



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

**GELENEKSEL TEKNİKLERLE ÜRETİLEN YOĞURTLARDAN VE DOĞADAKİ  
BİTKİSEL ÖRNEKLERDEN YOĞURT KÜLTÜRLERİNİN İZOLASYONU  
İDENTİFİKASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

**Hakan TAVŞANLI**

**(DOKTORA TEZİ)**

**Bursa-2015**



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

GELENEKSEL TEKNİKLERLE ÜRETİLEN YOĞURTLARDAN VE DOĞADAKİ  
BİTKİSEL ÖRNEKLERDEN YOĞURT KÜLTÜRLERİNİN İZOLASYONU  
İDENTİFİKASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Hakan TAVŞANLI

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Recep ÇIBIK

Bursa-2015

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE**

Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Hakan Tavşanlı tarafından hazırlanan Geleneksel Tekniklerle Üretilen Yoğurtlardan ve Doğadaki Bitkisel Örneklerden Yoğurt Kültürlerinin İzolasyonu İdentifikasyonu ve Karakterizasyonu konulu Doktora tezi 25/03/2015 Çarşamba günü, 10:00-12:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>
<b>Tez Danışmanı</b>	Prof.Dr.Recep Çıbık
<b>Üye</b>	Prof.Gül Ece Soyutemiz
<b>Üye</b>	Prof.Dr.Levent Akkaya
<b>Üye</b>	Doç.Dr. Nazmiye Güneş
<b>Üye</b>	Yrd.Doç.Dr.Mukadderat Gökmen

İmza



Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı toplantısında alınan ..... numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Metin PETEK

Enstitü Müdürü

Bu tez, Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığı tarafından UAP(V)-2012/11 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET	III
İNGİLİZCE ÖZET	V
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	7
Laktik Asit Bakterileri	7
Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması	7
Laktik Asit Bakterilerinin Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	9
Yoğurta Kullanılan Laktik Asit Bakterileri	11
<i>Streptococcus thermophilus</i>	11
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	12
Laktik Asit Bakterilerinde İdentifikasyon Yöntemleri	14
Fenotipik Yöntemler	14
Moleküler Yöntemler	16
1.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Temelli Olmayan Moleküler Yöntemler	16
2.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Temelli Moleküler Yöntemler	18
MALDI-TOF MS (Kütle Spektrometrisi)	19
Laktik Asit Bakterilerinin Teknolojik Özellikleri	20
Laktik Asit Bakterilerinde Laktoz Fermantasyonu	20
Laktik Asit Bakterilerinin Proteolitik Özellikleri	24
Laktik Asit Bakterilerinde Bakteriyoliz	25
Laktik Asit Bakterilerinde Antibiyotik Dirençliği	26
Laktik Asit Bakterilerinde Bakteriofaj	27
Laktik Asit Bakterilerinde Bakteriosin Üretimi	28
Laktik Asit Bakterilerinin Doğal Ortamları ve Kullanıldığı Ürünler	30
Yoğurt Starter Kültürleri	32
Yoğurt Starter Kültürleri Arasındaki İlişki	36
GEREÇ VE YÖNTEM	37
Laktik Asit Bakterilerinin İzole Edildiği Numunelerin Toplanması	37
Geleneksel Yöntemlerle Üretilen Yoğurtların Toplanması	37
Bitki, Yağmur Suyu ve Çiy Damlarının Toplanması	37
Bitki, Yağmur Suyu ve Çiy Damlası Örneklerinin Süt ile İnkube Edilmesi	38
Mikrobiyolojik Analizler	41
Üretilen Yoğurt Numunelerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	41

İzolatların İdentifikasyonu	42
Biyokimyasal Testler	42
MALDİ-TOF MS Tekniğiyle İdentifikasyon	43
Geleneksel Yöntemlere Göre Üretilen Yoğurtların Mikrobiyolojik Analizleri	45
Geleneksel Yöntemlere Göre Üretilen Yoğurtların Duyusal Analizleri	46
Asitlik ve pH Ölçümü	47
Suğların Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	47
Glikoliz Yeteneklerinin Belirlenmesi	47
a) Besiyerinde Glikolizisin Belirlenmesi	47
b) Yağsız Süt Tozundan Hazırlanan Yeniden Yapılandırılmış Sütte Glikolizisin Belirlenmesi	47
Fast-Slow Differention Agar'da Bakterilerinin Proteoliz ve Laktoz Kullanımlarının Değerlendirilmesi	48
Suğların Bakteriyolitik Özelliklerinin Belirlenmesi	48
Yoğurt Bakterilerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi	49
<b>BULGULAR</b>	<b>50</b>
Bitkiler, Yağmur ve Çiy Damlları ile Sütün Pıhtılaştırılması	50
Doğal Kaynaklardan Pıhtılaştırılan Sütlerin Depolanma Sürecinde pH ve Asitlik Değiğimi, Mikrobiyolojik Duyusal Nitelikleri	51
Yoğurt Bakterilerinin İzolasyonu ve İdentifikasyonu	56
İzolatların Teknolojik Karekterizasyonu	66
<i>S. thermophilus</i> Suğlarının M17 Sıvı Besiyerinde Glikolizisin Belirlenmesi	66
<i>S. thermophilus</i> Suğlarının Yağsız Süt Tozunda Glikolizisin Belirlenmesi	68
<i>L. delbrueckii</i> Suğlarının MRS Sıvı Besiyerinde Glikolizisin Belirlenmesi	70
<i>L. delbrueckii</i> Suğlarının Yağsız Süt Tozunda Glikolizisin Belirlenmesi	71
Yoğurt Bakterilerinin Proteoliz ve Laktoz Kullanımları	73
İzole Edilen Suğların Bakteriyolitik Aktiviteleri	75
Yoğurt Bakterilerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi	79
<b>TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	<b>85</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>92</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>100</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>101</b>

## ÖZET

Tez çalışması geleneksel yöntemlerle üretilen yoğurtlardan, aynı zamanda bitki, yağmur suyu ve çiy damlalarından yoğurt üretilerek, üretilen yoğurtlarda doğal ortamda bulunan laktik asit bakterilerinin izolasyonu, tanımlanması ve suşların teknolojik karakterizasyonlarını belirlemek amacıyla yapıldı. Bu amaç ile 100 adet geleneksel yöntemlerle üretilmiş yoğurt numunesi organoleptik özelliklerine bakılarak Ege ve Marmara bölgelerinin kırsal alanlarından toplandı. Doğal kaynaklardan yoğurt bakterilerinin izolasyonu için farklı alanlardan toplanan 100 adet bitki, 100 adet yağmur suyu ve 100 adet çiy damlası sütün pıhtılaştırılması ve yoğurt üretimi için kullanıldı. Toplanan numunelerden bitki örneklerinin 17, yağmur suyu örneklerinin 20, çiy damlası örneklerinin ise 18 tanesinin sütü pıhtılaştırdığı gözlemlendi.

Pıhtının şekillendiği örneklerde yoğurt kıvam ve tadının oluşması için gerekli bakteri sayısına ( $10^7$ - $10^8$  kob/g) inkubasyonun 12. saatten sonra ulaşıldığı belirlendi. Duyusal analizlerde örneklerin bir kısmının kabul edilebilir niteliğe sahip olduğu saptandı. Temel biyokimyasal testlerle tanımlanan izolatların, matriks ile desteklenmiş lazer iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF) ile tanımlanması neticesinde, geleneksel yöntemlerle üretilen yoğurtlardan 27 adet, bitki kullanarak pıhtılaştırılan sütlerden 3 adet, yağmur suyu ile pıhtılaştırılan sütlerden 8 adet ve çiy damlaları ile pıhtılaştırılan sütlerden 7 adet olmak üzere toplam 45 adet *Lactobacillus delbrueckii* suşu izole edildi. Aynı şekilde, geleneksel yöntemlerle üretilen yoğurtlardan 42 adet, bitki kullanarak pıhtılaştırılan sütlerden 4 adet, yağmur suyu ile pıhtılaştırılan sütlerden 8 adet ve çiy damlaları ile pıhtılaştırılan sütlerden 12 adet olmak üzere toplam 66 adet *Streptococcus thermophilus* suşu elde edilmiştir.

Tanımlanan suşların asidifikasyon, proteoliz, bakteriyoliz gibi teknolojik özellikleri ile antibiyotik dirençlilik profilleri de çalışmanın bir parçası olarak değerlendirildi. Suşların asidifikasyon özellikleri; laktoz ile zenginleştirilmiş tamponlu sıvı besiyerinde ve yağsız süt tozundan hazırlanmış ortamda 24 saat boyunca pH'daki değişim olarak ölçülmüştür. Geleneksel yoğurt, bitki, yağmur suyu ve çiy damlasından elde edilen suşların yeniden yapılandırılmış yağsız süt tozunda zamana bağlı olarak pH değeri ortalamaları incelendiğinde her iki yoğurt bakterisi için 2. saatler arasındaki farklılık istatistikî açıdan ( $p < 0,01$ ) önemli bulunmuştur.

Suşların proteolitik aktiviteleri ve laktoz kullanımları FSD Agar (Fast Slow Differentiation Agar) belirlendi. *L. delbrueckii* suşlarının 17 tanesi (% 38) kuvvetli, 12 tanesi (% 26) orta ve 16 tanesi (%37) zayıf proteolitik aktivite gösterirken *S. thermophilus* suşlarının 9 tanesi (% 14) kuvvetli, 26 tanesi (% 39) orta ve 31 tanesi (% 47) zayıf proteolitik aktivite gösterdi.

Bakteriyolizis yoğurt oluşumunda asidifikasyonu kısıtladığından dolayı yüksek bakteriyolitik özelliğe sahip suşlar tercih edilmemektedir. Çalışmamızda suşların bakteriyolitik özellikleri tamponlanmış potasyum fosfat ortamında türbidimetrik olarak belirlendi. Bakteriyolizisin suşa göre değişkenlik gösterdiği ve *L. delbrueckii* suşlarının 2. saatin sonunda bakteriyolitik hız olarak % 3 ile 35 arasında değişen liz oranı gösterdikleri 24 saatin sonunda ölçülen son bakteriyoliz noktasının ise % 18 ile 95 arasında değiştiği gözlemlendi. *S. thermophilus* suşlarının da benzer şekilde suşa bağlı değişkenlik gösterdiği ve 2 saatte % 3-42 oranında bakteriyolitik hız gösterdikleri saptandı. Bakteriyolizisin son noktası olarak ise laktobasillere nazaran nispeten daha düşük bir seviyede kaldı ve % 16 ile 76 arasında değiştiği görüldü.

Suşların antibiyotik dirençlilik profilleri disk difüzyon yöntemine göre belirlendi. *L. delbrueckii* suşlarının tamamı quinupristin/dalfopristin, tetrasiklin ve kloramfenikole duyarlılık gösterdi. Sekiz suşun tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu, 21 suşun sadece bir antibiyotiğe direnç gösterdiği ve çoklu direnç profili olarak da 1 suşun 7 adet antibiyotiğe dirençli olduğu belirlendi. *S. thermophilus* suşlarının 8 tanesinin kullanılan 14 antibiyotiğin tamamına duyarlı olduğu, 3 adedinin ise sadece 1 antibiyotiğe dirençli olduğu saptanmıştır. Ayrıca 45 suşun gentamisine, 43 suşun streptomisine, 40 suşun eritromisine dirençli oldukları tespit edildi. Çoklu antibiyotik dirençliliği olarak değerlendirildiğinde 31 adet (% 47) suşun 6 ve daha üzeri antibiyotiğe direnç gösterdiği saptanmıştır.

Sonuç olarak bu doktora tez çalışmasında geleneksel yöntemlerle üretilmiş yoğurtlardan, bitkilerden direk olarak ya da yağmur suyu ve çiy damlaları gibi doğal kaynaklardan *L. delbrueckii* ve *S. thermophilus* suşlarının izolasyonu ve identifikasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen suşların süt endüstrisinde yoğurt yapımında starter kültür olarak kullanılabilirliklerine ilişkin bazı temel testler de gerçekleştirilse de daha detaylı çalışmalar ile suşların karakterizasyonunun ve yoğurt fermantasyonuna ilişkin uygunluklarının belirlenmesi gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Geleneksel yoğurt, *Lactobacillus delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus*, bitki, yağmur suyu, çiy damlası



## SUMMARY

### Isolation, Identification And Characterization of Yoghurt Cultures From Traditionally Produced Yoghurts And Natural Plant Samples

The present Ph D thesis outlines the isolation and identification of lactic acid bacteria, particularly yoghurt bacteria *Lactobacillus delbrueckii* and *Streptococcus thermophilus* from natural environments such as traditionally produced homemade yogurts, plants collected from the wild environment, rainwater washed plants and from dew drops in spring time. For this aim, a total of 100 yoghurt samples were selected for their organoleptic properties from villages in a relatively extended geographical area in Marmara and Aegean regions. One hundred samples from each of plants, rainwater washed plants and dew drops were also collected from the same regions. Thereafter, these last samples were tested for their milk clotting properties after inoculation into pasteurized milk. 17 of plants samples, 20 of rainwater samples and 18 of dew drops samples were able to coagulate milk after incubation process.

In the samples where the clotting formed, the number of lactic acid bacteria reached to desired level after 12 h incubation ( $10^7$ - $10^8$  cfu / g), and typical yoghurt consistency and taste were observed in some samples. Even, some of the samples exhibited acceptable quality level by sensorial analyses. Isolated bacteria were then identified by basic biochemical tests and matrix- assisted laser ionization time of flight, mass spectrometry (MALDITOF-MS) analysis and 45 isolates were confirmed as *L. delbrueckii* ssp. 27 of isolates were from traditionally produced yoghurts, 3 from plants, 8 from rainwater washed plants and 7 from dew drops. Moreover, 66 strains of *S.thermophilus* were identified by the same technique, of which, 42 were from naturally produced yogurts, four from plants, eight from rainwater washed plants and 12 from dew drops.

Some technologically important properties of strains such as acidification, proteolysis, bacteriolysis as well as antibiotic resistance profiles were assessed as a part of the study. Acidification the strains was measured as the change in pH in buffered medium and reconstituted skim milk after incubation for 24 hours. Statistically important difference was observed between lactobacillus and streptococcus strains in term of their acidification at 2. h of incubation ( $p < 0.01$ ).

Proteolytic activity and lactose utilization of the strains were determined on FSD Agar (Fast Slow Differential Agar). Strong [17 lactobacillus (38 %), 9 streptococcus (14 %)], moderate [12 lactobacillus (26 %), 26 streptococcus (39%)] and weak [16 lactobacillus (37%), 31 streptococcus (47%)] level of proteolytic activity were noted for strains.

Higher bacteriolytic property exhibiting strains are not preferred in yogurt production because of the retardation of acidification which is the main step in yoghurt production. Bacteriolysis which is a strain dependent character was measured turbidimetrically in potassium phosphate buffer. The rate of bacteriolysis as measured at 2. h of incubation was found to vary between 3 and 35% and its extend varied between 18 and 95% after 24 h incubation for *L. delbrueckii*. For *S. thermophilus*, the rate varied between 3-42%, and the extend varied between 16 and 76%. This provides evidence that lactobacilli have higher bacteriolysis compared to streptococcus.

Antibiotic resistance profile of strains was determined by the disk diffusion method. *L. delbrueckii* strains were susceptible to quinupristin / dalfopristin, tetracycline and chloramphenicol and 21 strains were showed resistance to only one antibiotic. On the other hand, eight strains were sensitive to all tested antibiotics. One strain showing multi-drug resistance profile was determined to be resistant to 7 different antibiotics. As for the streptococcus strains, eight of which were sensitive to all tested antibiotics, and three were resistant to only one antibiotic. The resistance to gentamicin (45 strains), streptomycin (43 strains) and erythromycin (40 strains) was very common among the strains. Interestingly, multiple antibiotic resistances were also quite common and 31 strains (47%) showed resistance to 6 or more antibiotics.

As a result, *L. delbrueckii* and *S. thermophilus* have been isolated from a range of natural sources such as traditionally produced yogurts, plants, rainwater washed plants and dew drops. Some technologically important characters of the strains were also determined. The probable use of these strains in dairy technology as starter requires some additional tests and manufacturing trials.

**Key Words:** Traditional yogurt, *Lactobacillus delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus*, plant, rain water, dew drops

## GİRİŞ

Göçebe toplulukların avcılık ve toplayıcılıktan yavaş yavaş yerleşik düzene geçiş döneminde yabani hayvanları evcilleştirmeye başlamışlardır. Bu süreçte yaklaşık olarak M.Ö 6000- 8000 yılları arasında koyun, keçi, sığır ve manda gibi hayvanların evcilleştirildiği bildirilmektedir. Hayvanların evcilleşmesi hayvansal ürünlerin çeşitliliğini arttırmıştır. Hayvansal ürünlerden sütün besin olarak kullanılması ile beraber sütün daha uzun süre muhafaza edilmesi gerekliliği doğmuştur. Bunun için ilk önce süt bir şekilde kaynatılmıştır. Sütün kaynatılması süt yoğunluğunda azalmaya, kazeinin denaturasyonuna ve patojen bakterilerin yıkımlanmasına neden olmuştur. Sonuçta o dönem içerisinde etkili bir muhafaza yöntemi geliştirilmiştir. Kısmen işlem görmüş sütte bulunan sıcaklığa dirençli laktik asit bakterileri ve doğal koşullarla bulaşan fermentatif bakterilerin etkisiyle yoğurt oluşumu başladığı tahmin edilmektedir (1, 2).

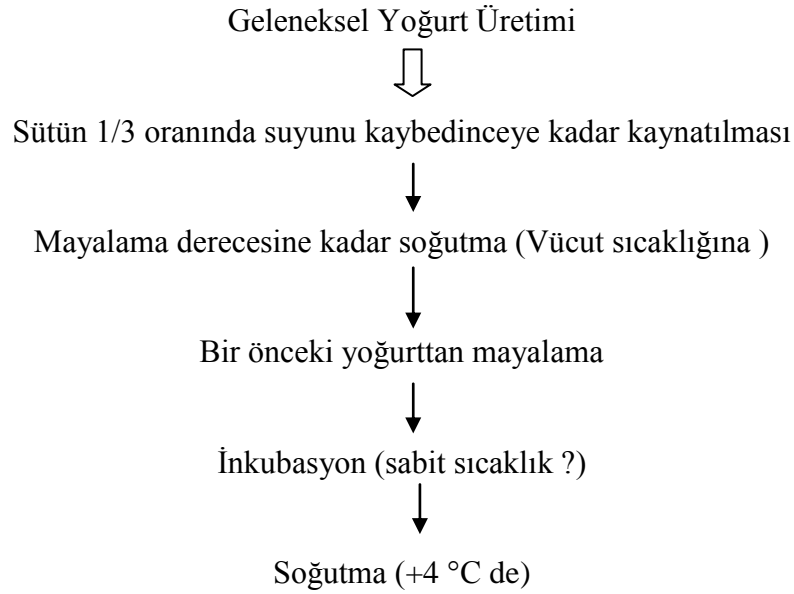
Yoğurdun oluşumu ile ilgili bunun dışında birçok olay anlatıla gelmiştir. Atalarımızın taşların altından beyaz karınca yumurtalarını taşla ezerek süte kattığı ve yoğurdun ilk defa bu şekilde üretildiği anlatılmıştır (1- 3).

Tezin ana fikrini de oluşturan eski yörük ve göçebe topluluklarda yoğurdun üretilmesi ise bahar aylarında özellikle, mart sonu, nisan, mayıs aylarında ya da hıdırellez gününde temiz bir tülbentle sabah çiy tanelerinin toplanması ve bunların mayalanacak süte katılması ile yoğurdun elde edilmesidir. Özellikle hıdırellez günü çiy damlasından mayalanan yoğurdun damızlık olarak kullanılıp bir yıl boyunca bu yoğurttan sütlerin mayalandığı bilinmektedir. İnsanlar hıdırellez günü mayalanan yoğurdun iyileştirici gücü olduğuna ve kutsal olduğuna inanmışlardır. Günümüzde bunun en iyi örneği Kütahya'nın Tavşanlı ilçesine bağlı yörük köylerinde bir yıllık yoğurt mayası, hıdırellez ve bu günü takip eden iki gün süresince sabah ezanı ile tan ağarması arasındaki vakitte doğadaki bitkilerin üzerinden toplanan çiy damlaları ile yoğurt üretimi yapılmaktadır. Çiy damlasından yoğurt mayalanmasına benzer diğer bir yöntem ise bahar aylarındaki yeni filizlenen bitki örtüsünden filizleri koparıp mayalanacak süte katılması ile yoğurdun elde edilmesidir (4,5).

Günümüzde ise yoğurt üretiminde iki yöntem kullanılmaktadır. Birincisi, starter kültürlerin süte katıldığı modern süt teknolojisinde kullanılan yöntemdir. Diğeri ise geleneksel olarak bir önceki yoğurttan alınan mayanın yoğurt yapılacak süte katılması ile yüzyıllardır yapılan mayalama metodudur (6). Ancak değişken son ürünlerle sonuçlanan bu son metot standart ürün almak zorunda olan süt endüstrinin ihtiyacına yanıt

verememektedir. Süt endüstrisi böyle değişken bir sonuçla karşı karşıya kalmamak için ve standart, aynı kalitede ürün elde edebilmek amacı ile fizyolojik, biyokimyasal ve genetik olarak tanımlanmış kültür kullanımını tercih etmektedir. Bu kültürlerin kullanıldığı yoğurtlarda ise tüketicinin istediği geleneksel yoğurt tat ve aroması oluşmamaktadır. Hem endüstrinin ihtiyaç duyduğu tanımlanmış kültür kullanımını sağlamak hem de geleneksel yoğurt tadını geliştirmek için birçok çalışma yapılmaktadır (7,8).

Geleneksel yoğurt üretimi yoğurda işlenecek sütün orjinal hacminin yaklaşık 1/3'ünü kaybedinceye kadar kaynatılması, vücut sıcaklığına kadar soğutulması, bir önceki günden kalan bir parça yoğurtla veya yoğurdun sulandırılmış şekli ile mayalanması ve mayalanma sıcaklığında 2-6 saat gibi tam net olmayan ve kişisel tecrübe ve aroma oluşumuna göre inkubasyonun ardından soğutulması işlemlerinden oluştuğu bildirilmektedir (9,10).



Şekil-1: Geleneksel yoğurt üretim aşaması (9)

Geleneksel yöntemlerle üretilmiş yoğurtlar ile ilgili yapılan çalışmalarda elde edilen kimyasal analiz sonuçları tablo-1'de gösterilmiştir.

Tablo-1: Geleneksel yoğurtlarda kimyasal analiz değerleri (7- 10)

Kimyasal analiz	Değerler
Ortalama kuru maddede	% 13,02±2,22
Yağ oranı	% 3,88±1,95
Protein oranı	% 3,87±0,79
Titrasyon asitliği	% 3,65±4,19,
Asetaldehit miktarı	16,07±12,18 ppm
pH değeri	3,81±0,19
Lipoliz derecesi	4,14±3,34 meq KOH/100g yağ

Fabrikasyon tip yoğurt üretimi ise Türk Standardları Enstitüsü yoğurt standardına (TS 1330) göre; İnek sütü (TS 1018), koyun sütü (TS11044), manda sütü (TS11045), keçi sütü (TS11046) veya karışımlarının pastörize edilmesi veya pastörize sütün (TS1019), gerektiğinde süt tozu ilavesiyle (TS1329) homojenize edilip veya edilmeden *Lactobacillus delbrueckii* alttür. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*'dan oluşan yoğurt kültürünün ilave edilmesi ve TS 10935'e uygun işlemlerden sonra elde edilen mamüldür (11). Fabrikasyon tip yoğurt üretiminde aranan en önemli özellikler kıvam-yapı, tat, aroma, koku ve görünüş olarak sıralanabilir. Yoğurdun kalitesini etkileyen faktörler arasında; ham maddenin kalitesi, toplam kuru madde, ham maddedeki protein içeriği, asitlik, katkı maddeleri, kullanılan starter kültürlerin özellikleri ve inokülasyon oranları yer alır. Bu kalite özelliklerini standart bir şekilde sağlamak için yoğurt prosesi geliştirilmiştir. Fabrikasyon tip starter kültür kullanılarak yapılan yoğurt prosesi ise; 9 aşamada incelenebilir.

1. Standardizasyon: Sütün yağı % 0.5- 4.5 kadar alınır.
2. Ön ısıtma (30-35 °C de) kuru madde ayarlanması yapılır. Yağsız kuru madde miktarının % 16'ya çıkarılması amaçlanır. Yoğurt üretiminde kullanılacak sütün yağsız kuru madde miktarı, çeşitli yöntemlerle arttırılabilir.

Vakumla Suyun Azaltılması: Basınç altında vakumla gerçekleşir. Yoğurda işlenecek sütün yoğunlaştırıcıda genellikle suyun % 10- 25 arasında ayrılması sağlanır. Bu koyulaştırma işlemi yoğurdun kalitesi açısından iyi sonuç vermektedir.

Membran Filtrasyon ile Suyun Azaltılması: Hiper filtrasyon düşük sıcaklıkta 3- 8 atm lik basınç uygulanır.

Süt Tozu veya Konsantre Süt İlavesi: Genellikle yoğurt yapımında % 1- 3 arasında süt tozu kullanılır. Kullanılan süt tozunun eriyebilme yeteneği önemlidir.

Peyniraltı Suyu Tozu İlavesi: Tavsiye edilen miktar % 1- 2 oranındadır. Daha yüksek oranlarda kullanılırsa, tada olumsuz yönde etki yapmaktadır.

3. Homojenizasyon ile yağ globülleri 1- 2 µm. büyüklüğünde parçalanır. Bu işlem sütün yüksek basınç altında çok küçük súbaplardan geçirilmesi sonucu yağ globül çaplarının küçültülmesi ve sütü daha standart hale getirme işlemi olarak tanımlanabilir. Bu 10 katına kadar parçalanan yağ globülleri etrafındaki fosfolipit-protein kompleksinden oluşan membran kırılmakta buda yağ globüllerinin etrafına daha çok protein absorbe olmasını sağlamaktadır. Bu kompleks yapı yoğurt oluşumunda serum oluşumunu azaltmaktadır (12).

4. Pastörizasyon 90- 95 °C de 5-10 dakika, 80-85 °Cde 30 dakika yapılır. Pastörizasyon derecelerinden daha çok 85 °C de 30 dakika tercih edilmektedir. Pastörizasyon ile patojen bakterilerin yıkımlanması, lipaz gibi enzimlerin inaktivasyonunu ve proteinlerin özellikle β-laktoglobulin ve α-laktalbumin denaturasyonunu sağlayarak daha yumuşak, kremi kuvvetli bir pıhtının elde edilmesi amaçlanmaktadır (7).

5. İnkübasyon sıcaklığı, yoğurt oluşumunu sağlayacak *L. delbrucekii* alttür. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* bakterilerinin üremesi için süt 43- 45 °C'ye kadar soğutulur.

6. Yoğurt kaplarına aktarım iki şekilde yapılır. Birincisinde süt istenilen büyüklükteki kaplara aktarılıp üzerine % 2 oranında kültür katılır. Bu yöntem maliyeti yüksek ve donanım gerektirir ama standart kalitede yoğurt üretilir. İkinci yöntemde ise süt kazanına yine % 2 oranında kültür katılır karıştırılır ve ardından kaplara doldurulur.

