bardaklar, üstü kapalı bir şekilde $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de depolanmış ve Maya Glukoz Kloramfenikolde (YGC) salin peptonda yapılan ilave uygun 1 kat dilüsyonlar ve 1 g yoğurdun yerleştirilmesi ve 5 gün boyunca 25°C 'de yapılan aerobik inkübasyon vasıtasıyla *D. hansenii* kontaminasyonuna ilişkin olarak uygun aralıklarda analiz edilmiştir.

Şekil 12'de gösterildiği gibi, *D. hansenii* büyümesi, fermantasyondan önce başlatıcı kültür YF-L901 ile birlikte aşılması durumunda *Lactobacillus rhamnosus* suşu CHCC14226'nın mevcudiyetinde inhibe edilmiştir. Suş, ticari kültür olan HOLDBAC™ YM-B'ye kıyasla çarpıcı bir şekilde daha yüksek seviyede inhibisyona sebep olmuştur.

15 **TEVDİ EDİLEN NUMUNELER ve UZMAN ÇÖZÜMÜ**

Mevcut başvuru sahibi, patentin alındığı tarihe kadar aşağıda belirtilen tevdi edilen mikro organizmaların bir numunesinin yalnızca bir uzmanın istifadesine sunulmasını talep eder.

20

Lactobacillus rhamnosus suşu CHCC12697 3-3-2011 tarihinde Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu'na (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) tevdi edilmiş ve DSM24616 erişim numarası verilmiştir.

25

Lactobacillus rhamnosus suşu CHCC14226, 15-3-2011 tarihinde Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu'na (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) tevdi edilmiş ve DSM24652 erişim numarası verilmiştir.

30

Lactobacillus paracasei suşu CHCC12777, 15-3-2011 tarihinde Alman

Mikroorganizma ve Hücre Kùltürleri Koleksiyonu'na (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) tevdi edilmiş ve DSM24651 erişim numarası verilmiştir.

- 5 Tevdi edilme işlemleri, Patent İşlemleri Amacıyla Mikroorganizmaların Tevdi Edilmesinin Uluslararası Kabulü Konusunda Budapeşte Anlaşması'na uygun bir şekilde yapılmıştır.

REFERANSLAR

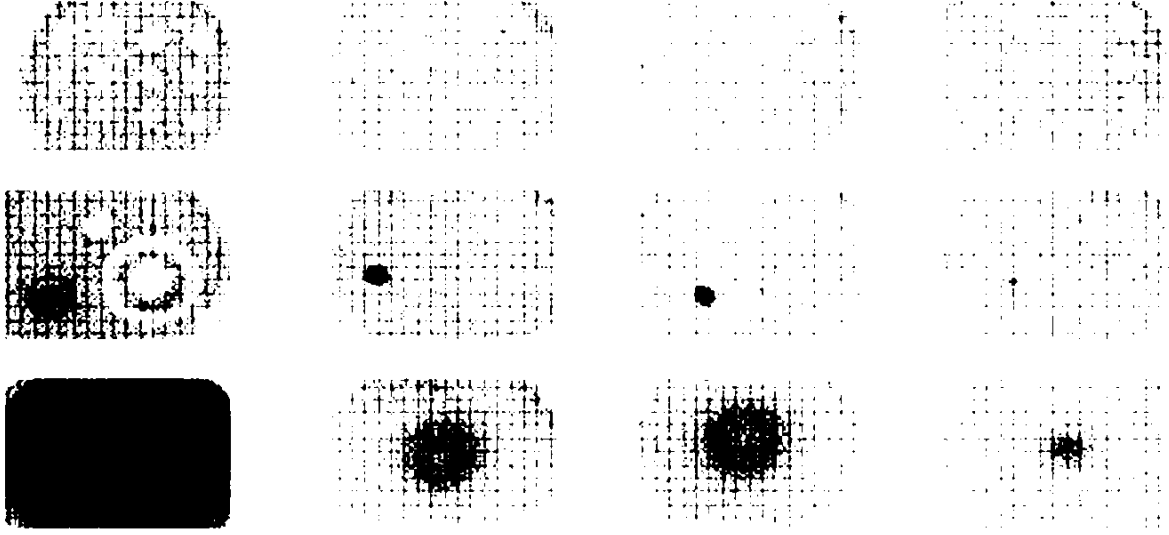
10

US 2005/0095318 (Schwenninger vd.)

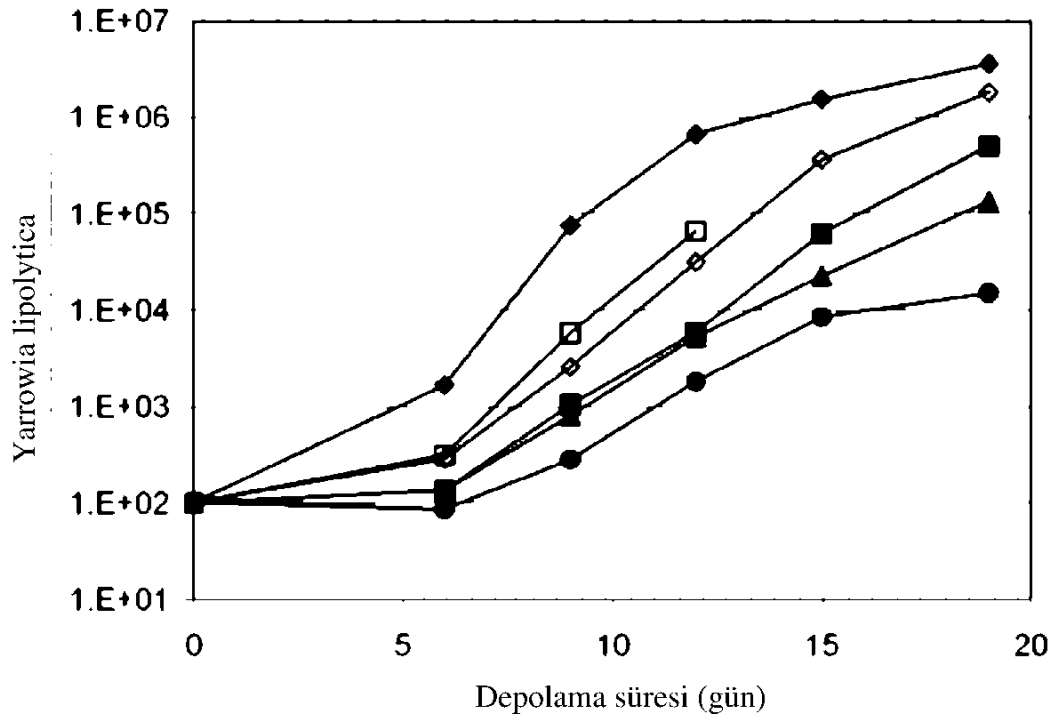
WO 2004/041305 (Valio Ltd)

15

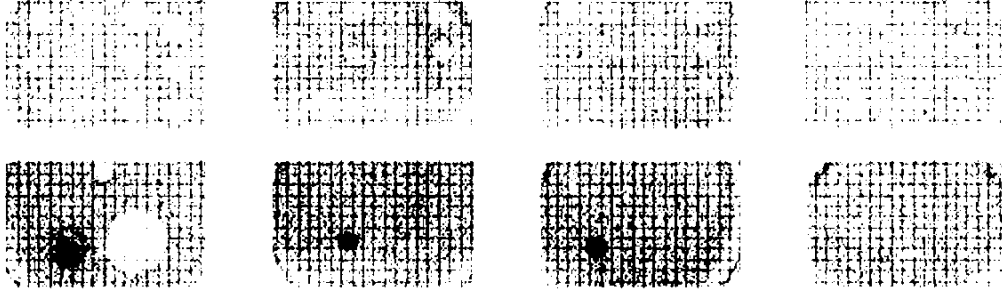
Tharmaraj, N. & Shah, N.P. (2009) Antimicrobial effects of probiotic bacteria against selected species of yeasts and molds in cheese-based dips. International Journal of Food Science & Technology. 44: 1916-1926.