7. Kültür ilavesi; *L. delbrueckii* alttür. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* gibi iki laktik asit bakterisi bulunur. Yoğurt mayalamada bu bakterilerin 1: 1 oranda birleşiminden meydana gelen saf kültürler kullanılır. Bu bakteriler için optimum gelişme sıcaklığı 43- 46 °C civarındadır (13).

8. İnkübasyon 42- 43 °Cde 3- 4 saat ya da pH 4.3 için gerekli asitliğin oluşumuna kadar devam edilir. Süt starter kültür inoküle edilmesinden sonra paketlenip inkübasyona bırakılmasıyla SET tipi yani pıhtının kırılmadan paketlenmesi, starter kültürle inokülasyon ve inkübasyon sonrasında pıhtının kırılıp karıştırılmasıyla da STİRRED tipi yoğurt elde edilmektedir (14- 16).

Tablo- 2: Fabrikasyon tip yoğurtta kimyasal bileşim (6, 9)

Bileşim	Miktar
Su	% 80- 86
Kuru Madde	% 14- 20
Yağ	% 2- 8
Protein	% 4- 8
Süt Şekeri	% 2- 5
Mineral Maddeler	% 0.8- 1.2
Asitlik	0.9

9. Soğutma pıhtılaşma süresi tamamlandıktan sonra, mikroorganizmaların aktivitesini sonlandırmak amacı ile yoğurt hızlı bir şekilde 20 °C'nin altına soğutulmalıdır. Yoğurt yaklaşık 30- 45 dakika içerisinde 10 °C'ye kadar soğutulur. Soğutma işlemi sonrasında yoğurt satışa hazır hale gelir (17- 19).

Tablo- 3: Yağ oranlarına göre yoğurdun bileşimi

Bileşim	Tam Yağlı Yoğurt	Düşük Yağlı Yoğurt
Protein	3.9	5.0
Yağ	3.4	1.0
Karbonhidrat	4.9	6.5

Süt endüstrisinde yoğurt kimyasal yapısına göre tam yağlı veya düşük yağlı yoğurt olarak üretilmektedir. Bu iki yoğurda ait kimyasal özellikler tablo- 2 ve tablo- 3 de gösterilmiştir. Pazar ihtiyaçlarına göre de meyveli yoğurt, süzme ya da torba yoğurdu, set ve stirred yoğurt gibi çok az üretim farklılıkları olan yoğurtlar üretilmektedir (7, 20). Bu çalışmada Türkiye'de Güney Marmara'nın dağ köylerinde yaşayan yaşlı kadınların halk arasındaki ismi kuzukulağı (*Rumex acetosella*), gerdeme (*Nasturtium officinale*) gibi bitkilerden yoğurt elde ettikleri ve bu yoğurtları özellikle aroma farklılığından dolayı tercih ettikleri bilinmektedir. Fakat dünyadaki bitkisel çeşitliliği en fazla olan ülkelerden biri olan ülkemizde, bitkisel örneklerde laktik asit bakterilerinin varlığı üzerinde şimdiye kadar detaylı çalışma yapılmamıştır. Yapılan ön araştırmalarla edinilen bilgiler ışığında, bu tez çalışmasının amacı, doğadaki bitkilerden özellikle bahar aylarındaki yağmur suyu ve çiy damlasından izole edilen yoğurt kültürlerinin ve ticari kültürlerle bulaşmamış geleneksel yoğurt örneklerinden kültür izolasyonu, elde edilecek izolatların identifikasyonu ve teknolojik nitelikleri açısından karakterize edilmeleridir. Geleneksel yollarla üretilen yoğurtlarda bulunan bakteriler ile doğadan izole edilenler değerlendirilecek ve gelecekteki

alışmalar için de kullanılabilir genetik bir veri tabanı oluşturulacaktır. Aynı zamanda çalışma sonunda elde edilen suşlar yoresel laktik asit bakteri çeşitliliğinin koruma altına alınmasına da katkıda bulunacaktır. Endüstriyel olarak, bu çalışma sonunda yoğurt yapımı için uygun özellikte olan bakterilerden oluşturulan kùltürlerin, sùt endüstrisinde kullanımı için temel oluşturulması amaçlanmaktadır. Halen starter kùltürlerini yurt dışından alan sùt ve sùt ürünleri endüstrisi için, yerli kùltürlerin kullanım olanakları doğacak ve tüketicinin arzuladığı tat ve aromaya kavuşma imkânı oluşacaktır.



## GENEL BİLGİLER

### Laktik Asit Bakterileri

#### Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması

Laktik asit bakterileri kavramı, 19. yüzyıl ikinci yarısının sonlarında bilim ve teknoloji gelişmesiyle beraber doğmuştur. Laktik asit fermantasyonu terimi Pasteur tarafından 1857 yılında tanımlanmasının ardından saf kültürün ilk izolasyonu *Bacterium lactic* ile 1873 de Lister tarafından yapılmıştır. Bu saf kültürün izolasyonunu takiben 1890 yıllarında Kiev de Weigman, Kopenhag da Storch tarafından laktik asit bakterileri peynir ve sıvı yoğurt yapımında kullanılmıştır. O yıllarda koliform bakterilerin sütü fermente etme ve pıhtılaştırıcı yetenekleri ile laktik asit bakterilerine benzemelerine bağlı olarak sorunlar yaşanmıştır. Ancak 1901 yılında Beijerinck tarafından laktik asit bakterilerinin Gram pozitif yapıda hücre duvarına sahip olduğunun rapor edilmesi bu iki grubun birbirinden ayrıştırılmasına imkan sağlamıştır (21, 22).

Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması ilk olarak Orla-Jensen (1919) tarafından yapılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre laktik asit bakterileri morfolojik yapılarına, katalaz reaksiyonuna ve fermantasyon yeteneklerine göre; *Betabacterium*, *Thermobacterium*, *Streptobacterium*, *Streptococcus*, *Betacoccus*, *Microbacterium* ve *Tetracoccus* olarak sınıflandırılmıştır (23, 24).

Tablo- 4: Orla-Jensen (1919) göre laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması

Cins	Şekil	Katalaz	Nitrit indirgeme	Fermantasyon	Şimdiki Sınıflandırma
<i>Betabacterium</i>	Çubuk	-	-	Hetero	<i>Lactobacillus</i> <i>Weissella</i>
<i>Thermobacterium</i>	Çubuk	-	-	Homo	<i>Lactobacillus</i>
<i>Streptobacterium</i>	Çubuk	-	-	Homo	<i>Lactobacillus</i> <i>Camobacterium</i>
<i>Streptococcus</i>	Kok	-	-	Homo	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i>
<i>Betacoccus</i>	Kok	-	-	Hetero	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weissella</i>
<i>Microbacterium</i>	Çubuk	+	+	Homo	<i>Brochothrix</i>

Tablo- 4 incelendiğinde Orla-Jensen (1919) süt endüstrisindeki öneme sahip laktobasil ve streptokokları tek bir özellikleri bakımından ele alarak sınıflandırdığı görülmektedir

(25). Streptokokların ilk olarak sınıflandırılması 1937 de Sherman tarafından yapılmıştır. Zorunlu anaeroplara ile *Pneumococ*'lar Sherman'a göre sınıflandırma dışı bırakılmıştır (24, 25). Fakültatif anaerobik streptokoklar ise dört gruba ayrılmıştır. Tablo- 5'de streptokokların sınıflandırılması görülmektedir (26). Bu sınıflandırmada bakterilerin biyokimyasal özellikleri esas alınmıştır. Shleifer ve Kilpper-Balz 1984- 1987 yıllarında moleküler karakterizasyonu temel olarak bu sınıflandırmayı daha da geliştirmişlerdir. Moleküler karakterizasyona göre streptokokların bazıları laktokok ve enterokok cinsi olarak ayrılmıştır (27, 28). Bundan daha eski yıllarda 1933 de Lancefield streptokokları serolojik yapısında var olan C maddesi farklılıklarına göre A, E ve N gruplarına ayırmıştır. Bu farklılıkları fizyolojik ve biyokimyasal testler ile doğrulamışlardır. Çeşitli identifikasyon yöntemleri gelişmesine rağmen, laktik asit bakterileri identifikasyonda bu gün bile ilk basamak olarak Sherman testleri kullanılmaktadır (7, 29).

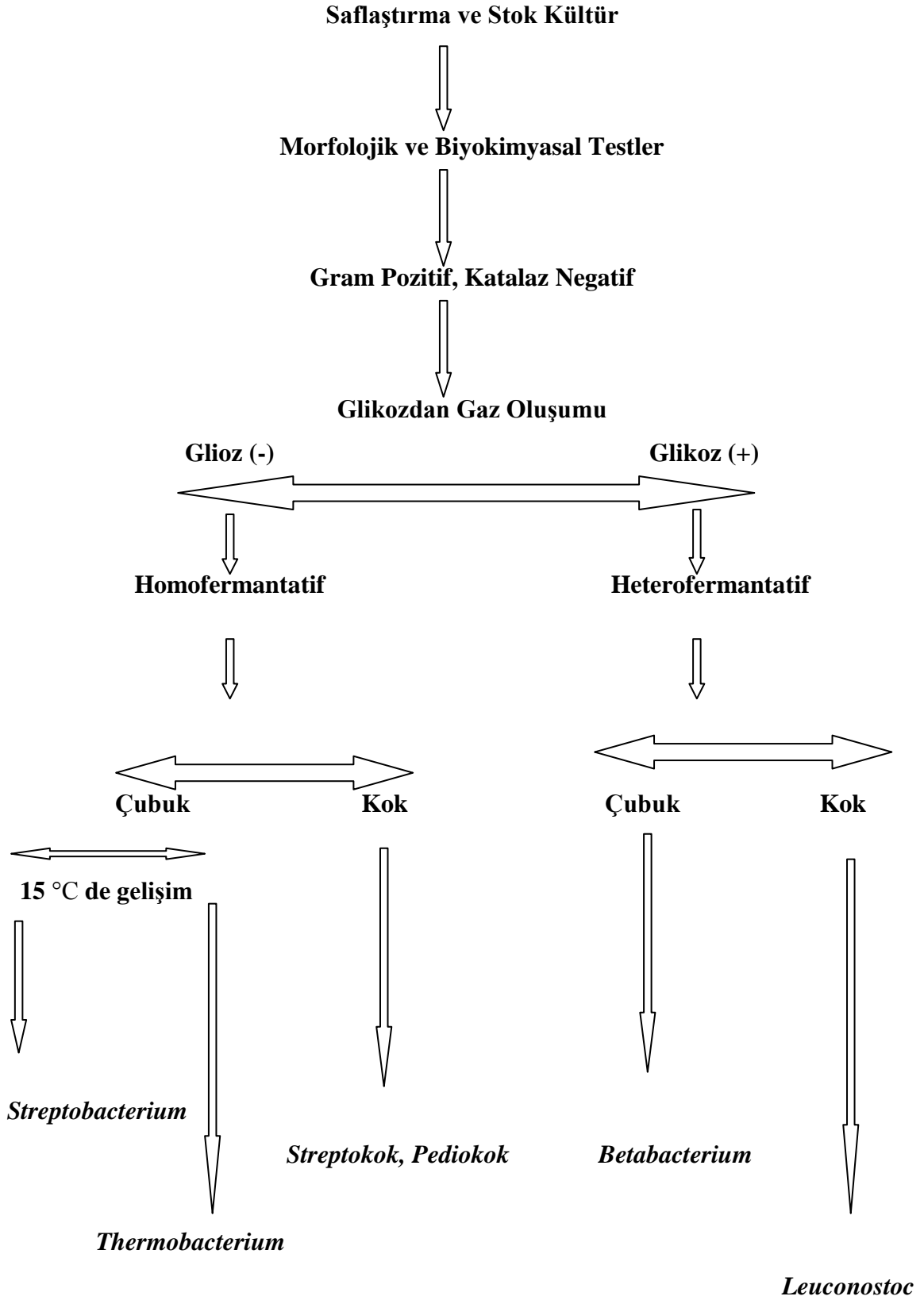
Tablo- 5: Sherman'a göre streptokokların sınıflandırılması (1937)

	<u>Pyojen</u>	<u>Viridans</u>	<u>Laktik</u>	<u>Enterokok</u>
Lancefield grubu	A, B, C, G		N	D(Q)
Hemoliz			-	-
Gelişme				
10 °C	-	-	+	+
45 °C	+	+	-	+
pH 9.6	-	-	-	+
60 °Cye 30 dak. dayanım	-	+	d	+
Metilen mavisi (0.1%)	-	-	+	+(-)

Bu klasik bakteri sınıflandırılmasında bakterilerin morfolojik yapısı ve biyokimyasal özellikleri temel alınmıştır. Bu gün ise hücre duvarı kompozisyonu, yağ asit üretimi, moleküler karakterizasyonu özellikle de DNA'daki % G+ C oranı, elektroforezde gen özellikleri, DNA hibridasyon çalışmaları ve yapıları, RNA ( rRNA) yapıları laktik asit bakterilerinin sınıflandırılmasında değişikliklerin oluşmasıyla sonuçlanmıştır (30, 31).

## Laktik Asit Bakterilerinin Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Laktik asit bakterileri; morfolojik yapısı mikroskopta incelendiğinde eni, boyu ve çapı arasında kültür koşullarına göre farklılıklar gösterdiğinden morfolojik ayrımı tam olarak yapılamamaktadır. Laktik asit bakterileri cins ve türlerine göre değişmekle birlikte genel olarak kok, düzgün basil ve düzensiz basil olmak üzere üç farklı şekilde görülmektedir (32). *Streptococcus*, *Lactococcus* ve *Enterococcus* cinsi ikili veya zincir şeklinde sıralanmış ovoid hücrelerden, *Leuconostoc* cinsi ikili, zincir şeklinde sıralanmış lentiküler hücrelerden, *Pediococcus* grubu tetrad yapıda dizilmiş yuvarlak hücrelerden oluşmuştur. *Lactobacillus* grubunda bulunan türler; düzgün basil tekli, ikili veya çok uzun zincir şeklinde görünürlerken ortamın biyotik ve abiyotik koşullara bağlı olarak zincir şeklinde görülen basillerin bölünmüş veya spiral şeklinde olduğu da görülebilmektedir. *Streptobacterium* grubu küt kısa basillerden, *Bifidobacterium* türleri ise düzensiz basil şeklinde görülürler (33, 34). Laktik asit bakterileri Gram pozitif, spor oluşturmeyen, mobilitesi peritrik flagellarının bulunduğu birkaç grup dışında pek görülmemektedir (35). Laktik asit bakterileri düşük guanin (G) ve sitozin (C) bazlarına sahip, katalaz ve oksidaz negatif, fakültatif anaerop, aside dayanıklı, homofermantatif ve heterofermantatif şeker fermantasyonu yapabilen, nitrat indirgen mikroorganizmalardır (36). Homofermantatif laktik asit bakterileri fermantasyon sonucunda % 99 oranında laktik asit, % 1 oranında diğer maddelerden oluştururken, heterofermantatif laktik asit bakterileri % 70 oranında laktik asit, % 30 oranında asetik asit, etil alkol ve karbondioksit oluştururlar. Homofermantatif laktik asit bakterilerinin başlıca karbon kaynağı glikozdur ve büyük oranda laktik asit oluştururlarken, heterofermantatif laktik asit bakterileri glikozu laktat, etanol ve karbondioksit parçalar (37). Bu mikroorganizmalar üreyebilmek için aminoasitlere, B grubu vitaminlere ayrıca pürin ve pirimidin bazlarına ihtiyaç duyarlar. Birçoğu mezofilik olan bu mikroorganizmalar 5 °C' nin altında ve 45 °C gibi yüksek sıcaklıklarda üreyebilirler. Gelişmesi için 3.2 ve 9.6 gibi düşük ve yüksek pH'da üreyebilirler. Sınıflandırmada yer alan türlerin bazıları zayıf proteolitik ve lipolitik yeteneğe sahiptirler (38). Laktik asit bakterileri cins düzeyinde sınıflandırılması şekil-2'de görülmektedir.

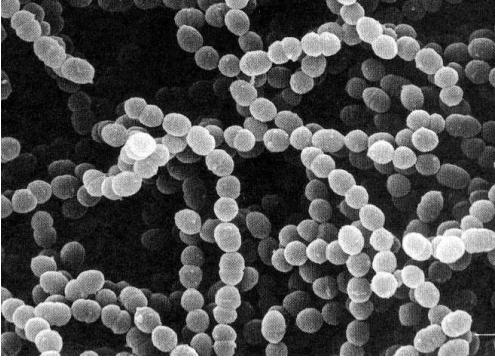


Şekil- 2: Laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve cins düzeyinde tanımlanması (39)

## Yoğurtta Kullanılan Laktik Asit Bakterileri

### *Streptococcus thermophilus*

*Streptococcus thermophilus*, *Streptococcaceae* sınıfına ait bir bakteridir. *S. thermophilus* ilk önce *Streptococcus salivarius* alttürü *thermophilus* grubunda sınıflandırılmışken, DNA profil çalışmaları bu bakterinin *S. salivarius* alttürü *thermophilus* 'undan fizyolojik özellikleri bakımından birçok farklılıkların olduğu bulunması ile *S. thermophilus* yeni bir tür olarak sınıflandırılmıştır (7).



Şekil- 3: *S. thermophilus* (10)

*S. thermophilus* laktik asit bakterileri grubuna ait termofilik Gram pozitif bakteridir. Yoğurtlarda, İtalyan, İsviçre tipi Mozzarella ve Emmantal peynirlerinde sütü fermente ederek galaktozdan hızlı asidifikasyon ile laktik asit üretiminde görevlidir. Bunun yanında birçok biyoteknolojik olayda şeker metabozlması, proteolitik aktivite ve üreaz aktivitesinde görevlidir. Metabolik aktivitelerin sonunda biyojen amin (triamin, histamin, kadaverin ve putresin) gibi toksik bileşiklerde üretebilir.

#### Genel özellikleri

- Gram pozitif
- Hareketsiz
- Kok: Oval 0.7- 0.9µm büyüklüğünde çiftler halinde veya 10- 20 hücreden oluşan uzun zincirli
- Homofermantatif L (+) laktik asit
- Fakültatif anaerob
- Katalaz negatif
- Gelişme sıcaklığı Optimum 40- 45 °C, minimum 20- 25 °C ve maksimum 50- 52 °C dir.

- 60 °C de 30 dakika ısıya dirençlidir
- % 2 lik NaCl zayıf gelişir ya da gelişmez
- G- C oranı % 37- 40

*S. thermophilus* aynı zamanda fermantasyon aşamasında *S. aureus* ve *L. monocytogenes* gibi patojen bakterilerin üremesini kontrol eden antimikrobiyal maddeler üretmektedir. Antimikrobiyal madde üretiminde ilk sırada thermophilin adında bakteriosin yer almaktadır.

*S. thermophilus* gelişme için monosakkarit ve disakkarit karbonhidratları kullanır. Sınırlı sayılabilecek proteolitik aktiviteye sahiptir. Gelişmesi ve üreyebilmesi için serbest aminoasitlere ihtiyacı vardır. Bu serbest aminoasitler glutamik asit, histidin, sistein, metionin, valin, leusin, izoleusin, triptofan, arjinin ve tirozin grubu aminoasitlerdir. Fakat bunlar sütte başlangıçta sınırlıdır. Süte uygulanan ısı işlemi ve *L. bulgaricus* üremeye başlaması serbest aminoasit miktarı artması ile sonuçlanmakta bu durumda *S. thermophilus* üremesi hızlanmaktadır (7, 40, 41).

### ***Lactobacillus delbrueckii***

Bu grup fermantatif özelliklerine göre kendi içerisinde;

1. Obligat homofermantatif,
2. Fakultatif heterofermantatif,
3. Obligat heterofermantatif

laktobasiller olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Birinci ve ikinci gruptaki birçok laktobasil ve üçüncü gruptan pek azı gıda fermantasyonunda önemli rol oynamaktadır. Üçüncü grupta yer alan laktobasillerin çoğu gıdaların bozulmasında önemli rol oynayan mikroorganizmalardandır.

*L. delbrueckii*, obligat homofermantatif laktobasil grubu içinde yer almaktadır. Bu grup da yer alan 4 tür bulunmaktadır. Bunlar *L. delbrueckii* alttür *delbrueckii*, *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus*, *L. delbrueckii* alttür *lactis* ve *L. delbrueckii* alttür *inducus* dur. *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus*, *L. delbrueckii* alttür *lactis* ile DNA ları %80 oranında benzemektedir (7, 21). Bu dört tür içinde *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* ve alttür *inducus* laktoz, glukoz, fruktoz ve mannoz şekerleri kullanırken, *L. delbrueckii* alttür *lactis* galaktoz, sukroz, maltoz, trehaloz ve diğer karbonhidratları da kullanabilirler (42).

Tablo- 6: Laktobasil cinsinin fenotipik karakterizasyonuna göre sınıflandırma (21).

Grup 1	Grup2	Grup3
<b>Obligat homofermantatif</b>	<b>Fakültatif heterofermantatif</b>	<b>Obligat heterofermantatif</b>
<i>Lb.acidophilus</i>	<i>Lb.acetotolerans</i>	<i>Lb.brevis</i>
<i>Lb.amylophilus</i>	<i>Lb.agilis</i>	<i>Lb.buchneri</i>
<i>Lb.amylovorus</i>	<i>Lb.alimentarius</i>	<i>Lb.collinoides</i>
<i>Lb.aviarius subs.araffinosus</i> <i>subs.aviarus</i>	<i>Lb.bifermantas</i>	<i>Lb.fermentum</i>
<i>Lb.crispatus</i>	<i>Lb.casei</i>	<i>Lb.fructivorans</i>
<i>Lb.delbrueckii subs. Bulgaricus</i>	<i>Lb.coryniformis subs.</i> <i>Coryniformis</i>	<i>Lb.fructosus</i>
<i>Lb.delbrueckii subs.lactis</i>	<i>Lb.coryniformis subs torguens</i>	<i>Lb.hilgardii</i>
<i>Lb.farciminis</i>	<i>Lb.curvatus</i>	<i>Lb.kefir</i>
<i>Lb.gallinarum</i>	<i>Lb.graminis</i>	<i>Lb.malefermentans</i>
<i>Lb.gasseri</i>	<i>Lb.hamsteri</i>	<i>Lb.oris</i>
<i>Lb.helveticus</i>	<i>Lb.homohiochii</i>	<i>Lb.panis</i>
<i>Lb.jensenii</i>	<i>Lb.intestinalis</i>	<i>Lb.parabuchneri</i>
<i>Lb.johnsonii</i>	<i>Lb.murinus</i>	<i>Lb.parakefir</i>
<i>Lb.kefiranofacies</i>	<i>Lb.paracasei subs. paracasei</i>	<i>Lb.pontis</i>
<i>Lb.kefirgranum</i>	<i>Lb.paracasei subs.tolerans</i>	<i>Lb.veuteri</i>
<i>Lb.mali</i>	<i>Lb.paraplantarum</i>	<i>Lb.sanfrancisco</i>
<i>Lb.ruminis</i>	<i>Lb.pentosus</i>	<i>Lb.suebicus</i>
<i>Lb.salivarius subs. Salicinus</i>	<i>Lb.plantarum</i>	<i>Lb.vaccinostercus</i>
<i>Lb.salivarius subs.salivarius</i>	<i>Lb.rhamnosus</i>	<i>Lb.vaginalis</i>
<i>Lb.sharpeae</i>	<i>Lb.sake</i>	

#### Genel özellikleri

- Gram pozitif, hareketsiz
- Uçları yuvarlanmış çubuk 2– 9µm, tek yada 3– 4 hücreden oluşan zincir şeklinde



Şekil- 4: *L.bulgaricus*

- Laktik asit D(-) % 1.8 oranında
- Fakültatif anaerop oksijene karşı oldukça duyarlı
- Katalaz negatif

- Gelişme sıcaklığı Optimum 42- 43 °C, minimum 22 °C ve maksimum 50- 55 °C. dir.
- Laktoz, fruktoz ve glikozu fermente eder
- G-C oranı % 49- 51
- Gelişimi için Ca pantotenat, niasin, riboflavin ve B kompleks vitaminlerine ihtiyaç duymaktadır (7, 21, 43, 44).

## **Laktik Asit Bakterilerinde İdentifikasyon Yöntemleri**

### **Fenotipik Yöntemler**

Geleneksel fenotipik yöntemler arasında laktik asit bakterilerinin morfolojik yapı, fizyolojik özellikleri, metabolik yapı ve biyokimyasal özelliklerden yararlanılmaktadır. Fenotipik özelliklerin ortaya çıkarılması için farklı pH, sıcaklık, tuz konsantrasyonunun da gelişme ve glikozdan gaz üretimi gibi fizyolojik testler cins identifikasyonunda kullanılmaktadır. Karbonhidrat fermantasyonu gibi biyokimyasal testler API CHL50 gibi ticari amaçlı hazırlanmış kitler fenotipik yöntemler olarak kullanılmakta ve tür bazında ayırımı sağlayabilmektedir (45). Bu fenotipik yöntemler bakteri identifikasyonunda kullanılsa bile moleküler teknikler kullanılmadan yapılan identifikasyon tür bazında tanımlamada yeterli gelmemektedir. Laktik asit bakterilerinden yoğurt bakterilerinin fenotipik identifikasyonunda; hücre morfolojileri, hücre duvarı özellikleri (Gram -, +), katalaz testi, glikozdan gaz oluşturma yeteneği, farklı sıcaklık ( 10- 15- 45 °C de), tuz konsantrasyonunda (% 2- 4- 6.5 ) ve pH (4.5- 6.5) derecelerinde üreme yetenekleri, sitrat kullanımı ve karbonhidratları fermente testleri ( L (+) arabinoz, D (+) galaktoz, laktoz, maltoz, mannitöz, raffinoz, sukroz, D (-) salisilin, sorbitol, D (+) trehaloz, D (+) ksiloz, gliserol , D (+) mannoz, D (-) riboz, melibiyoz, melesitoz, glukoz, fruktoz, ve rhamnoz ) uygulanmaktadır (46, 47).



Tablo- 7: *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus*. identifikasyon tablosu (48).

Fenotipik testler	<i>L. bulgaricus</i>	<i>S. thermophilus</i>
Hücre morfolojisi	Basil	Kok
Gram Boyama testi	+	+
Katalaz test	-	-
10°C de üreme	-	-
15°C de üreme	-	-
45°C de üreme	+	+
% 2 NaCl üreme	+	-
% 4 NaCl üreme	+, -	-
%6,5 NaCl üreme	-	-
Glikozdan gaz	-	-
pH: 4,5	+	+
pH: 6,5	+	+
sitrat kullanımı	-	-

*L. delbrueckii* alttürlerinin biyokimyasal ayırımına ilişkin tablo- 8’de bulunmaktadır.