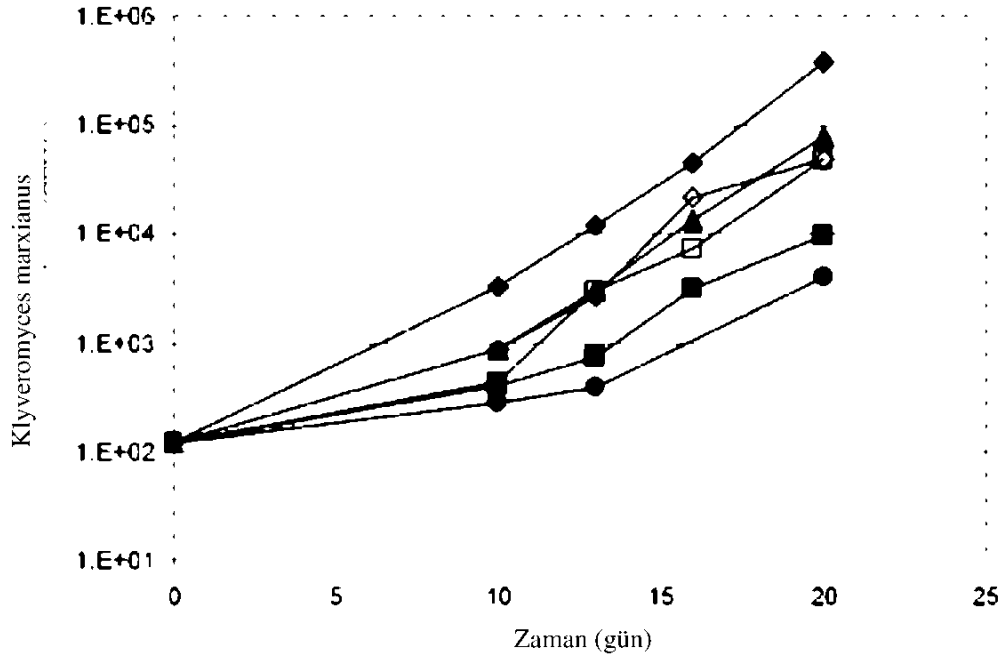
ŞEKİL 1



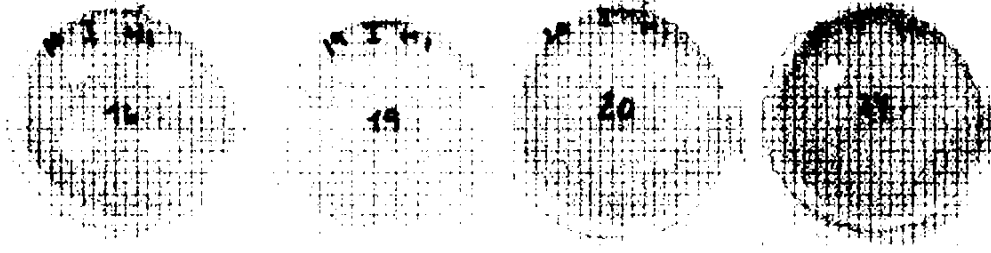
ŞEKİL 2



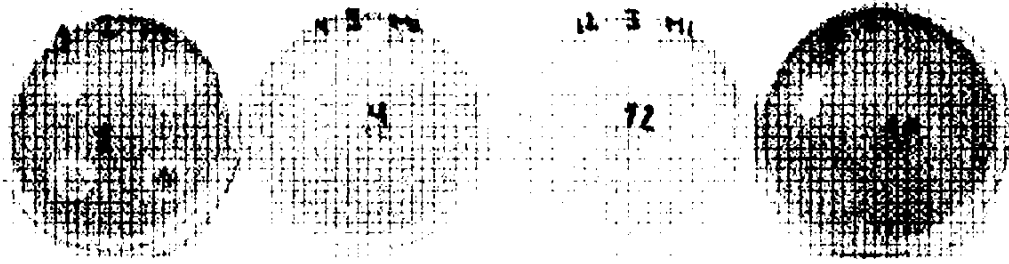