Tablo- 8: *Lactobacillus delbrueckii* fenotipik ayrıştırılması (7)

Fenotipik testler	<i>L.delbrueckii ssp.bulgaricus</i>	<i>L.delbrueckii ssp.lactis</i>	<i>L.delbrueckii ssp.delbrueckii</i>
NH <sub>3</sub> den arginin	-	A	A
Celobiyos	-	A	A
Galaktoz	-	A	-
Laktoz	+	+	-
Maltoz	-	+	A
Mannitol	-	-	-
Mannoz	-	+	+
Mellibioz	-	-	-
Raffinoz	-	+/-	-
Salisin	-	+	-
Sukroz	-	+	+
Trehaloz	-	+	A
Fruktoz	+	+	+
Glikoz	+	+	+
Sorbitol	-	+/-	+/-
Esculin	+/-	+/-	-

\*(+) :%90 pozitif, (-) : %90 negatif, (A) 11-89% pozitif

Laktik asit bakterilerinin identifikasyonu için yapılan çalışmaların çoğunda moleküler düzeyde yapılan identifikasyon yöntemleri, yüksek oranda tanımlama yapabilese bile, klasik identifikasyon yöntemleri ile beraber kullanılmıştır. Bu fenotipik yöntemlerde tür bazında tanımlamada tek başına yeterli değildir. Bu amaçla moleküler yöntemlerin kullanılmasını zorunlu haline gelmiştir (45).

## **Moleküler Yöntemler**

Hücrenin genetik yapısının analizini temel alan yöntemlerdir. DNA temelli yöntemler, kullanılan tekniğin tipine bağlı olarak mikroorganizmaların cins seviyesinden suş seviyesine kadar tanımlanmasını sağlamaktadır. Laktik asit bakterilerinin identifikasyonunda kullanılan değişik moleküler teknikler vardır.

Prokaryotlarda rRNA'yı kodlayan 16S, 23S ve 5S olmak üzere 3 gen bölgesi bulunmaktadır. Bunlar ara bölgelerle ayrılmakta ve sekansta, hem cins hem tür seviyesinde uzunluk açısından çeşitlilik göstermektedir. 16S ve 23S rRNA bölgeleri yüksek derecede korunmuş dizileri içeren bölgelerdir. Bu bölgelere özgü primerler kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirilerek sekanslama işlemi neticesinde sonuca gidilebilir.

Bu bölgelerin yanında bazı spesifik genlere özgü geliştirilmiş primerler vasıtasıyla da tanımlamalar yapılabilmektedir.

DNA dizi analiziyle bakteriyel DNA'daki farklılıkların ayrımı mümkündür. İzolatların ayrımı için DNA sekanslamanın kullanılması en ideal yol olarak görülmesine rağmen, her izolatın tüm genomunun sekanslanması pratik değildir. 16S rRNA sekanslarının veri bankaları oluşturulmuştur ve bu sekansların karşılaştırılması tanımlanmasına olanak sağlamamaktadır (49, 50).

Ayrıca elde edilen izolatların tür ve daha alt düzeyde suş seviyesinde de tanımlanmasında kullanılan farklı teknikler mevcuttur.

## **1.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Temelli Olmayan Moleküler Yöntemler**

### **a) Dalgalı Alan Jel Elektroforezi (PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis)**

Moleküler tiplendirme yöntemlerinin en başarılısı olarak kabul edilen yöntemde sıvı veya katı besiyerinde üretilen bakteriler, düşük erime ısıyla agarozla karıştırılıp küçük kalıplar içine dökülmektedir. Agaroz içine karıştırılan bakteri hücreleri, deterjan ve enzim yardımıyla parçalanarak DNA izolasyonuna tabi tutulmaktadır. Lizis işlemini takiben

agaroz kalıpları iyice yıkanarak veya diyalize edilerek protein ve karbonhidrat gibi kontaminantların uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Kromozomal DNA agaroz jel içinde tutulu kalmaktadır. Agaroz içindeki bakteriyel DNA nispeten az sayıda ve büyük parçalar oluşturan bir restriksiyon enzimi ile kesime uğratılmaktadır. Kesime uğratılmış DNA parçaları bulunan kalıplar, elektroforez uygulanacak jel içindeki uygun çukurlara yerleştirilmekte ve belli aralıklarla yönü değiştirilen elektrik akımına tabi tutulmaktadır. Bu tip bir elektrik akımı 10-800 kb'lık DNA fragmanlarının net olarak ayırt edilmesini sağlamaktadır. Elektroforez sonucunda jel etidyum bromürle boyanarak her bir izolata ait bant profili görünür hale getirilmektedir. Bu bant profilleri bilgisayar programları yardımıyla değerlendirilerek suşların birbiriyle ilişkileri ortaya konulmaktadır.

#### **b) Ribotiplendirme (Ribotyping):**

Ribotiplendirmede total genomik DNA bir restriksiyon enzimi ile daha küçük fragmentlere parçalanmakta ve bu parçalar jel elektroforeziyle birbirinden ayrılmaktadır. Fragmentler jelden bir membrana transfer edilmekte ve ribozomal 16S ve 23S rRNA'yı kodlayan genlerin korunmuş bölgelerine spesifik işaretlenmiş evrensel bir proba hibridizasyona tabi tutulmaktadır. Hibridizasyondan sonra fragmentleri göstermek için problemlerin hibridize olduğu yerde probdaki işaret gözlenmektedir. Ribotip denilen bu bantlar, referans bir tür veri bankasıyla karşılaştırılarak izolatların tanımlanması için kullanılabilir. Bu yöntem laktik asit bakterilerinin tür bazında identifikasyonunda en çok kullanılan yöntemlerdendir.

#### **c) Plazmid Profil Analizleri:**

Plazmid profilleri bakteriyel tiplendirme için yardımcı analizler olarak kullanılmaktadır. Aynı türe ait olan suşların sahip oldukları plazmidlerin sayısı ve büyüklüklerindeki varyasyonları olarak bilinen plazmid profili analizi, laktik asit bakterilerin tiplendirilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Plazmid profilleri bakterilerin fermantasyon aşamasında kaybolma ihtimalinin olmasından dolayı tür bazlı identifikasyonda bu yöntemde de problemler ile karşılaşmaktadır.

#### **d) Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism):**

Bu yöntemde kromozomal DNA izole edilmekte ve restriksiyon enzimiyle muamele edildikten sonra oluşan fragmentlerin agaroz jelde ayrımı yapılmaktadır.

## 2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Temelli Moleküler Yöntemler

Tür ve tür içi seviyede yüksek ayırım gücü tercih edildiğinde PZR temelli moleküler parmak izi tekniklerinin daha yüksek potansiyele sahip oldukları düşünülmektedir.

### a) Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RFLP-PZR):

Hızlı bir yöntemdir. Genomdaki hedef bölgeler, spesifik primerlerin kullanımıyla çoğaltılmakta ve daha sonra restriksiyon enzimiyle kesilmektedirler. Elde edilen restriksiyon fragmentleri, agaroz jel elektroforezi neticesinde ayrılmakta ve karşılaştırılmaktadır. Bu yöntemde hedef bölgenin önceden bilinmesi gerekmektedir. Bu durum teknik açısından bir dezavantajdır. Bu nedenle genellikle evrensel primerler kullanılmaktadır.

### b) Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-PZR (RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA- PCR):

RAPD parmak izi analizi laktik asit bakterilerinin tür içi ve türler arası ayırımında son zamanlarda oldukça yaygın olarak kullanılan PZR-temelli bir tekniktir. RAPD markörleri, küçük (10 baz), %50'den çok guanin ve sitozinden meydana gelmiş, rastgele seçilmiş primerler tarafından PZR ile çoğaltılmış nispeten daha kısa DNA fragmentlerinden (yaklaşık 200–2000 baz çifti uzunluğunda) oluşmaktadır. Bu yöntemde bilinen özgül bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine, rastgele seçilen bir veya daha fazla primerle DNA'daki birçok bölgenin çoğaltılması gerçekleştirilmektedir. Bu sistemle, genom dizisi hakkında hiçbir şey bilinmeyen DNA'lar çalışılmaktadır. Primer bağlanmasıyla, polimeraz enzimi 5'→3' yönünde çalışarak DNA moleküllerini çoğaltılmakta ve bunlar agaroz jel veya poliakrilamid jel elektroforezi ile birbirinden ayrılıp uygun boyalarla boyanarak izlenebilmektedir. Amplifikasyon sonucunda jel elektroforezinde gözlenen her bir izolata ait bant profilleri birbirleriyle karşılaştırılmaktadır. Aynı bant profili gösteren izolatlar filogenetik olarak ilişkili şeklinde yorumlanabilmektedir. Bant profilleri benzer olan izolatlar yeni primerlerle tekrar test edilmeli veya diğer tiplendirme yöntemleriyle çalışılmalıdır. Laktik asit bakterileri türler arası ayırımında, bazı türlerin (*Enterococci*, *Pediococci* ve *Lactobacilli*) tür içi ayırımında ve gıdalardan izole edilen suşların genus bazında ayırımında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

**c) oğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi (AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism):**

Genellikle birbirine yakın türlerin karakter analizlerinde kullanılan AFLP sonuçları günümüzde bakteriyel taksonomiye açıklamakta ve sonuçları DNA-DNA hibridizasyonu gibi teknikler ile desteklenmektedir. Laktik asit bakterilerinin tür ve tür içi tanımlamada en çok kullanılan tekniktir.

**d) Tekrarlanan Palindromlara dayalı PZR (Rep-PZR: Repetitive Extragenic Palindrome PCR):**

Bakteri DNA'sı içerisinde sürekli tekrarlayan elementler bulunmaktadır. Versalovic ve arkadaşları 1994'de, bakteriyel parmakizi için bakteriyel genomların içinde bulunan bu tekrarlanan DNA elementlerinin PZR ile amplifikasyonundan elde edilen spesifik bantların incelenmesiyle yapılan bir tiplendirme yöntemi tanımlamıştır. Rep-PZR çoğu bakterinin genomunda birçok kopyasının doğal olarak bulunduğu, oldukça korunmuş ve tekrarlanan DNA sekanslarının amplifikasyonu üzerine kurulmuş bir genomik parmakizi tekniğidir

**e) PZR Ribotiplendirme**

**1.oğaltılmış rDNA Geni Restriksiyon Analizi (ARDRA: Amplified rDNA Restriction Analysis):**

Temeli 16S rDNA bölgesinin çoğaltılması esasına dayanan PZR-RFLP esaslı bir yöntem olan ARDRA'da 16S rDNA genleri evrensel primerler veya tür spesifik primerler kullanılarak 16S rDNA bölgesi çoğaltılmaktadır. Daha sonra yine spesifik restriksiyon enzimlerin kullanımı ile amplifiye edilen bölgeler kesilmektedir. Sonuçta oluşan fragmentler agaroz jelde görüntülenerek karşılaştırmalı olarak sınıflandırmaya tabi tutulmaktadır.

**MALDI-TOF MS (Ktle Spektrometrisi)**

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında mikroorganizmaların rutin identifikasyonunda MALDI-TOF MS teknolojisinin kullanımı yeni bir dönemin kapılarını açmaktadır. Geleneksel olarak kullanılan fenotipik identifikasyon ile birçok bakterinin kesin tanısı çok büyük bir oranda yapılabilmektedir, ancak bu yöntemin maliyetleri çok yüksektir ve uzun bir zaman gerekmektedir. Otomatizer (PCR) sistemler kullanıldığında bile identifikasyon spektrumu kısıtlıdır, mikroorganizmanın Gram pozitif/negatif zellikleri, Enterobacteriaceae, Neisseria, Haemophilus grubu gibi ayırımların önceden belirlenmesi gerekmektedir. Genotipik identifikasyon ise, özel bazı mikroorganizmalarla sınırlı kaldığı

ve pahalı olduğu için rutin laboratuvar çalışmalarına uygun değildir. Rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında MALDI-TOF MS teknolojisinin mikroorganizmaların rutin identifikasyonunda kullanılmaya başlanması devrim niteliğindedir. Bu metodolojide, mikroorganizmaların protein yapılarının kütle spektrofotometresinde iyonizasyonu ve ölçülen m/z değerlerine göre elde edilen spektraların grafiksel görüntülerinin sistemin veri tabanındaki referans organizmaya uyumuna göre mikroorganizmaların cins ve türleri identifiye edilmektedir. Bu teknoloji ile katı besiyerlerinde izole koloniler oluşturularak üretilmiş aerobik ve anaerobik bakteriler, mayalar ve mikobakteriler hem 1-2 saat gibi çok kısa bir süre içinde hem de çok geniş bir yelpazede cins ve çok büyük çoğunlukla tür düzeyinde doğru olarak identifiye edilebilmektedir (51, 52).

### **Laktik Asit Bakterilerinin Teknolojik özellikleri**

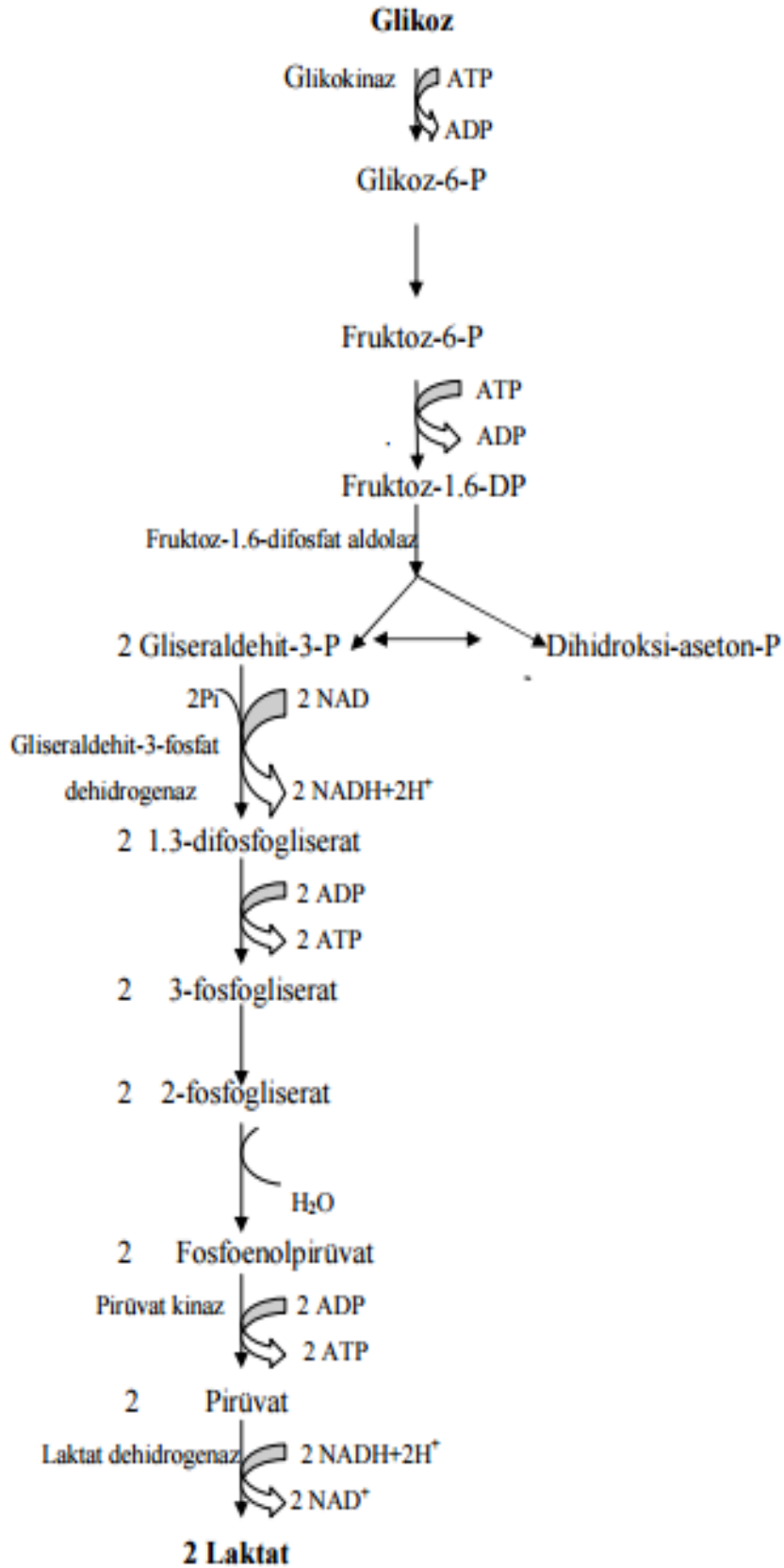
#### **Laktik Asit Bakterilerinde Laktoz Fermantasyonu**

Laktik asit bakterileri laktozu önce glikoz ve galaktoz olan monosakkaritlere yıkımlamaktadır. İkinci aşamada glikoz ve galaktozun laktik aside dönüşümü gerçekleşir. Laktik asit bakterilerinin elektron transport sistemleri yoktur. Enerjilerinin karbonhidratların oksidasyonları sırasında fosforilasyon ile elde ederler. Laktik asit bakterileri glikozu içerdikleri enzim sistemlerine göre Fruktoz difosfat (FDF) veya Hezoz-monofosfat (HMF) yollarına göre katalize etmektedirler. Laktozu iki farklı yolla katabolize ettiklerinden dolayı son ürünlerde farklılıklar görülmektedir. Bu farklılıklardan dolayı laktik asit bakterileri laktozu fermante etme özelliklerine göre başlıca iki gruba ayrılmaktadırlar. Bu gruplar; homofermantatif laktik asit bakterileri ve heterofermantatif laktik asit bakterileridir. Homofermantatif laktik asit bakterileri fermantasyon sonucu % 99 oranında laktik asit ve % 1 oranında diğer maddeler oluştururken, heterofermantatif laktik asit bakterileri, laktik asit, asetik asit, etanol ve karbondioksit gibi karışık son ürünler oluştururlar (32).

Homofermantatif laktik asit bakterileri heksoizomeraz (glikoz fosfat izimeraz) ve aldolaz enzimine sahipken, fosfoketolaz enzimi içermezler. Glikoliz için Embden-Mayerhoff- Parnas metabolik yolunu izleyerek bir molekül glikozdan iki molekül laktik asit üretirler. Heterofermantatif laktik asit bakterileri ise heksoizomeraz ve aldolaz enzimi yerine 6 karbonlu şekeri (hezoz), 5 karbonlu şekerlere (pentoz) dönüştüren ve bu esnada

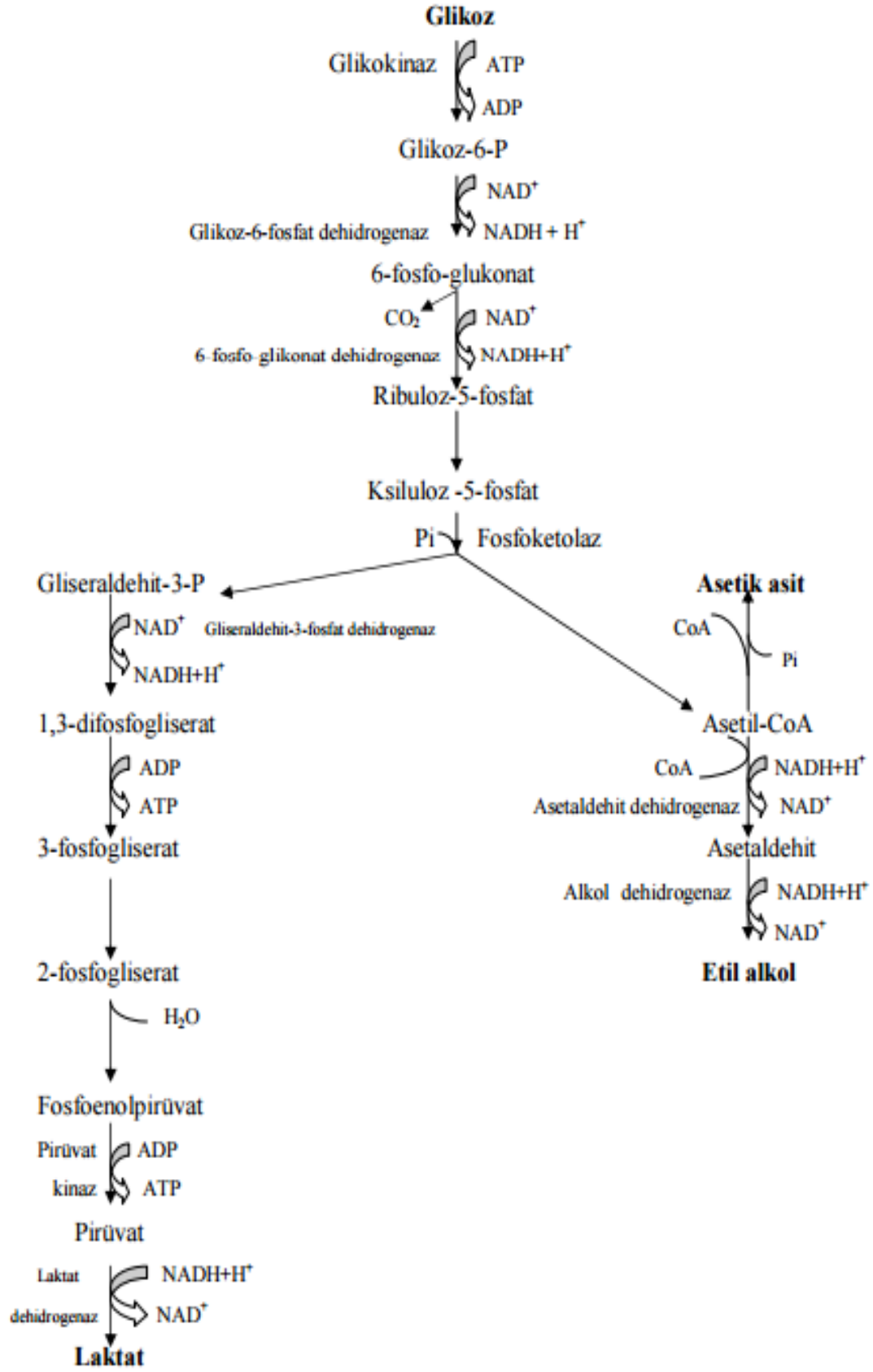
da aldehit ve diasetil gibi aroma bileşiklerinin oluşmasını sağlayan fosfoketolaz enzimine sahiptirler. Bu gruba giren laktik asit bakterileri glikoz yıkımında EMP metabolik iz yolu yerine fosfoketolaz glikolitik izyolunu kullanırlar. Şekil- 5' de laktik asit bakterilerinin laktoz fermantasyonunda izledikleri iki yol gösterilmektedir (32, 40).

Yoğurt bakterileri olarak isimlendirilen *S. thermophilus* ve *L. delbruechii* alttür *bulgaricus* her ikisinde homofermantatif laktik asit bakterileridir. Laktozdan laktik asit üretirler. Laktozu hücre içinde D- glukoz ve  $\beta$ -D- galaktoza hidrolize eden  $\beta$ -D- galaktozidaz enzimine sahiptirler. Bunun dışında  $\beta$ -P-gal adlı ikinci bir enzim bulundururlar. Bunlardan  $\beta$ -D-galaktozidaz enzim aktivitesi daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu enzimlerin etkinliğiyle laktoz hücre içinde D-glukoz ve  $\beta$ -D galaktoza daha sonra galaktoz 6P' a ardından da her iki bakteride bulunan laktat dehidrojenaz enzimi etkisiyle pirüvik asit üzerinde laktata dönüşür. Laktik asitin ikinci karbon (C) atomunun farklı bağlanışlarına göre L (+), D (-) türde laktik asit formları oluşmaktadır. *S. thermophilus* L (+), *L. delbruechii* alttür *bulgaricus* ise D (-) formda laktik asit üretirler. Yoğurt pıhtısının oluşumu sırasında oluşan asiditenin etkisiyle kazeinat partiküllerinin stabilizasyonu bozulur; kalsiyum ve fosfat kazein kompleksinden ayrılır ve % 82 den fazlası çözünür duruma geçer. Kazeinde oluşan (+) yüklü gruplar ( $\text{NH}_3^+$ ), mevcut (-) yüklü gruplarla ( $-\text{COO}^-$ ) birleşerek pıhtı şekillenir (53).



Şekil- 5: Homofermantatif laktik asit fermantasyonu (10)





Şekil- 6: Heterofermantatif laktik asit fermantasyonu (10)

## Laktik Asit Bakterilerinin Proteolitik Özellikleri

Laktik asit bakterilerinin süte aşılmasından sonra proteaz enzimlerinin etkisiyle kazeinin polipeptid ve oligopeptidler üzerinden serbest aminoasitlere kadar proteinleri parçalama olayına proteoliz denir. Proteolitik aktivite, hem starter kültürlerin asit oluşturma fonksiyonu hem de ürünün duyuasal nitelikleri açısından önemlidir. Laktik asit bakterileri gelişebilmeleri için ortamda bazı serbest aminoasitlerin bulunmasına gerek duymaktadırlar. *Streptococcus* türleri, ekstrasellüler proteinaz enzimiyle özellikle hücre zarına bitişik olan kazeini peptidlere parçalayarak ihtiyaç duydukları serbest aminoasitleri oluştururlar. Bu peptitler, bakteri hücresi tarafından alınır ve intrasellüler olarak hidrolize edilirler. Laktik asit bakterilerinde bulunan proteolitik enzimler peynir aromasının ve peynirin elastik kırılabilir yapıya dönüşmesi için gereklidir. Peynirde proteolitik aktivite aynı zamanda ikincil floranda gelişmesini desteklemektedir. Tereyağı ve bazı ürünlerin kokusunun oluşmasında etkili olduğu görülmüştür. Proteolitik aktivitenin hızında pH ve ısının etkili olduğu görülmüştür (54).

Yoğurta ise proteolitik aktivite bakterilerin logaritmik gelişme fazında oluşmaktadır. *S. thermophilus*' un yalnızca endosellüler enzim ürettiği, *L. bulgaricus*' un ise endosellüler ve az miktarda ekzosellüler enzim ile proteolitik aktiviteyi gerçekleştirmektedir. Ekzosellüler enzimlerle proteinlerin, küçük parçalara ayrılarak hücre içine daha fazla serbest aminoasit girmesini sağlamaktadır (55). Yapılan araştırmalarda, yoğurt bakterileri arasında laktik asit üretimi ve proteolitik aktivitenin cins, tür ve alttürler arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

Yoğurttaki proteolitik aktivite belirli düzeyde olması durumunda yoğurdun yapı ve kıvamını düzelttiği, asit üretimini teşvik ettiği ve yoğurdun sindirilebilirlik özelliğini arttırdığı bildirilmektedir. Aynı zamanda bu iki bakteri arasındaki simbiyotik ilişkinin en önemli basamağı proteolitik aktivitedir. *S. thermophilus*, proteince zengin ortam olan sütte sınırlı proteolitik yeteneğe sahiptir. Bu bakteri nitrojen kaynağı olarak sütte doğal olarak bulunan ve sıcaklık uygulaması nedeniyle ortama salınan serbest aminoasitlerinden yararlanır. Ancak glutamik asit, histidin, sistin, metionin, valin ve lösin gibi aminoasitler sütte *S. thermophilus*' un gelişimini sağlayacak seviyede değildir. Bu eksikliği daha kuvvetli proteolitik yeteneği olan *L. bulgaricus* giderir. *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*' un farklı olarak kazeini özellikle  $\beta$ -kazeini, partiküle bağlı proteinaz enzim sistemi ile polipeptidlere hidrolize etmektedir. Polipeptid ve oligopeptidler üzerinden proteolitik

aktivite proteinlerin serbest aminoasitlere kadar parçalanarak *S. thermophilus* gelişimi için ihtiyaç duyduğu serbest aminoasit miktarını artırarak ve aroma oluşumunu teşvik etmektedir (56). Ancak protolitik aktivitesi yüksek olan suşlardan elde edilen yoğurtlarda acı tat oluşumu gözlenmektedir (55, 57).