ŞEKİL 3



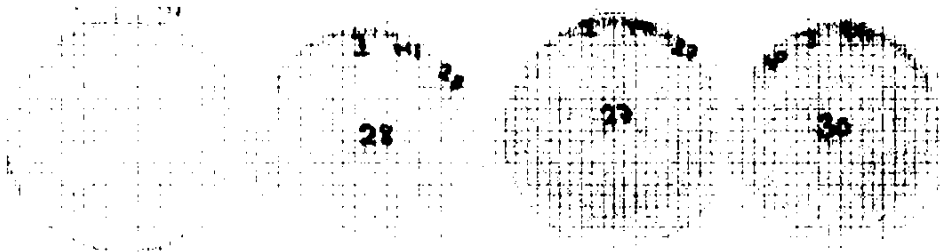
ŞEKİL 4



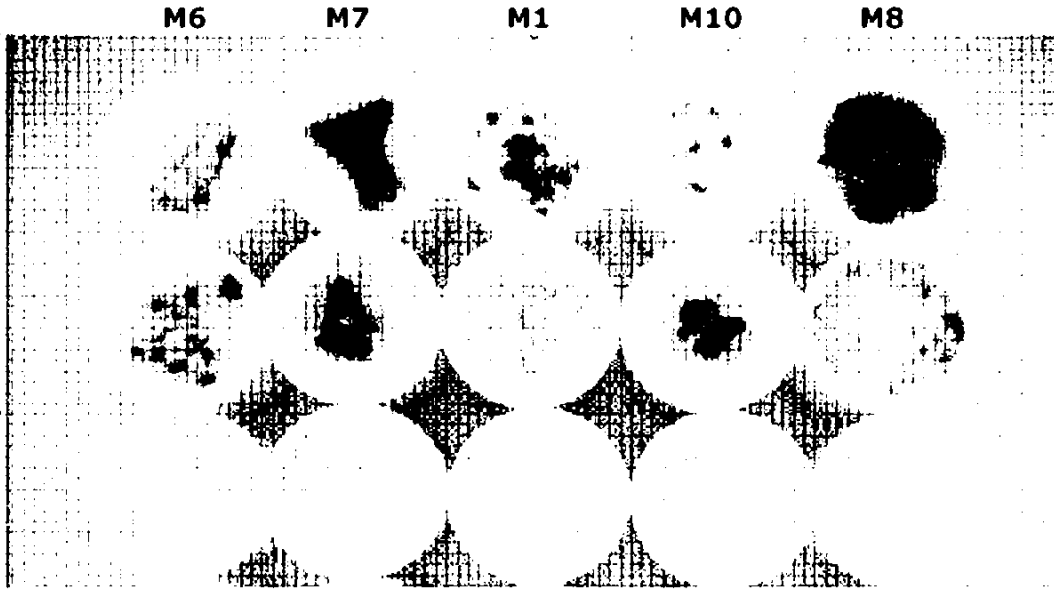