### **Laktik Asit Bakterilerinde Bakteriyoliz**

Bakteriyel otoliz, bakterinin çevresel iskeletini oluşturan ve bakteriye şeklini veren hücre duvarının ana bileşeni olan peptidoglikan tabakasının yine bakteri tarafından üretilen hücre içi endojen hidrolitik enzimler vasıtası ile yıkımlanmasıdır. Bu enzimler peptidoglikan üzerinde bölgesel olarak gerçekleştirdikleri ve hidroliz neticesinde açığa çıkardıkları serbest parçacıklara göre;  $\beta$ -N-asetilmuramidaz,  $\beta$ -N-asetilglukozaminidaz, N-asetilmuramil-L-alanin amidaz ve peptidazlar şeklinde sınıflandırılırlar. Laktik asit bakterilerinde bakteriyoliz süt endüstrisinde hayati bir öneme sahiptir. Bu bakterilerin özellikle peynirlerin olgunlaşma sürecinde bakteriyoliz neticesinde açığa çıkan hücre içi enzimler olgunlaşma süresinin kısılmasını sağlamak ve istenen aromatik niteliklerin gelişimini arttırmaktadır. Yoğurtta ise yoğurt bakterilerinin aşırı derecede çoğalmasını engellemektedir (58, 59). Yoğurt bakterilerinde bakteriyoliz oranı ile yapılan çalışmada yoğurt kalitesi üzerine etkili olduğu görülmüştür. Yüksek otoliz oranına sahip suşlardan elde edilen yoğurtlarda laktik asit üretimi, pıhtılaşma zamanı, viskozite, su tutma kapasitesi, aroma bileşiklerinin oluşumu ve raf ömrü gibi kalite niteliklerini az yada çok etkilediği görülmüştür. Özellikle yüksek otoliz oranına sahip suşlarda laktik asit üretimi negatif yönde etkilemekte ve bu durumda yoğurtta pıhtılaşma zamanının uzamasına neden olmaktadır. Yoğurt bakterilerinin bakteriyolizi su tutma kapasitesinde, viskozitede ve aroma bileşiklerinin oluşumu üzerine çok etkili olmadığı görülmüştür. Yoğurt 10- 15 °C de muhafazası sırasında bakteriyoliz oranında azalma görülmüştür (60). Yapılan çalışmalarda düşük bakteriyoliz oranına sahip yoğurt bakterilerinin belirlenerek yoğurt endüstrisinde kullanılması yoğurt inkubasyon zamanının kısılmasına ve pıhtılaşmanın istenilen düzeyde oluşmasına olanak sağlayacaktır (61).

## Laktik Asit Bakterilerinde Antibiyotik Dirençliği

Antibiyotiklerin keşfi ile neredeyse eş zamanlı olarak, mikroorganizmaların bu ilaçlara karşı direnç kazanabileceği ve gerekli önlemlerin alınmaması durumunda mevcut antibiyotiklerin enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde etkisini kaybedeceği, dolayısıyla insanlığın antibiyotik öncesi dönemle yeniden karşılaşabileceği öngörölmüştür. Bakteriler, çevrelerinde meydana gelen değişikliklere hızlı uyum sağlayabilen canlılardır. Antibiyotik direnci de bunun bir örneğidir. Bakteriler, fermante gıda ürünlerinin oluşmasında kendi genetik kapasitelerine (kromozomal) ilave olarak dışarıdan kazandığı özelliklerle de (plazmit) etkili olmaktadır. Plazmitler, birçok tekstür oluşturan önemli metabolitleri kodlayan genleri taşıyabilmektedir. Aroma oluşturan enzimlere için gen taşırken ayrıca antibiyotiklere karşı direnç oluşturacak kodları da taşır ve naklederler. Laktik asit bakterilerinin birçok türü doğal olarak plazmit taşırlar. Bu bakteriler çeşitli gıda ürünlerinde diğer bakteriler ile karşılaştığında plazmid transferi ile potansiyel direnç taşıyıcı ve aktarıcı olarak etki gösterirler (62).

Son 60 yıldır biyosfere 1-10 milyon ton antibiyotik bırakılmış olduğu tahmin edilmektedir. Bu durum, dirençli suşların ortaya çıkmasında güçlü bir baskı oluşturmaktadır. Dünyada, antibiyotiklere karşı mikroorganizmaların direnci insanda ve veteriner ilaçlarında önemli bir problemdir. Genellikle, antibiyotik kullanımının yayılımı antibiyotik dirençlerindeki artış için temel risk faktörü olduğu kabul edilmektedir. Hücre duvarı sentez inhibitörü yönüyle laktobasiller genellikle penisilinlere (piperasilin ve ampisilin) ve  $\beta$ -laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır, fakat oksasilin ve sefalosporin (sefoksitin ve seftriakson) için dirençlidir. Çoğu laktobasil genel olarak aminoglükosid'lere (neomisin, kanamisin, streptomisin ve gentamisin) oldukça dirençli, tetrasiklin klindamisin, eritromisin, kloramfenikol gibi protein sentezini inhibe eden antibiyotiklere duyarlıdır. Laktobasiller genellikle nükleik asit sentezini engelleyen enozasin, pefloksasin, norfloksasin, nalidiksik asit, sulphamethaksazol, trimethoprin, co-trimoksazol ve metronidazole dirençlidir (39).

Çin'de yoğurt ve sebzelerden izole edilen 53 laktik asit bakterisine streptomisin, ampisilin, eritromisin, tetrasiklin ve vankomisin dirençlikleri disk difüzyon testi uygulanmış, laktik asit bakterilerinin tamamının streptomisine, 37 tanesinin vankomisine, 7 tanesinin eritromisine ve tetrasikline ve 6 tanesinin ampisiline dirençli oldukları rapor edilmiştir. Yine aynı çalışmada izole edilen 9 tane *S. thermophilus* izolatının tamamının

ampisilin, tetrasikline ve vankomisine dirençli olduğu görülmüştür (63). Çin de yapılan diğer bir çalışmada Çin'nin çeşitli bölgelerinden ev yapımı yoğurtlardan 43 tane yoğurt bakterisi izole edilmiş bunlardan 18 tanesi *L. bulgaricus* ve 23 tanesi *S. thermophilus* olarak identifikasyonu yapılarak 11 antibiyotiğe karşı direçlilikleri bakılmıştır. Sonuç olarak farklı oranlarda direçlilik saptanmıştır (64). Hindistan'da yapılan çalışmada *L. bulgaricus*'un 31 suşu sulfonamid, sulfametozaksol, kolimksin, trihorpim, polimiksin B, neomisin nalidiksik asid, mikosatin'e direnç göstermiştir. Streptomisin, oksasilin, oleandomisin, novabiosin, furadantin ve kloksasiline karşı duyarlı oldukları, kanamisin ve streptomisin duyarlılıkları değişken *L. plantarum* *L. casei*, *L. salivarius*, *L. leismanii*, *L. acidophilus* gibi çoğu türlerin vankomisine karşı direnç taşımakta oldukları görülmüştür (65).

Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise izole edilen tüm geleneksel süt ürünlerinde bulunan toplam 46 *Lactobacillus* türlerinin % 59'u vankomisine %27'si siprofloksasine, % 27'si gentamisine, % 11'i eritromisine ve % 4'ü tetrasikline direnç gösterdiği saptanmıştır. İzole edilen *Lactobacillus* türlerinin hiçbirinde kloramfenikol, ampisilin, nitrofurantoin ve rifampisin direncine rastlanmamıştır. İzole edilen 10 adet *Streptococcus* suşunun % 40'ının vankomisine, % 30'unun siprofloksasine, % 20'sinin gentamisine ve % 10'unun eritromisin ve kloramfenikole karşı dirençli olduğu saptanmıştır (39). Türkiye'de yapılan başka bir çalışmada çeşitli köy ve kasabalardan toplanan yoğurt örneklerinden 34 tane *S. thermophilus* identifiye edilmiştir. *S. thermophilus*'un büyük bir çoğunluğunun gentamisine (% 79) penisiline G (%64) dirençli, kloramfenikole (% 94) ve tetrasikline (% 88) ise hassas olduklarını rapor etmişlerdir (66).

### **Laktik Asit Bakterilerinde Bakteriofaj**

Laktik asit bakterileri bir çok gıdanın fermantasyonunda aroma, asitlik gelişiminde ve korunmasında kullanılan bakterilerdir. Bu mikroorganizmalar *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *S. thermophilus* gibi en yaygın olarak peynir, yoğurt, tereyağı gibi gıdaların fermantasyonunda kullanılmaktadır. Bakteriofajlar homolog veya heterolog reseptörleriyle bakteriye tutunan ve bakteri hücresinin lizisine neden olan viruslardır. Bakteriofaj sorunları ülkemizde peynir üretiminde sorun olduğu rapor edilmemiş olmasına rağmen, yoğurt üretiminde ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Yoğurt asidifikasyonunda durma, yavaşlama ve asetaldehit üretiminde azalmaya neden oldukları rapor edilmektedir. Buda süt endüstrisinde ciddi ekonomik

kayıpların doğmasına neden olmaktadır. Bu problemlerin önüne geçilebilmesi için tam bir HACCP yönetimi, kültür radyasyonu, faja dirençli laktik asit bakterilerinin kullanımı ve bakteriofaj identifikasyonlarının yapılması gerekmektedir. Laktik asit bakterilerinin bakteriofajlarının bölgesel olarak farklılık göstermesi ve moleküler tanı yöntemleri yeni yeni gelişmesinden dolayı tam olarak identifikasyonu yapılamamıştır. Dünyada ve ülkemizde bu alanda yazılmış makaleler vardır (67- 69).

Çin’de yoğurt örneklerinden 20 adet laktobasil şuşu izole edilmiş izolatlara 16S rDNA genine göre identifikasyon uygulanmıştır. İdentifikasyon sonuçlarında % 98 -99 oranında *L. fermentum* identifiye edilmiştir. Bu 20 adet identifikasyonu yapılmış bakterinin 7 tanesinde lizojenik kaynaklı bakteriofaj tespit edilmiştir (70). İtalya’da yapılan bir çalışmada mozzarella peynirlerinde izole edilen *S. thermophilus*’ların 26’sında bakteriofaj tesbit edildiği rapor edilmiştir (71). Fransa, Almanya ve İsviçre’de 1987 yılında peynir ve yoğurtlardan izole edilen 345 adet ve Kuzey Amerika ve Avrupa’da 110 adet virulent *S. thermophilus* bakteriofajı tesbit edilmiştir (72). Ülkemizde ise 2005 yılında geleneksel yoğurt ve çiğ süttten izole edilen *L. bulgaricus* eksopolisakkarit üretiminin yerli bakteriofaj ve nisin kullanım ile aralarındaki oranlar karşılaştırılmış ve sonuçta bakteriofaj ve nisin varlığının eksopolisakkarit üretimi arasına direk bir bağlantı olduğu görülmüştür (73). Başka bir çalışmada doğal yollardan izole edilen 12 adet ve ticari olarak 1 adet *L. bulgaricus* kendi türüne ait fajlarla test edilmiş ve doğal yollardan izolen edilen 12 adet şuşun tamamı duyarlı olduğu, ticari olarak kullanılan şuşun ise dirençli olduğu görülmüştür (67).

### **Laktik Asit Bakterilerinde Bakteriosin Üretimi**

Gram pozitif bakterilerden olan Laktik asit bakterileri genel olarak *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve *Streptococcus* cinsini kapsamaktadır. Laktik asit bakterilerinin oluşturdukları protein yapısında olan ve bakteriosinler olarak da tanımlanan çeşitli antimikrobiyel maddeler üretmektedirler. Bu maddeler, mikroorganizmalar üzerine öldürücü etki yapmayan, sınırlı sayıdaki bakterilere etkili olan protein yapısında, antogonistik maddelerdir. Laktik asit bakterileri organik asitler, hidrojen peroksit, diasetil, bakteriosin ve benzeri bileşikler üretirler (74). Gıdalarda bulunan birçok mikroorganizma organik asitlere karşı hassastır ve sonuçta düşen pH’ya da direnç gösterememektedir.

Laktik asit bakterileri tarafından aerobik gelişme esnasında üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birçok mikroorganizmanın vejetatif hücreleri ve sporları üzerinde öldürücü etkiye sahiptir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antogonistik etkisi *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas spp.*'de belirlenmiştir.

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ve bakteriosin veya bakteriosin benzeri metabolitler olarak isimlendirilen antimikrobiyal karakterli bu maddeler protein yapısında olup, genellikle kısa zincirli, küçük molekül ağırlığına sahiptirler. Etki spektrumları bazı türlerle sınırlı olup, daha çok Gram pozitif mikroorganizmalar üzerinde etkilidirler.

*L. bulgaricus* tarafından üretilen bulgarisin BB18 ve *Enterococcus faecium* tarafından üretilen enterosin MH3 bakteriosinlerin *Corynebacterium difterium*, *Clostridium difficile*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurum* ve *Candida albicans* türlerine karşı yüksek antimikrobiyal etkisinin olduğu görülmüştür. Özellikle bulgarisin BB18 kuvvetli patojen olan *Helicobacter pylori* üzerinde yüksek inhibitör etkisinin olduğu rapor edilmiştir (75). Yoğurt ve bitkilerden izole edilen *S. thermophilus* tarafından üretilen thermophilin 347 bakteriosinin *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* ve birkaç laktik asit bakteri üzerine bakterisidal etkisi olduğu rapor edilmiştir (76, 77).

Moğolistan'da yoğurtlardan izole edilen *E. faecium* PC4,1 ürettiği enterosin bakteriosinin listeria ve mantar türleri üzerinde antogonist etkisi olduğu rapor edilmiştir (78).

Türkiye'de Aslım ve arkadaşları (79) tarafından 2005 yapılan bir çalışmada geleneksel yöntemlerle üretilen yoğurtlardan izole edilen *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. lactis* ve *L. helveticus* laktik asit bakteri türlerinin tamamı *S. aureus*, *E. coli*, *Yersinia enterocolitica* karşı antimikrobiyal etkilerin olduğunu tespit etmişlerdir.

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen, diasetil, alkol ve CO<sub>2</sub> gibi metabolitlerde bazı mikroorganizmalar üzerine inhibitör etki gösterebilmektedir. Diasetil, diasetil (2,3-bütandion) pirüvattan sentezlenen laktik asit bakterilerinin en son metabolik ürünüdür. Diasetil tereyağı için bilinen en iyi aroma maddesidir. Diasetilin mayalar ve Gram pozitif bakteriler için 200 mg/ml düzeyinde laktik olmayan Gram pozitif bakteriler için 300 mg/ml düzeyinde bakteristatik etkisi olduğu görülmüştür. Reuterin, heterofermantatif *L. reuterii* türü tarafından oluşturulan, düşük molekül ağırlığında, yüksek çözünürlükte bir maddedir. *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* ve *Trypanosoma* cinsleri üzerinde antogonist etkili olduğu rapor edilmiştir (80).

## Laktik Asit Bakterilerinin Doğal Ortamları ve Kullanıldığı Ürünler

Laktik asit bakterileri su ve toprakta çok az bulunmakta, süt, et, hububat ve sebzeler ile bitki artıklarında, memelilerin ağız, bağırsak ve vagina florasında bulunmaktadır (81).

*Streptococcus* türleri; insan, hayvan ve kuşlarda rastlanabilir. *Streptococcus*'lardan N ve D serolojik gruplarına ait belirli türler, bitkilerde bulunmaktadır. Bitkilerdeki *Streptococcus* türlerinin çoğu saprofit, geri kalanlar ise patojen özellik göstermektedirler.

*Lactobacillus* türleri daha çok insan, hayvan ve bitkilerde ve bunların bulunduğu ortamda bulunmaktadırlar. Özellikle insan ve hayvanların bağırsaklarına adapte olmuş türleri vardır (82). Genellikle antimikrobiyel etkileri olduğu, dış plaklarının oluşumunu engellediği, *L. acidophilus*'un fungal kaynaklı vaginitis oluşumunu engellediği ve bağırsaklarda patojen mikroorganizmalar üzerine baskılayıcı etkisinin olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (83). *Pediococcus* türleri bitkilerde bulunurlar aynı zamanda diğer laktik asit bakterileri gibi doğal fermantasyona uğramış bitkisel ve haysansal ürünlerde de bulunmaktadırlar (1, 3, 83).

Laktik asit bakterileri bulunduğu doğal ortamların dışında birçok gıdanın fermantasyonunda da önemli rol oynarlar. Süt ürünlerinde (peynir, yoğurt, tereyağ, kefir, kıymız vs.) bulunan laktik asit bakterileri ürünlere kendine has aroma, koku ve yapı kazandırmaktadır. Örneğin tereyağında oluşturdukları metabolitler sonucu özellikle de diasetil ile yayık yağının aromasını ve kokusunun oluşmasını sağlamaktadır. Ayrıca bu bakterilerin oluşturduğu metabolitler ve bakteriosin yardımıyla bazı patojenlerin inhibisyonu da sağlanmaktadır. Örneğin, kefir florasını oluşturan maya ve laktik asit bakterilerinin enterobakteriler ve bazı patojen bakteriler üzerine inhibitör etkileri olduğu rapor edilmiştir. Ürettikleri laktik asitle ürünün pH'sını düşürerek mikroorganizmaların üremesini engelleyerek bozulmanın önüne geçerler. Yoğurtta bulunan laktik asit bakterilerinin kolesterol düşürücü etkileri olduğu saptanmıştır. Yoğurtta üretilen laktik asit ve yoğurdun sahip olduğu diğer antibakteriyel maddeler, kalın bağırsakta indol ve skatol gibi fenolik bileşikler üreterek canlı dokuya zarar veren ve hatta kanser başlangıcına neden olan bakterilere karşı engelleyici, bağışıklık sistemini güçlendirici, vücudu koruyucu ve kadınlarda hamilelik süresince ve sonrasında kan basıncını düzenleyici etkisi olduğu belirtilmektedir. Bozada baskın olarak bulunan laktik asit bakterileri mayalarla sinerjik bir ilişki içersindedir. Tarhana üretiminde ise kullanılan maya (ilave edilen veya spontan olarak gelişen) ve yoğurt florasından kaynaklanan (*S. thermophilus* ve *L. bulgaricus*)



mikroorganizmaların gelişmesi sonucu meydana gelen laktik asit, etil alkol, CO<sub>2</sub> ile ürüne özgü tat ve aroma sağlamaktadır. Geleneksel Türk içeceği olan şalgam üretiminde kullanılan, içerisinde laktik asit bakterilerini de barındığı ekşi maya (*L. sanfranciscensis*, *L. pontis*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. alimentarius*, *L. fructivorans*, *L. reuteri*, *L. fermentum* ve *Saccharomyces cerevisiae* ve az miktarda *Saccharomyces exiguous*, *Candida krusei* ve *Candida milleri*) dir. Fermantasyonun şalgamın kırmızı renginin oluşumunda da etkili olduğu görülmüştür. Turşularda bulunan laktik asit bakterisi *L. plantarum*'dur. Turşu yapımında salamura konsantrasyonu bu mikroorganizmaya göre ayarlanmaktadır. Turşu üretiminde kontrollü bir fermantasyon sağlanabilmesi için *L. plantarum*'un starter kültür olarak kullanılması gerekmektedir. Laktik asit bakterilerinin fermantasyonda kullanıldığı ürünler ve etkileri tablo- 9'da gösterilmiştir (84).

Tablo- 9: Laktik asit bakterilerinin kullanıldığı ürünler

Ürün	LAB türü	İşlevi
Peynir	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S.cremoris</i> ) <i>L. helveticus</i> ve <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. casei</i> <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>L. dextranicum</i> <i>L. Mesenteroides</i>	Asidifikasyon Aroma
Yoğurt	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> <i>L. lactis</i> <i>ssp. lactis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i> , <i>L. delbrueckii ssp. lactis</i>	Asidifikasyon Aroma
Tereyağı	<i>S. thermophilus</i> , <i>Streptococcus sp.</i> , <i>L.delbrueckii ssp. bulgaricus</i> , <i>L. casei ssp. casei</i> <i>L. paracasei ssp. paracasei</i> , <i>E. faecium</i> <i>L.pseudomesenteroides</i> ( <i>L. mesenteroides ssp.</i> <i>dextranicum</i> ), <i>L. gelidum</i> ( <i>L. mesenteroides ssp.</i> <i>mesenteroides</i> ), <i>Weissella paramesenteroides</i> ( <i>L.</i> <i>paramesenteroides</i> )	Asidifikasyon Aroma
Kefir	<i>L. bulgaricus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>S. durans</i> <i>L. cellobiosis</i> , <i>S. avium</i> , <i>L.</i> <i>cremoris</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> <i>L. kefirgranum</i> , <i>L. parakefir</i> , <i>L.brevis</i> , <i>L. plantarum</i> <i>L. helveticus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L.</i> <i>casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. fructivorans</i> , <i>L. hilgardi</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. viridescens</i> , <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> , <i>S.</i> <i>thermophilus</i> , <i>Leuconostoc spp.</i>	Asidifikasyon Aroma
Kıymız	<i>L. bulgaricus</i> , <i>L. Acidophilus</i>	Alkol Fermantasyonu , Asidifikasyon Aroma
Sucuk	<i>L. plantarum</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L.</i> <i>brevis</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>Lc. lactis subsp. lactis</i> ,	Asidifikasyon Aroma

	<i>L. mesenteroides subsp. mesenteroides/dextranicum, Leuc. lactis, Lactobacillus spp, L. sake, L. viridescens, L. agilis, L. carnis, L. casei subs. Rhamnosus</i>	
Pastırma	<i>L. pentosus ve L. Sakei</i>	Asidifikasyon Aroma
Boza	<i>L. paramesenteroides, L. mesenteroides subsp. mesenteroides, L. mesenteroides subsp. dextranicum, O. oeni L. coryniformis, L. confusus, L. sanfrancisco L.fermentum</i>	Asidifikasyon Aroma
Tarhana	<i>S. thermophilus ve L. Bulgaricus</i>	Aroma
Şalgam	<i>L. sanfranciscensis, L. pontis, L. brevis, L. plantarum, L. alimentarius L. fructivorans, L. reuteri, L. Fermentum</i>	Aroma, Renk oluşumu
Turşu	<i>E. faecalis, L. mesenteroides, L. brevis (L.pentoaceticus), L.plantarum, P.pentosaceus</i>	Asidifikasyon

### Yoğurt Starter Kültürleri

Binlerce yıl önce mikrobiyal olarak bilinmemesine rağmen yoğurt, Orta Asya da evlerde bireysel olarak yapılan bir üründür. Bilimin ilerlemesiyle birlikte geleneksel yoğurdun yapılabilmesi için Gram pozitif çubuk ve yuvarlak morfolojiye sahip *S.thermophilus* ve *L. bulgaricus* adı verilen laktik asit bakterilerinin gerekliliği ortaya konmuştur (85). Yoğurt set tipi ve stirred tipi yoğurt olarak üretilmektedir. Set tipi yoğurtlarda ambalajlarda inkubasyon yapılır ve pıhtı jel parçalanmaz, stired tip yoğurtlarda ise fermantasyon büyük kazanlarda yapılır ve pıhtı jel parçalanarak porsiyonlara bölünür. Stired tipi yoğurtlar pıhtısı parçalandığından pürüzsüz ve yapışkan karakterdedir (86). Sütün yoğurda dönüşmesi sırasında birçok fiziksel, kimyasal, biyokimyasal reaksiyonlar oluşmaktadır. Bu reaksiyonlar yoğurt bakterileri olan *S. thermophilus* ve *L.bulgaricus* 'un laktoz, protein ve yağ gibi besin maddelerini fermente etmeleri ile oluşmaktadır. Fermantasyon reaksiyonlarını dört ana başlıkta toplanmaktadır. Bunlar karbonhidrat metabolizması, proteolizis, lipolizis ve tat ve çeşni maddelerinin oluşumudur (6, 86).

Karbonhidrat metabolizmasında ilk aşama laktozu yoğurt bakterileri olan *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus*'un hücre içine taşınması ile başlamaktadır. Bu aşamada katalizör olarak fosfotransferaz enzimi görevlidir. Bakteri hücresi Laktozu  $\beta$ -D galaktosidaz enzimi ile glikoz ve galaktoza parçalamaktadır (87).  $\beta$ -D- galaktosidaz enzimi *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* bakterilerinde mevcut olan laktoz fosfattan glikoz ve galaktoz-6-fosfat meydana getirir (88). Oluşan glikoz Embden Meyerhof parnas glikolitik reaksiyon zincirine girerek önce pürüvik asit meydana gelmektedir. Oluşan

Pirüvik asit, laktat dehidrojenaz enzimi yardımıyla laktik aside dönüşmektedir. Oluşan laktik asit süt pH'sını 6.7 den 6 daha sonra 6.0 da 5.0 en son olarakta 5.0 – 4.6 altıya düşürmektedir. pH'nın 4.6'ya düşmesi kazein misellerinin izoelektrik noktasını bozarak proteinlerin koagule olmasına ve yoğurt pıhtısının oluşumuna neden olmaktadır (89). Ayrıca laktik asit yoğurtta tipik aromatik ve çeşninin oluşumunda sağlamaktadır. Yoğurtta laktik asit D (-), L (+) ve DL (-+) olmak üzere üç formda bulunmaktadır. *S. thermophilus* L (+) üretirken, *L. bulgaricus* D (-) ve DL(-+) laktik asit üretmektedir. Yoğurt oluşurken L (+), D (-) laktik asit üretiminden daha hızlı olmaktadır. Laktik asit miktar ve oranları yoğurdun inkubasyon sıcaklığı ve süresi, kullanılan starter kültür oranına ve yoğurdun muhafaza süresi ve şartlarına bağlı olarak değişir (6, 89, 90).

Tablo- 10: Laktik asit bakterilerinin sentezledikleri laktik asit konfigürasyonları

Homofermantatif	Laktik asit konfigürasyonu	Heterofermantatif	Laktik asit konfigürasyonu
<b>Laktobasiller</b>			
<i>L. acidophilus</i>	DL	<i>L. brevis</i>	DL
<i>L. bulgaricus</i>	D(-)	<i>L. buchneri</i>	DL
<i>L. casei</i>	DL(+)	<i>L. cellobiosus</i>	DL
<i>L. coryniformis</i>	DL	<i>L. confosus</i>	DL
<i>L. curvatus</i>	DL	<i>L. coprophilus</i>	DL
<i>L. delbrueckii</i>	DL	<i>L. hilgardii</i>	DL
<i>L. jugurti</i>	D(-)	<i>L. fermentum</i>	DL
<i>L. helveticus</i>	DL	<i>L. sanfrancisco</i>	DL
<i>L. jensenii</i>	D(-)	<i>L. trichodes</i>	DL
<i>L. lactis</i>	D(-)	<i>L. viridescens</i>	DL
<i>L. leichmannii</i>	D(-)		
<i>L. plantarum</i>	DL		
<i>L. salivarius</i>	L(+)		
<b>Pediokoklar</b>		<b>Leukonostoklar</b>	
<i>P. acidilactici</i>	DL	<i>Leu. mesenteroides</i>	D(-)
<i>P. cerevisiae</i>	DL	<i>Leu. paramesenteroides</i>	D(-)
<i>P. pentosaceus</i>	DL	<i>Leu. lactis</i>	D(-)
		<i>Leu. gelidum</i>	D(-)
		<i>Leu. carnosum</i>	D(-)
<b>Streptokoklar</b>			
<i>Str. bovis</i>	D(-)		
<i>S. thermophilus</i>	D(-)		

### **Laktokoklar**

<i>L.lactis alttür lactis</i>	D(-)
<i>L.lactis alttür cremoris</i>	D(-)
<i>L.lactis alttür diacetylactis</i>	
<i>L.lactis alttür hordniae</i>	
<i>L.garvieae</i>	
<i>L.plantarum</i>	
<i>L.raffinolactis</i>	

### **Vagokoklar**

<i>V.fluvialis</i>
<i>V.salmoninarum</i>

### **Karnobakteriler**

<i>C.divergens</i>
<i>C.mobile</i>
<i>C.gallinarum</i>
<i>C.piscicola</i>

Süt fermantasyonunda bakterilerin proteolitik aktiviteleri önemlidir. Yoğurt bakterilerinin proteolitik aktiviteleri zayıf olmasına karşın süt fermantasyonunda önemli derecede etki göstermektedir. Örneğin; Probiyotik bakteriler (*L. acidophilus* ve *Bifidobacterium spp.*) yoğurt oluşumunda insan sağlığı için daha yararlı bileşikler oluşturmalarına rağmen probiyotik bakterilerinin proteolitik özellikleri zayıf olduğundan fermentasyon süresinin uzamasına neden olmaktadır. Bu durum süt endüstrisinde probiyotiklerin tek başına kullanım alanlarını kısıtlamaktadır (6, 91). *L.bulgaricus* 'un, *S. thermophilus* 'a göre proteolitik aktivitesi daha kuvvetlidir. Bundan dolayı yoğurt starterlerinde bulunan *L.bulgaricus*, *S. thermophilus* oranının 1: 1 olması proteolitik aktivite üzerine oldukça önemlidir (92). Yoğurt starterlerindeki oran 2:1 olduğunda serbest aminoasit miktarında artmalar görülmüştür. Bu etki yoğurda kontamine olan proteolitik yeteneğe sahip bakterilerle birlikte daha da artarak istenmeyen acı tat ve aroma oluşumuna neden olmaktadır (93, 94).

Yoğurt oluşumu sırasında *L.bulgaricus*, *S. thermophilus*'un sahip oldukları endo lipoprotein lipaz enzimin etkisiyle sütteki yağ moleküllerinin parçalayarak yağ asitlerine dönüşmektedir. Sekonder reaksiyon sonucunda yağ asitlerinin oksidasyonu olayı gerçekleşmektedir. Lipoliz olayı yoğurt fermantasyonunun ilk aşamalarında çok yüksek değildir ama yoğurdun depolanmaya başlaması ile beraber yoğurttaki süt yağı azalırken serbest yağ asiti miktarı giderek artmaktadır. Bu durum tablo- 11'de görülmektedir.

Tablo-11: Yoğurt muhafazası sırasında yağ ve yağ asit miktarının değişmesi

	Muhafaza Süresi (saat)		
	2	6	21
Sütyağı	4.05	3.96	3.91
Serbest yağ asitleri(meq NaOH/100g)	200	220	260

Lipoliz olayı hızına süte uygulanan ısı işlemi, homojenizasyon, yoğurt starter bakterilerin oranı 1: 1 (*L. bulgaricus*' un lipolitik etkisi daha fazladır) ve yoğurta kontamine olmuş psikrotrof bakteri miktarına göre değişmektedir. Lipoliz ve oksidasyon sonucunda aldehitler, az miktarda keton, alkol ve hidrokarbon bileşikleri oluşarak yoğurt tadında metalik ve karbonik bileşiklerin oluşumuna neden olmaktadır (95). Aromatik olarak yüksek kalitede bir yoğurt elde edebilmek için birkaç faktör önemlidir. Bunlar; süt kaynağı ve kalitesi, starter kültür özellikleri ve oranı, inkubasyon şartlarıdır. Bu faktörler aroma oluşumunu etkilemektedir (96).

Araştırmada yoğurta bir çok aroma bileşiğinin olduğu ortaya konmuştur. Bu aroma bileşikleri; karbonil bileşikler, organik asitler, alkol ve esterlerdir. Karbonik bileşikler içerisinde ilk sırayı asetaldehit almaktadır. Asetaldehitin bir kilogram yoğurta 23- 40 mg bulunması (23- 40 mg/kg) ya da en az 8- 10 mg/kg oranında bulunması yoğurt tadının oluşması için yeterlidir. Asetaldehit oluşumunda *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* her ikisinde sorumludur. Fakat *L. bulgaricus*' un daha fazla asetaldehit ürettiği rapor edilmiştir. Diğer karbonil bileşikler diasetil, aseton ve asetoindir. Tereyağına kendine has aromasını veren diasetil yoğurt da bulunur. Diasetil konsantrasyonunun yoğurta artması durumunda asetaldehit miktarını azaltmaktadır. İstenilen tat ve aromanın oluşması için az miktarda (0.9 mg/kg) diasetil oluşması yeterlidir. Aseton ve aseton miktarları ise 0.3- 0.4 mg/kg miktarları yeterlidir. Yoğurdun kendine has tadının oluşması için bu karbonil bileşiklerinin belli bir oranda ve dengede olması oldukça önemlidir.

Organik asitlerden laktik asit uçucu olmamasından dolayı aroma bileşiklerinin oluşumunda oldukça önemlidir. Yoğurt fermantasyonunda laktozun % 20- 40 lık oranı laktik aside çevrilmiştir. Bu da yoğurta yaklaşık % 0.9 laktik asit oluşuna denk gelmektedir. Aynı zamanda laktik asit oluşum miktarı karbonil bileşiklerin oluşumunu etkilediğinden aroma oluşumunda önemini daha da arttırmaktadır. Laktik asitle birlikte yoğurt fermantasyonunda önemli miktarda asetik asit ve daha az olarak da uzun zincirli asitler oluşmaktadır.

Alkol ve esterler grubunda birinci sırada etanol yer almaktadır. Glikoz geri dönüşümü ve aminoasitlerin parçalanması sırasında oluşur. Yoğurt içerisinde 0.2- 9.9 mg/kg oranında bulunur. Yoğurtta düşük konsantrasyonda ester gruplarında daha çok etil ester bulunur. Etil ester, etil alkol ve asitlerin esterifikasyon reaksiyonu sonucunda oluşmaktadır (96, 97).

### **Yoğurt Starter Kültürleri Arasındaki İlişki**

Yoğurt, *L.bulgaricus* ve *S. thermophilus* 'un sütte fermente olmasıyla oluşan insan sağlığına yararlı bir gıda maddesidir (98). Yoğurt yapılacak süte katılan 1: 1 oranında Laktik asit bakterileri ilk önce zayıf proteoliz yeteneğine sahip *S. thermophilus* fermantasyonunun başlangıcında ortamda dominanttır. *S. thermophilus* gelişimi için gerekli azot kaynağını sütte doğal olarak bulunan ısı işlemi ile miktarı daha da artan serbest aminoasitlerden karşılanır. *L. bulgaricus* 'dan önce gelişmeye başlayarak ortamdaki oksijeni kullanır. Laktozu fermente ederek geliştirdiği laktik asit yanında, oluşturduğu formik asit ve üreden, üreaz ile meydana getirdiği az miktardaki karbondioksit ile *L. bulgaricus* 'un gelişimini uyarmaktadır. Serbest aminoasit miktarı *S. thermophilus* tamamının gelişmesi için yeterli olmadığından gerekli olan serbest aminoasit *L.bulgaricus* 'un ortamda üremeye başlamasıyla karşılanır. *L. bulgaricus* tarafından açığa çıkarılan serbest aminoasitleri içeren oligopeptitler *S. thermophilus* gelişimini teşvik etmektedir. *S. thermophilus* ilk başta üremesiyle oluşan az mikardaki asit ortam *L. bulgaricus* üremesini hızlandırır. Proteolitik aktivite her iki bakterinin birbiri için gerekli serbest aminoasit miktarının oluşumunu sağlamaktadır. *S.thermophilus* tarafından üretilen peptitler, pürin ve pürimidinler okzalik asit, fumarik asit, formik asit, pürivik asit ve CO<sub>2</sub> gibi metabolitler ise *L. bulgaricus*'un gelişimine yardımcı olmaktadır. Devam eden asit üretimi, yoğurt pH' sını 4.6 ya kadar düşürür. Simbiyotik yaşamın sonucu olarak, her iki bakterinin de laktozu laktik aside kadar metabolize etmesiyle fermantasyon 3- 4 saat içinde tamamlanmaktadır. Fermantasyon sonucunda ortama salınan metabolitler ile yoğurdun tat, aroma veyoğurt kıvamını oluşmaktadır (39, 99, 100).

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Laktik Asit Bakterilerinin İzole Edildiği Numunelerin Toplanması

### Geleneksel Yöntemlerle Üretilen Yoğurtların Toplanması

Yoğurdun geleneksel olarak üretildiği kırsal alanlarda hayvancılıkla uğraşan ve kendi yoğurtlarını kendi yapan çiftçilerle birebir görüşülerek ve organoleptik özellikleri de kontrol edilerek yoğurt numuneleri toplanmıştır. Bu numunelerin toplanmasında; Ege ve Marmara bölgelerindeki farklı illerin merkez ve ilçelerine uzak endüstriyel üretime ulaşma imkânı kısıtlı olan ayrıca kendi hayvanlarından elde ettikleri sütü kendi geleneksel tekniklerine göre mayalayan çiftçilerin seçilmesine özen gösterilmiştir.

### Bitki, Yağmur Suyu ve Çiy Damlalarının Toplanması

Doğadaki çeşitli bitkilerde ve gıda kaynaklarında laktik asit bakterilerinin izolasyonları yapabilmek amacıyla birçok kaynak kullanılmıştır (101, 102). Tez çalışmamızda doğadaki laktik asit bakterilerin izolasyonu için üç farklı yöntem kullanıldı. Bu yöntemlerden birincisi yeşil yapraklı, yoğurt bakterilerini barındırması muhtemel sağlıklı, kimyasal ilaçlara maruz kalmamış en az 15 cm boyundaki yeşil bitkilerden gerdeme (*Nasturtium officinale*), kuzu kulağı (*Rumex acetosella*), buğday hasılı (*Triticum*), arpa hasılı (*Hordeum vulgare*), çim (*Lolium*), turp otu (*Sinapis arvensis*) ve ağaçların filizlerinden leylandi (*Cupressocyparis*), akasya (*Robinia pseudoacacia*) gibi ağaçlardan yoğurt yapılmak üzere örnek alınmıştır. Bitki örnekleri kontaminasyonu engellemek için dikkatli bir şekilde koparılarak steril kavonozlara yerleştirilmiş ve aynı gün içerisinde laboratuara taşınmıştır (23). İkinci yöntemde özellikle mart nisan aylarında bitkilerden süzülen yağmur suları steril kavonozlara biriktirilmiştir. Üçüncü yöntem de ise Anadolu'nun çeşitli yörelerinde hala uygulanmakta olan kuru bir tülbent yardımıyla çiy damlalarının toplanması test edilmiştir. Bu amaçla, bahar aylarında özellikle de yeşilliğin artmaya başladığı nisan ayında buğday ve arpa ekini ile bazı ağaç yapraklarından, daha önce otoklavlanarak (121 °C de 15d.) sterilize edilmiş kuru bir tülbent hijyenik kurallar çerçevesinde sabahın erken saatlerinde çiy damllarına temas ettirilmiştir. Yeterince ıslandığı kanaat edilen tülbent daha sonra steril kavonozlar ile laboratuara taşınmıştır. Doğadaki laktik asit bakterilerini toplamak amacıyla uygulanan bu yöntemlerden toplamda 100 adet örnek alınmıştır.

## Bitki, Yağmur Suyu ve Çiy Damlları Örneklerinin Süt ile İnkube Edilmesi

Laboratuara taşınan numuneler aynı gün içinde zaman geçirmeden analize alınmıştır. Bu amaçla Susurluk ilçesi Göbel kasabasında Çınar ailesine ait çiftlikten antibiyotik kullanılmayan sağlıklı hayvanlardan elde edildiği onaylanan sütler 93- 94 C° de 10 dakika boyunca ısıtılmış ve sonrasında 42- 45 °C ye soğutulmuştur. İçinde daha önce toplanmış bitki yaprakları bulunan kavanozlar, uygun sıcaklığa soğutulmuş sütler ile doldurulmuş ve etüvde inkubasyona alınmıştır.

Çiy damllarıyla ıslatılmış tülbentlerde aynı şekilde üzerine soğutulmuş süt ilave edilerek etüvde inkubasyona alınmıştır.

Yağmur damlların da ise 30 ml dolayındaki yağmur suyu, 100 ml soğutulmuş süt ile karıştırılmış ve inkube edilmiştir.

İnkubasyon üç basamaklı olarak gerçekleştirilmiştir.

- Birinci aşamada numuneler 42- 44 °C de 24 saat inkube edilmiştir.
- İkinci aşamada ise birinci inkubasyon sonrası pıhtılaşma gösteren numuneler yeniden ½ oranında süt ile karıştırılıp yeniden 42- 44 °C de 24 saat inkube edilmiştir. Bu aşamada bazı örneklerin 24 saat sonunda pıhtılaşma göstermediği saptanmıştır. Bu numunelerde yeterli ve istenen mikroorganizma bulunmadığı varsayımı çıkarılmıştır.
- Son basamakta ise 2. inkubasyondaki pıhtıdan % 10 oranında alınmış ve 42- 44 °C de 8 saat inkubasyona bırakılmıştır.

İstenen kıvamın şekillendiği bu numunelerde zamana bağlı olarak laktik asit sayılarındaki değişiklikler ile toplam aerob bakteri sayısı, toplam maya küf sayısı, koliform sayısı ve stafilokok sayıları da analiz edilmiştir. Tablo- 12’de numunelerin toplandığı bölge ile hangi kaynaktan alındıkları ayrıca, 3. inkubasyon sonrası yoğurtlaşan pıhtılardaki pH değerleri ve Soxhlet Henkel asitlik değeri olarak ulaştıkları asitlik dereceleri verilmiştir (103).



Tablo- 12: Yoğurt örneklerinin kaynağı, toplandığı bölgeler ve üretilen yoğurtların 3. inkubasyon sonunda ulaştıkları pH, SH Değerleri

Numunenin kaynağı	No	Numunenin toplandığı bölge	pH	SH
Geleneksel yoğurt	1	Muğla	4,4	42
Geleneksel yoğurt	2	Süt kuaz	4,3	41
Geleneksel yoğurt	3	Karabulut	3,97	45
Geleneksel yoğurt	4	Sönmez	4	43
Geleneksel yoğurt	5	Dereköy (kepsut)	3,98	46
Geleneksel yoğurt	6	Dereköy (kepsut)	4,33	43
Geleneksel yoğurt	7	Dereköy (kepsut)	3,95	48
Geleneksel yoğurt	8	Katranlı (kepsut )	3,8	49
Geleneksel yoğurt	9	Katranlı (kepsut)	3,97	42
Geleneksel yoğurt	10	Bakacak (İvrindi)	3,7	48
Geleneksel yoğurt	11	Bakacak (İvrindi)	3,96	45
Geleneksel yoğurt	12	Bakacak (İvrindi)	3,82	42
Geleneksel yoğurt	13	Akyar (Bigadiç)	4,01	41
Geleneksel yoğurt	14	Akyar (Bigadiç)	4,11	46
Geleneksel yoğurt	15	Büyükdağdere (sındırgı)	3,87	48
Geleneksel yoğurt	16	Büyükdağdere (sındırgı)	3,91	45
Geleneksel yoğurt	17	Büyükdağdere (sındırgı)	3,95	42
Geleneksel yoğurt	18	Dağkadı( Karacabey)	3,62	49
Geleneksel yoğurt	19	Ulubat( Karacabey)	4,13	43
Geleneksel yoğurt	20	Türkmeneli( Balıkesir )	3,8	42
Geleneksel yoğurt	21	Ovabayındır (Balıkesir)	4	40
Geleneksel yoğurt	22	Ovabayındır (Balıkesir)	3,95	46
Geleneksel yoğurt	23	Afyon	4,05	44
Geleneksel yoğurt	24	Afyon	3,9	43
Geleneksel yoğurt	25	Afyon	4	42
Geleneksel yoğurt	26	Uşak	4,0	42
Geleneksel yoğurt	27	Uşak	3,91	46
Geleneksel yoğurt	28	Uşak	4,08	44
Geleneksel yoğurt	29	Kuşakaya(Edremit)	3,88	48
Geleneksel yoğurt	30	Kuşkaya (Edremit)	3,7	49
Geleneksel yoğurt	31	Kuşkaya (Edremit)	3,9	45
Geleneksel yoğurt	32	Çakırdere (havran)	3,85	46
Geleneksel yoğurt	33	Çakırdere(havran)	3,75	49
Geleneksel yoğurt	34	Çan (Çanakkale)	3,97	3,8
Geleneksel yoğurt	35	Çan (Çanakkale)	3,95	43
Geleneksel yoğurt	36	Çan (Çanakkale)	3,92	43
Geleneksel yoğurt	37	Bayramiç (Çanakkale)	3,96	43
Geleneksel yoğurt	38	Bayramiç (Çanakkale)	4,09	45
Geleneksel yoğurt	39	Tire (İzmir)	4,10	44
Geleneksel yoğurt	40	Tire (İzmir)	3,88	46
Geleneksel yoğurt	41	Tire (İzmir)	3,86	46
Geleneksel yoğurt	42	Ödemiş (İzmir)	4,10	4,6
Geleneksel yoğurt	43	Ödemiş (İzmir)	3,8	47
Geleneksel yoğurt	44	Ödemiş (İzmir)	3,76	48
Geleneksel yoğurt	45	Kozalaklı (aydın )	4,15	42
Geleneksel yoğurt	46	Kozalaklı (aydın )	4	43
Geleneksel yoğurt	47	Kozalaklı (aydın )	3,93	41
Geleneksel yoğurt	48	Bandırma (Balıkesir)	3,95	46

Geleneksel yoğurt	49	Bandırma (Balıkesir)	4,13	42
Geleneksel yoğurt	50	Bandırma (Balıkesir)	4,19	44
Geleneksel yoğurt	51	Akyar (Bigadiç)	3,78	45
Geleneksel yoğurt	52	Türkmeneli( Balıkesir )	4,02	42)
Geleneksel yoğurt	53	Kuşakaya(Edremit)	3,87	48
Geleneksel yoğurt	54	Çan (Çanakkale)	4.13	44
Geleneksel yoğurt	55	Bayramiç (Çanakkale)	4	43
Geleneksel yoğurt	56	Tire (İzmir)	4,58	40
Geleneksel yoğurt	57.1	Kozalaklı (aydın )	3,98	44
Çiy Damlaları	57	Dereköy (kepsut)	4,0	43
Çiy Damlaları	58	Dereköy (kepsut)	3,98	48
Çiy Damlaları	59	Akyar (Bigadiç)	4,16	45
Çiy Damlaları	60	Türkmeneli( Balıkesir )	3,94	49
Çiy Damlaları	61	Kuşakaya(Edremit)	4,23	42
Çiy Damlaları	62	Çan (Çanakkale)	3,84	48
Çiy Damlaları	63	Bayramiç (Çanakkale)	3,60	50
Çiy Damlaları	64	Tire (İzmir)	4,10	43
Çiy Damlaları	65	Kozalaklı (aydın )	4,19	42
Çiy Damlaları	66	Bandırma (Balıkesir)	4,13	41
Çiy Damlaları	67	Kemalpaşa (Bursa)	3,61	51
Çiy Damlaları	68	Susurluk (Balıkesir)	4,59	46
Çiy Damlaları	69	Bakacak (Balıkesir)	4,55	46
Çiy Damlaları	70	Tahtakuşlar (Balıkesir)	4,47	45
Çiy Damlaları	71	Güven çetmi (Balıkesir)	5,83	38
Çiy Damlaları	72	Bayırdır (izmir)	5	39
Çiy Damlaları	73	Selendi (Manisa)	4,48	45
Çiy Damlaları	74	Kınık (Manisa)	5,2	37
Çiy Damlaları	75	Uşak	4,6	43
Çiy Damlaları	76	Hacıkara (Bursa)	4,5	44
Bitkiler	77	Dursunbey (Balıkesir)	4,1	42
Bitkiler	78	Balıkesir	3,85	41
Bitkiler	79	Balıkesir	4,6	40
Bitkiler	80	Bandırma( Balıkesir )	4,8	40
Bitkiler	81	Susurluk (Balıkesir)	4,55	43
Bitkiler	82	İzmir	4,40	44
Bitkiler	83	Tire(İzmir)	4,48	42
Bitkiler	84	Selendi(Manisa)	4,47	41
Bitkiler	85	Kuşadası (aydın )	4,43	44
Bitkiler	86	İvrindi (Balıkesir)	4,45	42
Bitkiler	87	Balıkesir	4,88	40
Bitkiler	88	Bursa	4,43	44
Yağmur Damlaları	89	Avcılar (İstanbul)	4,49	43
Yağmur Damlaları	90	Erdek(Balıkesir)	4,50	45
Yağmur Damlaları	91	Balya (Balıkesir)	4,48	43
Yağmur Damlaları	92	Bandırma (Balıkesir)	4,51	46
Yağmur Damlaları	93	Uşak	4,62	43
Yağmur Damlaları	94	Manisa	4,53	43
Yağmur Damlaları	95	Susurluk ( Balıkesir)	4,60	44
Yağmur Damlaları	96	Salihli (Manisa)	4,69	44
Yağmur Damlaları	97	Dursunbey (Balıkesir)	4,33	46

Yağmur Damlaları	98	Burhaniye (Balıkesir)	4,29	45
Yağmur Damlaları	99	Ören (Balıkesir)	4,52	44
Yağmur Damlaları	100	Gömeç (Balıkesir)	4,51	46
Yağmur Damlaları	101	Susurluk	4,22	42
Yağmur Damlaları	102	Susurluk	4,19	43
Yağmur Damlaları	103	Balıkesir	4,57	45
Yağmur Damlaları	104	Balıkesir	4,37	43
Yağmur Damlaları	105	Kepsut	4,87	48
Yağmur Damlaları	106	Kepsut	4,29	42
Yağmur Damlaları	107	Bandırma	4,57	44
Yağmur Damlaları	108	Bandırma	4,45	43
Bitkiler	109	Biga (Çanakkale)	4,95	38
Bitkiler	110	Çan (Çanakkale)	4,51	45
Bitkiler	111	Çanakkale	4,53	43
Bitkiler	112	Çanakkale	4,52	42
Bitkiler	113	Lapseki (Çanakkale)	4,51	42

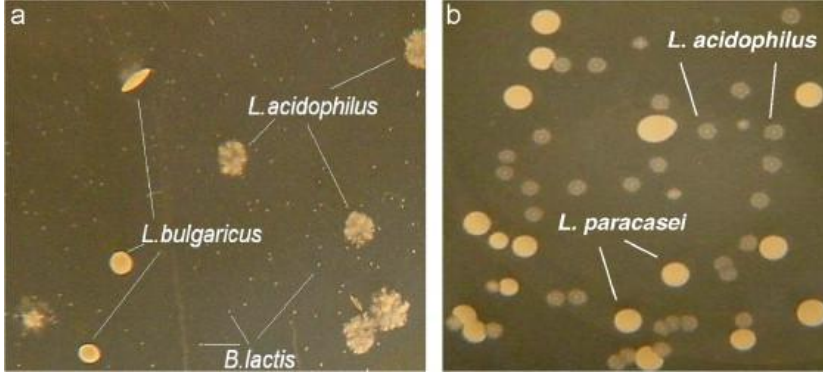
\*Birbirinden bağımsız üç farklı ölçümün aritmetik ortalaması alınmıştır.

## Mikrobiyolojik Analizler

### Üretilen Yoğurt Numunelerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Üçüncü inkubasyon sonucunda oluşan pıhtıdan laktik asit bakterilerini izole etmek maksadıyla numunelerden 10 g'lık porsiyonlar alındı ve 90 ml % 0,1'lik TPS içerisinde 2 dakika süreyle stomacherde (Seward stomacher, model 400 circulator) homojenize edildi. Hazırlanan homojenat seri dilüsyonları (15 cm cam tüplerin) ( $10^{-1}$ -  $10^{-8}$ ) hazırlandı (104).

Laktobasillerin izolasyonu için MRS Agar (Merck 1,10660) kullanılmıştır. Bu amaçla, MRS Agar (Merck 1,10660) 121 °C'de 15 dak. 2 atm sterilize edildikten sonra ultrafiltasyon ile sterilize edilmiş laktoz (% 5) ile 1/10 oranında zenginleştirildi. MRS agara üreme kontrolü ve sterilizasyon kontrolü yapıldıktan sonra uygun dilüsyonlardan, kolonilerin daha net belli olması açısından yayma plak tekniğine göre ekimleri yapılmıştır. Plaklar anaerobik olarak (Merck Anaerogen Kit ) 42 °C'de 48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı ve süre sonunda MRS agar'da üreyen açık sarı renkli koloniler *Lactobacillus spp.* şüpheli koloniler olarak değerlendirilmiştir. Şüpheli koloniler % 20 lik gliserol içerisinde -22 °C'de korumak ve ileriki işlemler için muhafaza edilmiştir (105- 107).



Şekil- 7: a) MRS-fruktoz agar b) MRS-maltoz agar da laktobasillerin koloni morfolojisi (108)

Streptokokların izolasyonunu için M17 Agar (Merck1.15108) kullanılmıştır. M17 Agar (Merck 1.15108) 121 °C’de 15 dak. steril edildikten sonra ultrafiltrasyon ile sterilize edilmiş laktoz (% 5) ile 1/10 oranında zenginleştirildi. M17 agara üreme kontrolü ve strelizasyon kontrolü yapıldıktan sonra uygun dilüsyonlardan, kolonilerin daha net belli olması açısından yayma plak tekniğine göre ekimleri yapılmıştır. Plaklar anaerobik olarak (Merck Anaerogen Kit ) 42 °C’de 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı ve bu süre sonunda üreyen açık sarı renkli koloniler *Streptococcus spp.* şüpheli koloniler olarak değerlendirildi. Şüpheli koloniler % 20 lik gliserol içerisinde -22 °C’de korunmak ve daha sonraki işlemler için muhafaza edilmiştir (105- 107).

## İzolatların İdentifikasyonu

### Biyokimyasal Testler

Laktik asit bakterilerinin idenfikasyonunda temel nitelikte olan; hücre morfolojisi, Gram boyama yöntemi, katalaz testi, farklı sıcaklık derecelerinde üreyebilme ( 10 °C, 15 °C, 45 °C ) farklı tuz konsantrasyonlarında üreyebilme ( % 2.4 ve 6.5 NaCl konsantrasyonlarında), farklı pH derecelerinde üreyebilme ( 4.5- 6.5 ), glikozdan gaz oluşturma ve sitrat kullanım özelliklerine bakılmıştır (47, 109).

Tablo- 13: Laktobasil ve streptokokların ayırımındaki temel biyokimyasal testler (48).