ŞEKİL 5



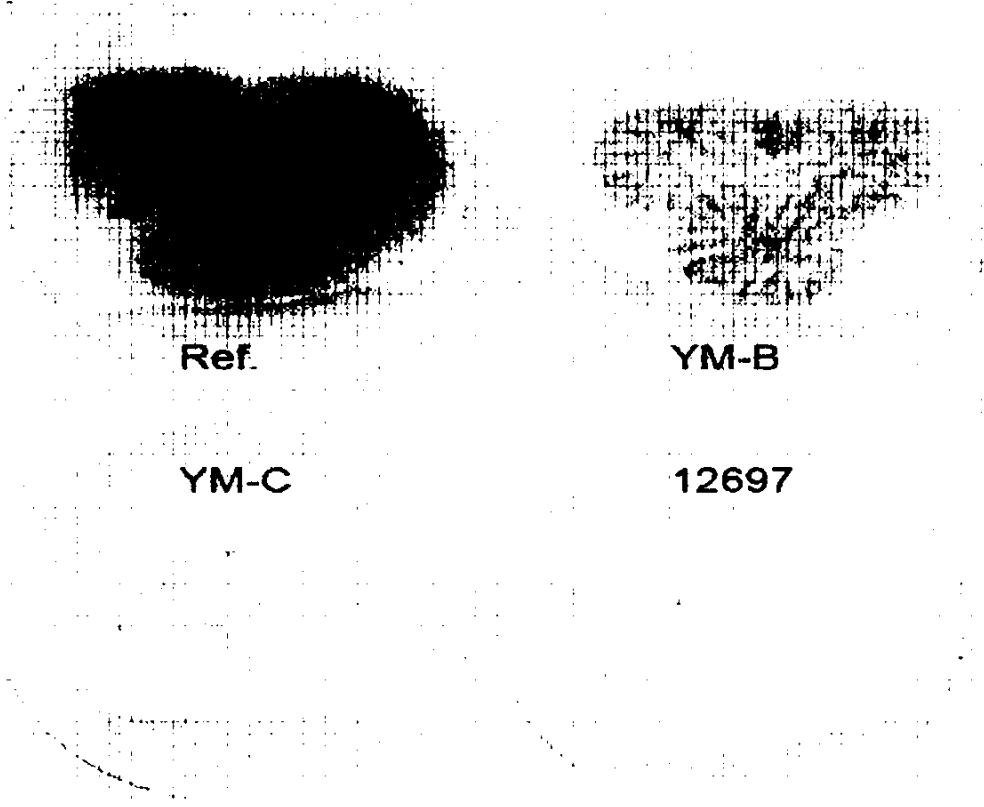
ŞEKİL 6



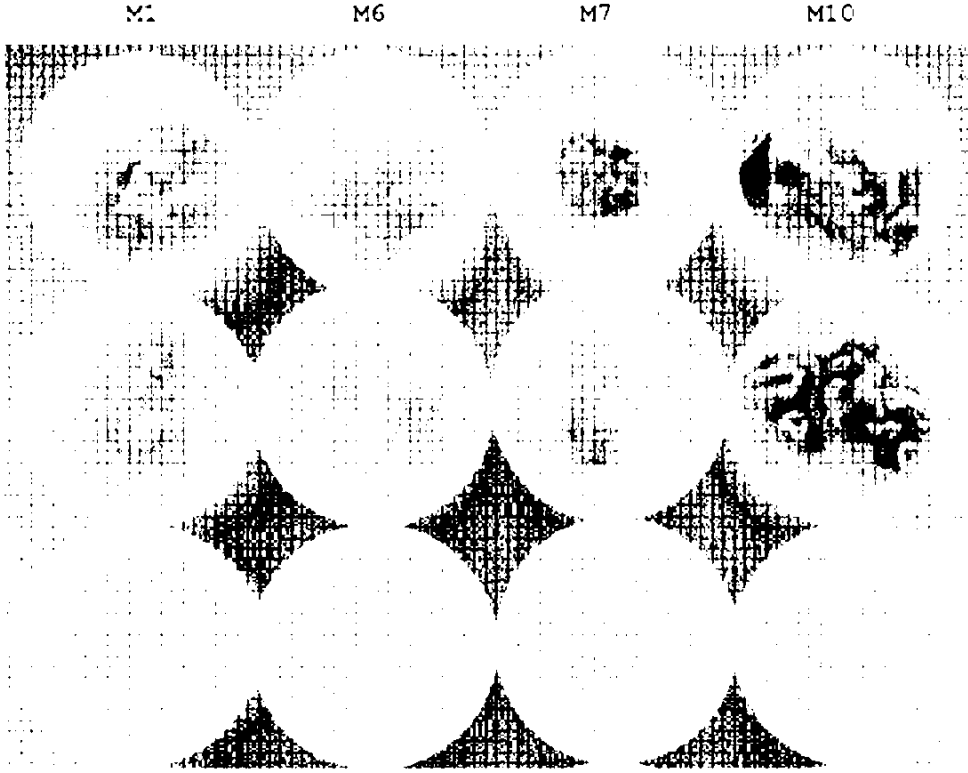
ŞEKİL 7