Testler	<i>L.delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	<i>S. thermophilus</i>
Hücre morfolojisi	Basil	Kok
Gram test	+	+
Katalaz test	-	-
10°C de üreme	-	-
15°C de üreme	-	-
45°C de üreme	+	+
% 2 NaCl üreme	+	-
% 4 NaCl üreme	+, -	-
%6,5 NaCl üreme	-	-
Glikozdan gaz	-	-
pH: 4,5	+	+
pH: 6,5	+	+
Sitrat kullanımı	-	-

Gram boyama ve katalaz testi MRS ve M17 Agarda üreyen tipik koloniler üzerine yapıldı (110, 111). Gram pozitif, katalaz negatif ve mikroskopta morfolojik olarak uygun yapısal özellik gösteren koloniler diğer testlere tabi tutuldular.

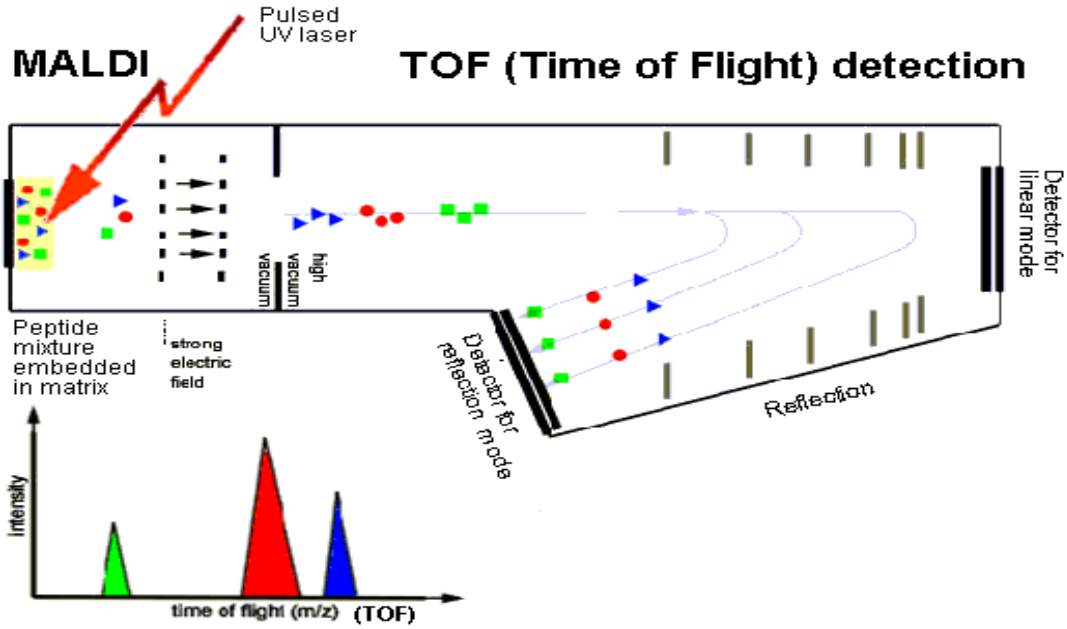
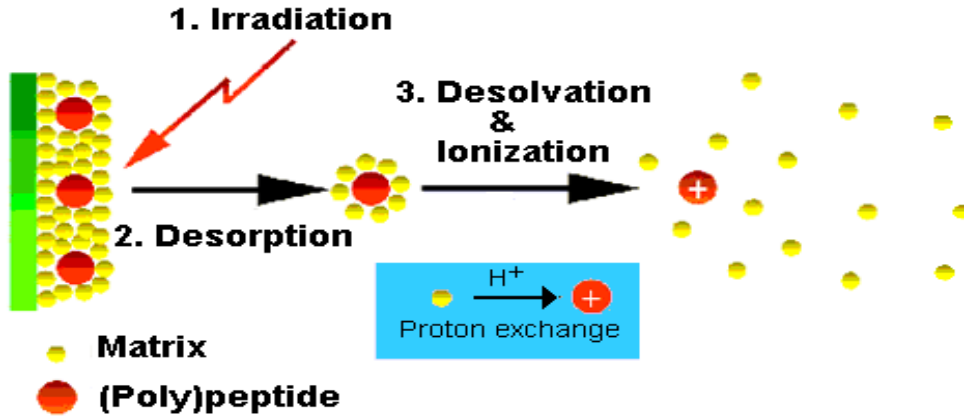
Farklı sıcaklıklarda ( 10 °C, 15 °C ve 45 °C de), tuz konsantrasyonunda (% 2, 4, 6.5 NaCl'de) ve pH (4.5, 6.5) üreme testleri laktobasiller için MRS sıvı besiyerinde streptokoklar için M17 sıvı besiyerinde gerçekleştirildi (21, 112, 113).

Sitrat fermantasyonu için izolatlar tüp içinde yatık Simmons Citrate Agar ( Merck 1.02501) besiyerine (4- 5 ml, pH 6.9 ve yeşil renkte) besiyerine ekimler yapıldı (112).

### **MALDİ-TOF MS Tekniğiyle İdentifikasyon**

MALDİ-TOF MS yöntemi rutin laboratuvarlarda kullanılan biyokimyasal reaksiyonların incelenmesi esasına dayanan sistemlerden farklı olarak çalışmaktadır. Otomatize sistemlerde mikroorganizmaya ait çeşitli biyokimyasal özellikleri incelenerek identifikasyon yapılmaktadır. MALDİ-TOF MS yönteminde mikroorganizmaya ait protein profili incelenmektedir. Bu sistem çalışması sırasında kendisine ait kalibrasyon kontrolü (myoglobin), pozitif kontroller bir Gram negatif (örn. *E.coli*), bir Gram pozitif (örn. *S. aureus*) referans suş ve bir de negatif kontrol olarakta distile su kullanılmaktadır (113, 114).

## MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)



Şekil- 8: MALDI-TOF MS tekniğinin çalışma şemasının görüntüsü

MALDI-TOF MS yönteminde MRS Agarda 24 saat üreyen logaritmik faz sonundaki şüpheli laktobasil kolonileri ile M17 Agarda 24 üreyen şüpheli streptokok kolonileri alınarak cihazın 'target' adı verilen metal plakası üzerindeki belirlenmiş alanlara yerleştirilip kurutulur. Ardından 1 µl matriks her bir örnek üzerine eklenerek tekrar havada kurutmaya bırakılır. Matriks solüsyonu içerisinde % 50 'asetonitrile' ve %2,5 'trifluoroacetic acid' içinde doymuş ' $\alpha$ -cyano-4-hydro-ycinnamic acid' bulunmaktadır. Örnekler hazırlandıktan sonra target olarak isimlendirilen plak 'Bruker Autoflex III MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)' cihazına yüklenir ve işlem başlatılır. 4.000-10.000 Da kütle aralığında 20

Hz'lik bir lazer vuruş sıklığı ile lineer pozitif iyon modeli olarak elde edilen spektrum otomatik olarak kaydedilir. Her bir spektrum için örnek alanına yapılan 100 kısa aşamada 600 uygun vuruş elde edilir. Kullanılan programa özel ayarlanmış lazer atışları yardımı ile matriks ışığı emer ve örneğin molekülleri iyonize hale geçip cihazın tüpü içerisinde molekül ağırlığına göre uçmaya başlar. Dijital hale çevrilen veriler TOF (time of flight- uçuş zamanı) oluşturmak üzere biriktirilir ve cihaz içerisinde bulunan bir detektör yardımı ile saptanır (113- 114).

### **Geleneksel Yöntemlere Göre Üretilen Yoğurtların Mikrobiyolojik Analizleri**

Elde edilen yoğurt örneklerinin 1 ve 2 numaralı olanı bitkilerden, 3, 4 ve 5 numaralı olanlar yağmur suyundan ve 6, 7, 8, 9 ve 10 numaralı olanlar ise çiy damlasından pıhtılaştırılması sonucunda elde edilmiştir. Geleneksel yöntemlerle üretilen yoğurtlarda 1, 7, 14 günleri arasında +4 °C de buzdolabı ortamında muhafaza süresince; Laktobasil, streptokok, toplam aerobik mezofil canlı sayısı, stafilokok, maya-küf sayımı ve koliform sayıları tesbit etmek için her bir yoğurt numunesinden 10 g porsiyonlar alındı ve 90 ml % 0.1'lik peptonlu su içerisinde 2 dakika süreyle stomacherde (Seward stomacher, model 400 circulator) homojenize edildi. Hazırlanan homojenat kullanılmak suretiyle örneklerin seri dilüsyonları ( $10^{-1}$  -  $10^{-8}$ ) hazırlandı (104).

Toplam aerobik mezofil bakteri sayımı için dilüsyonlardan 0,1 ml alınarak Plate Count Agar'a (Merck 1.05463) yayma plak tekniğine göre ekileri yapılmış ve 30 °C de 48- 72 saat inkubasyondan sonra koloniler sayılmıştır (115).

Laktobasil, streptokok sayıları sırasıyla MRS ve M17 besiyerinde yöntem modifiye edilerek yapıldı (105- 107).

Maya- küf sayımı için Rose Bengal Chloramphenicol Agar (Merck 1.00467) kullanılmıştır. Hazırlanan seri dilüsyonlardan 0,1 ml yayma plak tekniğine göre ekimleri yapılmış 25 °C'de 5 gün süreyle inkubasyona bırakılmış oluşan bütün koloniler sayılmıştır (116).

Stafilokok spp. sayımı için Baird-Parker Agar (Merck 1.05406) kullanılmıştır. Hazırlanan seri dilüsyonlardan 0,1 ml yayma plak tekniğine göre ekimleri yapılmış 37 °C'de 24- 48 saat süreyle inkubasyona bırakılmış oluşan siyah renkli koloniler sayılmıştır (117).

Koliform mikroorganizma için MPN tekniğine göre üçlü tüp yöntemi kullanılmıştır. Mac Conkey sıvı besiyerine (Merck 1.05396)  $10^{-3}$  dilüsyona kadar ekimleri yapılmış  $35^{\circ}\text{C}$  de 48 saat inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyon sonucunda durham tüpcüklerinde oluşan gaz ve bulanıklığa göre EMS tablosundan değerler okunmuştur (118).

### **Geleneksel Yöntemlere Göre Üretilen Yoğurtların Duyusal Analizleri**

Duyusal analiz için seçilen 15 kişilik grup eğitime tabi tutularak yoğurt hakkında deneyimleri arttırılmıştır. Üretilmiş yoğurtların 1, 7, 14 günleri arasında  $+4^{\circ}\text{C}$  de buzdolabı ortamında muhafaza süresince gelişen özellikleri değerlendirilmiştir. Duyusal analizler aşağıdaki tablo- 14'e bağlı kalarak yapılmıştır. Panelistlerin verdiği notların ortalama değerleri alınmıştır (119).

Tablo- 14: Duyusal değerlendirme tablosu (119)

<b>Görünüş</b>	
Temiz, parlak, süt renginde, serum ayrılması olmamış, çatlak ve gaz kabarcığı bulunmayan, homojen	5
Temiz, süt renginde, serum ayrılması olmamış, çatlak ve gaz kabarcığı bulunmayan	4
Temiz, mat grimsi, az sayıda çatlak ve az sayıda serum ayrılmış	3
Süt renginden farklı değişik renk meydana gelmesi, çok sayıda çatlak, gaz kabarcığı bulunan,- serumu ayrılmış gözle görülebilen her türlü yabancı madde bulunan	2 1
<b>Kıvam</b>	
Kaşıkla alınan kesitte dolgun kıvamda, düzgün yapıda, homojen, karıştırıldıktan sonra koyu bir akıcılık, serumu hemen ayrılmayan, dille damak arasında kolay dağılmayan	5
Alınan kesitte dolgun kıvamda, düzgün yapıda, homojen, karıştırıldıktan sonra koyu bir akıcılık, serumu az ayrılan, dille damak arasında en az dağılan, dolgun yapıda homojen	4
Alınan kesitte akıcılığı az, hafif pütürlü yapıda, karıştırıldıktan sonra akıcı ve serumu hemen ayrılan, ağıza alındığında dağılan, hafif pütürlü	3
Alınan kesitte çok akıcı, homojen olmayan ve pütürlü, karıştırıldıktan sonra çok akıcı hemen ve fazla miktarda serumu ayrılan, dipte tortu bulunduran, dille damak arasında tutulamayan, akıcı, homojen olmayan	1-2
<b>Koku</b>	
Kendine has hoş kokuda	4-5
Kendine has olmayan veya yabancı koku ihtiva eden	3
Kendine has olmayan, alkolsü, yanık veya yabancı koku ihtiva eden	1-2
<b>Tat</b>	
Kendine has hafif ekşimsi tatta olan	5
Hafif ekşimsi veya hafif tatlımsı	4
Ekşimsi, hafif acımsı, hafif küfümsü, hafif sabunumsu ya da hafif yanık tatta olan ve benzeri tad içeren	3
Aşırı derecede ekşimsi, acımsı, küfümsü, sabunumsu yanık tatta olan ve benzeri yabancı tat içeren	1-2



## **Asitlik ve pH Ölçümü**

Elde edilen yoğurtların 1, 7, 14 günleri arasında +4 °C de buzdolabı ortamında muhafaza süresince değişen asitlikleri Soxhelet Henkel (SH) ve pH değerleri (Sartorius pH meter) üç paralelli olarak ölçülmüş ortalaması alınmıştır (103).

## **Suşların Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi**

### **Glikoliz Yeteneklerinin Belirlenmesi**

MALDI-TOF analizleri sonucunda moleküler olarak *L. delbrueckii* spp. ve *S. thermophilus* tanımlanan suşların glikolitik metabolik aktivitelerinin belirlenmesi hem besiyerinde hemde yağsız süt tozundan hazırlanmış rekonstitüe sütte test edilmiştir. Bu amaçla suşlar MRS ve M17 sıvı besiyerinde canlandırılmıştır.

#### **a) Besiyerinde Glikolizisin Belirlenmesi**

*L. delbrueckii* spp . ve *S. thermophilus* suşlarının asidifikasyon yetenekleri belirlemek amacı için steril laktoz (% 5), % 1 oranında zenginleştirilmiş 10 ml MRS ve M17 sıvı besiyeri içeren türplere ekimleri yapılarak 42 °C de zamana bağlı olarak belirlenmiştir. Bu maksatla logaritmik fazdaki kültürlerden % 2 oranında ekilmiştir. İnkubasyonu izleyen 2. 4. 6. 8. ve 24. saatlerde pH'ları ölçülerek değişiklikler kaydedilmiştir (120).

#### **b) Yağsız Süt Tozundan Hazırlanan Yeniden Yapılandırılmış Sütte Glikolizisin Belirlenmesi**

Sütün tampon yeteneği besiyerine göre daha düşüktür. MRS ve M17 sıvı besiyerinde üreyen logaritmik fazın sonundaki suşlar 110 °C de 10 dakika sterilize edilmiş rekonstitüe sütte ekilerek (110 g yağsız süt/1 lt saf su) 42 °C de inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyonu izleyen 2. 4. 6. 8. ve 24. saatlerde pH'ları ölçülerek kaydedilmiştir (103, 119, 121).

## **Fast-Slow Differential Agar'da Bakterilerin Proteolitik Aktivite ve Laktoz Kullanımlarının Değerlendirilmesi**

FSDA'nın hazırlanması:

Besiyeri A ve B komponentlerinden oluşmaktadır. Bu komponentler terazide ayrı ayrı tartılarak hazırlanıp otoklav edildikten sonra birleştirilerek 50 °C de petri kutularına dökülmüştür.

A Komponent: 6 gr Agar agar  
9,5 gr Sodyum gliserofosfat  
0,5 gr Baktolismus  
275 ml distile su

B Komponent: 50 gr Süt tozu  
225ml distile su

FSDA besiyeri ortamına ekim için petriler dört eşit parçaya bölündü ve öze yardımıyla ekimler yapıldı. *S. thermophilus* için petri kapları anaerobik jar içerisinde 42 °C 24 saat inkubasyona bırakıldı. *L. delbrueckii spp.* için petri kapları anaerobik jar içerisinde 42 °C 48 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrasında proteaz pozitif (prt +) suşlar 1,3 mm çaplı, beyaz renkli ve çevresinde pembe asidifikasyon haleleri şeklinde koloniler oluştururken proteaz negatif (prt -) suşlar 0,2- 0,5 mm çaplı saydam bir görünüşte gelişmiştir (113, 120).

### **Suşların Bakteriyolitik Özelliklerinin Belirlenmesi**

MRS ve M17 sıvı besiyerinde gece boyu logaritmik fazın sonunda üreyen mikroorganizmalar 1,5 ml steril ependorf tüplere aktarılmış ve 8000 rpm 5 dak. santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üstte kalan besiyeri dikkatli bir şekilde dökülmüş dipte kalan bakteri peleti steril 4 °C de ki saf su ile yıkanmıştır. Bu sayede bakterilerin bulunduğu ortamdan besin maddeleri kalıntıları ve metabolitler arındırılmıştır. Dipteki bakteri payeti üzerine pH 7'ye ayarlanmış 100 mM konsantrasyondaki steril potasyum fosfor tamponu (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) eklenmiş ve optik dansitesi 650 nanometerde (OD<sub>650nm</sub>) 0.40-0.70 nm değerine ayarlanmıştır. Bakteriyoliz 45 °C de 0, 2, 24. saatlerde optik dansitedeki azalma olarak değerlendirilmiştir (122). Hücre bakteriyolizi aşağıda verilen formüle göre değerlendirilmiştir (123).

$$Ao - At \times \frac{100}{Ao} = \% \text{ Bakteriyoliz}$$

(Ao: Başlangıç değeri, At: Belirlenen süre sonunda ulaşılan değer )

### Yoğurt Bakterilerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin antibiyotiklere karşı direncini saptamak için Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI- 2012)'nün önerileri doğrultusunda disk diffüzyon tekniği ile gerçekleştirildi. Canlandırılmış suşlar 0.5 McFarland türbidite standardına getirilmiş ve her suştan ayrı ayrı olmak üzere 0.2 ml alınarak % 1 oranında % 5 lik laktozla zenginleştirilmiş MUELLER HILTON (Merck 1.05437) agara steril eküvyon yardımıyla inokule edildi. 14 farklı antibiyotik diski (Quinipristin/Dalfopristin 15 µg, Tetrasiklin 30 µg, Klindamisin 2 µg, Vankomisin 30 µg, Sefotaxime 30 µg, Linezolid 30 µg, Kloramfenikol 30 µg, Penisilim 10IU, Siprofloksasin 5 µg, Ampisilin 10 µg, Gentamisin 10 µg, Kanamisin 30 µg, Eritromisin 15 µg ve Streptomisin 300 µg) merkezleri arasında en az 24 mm olacak şekilde yerleştirilmiştir. Antibiyotik diskleri yerleştirilmiş petri kapları anaerobik jar içerisinde 37 °C de 24 saat inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyondan sonra, inhibisyon zon çapları ölçülerek sonuçlar kaydedildi ve CLSI'nün önerilerine göre duyarlı, orta derecede duyarlı ya da dirençli olarak değerlendirildi. Kontrol suşu olarak *S.aureus* ATCC® 25923 kullanıldı ve uygulanan zon çapı kriterleri tablo- 15'de verilmiştir (124, 125).

Tablo- 15: CLSI göre *S. aureus* ATCC® 25923 zon çapları

Antibiyotik	≥ R	I	≥ S
Quinipristin/Dalfopristin 15 µg,	15	16-18	19
Tetrasiklin 30 µg,	14	15-18	19
Klindamisin 2 µg,	14	15-20	21
Vankomisin 30 µg,	2	4-8	15
Sefotaxime 30 µg,	14	15-22	23
Linezolid 30 µg,	20	-	21
Kloramfenikol 30 µg,	12	13-17	18
Penisilim 10IU,	28	-	29
Siprofloksasin 5 µg,	15	16-20	21
Ampisilin 10 µg, g	28	-	29
Gentamisin 10 µg,	12	13-14	15
Kanamisin 30 µg,	13	14-17	18
Eritromisin 15 µg,	13	13-17	18
Streptomisin 10 µg	14	14-21	22

\* R: dirençli, I: orta duyarlı, S: duyarlı

## BULGULAR

### Bitkiler, Yağmur ve Çiy Damlaları ile Sütün Pıhtılaştırılması

Sütün asidifikasyonu neticesinde pıhtılaştırılması ile özellikle laktik asit bakterisi içermesi beklenen 100'er adet bitki, yağmur ve çiy damlası örneği yüksek ısıda pastörize edilen süte inoküle edilerek sütün pıhtılaşması için inkübe edildi. Bitki örneklerinin 17, yağmur suyu örneklerinin 20 ve çiy damlası örneklerinin 18 tanesi inkübasyon süresi sonunda sütte pıhtılaşma sağlayarak yoğurdun kıvam ve tadına yakın bir yapı oluşturdu. Elde edilen ürünlere ait pH ve SH değerleri Materyal ve Metot kısmında tablo- 12'de gösterildi. Bitki, yağmur ve çiy damlalarından mayalanan sütlerde 24 saatlik inkübasyon süresince pH'da, aerop koloni sayısında, laktobasil ve streptokok sayıları tablo- 16'da verilmiştir.

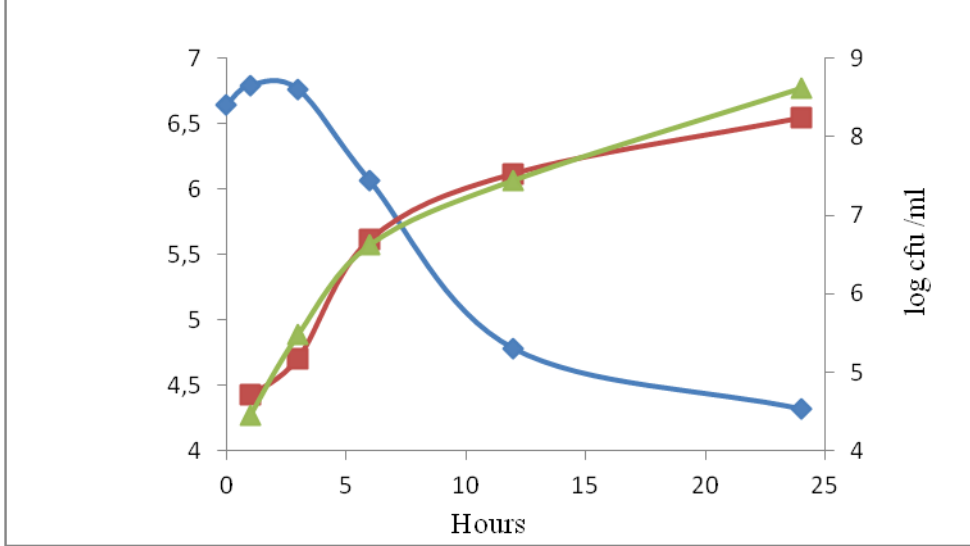
Tablo- 16: Sütün bitki, yağmur ve çiy damlaları ile pıhtılaştırılması ile oluşan ürünün pH, toplam canlı, laktobasil ve streptokok sayılarında zamana bağlı değişim (kob/g)

İnkübasyon süresi (saat)					
Bitki	1	3	6	12	24
pH (6,65)	6.86	6.78	6.12	4.86	4.34
Toplam canlı	$9.8.10^3$	$5.5.10^5$	$3.2.10^6$	$1.4.10^6$	$2.1.10^7$
Laktobasil	$2.4.10^4$	$1.2.10^5$	$2.5.10^6$	$2.6.10^6$	$2.4.10^8$
Streptokok	$1.7.10^4$	$1.7.10^5$	$2.10^6$	$8.7.10^6$	$3.10^8$
<b>Yağmur Suyu</b>					
pH	6.77	6.76	5.86	4.76	4.31
Toplam canlı	$3.1.10^4$	$1.10^5$	$2.1.10^7$	$7.2.10^6$	$1.4.10^7$
Laktobasil	$7.2.10^4$	$2.10^5$	$3.7.10^6$	$8.7.10^7$	$1.4.10^8$
Streptokok	$5.7.10^4$	$5.10^5$	$4.10^6$	$3.7.10^7$	$4.6.10^8$
<b>Çiy Damlası</b>					
pH	6.76	6.83	6,21	4,74	4.32
Toplam canlı	$1.6.10^4$	$6.10^5$	$2.5.10^6$	$4.1.10^6$	$2.10^7$
Laktobasil	$5.8.10^3$	$1.4.10^5$	$8.7.10^6$	$1.4.10^7$	$1.5.10^8$
Streptokok	$1.1.10^4$	$2.4.10^5$	$6.8.10^6$	$3.8.10^7$	$4.8.10^9$

\*Birbirinden bağımsız üç farklı ölçümün aritmetik ortalaması alınmıştır.

pH değerindeki değişiklikler değerlendirildiğinde her üç numunenin ilk 6 saatte belirgin bir değişme göstermediği ancak 6. saatten sonra pH'nın belirgin bir şekilde düşmeye başladığı, 12. saatten itibaren pH: 5'in altına, yoğurdun pıhtılaştığı değere düştüğü görülmektedir.

Aerobik koloni sayısı, laktobasil ve streptokok sayılarında zamana bağlı olarak sürekli bir artış görüldü. Bu artışın özellikle ilk saatlerde daha yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil- 9). Laktobasil ve streptokok sayılarının 12.saatte istenen sayılara ulaştığı saptandı.



Şekil- 9: Sütün bitki, yağmur ve çiy damlaları ile pıhtılaştırılması esnasında 24 saatlik saatlik inkubasyon ile pH (◆), laktobasil (■) ve streptokok (▲) sayılarındaki değişimler

### **Doğal Kaynaklardan Pıhtılaştırılan Sütlerin Depolanma Sürecinde pH ve Asitlik Değişimi, Mikrobiyolojik Duyusal Nitelikleri**

Bitki, yağmur ve çiy damlalarından pıhtılaştırılan 10 farklı numunenin asitlik, pH, toplam canlı, laktobasil, streptokok, maya ve küf, koliform ve stafilocok sayıları 14 günlük depolama sürecinde tespit edildi. Depolamanın 1, 7 ve 14 günlerindeki pH ve SH değerleri tablo- 17'de verilmiştir.

Tablo- 17: Sütün bitki, yağmur ve çiy damlaları ile pıhtılaştırılmış numunelerin depolama sürecinde pH ve asitlik (SH) değişimi

Numune Numarası Kaynağı		1.gün		7.gün		14.gün	
		pH	SH	pH	SH	pH	SH
1	Bitki	4.76	34	4.53	36	4.12	43
2	Bitki	4.15	38	3.94	39	3.54	46
3	Yağmur	4.68	24	4.48	29	4.27	35
4	Yağmur	4.36	31	4.09	36	3.87	45
5	Yağmur	4.49	30	4.00	37	3.99	42
6	Yağmur	4.42	29	4.18	41	4.06	41
7	Çiy	4.22	30	4.05	37	3.93	40
8	Çiy	4.39	38	4.35	43	4.14	44
9	Çiy	4.04	30	4.00	32	3.89	37
10	Çiy	4.44	32	4.05	37	3.91	39

\*Birbirinden bağımsız üç farklı ölçümün aritmetik ortalaması alınmıştır.

Depolama süresince pH'nın düşmeye, asitliğinde yavaşta olsa artmaya devam ettiği saptanmıştır. Tablo- 17 incelendiğinde muhafazanın 1. gününde pH'nın istenilen 4.04-4.76 seviyesine kadar azaldığı ve 14. günün sonuna kadar numunelerinin tamamında pH'da azalma eğiliminin devam ettiği görüldü. Bazı örneklerde pH'nın 2 haftanın sonunda 3.5 değerine kadar düştüğü saptandı.

Tablo- 18'de 1, 7 ve 14. günlerde bitki, yağmur ve çiy damlası numunelerinden pıhtılaştırılan sütlerde zamana bağlı olarak toplam maya ve küf, koliform bakteri (çoklu tüp yöntemi, EMS) stafilokok, toplam aerobik bakteri sayısı, laktobasil ve streptokok sayılarındaki değişiklikler verilmiştir. Muhafazanın 1. gününde 10 adet numuneye ait pH değerleri 4.04-4.76 arasında değişirken, toplam canlı sayıları  $1.54 \cdot 10^8$  ve  $8.2 \cdot 10^8$  kob/g, *Lactobacillus spp.* sayıları  $1.45 \cdot 10^7$  -  $2.9 \cdot 10^8$  kob/g, *Streptococcus spp.* sayıları  $1.78 \cdot 10^7$  -  $3.7 \cdot 10^8$  kob/g arasında değişti. Muhafazanın 7. gününde ise pH değerleri 3.94- 4.53 arasında değişirken, toplam canlı sayıları  $1.92 \cdot 10^8$  –  $6.8 \cdot 10^8$  kob/g, *Lactobacillus spp.* sayıları  $5.05 \cdot 10^7$  –  $2.9 \cdot 10^8$  kob/g, *Streptococcus spp.* sayıları  $4.12 \cdot 10^8$  –  $4.12 \cdot 10^8$  kob/g arasında değişti. Muhafazanın 14. gününde ise pH değerleri 3.54- 4.27 arasında değişirken, toplam canlı sayıları  $4.3 \cdot 10^7$  -  $7.12 \cdot 10^8$  kob/g, *Lactobacillus spp.* sayıları  $2.37 \cdot 10^7$  –  $6.5 \cdot 10^8$  kob/g, *Streptococcus spp.* sayıları  $5.6 \cdot 10^7$  -  $4.7 \cdot 10^8$  kob/g aralığında değişime uğradığı saptandı. *Lactobacillus spp.* ve *Streptococcus spp.* sayılarının yoğurt standartlarına uygun ( $> 10^6$  kob/g) olduğu, pH değerlerinin de standart yoğurtlarda istenilen pH değerinde olduğu saptandı.

Tablo- 18: Sütün bitki, yağmur ve çiy damlaları ile pıhtılaştırılmış numunelerin zaman bağılı olarak mikrobiyal yapısındaki değişimler

Numune		1. Gün						7. Gün						14. Gün					
		Toplam maya küf kob/g	Koliform sayısı EMS/g	Stap.spp kob/g	Toplam aerobik Bakteri sayısı	Laktobasil	Streptokok	Toplam maya küf kob/g	Koliform sayısı EMS/g	Stap.spp kob/g	Toplam aerobik Bakteri sayısı	Laktobasil	Streptokok	Toplam maya küf kob/g	Koliform sayısı EMS/g	Stap.spp kob/g	Toplam aerobik Bakteri sayısı	Laktobasil	Streptokok
1	Bitki	2.1.10 <sup>4</sup>	3 den az	1.4.10 <sup>3</sup>	2,8.10 <sup>8</sup>	8,25.10 <sup>7</sup>	2,3.10 <sup>8</sup>	7.7.10 <sup>4</sup>	3 den az	1.10 <sup>2</sup>	3,2.10 <sup>8</sup>	9.10 <sup>7</sup>	7,25.10 <sup>7</sup>	6.8.10 <sup>5</sup>	3 den az	-	7,12.10 <sup>8</sup>	9,5.10 <sup>7</sup>	2,64.10 <sup>8</sup>
2	Bitki	2.10 <sup>5</sup>	43	-	8,2.10 <sup>8</sup>	2,5.10 <sup>8</sup>	3,7.10 <sup>8</sup>	4.7.10 <sup>5</sup>	43	-	4,37.10 <sup>8</sup>	2,9.10 <sup>8</sup>	4,12.10 <sup>8</sup>	4.9.10 <sup>6</sup>	3 den az	-	6,9.10 <sup>8</sup>	3,58.10 <sup>8</sup>	4,57.10 <sup>8</sup>
3	Yağmur	3.3.10 <sup>4</sup>	43	-	1,71.10 <sup>8</sup>	3,1.10 <sup>7</sup>	1,8.10 <sup>8</sup>	3.7.10 <sup>5</sup>	75	15	1,92.10 <sup>8</sup>	9,7.10 <sup>7</sup>	9,6.10 <sup>7</sup>	4.7.10 <sup>5</sup>	150	-	2,48.10 <sup>8</sup>	1,84.10 <sup>8</sup>	9,03.10 <sup>7</sup>
4	Yağmur	2.8.10 <sup>3</sup>	1100	-	2,36.10 <sup>8</sup>	1,62.10 <sup>8</sup>	2,07.10 <sup>7</sup>	4.7.10 <sup>4</sup>	1100	-	2,42.10 <sup>8</sup>	6,45.10 <sup>7</sup>	1,61.10 <sup>8</sup>	5.3.10 <sup>5</sup>	210	-	2,84.10 <sup>8</sup>	1,29.10 <sup>8</sup>	1,75.10 <sup>8</sup>
5	Yağmur	2.4.10 <sup>2</sup>	1100	-	2,6.10 <sup>8</sup>	1,12.10 <sup>8</sup>	1,78.10 <sup>7</sup>	4,3.10 <sup>3</sup>	1100	-	2,71.10 <sup>8</sup>	1,36.10 <sup>8</sup>	8,72.10 <sup>7</sup>	5.7.10 <sup>4</sup>	-	-	2,98.10 <sup>8</sup>	1,66.10 <sup>8</sup>	1,37.10 <sup>8</sup>
6	Yağmur	1.8.10 <sup>3</sup>	93	0.6.10 <sup>2</sup>	5,23.10 <sup>8</sup>	2,9.10 <sup>8</sup>	6.10 <sup>7</sup>	3.7.10 <sup>4</sup>	150	-	6,8.10 <sup>8</sup>	1,1.10 <sup>8</sup>	4,12.10 <sup>7</sup>	7.9.10 <sup>5</sup>	150	-	7,5.10 <sup>8</sup>	2,37.10 <sup>7</sup>	6,5.10 <sup>6</sup>
7	Çiy	3,5.10 <sup>3</sup>	3 den az	-	1,73.10 <sup>8</sup>	5,75.10 <sup>7</sup>	2,8.10 <sup>8</sup>	4.3.10 <sup>4</sup>	3 den az	-	2,02.10 <sup>8</sup>	5,05.10 <sup>7</sup>	9,6.10 <sup>7</sup>	6.1.10 <sup>4</sup>	3 den az	-	2,52.10 <sup>8</sup>	4,85.10 <sup>7</sup>	5,6.10 <sup>7</sup>
8	Çiy	9,7.10 <sup>5</sup>	1100	-	3.10 <sup>8</sup>	1,35.10 <sup>8</sup>	1,72.10 <sup>7</sup>	4.1.10 <sup>6</sup>	1100	-	2,1.10 <sup>8</sup>	9,81.10 <sup>7</sup>	8,7.10 <sup>7</sup>	-	-	-	4,3.10 <sup>7</sup>	5,5.10 <sup>7</sup>	4,7.10 <sup>8</sup>
9	Çiy	3,4.10 <sup>2</sup>	3 den az	-	4,9.10 <sup>8</sup>	1,45.10 <sup>7</sup>	5,06.10 <sup>7</sup>	4.6.10 <sup>3</sup>	3 den az	-	4,4.10 <sup>8</sup>	6,21.10 <sup>7</sup>	9,9.10 <sup>7</sup>	7.2.10 <sup>4</sup>	3 den az	-	6,93.10 <sup>8</sup>	2,97.10 <sup>8</sup>	4,54.10 <sup>8</sup>
10	Çiy	1,7.10 <sup>3</sup>	1100	-	1,54.10 <sup>8</sup>	1,71.10 <sup>8</sup>	3,07.10 <sup>7</sup>	6.4.10 <sup>4</sup>	1100	-	4,9.10 <sup>8</sup>	2,62.10 <sup>8</sup>	3.10 <sup>8</sup>	2.7.10 <sup>5</sup>	-	-	6,37.10 <sup>8</sup>	6,5.10 <sup>8</sup>	1,84.10 <sup>8</sup>

Muhafazanın 1. gününe ait küf-maya sayıları  $2.4 \cdot 10^2 - 9.7 \cdot 10^5$  kob/g arasında değişirken, muhafazanın 7.gününde  $4.3 \cdot 10^3 - 4.1 \cdot 10^6$  kob/g ve muhafazanın 14. gününde ise  $5.7 \cdot 10^4 - 4.9 \cdot 10^6$  kob/g arasında değişti.

Yoğurt numunelerinde muhafazanın 1.gününde 1 ve 6 numaralı numunelerde *S. aureus* ( $1.4 \cdot 10^3 - 0.6 \cdot 10^2$ ) değeri belirlendi. *S.aureus* kontaminasyon sonucunda bulaşmış olabilir. Muhafazanın 14. gününde ise numunelerde *S. aureus*'a tesbit edilmedi. *S. aureus*'un 7. ve 14. günlerde 1 ve 6 nolu numunelerde Barid Parker agarda tipik koloni oluşturmaması, laktik asit bakterilerinin ürettiği muhtemel antimikrobiyal maddelerle açıklanabilir (84).

Koliform sayıları ise muhafazanın 1. gününde  $< 3 - 1100$  EMS/g, muhafazanın 7. gününde  $< 3- 1100$  EMS/g, muhafazanın 14.gününde ise  $< 3- 210$  EMS/g olarak değişim gösterdi. Yağmur suyundan elde edilen 1, 7 ve 9 numaralı numunelerde koliform sayısı  $< 3$  EMS/g olarak kaydedildi. Koliform bakteriler; bitki ve çiy damlasının yüzeyinde bulunmasına bağlı olarak bulaşmış olabilir. Muhafazanın son günü olan 14. günde yapılan analizlerde koliform sayısında azalma kaydedildi. Meydana gelen koliform sayısındaki azalma laktik asit bakterilerinin ürettiği antimikrobiyal maddelerden kaynaklanabilir (84).

Farklı doğal kaynaklardan elde edilen muhtemel laktik asit bakterileri ile pıhtılaştırılan ürünlerin duyu niteliklerine ilişkin puanlama tablosu aşağıda verilmiştir (Tablo- 19). Tabloda +4 C'de 14 gün boyunca muhafaza edilen ürünlerin görünüş, kıvam, koku ve tat gibi özellikleri eğitim almış 15 adet panelist tarafından değerlendirilmiştir. Değerler, panelistlerin herbir ürüne verdikleri puanın aritmetik ortalaması olarak verilmiştir.



Tablo- 19: Sütün; bitki, yağmur ve çiy damlaları ile pıhtılaştırılmış numunelerin duyuşal analiz sonuçları

Numune Numarası Kaynağı		1. GÜN				7.GÜN				14.GÜN			
		Görü- nüş	Kıvam	Koku	Tat	Görü- nüş	Kıvam	Koku	Tat	Görü- nüş	Kıvam	Koku	Tat
1	Bitki	4	4	2	3	4	3	2	2	1	1	1	1
2	Bitki	4	3	3	2	2	1	1	1	1	1	1	1
3	Yağmur	5	5	5	5	5	5	4	4	3	2	3	2
4	Yağmur	5	4	5	4	4	3	4	3	3	2	1	1
5	Yağmur	5	5	5	5	5	5	5	4	4	3	2	1
6	Yağmur	4	3	2	4	4	4	3	2	1	1	1	1
7	Çiy	1	1	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1
8	Çiy	3	3	3	3	3	2	2	3	1	1	1	1
9	Bitki	5	5	5	5	4	3	4	4	2	2	3	2
10	Çiy	4	4	3	3	3	3	2	2	1	1	1	1
11	Çiy	5	4	4	5	4	4	4	4	1	1	1	1
12	Bitki	5	5	5	5	5	5	5	5	3	3	3	3
13	Bitki	4	4	3	3	3	3	2	2	2	1	1	1
14	Bitki	5	5	5	5	4	4	4	3	1	1	1	1
15	Bitki	5	4	3	3	4	3	2	2	1	1	1	1
16	Bitki	5	4	2	2	3	4	2	1	1	1	1	1
17	Bitki	5	5	5	5	4	4	3	2	1	1	1	1
18	Bitki	5	5	5	5	5	5	5	5	1	1	1	1
19	Çiy	3	3	2	2	3	3	2	2	1	1	1	1
20	Çiy	5	4	2	2	4	2	2	1	1	1	1	1

Tablo- 19 incelendiğinde 3, 5, 9, 12, 14, 17, 18 numaralı örnekler birinci gün panelistlerden en yüksek puanı aldığı saptandı. Bunlardan 3 ve 5 numaralı numuneler Bandırma yağmur suyundan, 9 ile 17 leylandi ağaçları yapraklarından 12, 14 ve 18 buğday hasılı kullanılarak üretildi. Örneklerin bir haftalık muhafaza süresince organoleptik özelliklerinde fazla bir değişkenlik şekillenmediği görüldü. Muhafaza süresinin sonu olan 14. günde yapılan analizlerde ise görünüş, kıvam, koku ve tat gibi özelliklerin bozulduğu gözlemlendi. Örneklerden en hızlı pH düşmesi 7 numaralı örnekte rastlandı. Aynı örnekte çok hızlı bir pH düşüşüne bağlı olarak serum çıkışında fazla olduğu bunun sonucuda duyuşal niteliklerde bozulmalar görüldü. Numunelerinin tamamında muhafaza süresinin son günü olan 14. günde duyuşal özellikler yönünden en düşük notu aldıkları gözlemlendi.

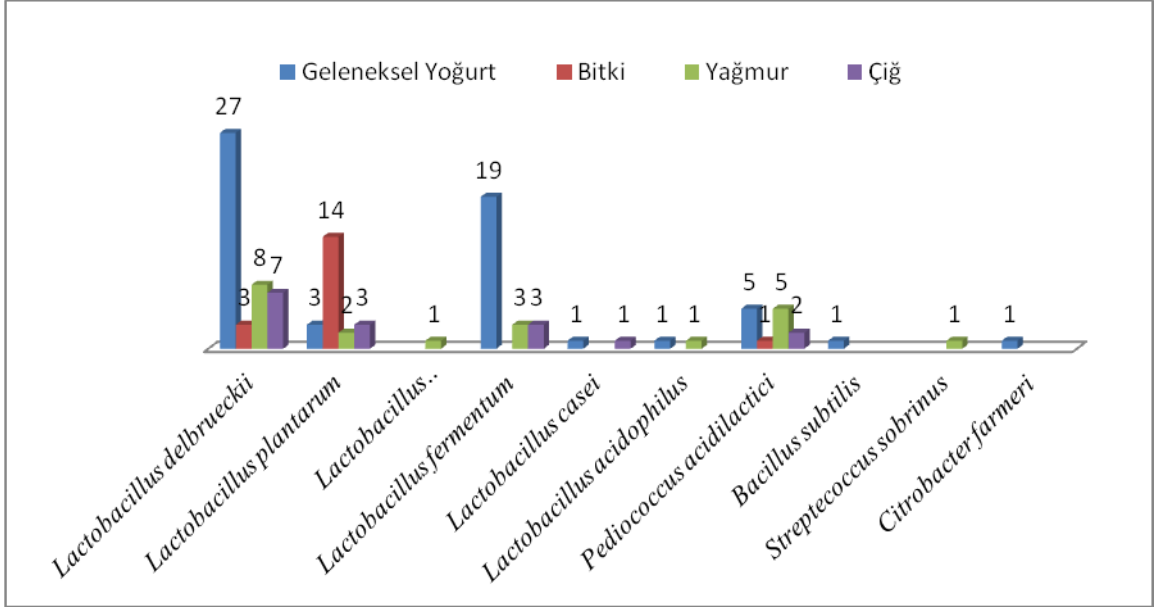
## Yoğurt Bakterilerinin İzolasyonu ve İdentifikasyonu

MRS agar ve M17 agarda üreyen laktik asit bakterileri koloni morfolojisine göre identifikasyonları yapıldı. MRS agar üreyen açık sarı renkli koloniler *Lactobacillus spp.* şüpheli koloniler olarak değerlendirildi. M17 agarda üreyen açık sarı saydam büyük ve dağılgan koloniler *Streptococcus spp.* şüpheli koloniler olarak değerlendirildi. Şüpheli kolonilerden öze ile MRS agar ve M17 agara tek koloni düşürme tekniğine göre çizerek ekimleri yapıldı. Sherman test, Gram boyama, katalaz testi ve mikroskopta 100 imersiyon objektifinde morfolojik olarak tanımlandıktan sonra elde edilen koloniler MALDİ-TOF MS yöntemine göre idetifikasyonları yapılmak üzere Düzen Laboratuarları/Ankara'ya gönderildi. MALDİ-TOF MS kütle spektrometresine göre elde edilen identifikasyon sonuçları aşağıda tablo- 20, 21'de verildi.

Tablo- 20: MALDI-TOF MS kütle spektrometresinde *Lactobacil spp.* İdentifikasyon Sonuçları

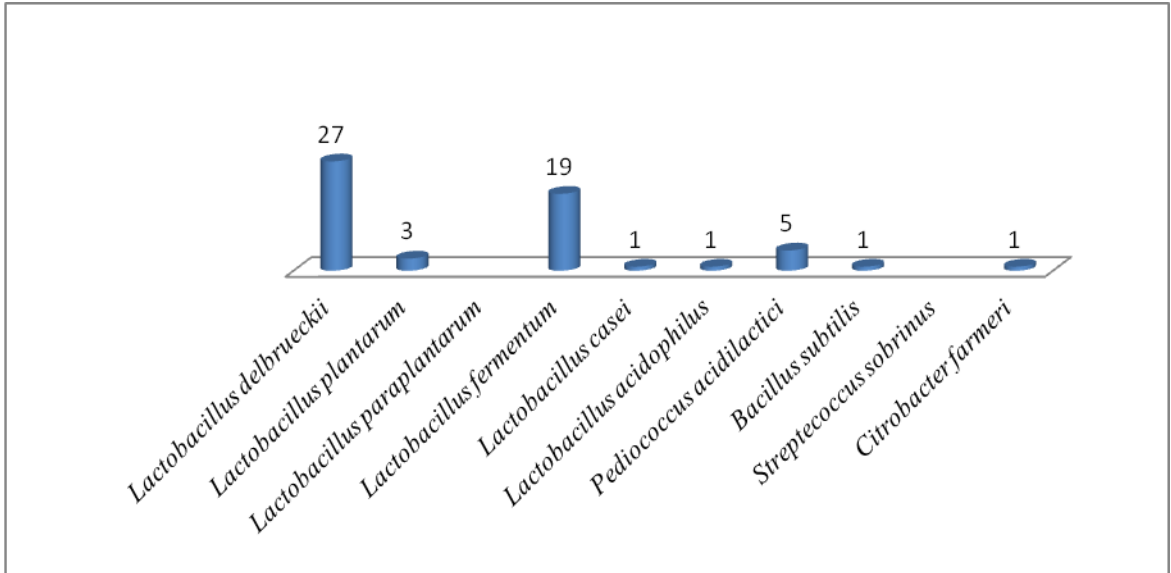
No	Numune Kaynağı	Maldi-tof identifikasyon	Morfolojisi	Gram	Katalaz	Isı derecelerinde üreme			Tuz kons. üreme			Farklı pH	Farklı pH	G. gaz
						10 °C	15 °C	45 °C	%2	%4	%6,5	4,5	6,5	
1	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
2	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
3	Bitki	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
4	Bitki	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
5	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
8	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
9	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
10	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
11	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
19	Çiy Damlası	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
28	Bitki	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
42	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
44	Yağmur	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
51	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
58	Çiy Damlası	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
59	Çiy Damlası	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
63	Çiy Damlası	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
68	Çiy Damlası	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
71	Çiy Damlası	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
75	Çiy Damlası	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
78	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
79	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
81	Yağmur	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
95	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
96	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
97	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
98	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
99	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
100	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
101	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-

102	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
103	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
104	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
105	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
106	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
107	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
108	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
109	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
110	G.yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
111	Yağmur	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
112	Yağmur	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
113	Yağmur	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
114	Yağmur	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
115	Yağmur	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
116	Yağmur	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Basil, (+)	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-



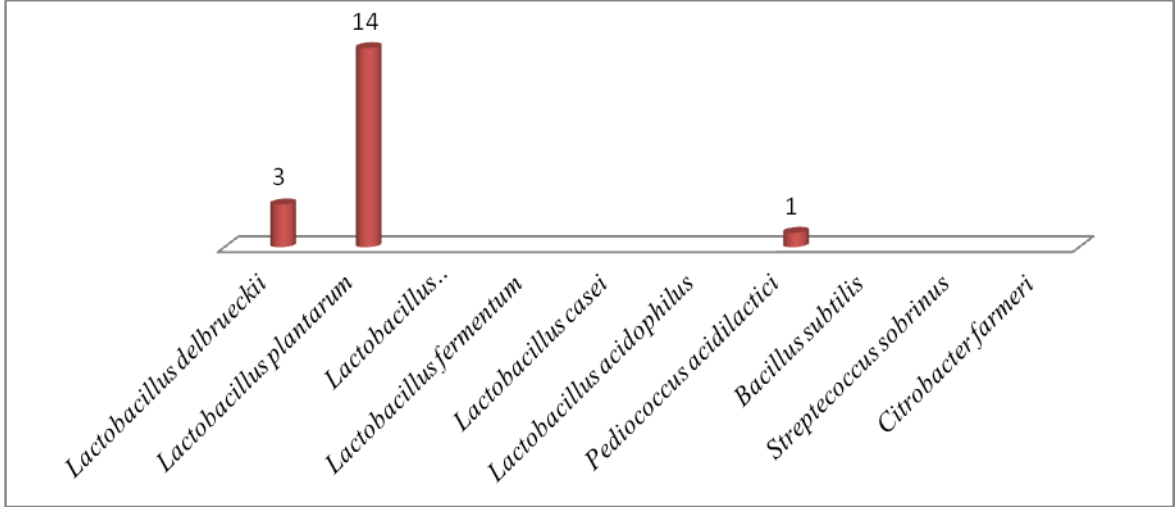
Şekil- 10: *Lactobacillus spp.* şüpheli izolatların MALDİ-TOF MS tekniğine göre identifikasyon sonuçları

MRS agarda tipik koloni veren 113 izolattan MALDİ-TOF MS tekniğine göre identifikasyonda % 39.8'i (45 tane) *L.delbrueckii*, % 19.4'ü (22 tane) *L. plantarum*, % 10.6'sı (12 tane) *L.fermentum* ve *P.acidilacti*, % 1.7'si (2 tane) *L.acidophylus* ve *L.casei*, % 0.88'si (1 tane) *paraplantarum/plantarum*, *P.adilacatici*, *L.paraplantarum*, *S.sorbinus*, *C.farmeni* ve *B.subtulis* olarak tanımlandı.



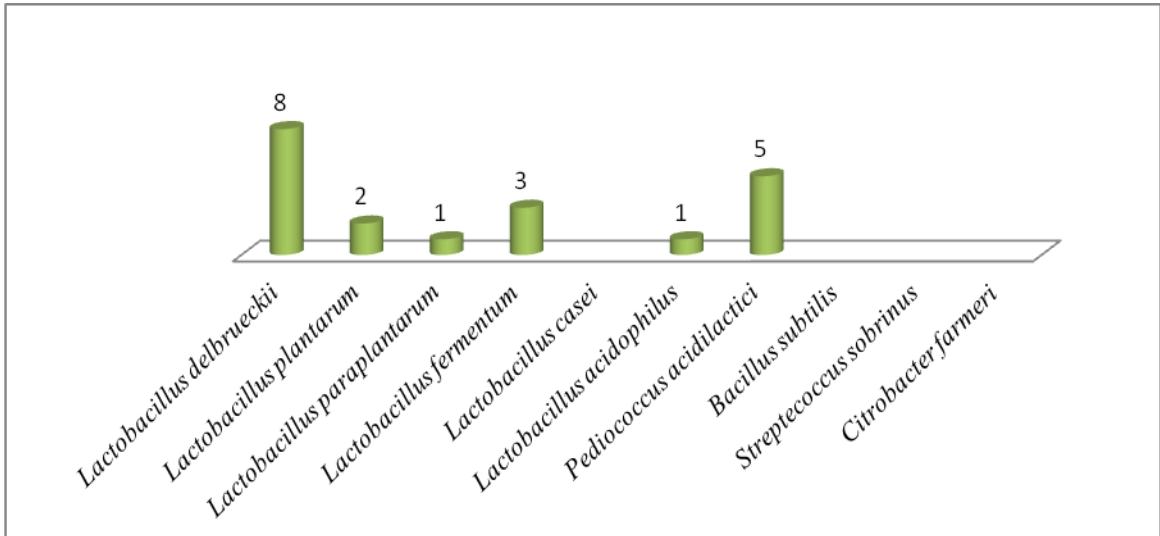
Şekil- 11: Geleneksel yoğurtlardan elde edilen izolatların MALDİ-TOF MS tekniğine göre identifikasyon sonuçları

Herbir suşun izole edildiği ortama göre değerlendirme yapıldığında (Şekil-11) geleneksel yöntemlerle üretilen yoğurt örnekleri izolatlarının % 60'ı *L. delbrueckii*, % 13.3'ü *L. fermentum*, % 11.1'i *P. acidilacti*, % 6.6'sı *L. plantarum*, % 2.2'si *L. casei*, *L. acidophilus*, *C. farmeri* ve *B.subtilis* olarak tanımlandı.



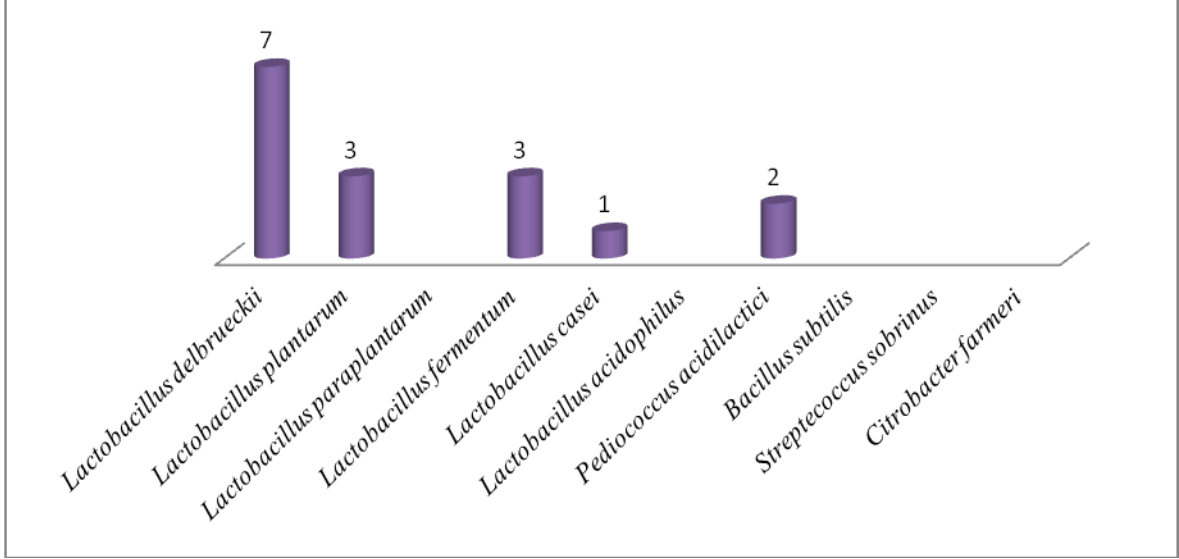
Şekil- 12: Bitkilerden elde edilen izolatların MALDI-TOF MS tekniğine göre identifikasyon sonuçları

Bitki örneklerinden pihtılaştırılan süt örneklerinden elde edilen izolatlardan; % 12'si *L. delbrueckii*, % 56'sı *L. plantarum*, % 28'i *L. paraplantarum/plantarum* ve % 4'ü *P. acidilacti* olarak tanımlandı (Şeki- 12).