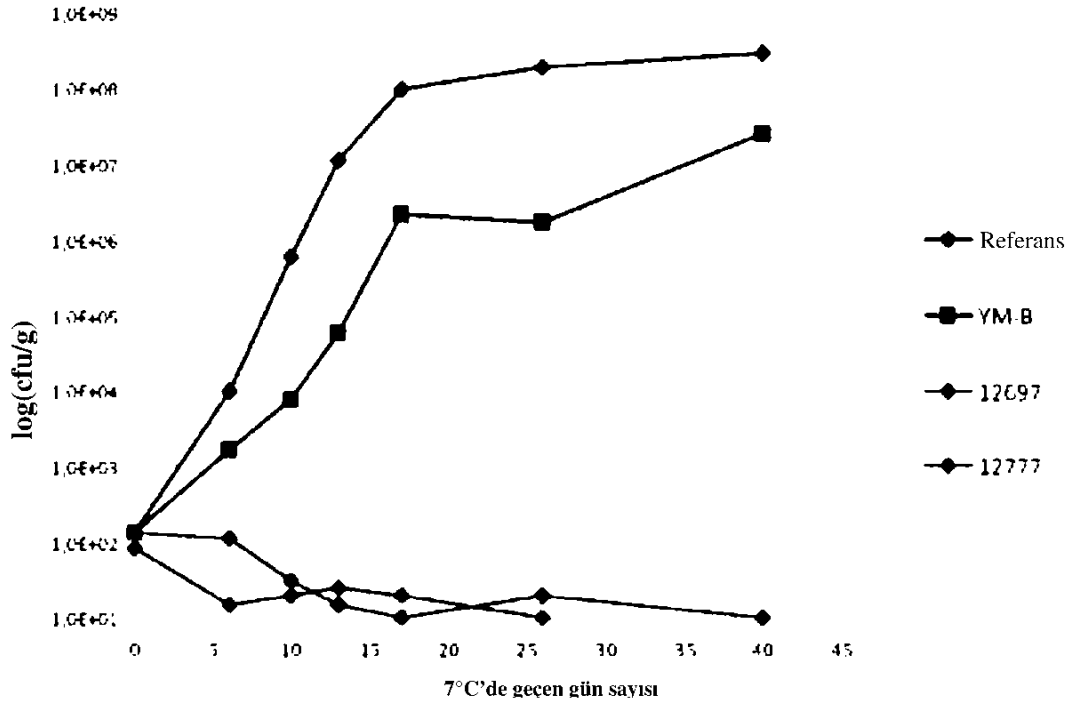
ŞEKİL 8



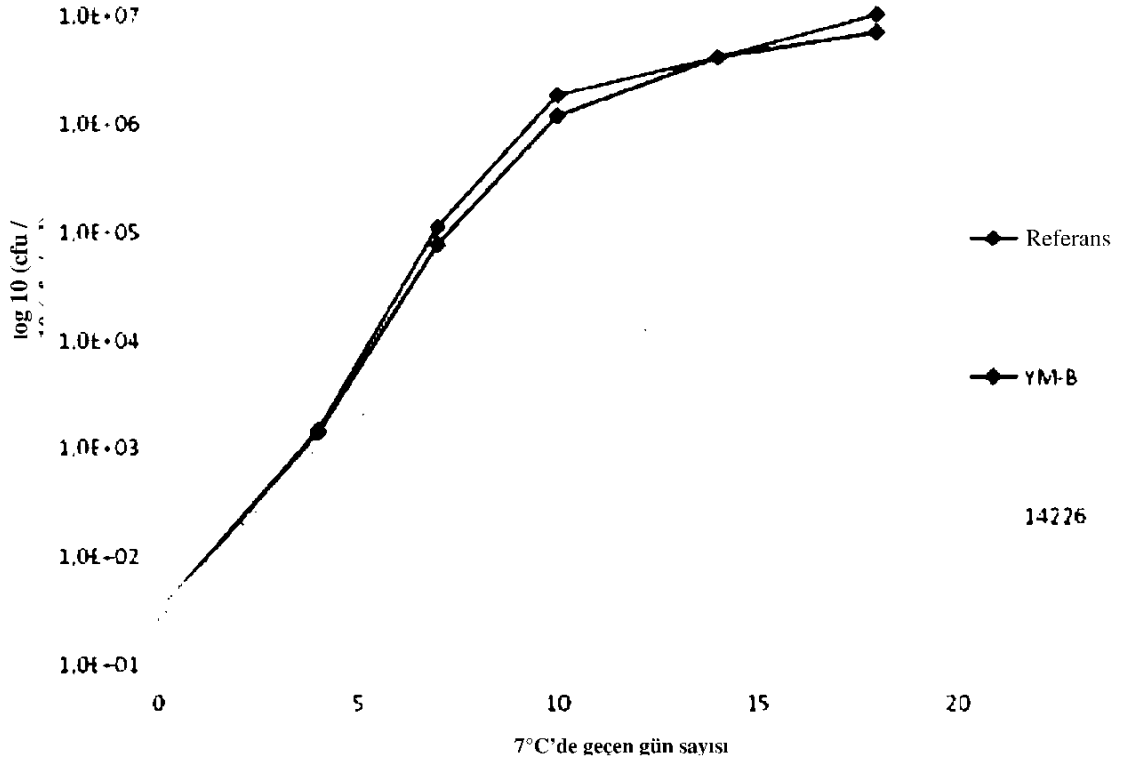
ŞEKİL 9



ŞEKİL 10



ŞEKİL 11



ŞEKİL 12