Şekil- 13: Yağmur damlasından elde edilen izolatların MALDI-TOF MS tekniğine göre identifikasyon sonuçları

Yağmur örneklerinden üretilen numunelerinden elde edilen izolatların, % 38.09'u *L. delbrueckii*, % 19.04'ü *P. acidilactici* % 14.28'i *L. fermentum*, % 9.5'i *L. plantarum* ve % 4.76'sının *L. paraplantarum*, *L. acidophilus*, *S. sorbinus* olarak tanımlandı (Şekil- 13).



Şekil- 14: Çiy damlasından elde edilen izolatların MALDI-TOF MS tekniğine göre identifikasyon sonuçları

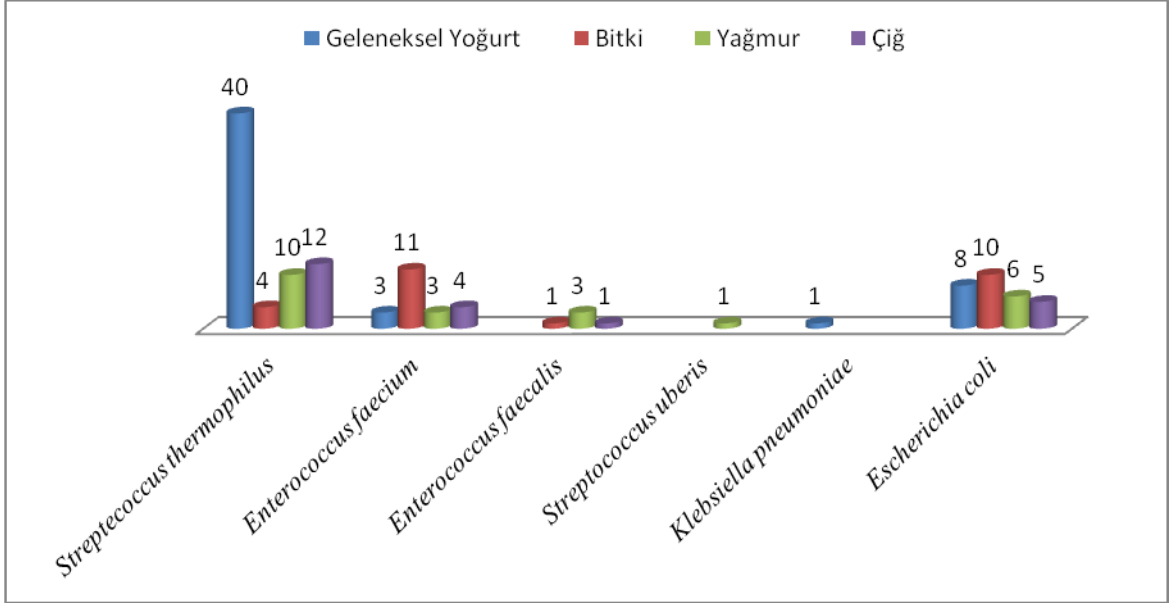
Çiy damlası örneklerinden elde edilen izolatların, % 36.8'i *L. delbrueckii*, % 15.78'i *L. fermentum*, *L. plantarum* ve *L. paraplantarum/plantarum*, % 10.52'si *P. acidilactici* ve % 5.26'sı *L. casei*, olarak tanımlandı (Şekil- 14).

Tablo- 21: MALDI-TOF MS Kütle Spektrometresinde *Streptococ spp.* İdentifikasyon Sonuçları

No	Numune kaynağı	Maldi-tof identifikasyon	Morfolojisi	Gram	Katalaz	Isı derecelerinde türeme			Tuz kons. üreme			Farklı pH	Farklı pH	G. gaz
						10 °C	15 °C	45 °C	%2	%4	%6,5	4,5	6,5	
24	Bitki	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
35	Bitki	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
36	Bitki	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
40	Bitki	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
59	Çiy Damlası	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
60	Çiy Damlası	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
61	Çiy Damlası	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
62	Çiy Damlası	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
63	Çiy Damlası	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
64	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
65	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
66	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
67	Çiy Damlası	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
68	Çiy Damlası	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
69	Çiy Damlası	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
70	Çiy Damlası	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
71	Çiy Damlası	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
72	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
73	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
74	Çiy Damlası	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
75	Çiy Damlası	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
76	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
77	Yağmur	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
78	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
79	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
80	Yağmur	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
81	Yağmur	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
82	Yağmur	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
83	Yağmur	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
84	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
85	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
86	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-

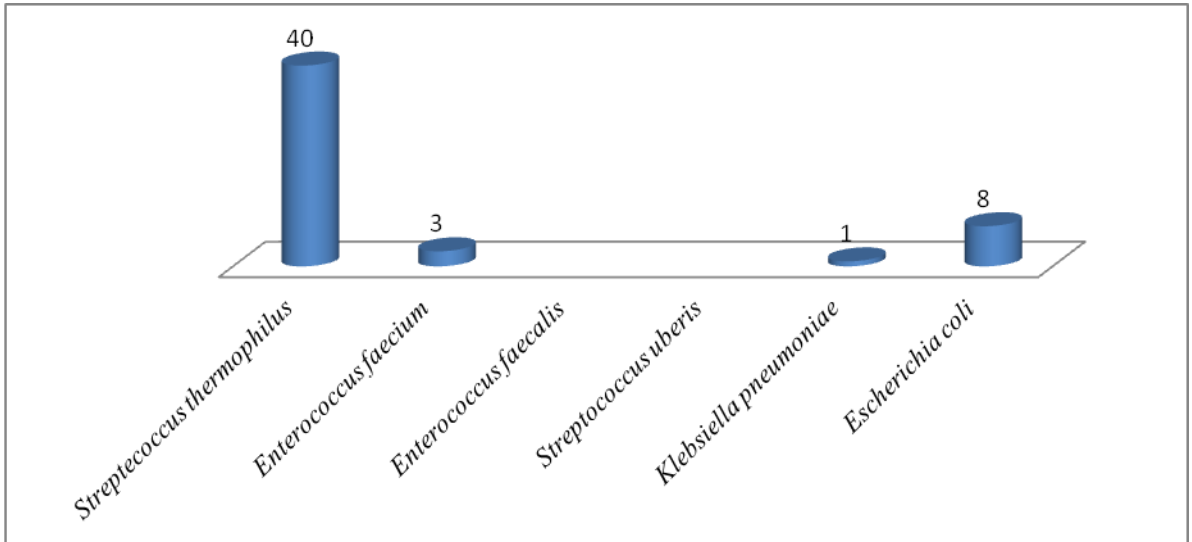


87	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
88	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
89	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
90	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
91	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
92	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
93	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
94	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
95	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
96	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
97	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
99	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
100	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
101	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
102	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
103	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
104	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
105	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
106	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
107	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
108	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
109	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
110	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
111	Yağmur	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
112	Yağmur	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
113	Yağmur	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
114	Yağmur	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
116	Yağmur	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
117	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
118	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
119	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
120	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
121	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
122	G.yoğurt	<i>S. thermophilus</i>	Kok, (+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-



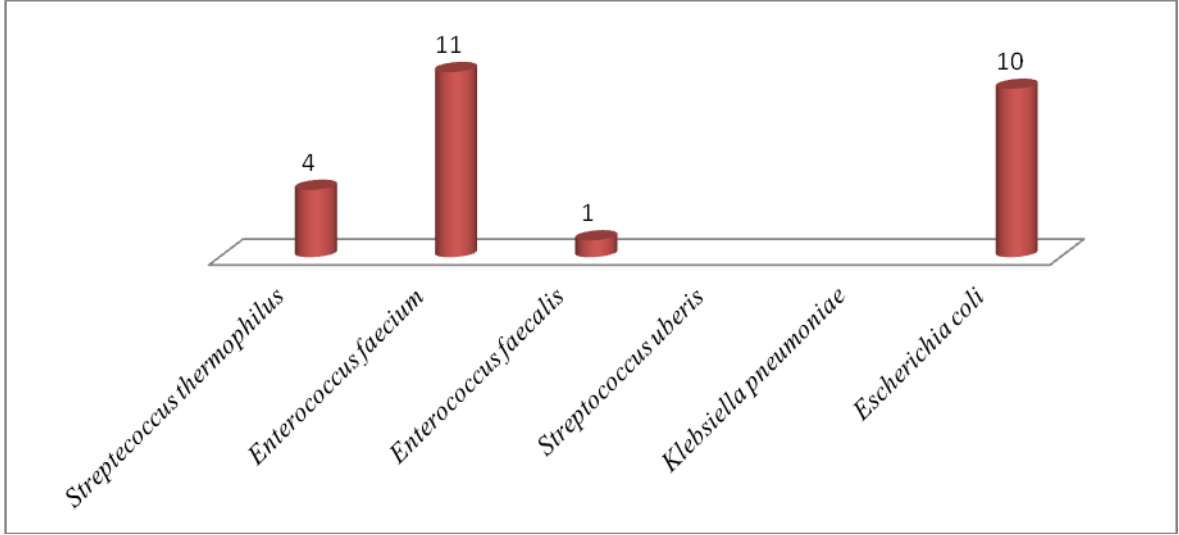
Şekil- 15: *Streptococcus spp.* şüpheli izolatların MALDI-TOF MS tekniğine göre identifikasyon sonuçları

Elde edilen 122 izolattan % 54.09'u *S. thermophilus*, %23.7'si *E.coli*, % 17.21' i *E. faecium*, % 4.31'i *E. faecalis* ve % 0.81'i *S. uberis* ve *K. pneumoniae* olarak tanımlandı (Şekil- 15).



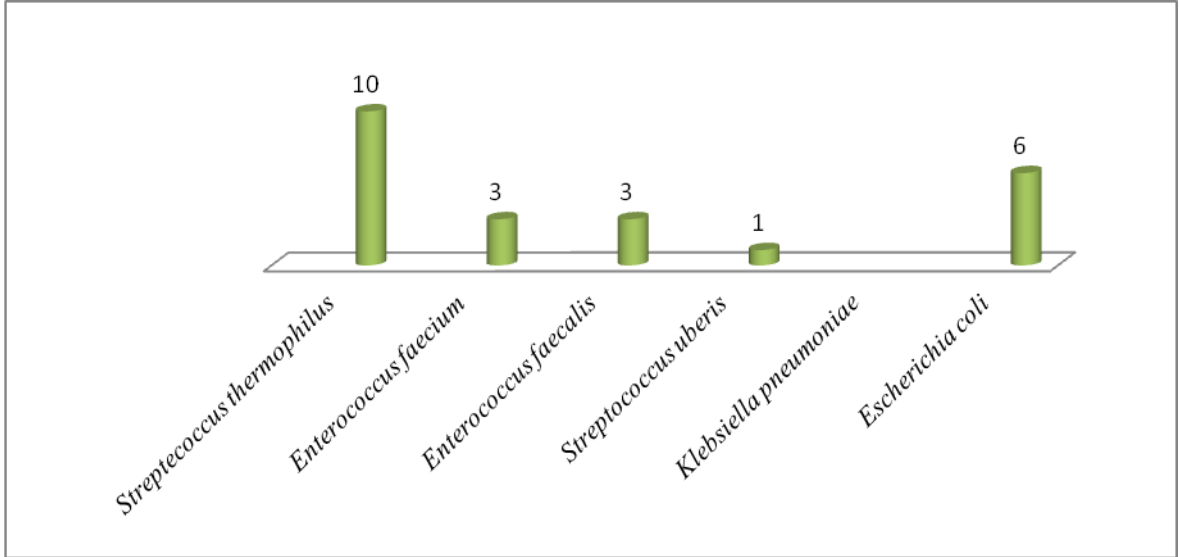
Şekil- 16: Geleneksel yoğurtlardan elde edilen izolatların MALDI-TOF MS tekniğine göre identifikasyon sonuçları

Geleneksel yöntemlerle üretilen yoğurt örneklerinden elde edilen izolatların % 65.6'sı *S. thermophilus*, % 4.68'i *E. faecium*, % 12.5 *E.coli* ve % 1.56'sı *K. pneumoniae* olarak tanımlandı (Şekil- 16).



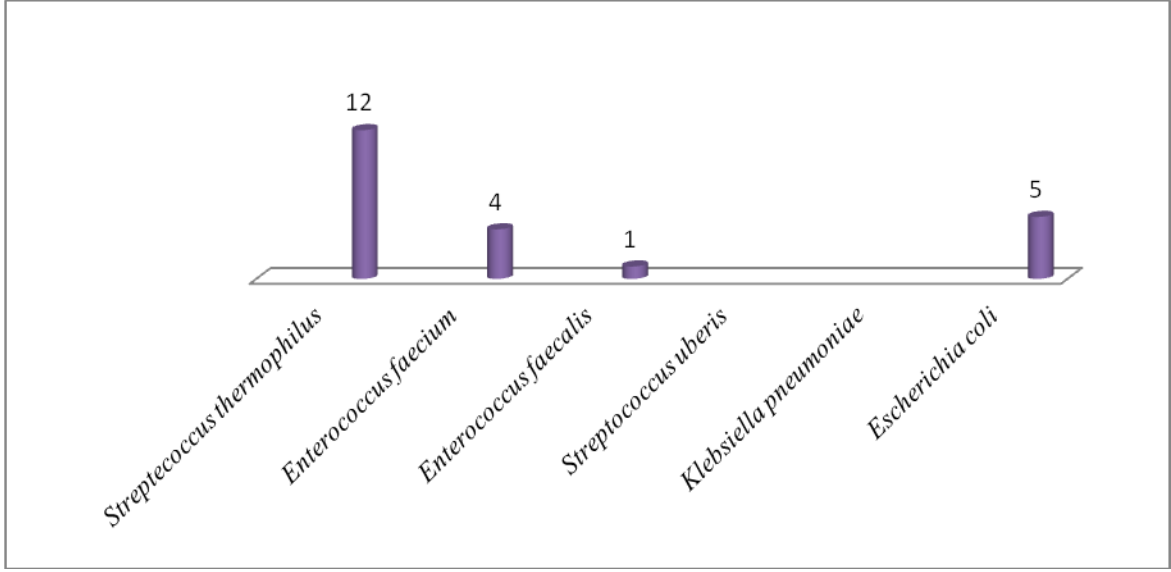
Şekil- 17: Bitkilerden elde edilen izolatların MALDI-TOF MS tekniğine göre identifikasyon sonuçları

Bitki örneklerinden elde edilen izolatların % 15.38'i *S. thermophilus*, % 42.30'u *E. faecium*, % 3.84 *E. faecalis* ve % 3.84'ü *E. coli* olarak tanımlandı (Şekil- 17).



Şekil- 18: Yağmur suyundan elde edilen izolatların MALDI-TOF MS tekniğine göre identifikasyon sonuçları

Yağmur örneklerinden üretilen numunelerinden elde edilen izolatlardan % 38.09'u *S. thermophilus*, % 14.28'i *E. faecium*, *E. faecalis*. % 28.57'si *E. coli* ve % 4.76'sı *S.uberis* olarak tanımlandı (Şekil- 18).



Şekil- 19: Çiy damlasından elde edilen izolatların MALDI-TOF MS tekniğine göre identifikasyon sonuçları

Çiy damlası örneklerinden üretilen numunelerden elde edilen izolatlardan % 54.54'ü *S.thermophilus*, % 18.18'i *E.faecium*, % 4.5'i *E.faecalis* ve % 22.72'si *E.coli* olarak tanımlandı (Şekil- 19).

M 17 agar da benzer koloniler gösteren bütün suşlara MALDI-TOF MS tekniğine göre identifikasyona tabi tutuldu. MALDI-TOF MS tekniğine göre identifikasyon sonuçlarına bakıldığında *S.thermophilus* dışında 17 suş *E.faecium* olarak, 6 suş *E.facealis* olarak, 26 suş *E.coli*, 1 suş *S.uberus* ve 1 suşda *K.pneumonia* olarak tanımlandı. MALDI-TOF MS tekniğine ile yoğurt bakterilerinin dışında başka bakterilerin de izole edilmesinin sebebinin yoğurt kıvam ve tadını veren diğer mikroorganizmalarında olması şeklinde açıklanabilir.

## İzolatların Teknolojik Karakterizasyonu

### *S. thermophilus* Suşlarının M17 Sıvı Besiyerinde Glikolizisin Belirlenmesi

Suşların buldukları ortamın pH'sını düşürme özelliklerinin tespiti amacı ile logoritmik fazın sonunda bulunan suşlar,% 5 oranında hazırlanmış steril laktoz ile % 1 oranında zenginleştirilmiş 10 ml M17 sıvı besiyeri içeren tüplere % 1 oranında ekim yapılarak 40 °C de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu izleyen 2. 4. 6. 8. ve 24. saatlerde pH'ları ölçülerek laktoz ve laktik asit üretim değişiklikleri kaydedildi.

Tablo- 22: *S. thermophilus* suşlarının pH değimi

Suşlar Kaynakları		M17 Sıvı Besiyeri (saat)					Yağsız Süt Tozu(saat)				
suş	Numune Kaynağı	2	4	6	8	24	2	4	6	8	24
24	Bitki	6,97	6,93	6,82	6,73	5,71	5,78	5,03	4,55	4,47	4,35
35	Bitki	6,95	6,85	6,63	6,60	5,55	6,23	5,37	4,60	4,45	4,88
36	Bitki	6,84	6,71	6,46	6,35	5,81	5,60	4,95	4,61	4,59	4,12
40	Bitki	6,76	6,26	5,88	5,86	6,02	5,99	5,34	4,73	4,69	4,18
59	Çiy Damlası	6,82	6,90	5,79	5,87	5,89	6,34	5,67	4,58	4,55	4,29
60	Çiy Damlası	7,02	6,09	6,85	6,69	5,70	6,8	5,74	4,50	4,44	4,95
61	Çiy Damlası	6,81	6,73	6,05	5,82	5,65	6,21	5,25	4,96	4,92	4,14
62	Çiy Damlası	6,98	6,98	6,84	6,78	5,70	6,78	6,26	5,05	4,90	4,01
63	Çiy Damlası	6,82	6,71	6,27	5,84	5,29	6,18	5,41	4,97	4,80	4,22
64	G.yoğurt	6,85	6,74	6,27	5,90	5,60	6,17	5,23	4,84	4,60	4,12
65	G.yoğurt	6,98	6,92	6,64	6,53	5,65	6,59	6,46	4,53	4,49	3,92
66	G.yoğurt	6,80	6,56	5,95	5,70	5,57	6,32	5,38	5,02	4,81	4,16
67	Çiy Damlası	6,83	6,80	6,35	5,93	5,66	6,32	5,33	5,14	4,92	4,24
68	Çiy Damlası	6,84	7	5,98	5,78	5,69	5,95	4,97	4,76	4,56	4,15
69	Çiy Damlası	6,87	6,84	6,28	5,80	5,72	6,22	5,33	4,91	4,70	4,22
70	Çiy Damlası	6,84	6,83	6,45	5,84	5,65	6,18	5,45	5,00	4,84	4,2
71	Çiy Damlası	6,81	6,69	6,30	5,95	5,63	6,21	5,52	5,10	4,89	4,18
72	G.yoğurt	6,88	6,87	6,61	6,49	5,59	6,24	4,59	4,24	4,10	3,83
73	G.yoğurt	7,00	6,92	6,67	6,63	5,64	6,53	5,02	4,39	4,26	3,88
74	Çiy Damlası	6,96	6,95	6,85	6,75	5,66	6,89	6,31	4,73	4,47	4,00
75	Çiy Damlası	6,81	6,72	6,37	6,00	5,14	6,20	5,41	5,12	4,92	4,38
76	G.yoğurt	6,85	6,85	6,76	6,61	5,54	6,23	5,61	4,83	4,53	3,95
77	Yağmur	6,81	6,75	6,53	6,27	5,41	6,07	5,42	5,07	4,82	4,26
78	G.yoğurt	6,55	6,79	6,38	5,93	5,39	6,06	5,25	4,91	4,70	4,08
79	G.yoğurt	6,80	6,52	5,96	5,77	5,62	6,06	5,14	4,88	4,52	4,13
80	Yağmur	6,84	6,70	6,14	5,79	5,48	6,07	5,17	4,84	4,55	4,17
81	Yağmur	7,09	6,95	6,65	6,57	5,58	6,85	5,61	4,67	4,64	4,13
82	Yağmur	7,04	7,02	7,05	7,05	5,66	7,03	7,10	7,04	6,87	4,56
83	Yağmur	7,10	6,57	6,09	5,91	5,88	6,04	5,34	5,06	4,94	4,57
84	G.yoğurt	7,06	7,03	7,02	5,99	5,69	7,26	7,26	7,09	6,95	4,09
85	G.yoğurt	7,07	6,33	6,01	5,90	5,75	6,14	5,32	4,96	4,76	4,55
86	G.yoğurt	7,08	7,02	7,00	6,98	5,75	7,20	7,19	7,14	5,60	4,07
87	G.yoğurt	7,09	7,07	7,01	6,95	5,64	7,02	7,10	6,79	5,16	4,13
88	G.yoğurt	7,08	7,09	6,25	6,13	5,85	6,68	6,22	5,25	4,84	4,46
89	G.yoğurt	7,09	7,01	6,04	5,88	5,83	6,63	6,10	5,10	4,82	4,49
90	G.yoğurt	7,06	6,14	5,82	5,74	5,60	6,20	5,30	4,95	4,78	4,48
91	G.yoğurt	7,08	7,04	7,02	7,02	5,80	7,45	7,35	7,44	7,45	4,12
92	G.yoğurt	7,06	7,02	7,00	6,91	5,64	7,29	6,80	5,41	4,85	4,13
93	G.yoğurt	6,89	6,85	6,52	5,93	5,63	7,09	6,79	5,46	4,83	4,20
94	G.yoğurt	6,98	6,57	6,13	5,85	5,58	6,89	5,38	4,63	4,47	4,16
95	G.yoğurt	7,00	7,02	6,89	5,97	5,49	6,61	4,92	4,53	4,39	4,05
96	G.yoğurt	6,87	6,81	6,02	5,95	5,68	6,58	6,02	5,02	4,76	4,48
97	G.yoğurt	6,98	6,87	6,23	5,93	5,83	6,63	6,15	5,06	4,75	4,48
99	G.yoğurt	7,02	6,32	5,96	5,88	5,34	6,27	5,58	5,15	5,04	4,49
100	G.yoğurt	6,95	6,46	6,03	5,94	5,86	7,41	7,29	7,17	6,67	4,17
101	G.yoğurt	6,79	6,86	6,72	5,91	5,55	7,33	7,31	7,10	7,00	4,47
102	G.yoğurt	6,94	6,87	6,42	5,96	5,67	6,73	6,41	5,73	5,38	4,60
103	G.yoğurt	7,01	6,88	6,75	5,95	5,76	6,95	7,02	6,87	6,78	4,5
104	G.yoğurt	6,99	6,84	6,25	5,98	5,76	6,61	5,83	4,91	4,84	4,45
105	G.yoğurt	6,96	6,75	6,28	5,94	5,62	6,60	5,95	4,69	4,49	4,10
106	G.yoğurt	7,01	6,92	6,83	5,87	5,61	5,95	5,44	4,63	4,61	4,12
107	G.yoğurt	6,97	6,82	6,21	5,94	5,63	6,04	5,64	4,51	4,53	4,26
108	G.yoğurt	7,03	7,00	6,92	6,79	5,96	6,86	5,64	4,45	4,41	4,85
109	G.yoğurt	6,99	6,86	6,24	6,01	5,69	6,88	6,36	5,15	4,92	4,16

110	G.yoğurt	70,4	6,99	6,74	5,98	5,67	6,79	6,52	4,64	4,59	3,98
111	Yağmur	7,06	6,36	6,09	5,90	5,75	6,34	4,76	4,44	4,16	3,93
112	Yağmur	6,99	6,96	6,81	6,77	5,59	6,81	5,32	4,47	4,45	3,91
113	Yağmur	6,89	6,85	5,91	5,68	5,54	6,87	6,39	4,75	4,56	4,42
114	Yağmur	6,81	6,79	6,25	5,92	5,64	6,46	5,45	4,76	4,82	4,17
116	Yağmur	6,99	6,92	6,86	6,77	5,71	6,92	5,19	4,62	4,38	4,06
117	G.yoğurt	6,89	6,91	6,67	6,56	5,62	6,79	5,48	5,11	4,76	4,11
118	G.yoğurt	6,98	6,89	6,71	6,59	5,59	6,41	5,43	5,25	4,87	4,19
119	G.yoğurt	7,01	6,94	6,63	6,66	5,61	5,97	4,97	4,76	4,56	4,15
120	G.yoğurt	6,97	6,96	6,87	6,74	5,62	6,68	5,42	4,89	4,69	4,28
121	G.yoğurt	7,07	7,01	7,00	6,89	5,64	6,65	4,94	4,65	4,49	4,10
122	G.yoğurt	6,88	6,82	6,56	5,91	5,63	6,87	6,09	5,23	4,45	4,01

\*Birbirinden bağımsız üç farklı ölçümün aritmetik ortalaması alınmıştır

Tablo- 22 incelendiğinde bütün suşların ortam pH'sını 5 değerinin altına düşüremediği saptandı. İnkubasyon sırasında meydana gelen pH değerinin 5 altına düşmemesi suşun asidifikasyon niteliğinin düşüklüğü ve besiyerinin tamponlama özelliğinin kuvveti ile açıklanabilir. pH'daki hızlı düşme özellikle 40, 66, 59, 60, 68, 79 ve 85 numaralı suşlarda kaydedildi. pH düşmesinin hızlı olduğu suşlardan 68 numaralı suşta kuvvetli, 59, 60 ve 79 orta seviyede laktoz aktivitesi saptandı. Bazı suşlarda ise pH'da görülen düşme yavaş (36, 74, 65) şekillendi. pH düşmesinin yavaş olduğu 65 ve 74 numaralı suşlarda laktoz aktivitesi zayıf 36. suşta orta seviyededir. Bakteriyolitik aktivitenin de belirlendiği bu suşlardan 36 numaralı suşta bakteriyolizin yüksek gerçekleştiği belirlendi. Bu suşta laktoz aktivitesi orta seviyede olmasına rağmen pH azalmasının gerçekleşmemesi yüksek bakteriyolitik aktiviteye bağlı olabilir.

### **S. *thermophilus* Suşlarının Yağsız Süt Tozunda Glikolizisin Belirlenmesi**

Süt yoğurt ortamını daha iyi yansıtması dolayısıyla suşların asidifikasyon yeteneği yağsız süt tozundan hazırlanan besiyerinde inkubasyonu izleyen 2. 4. 6. 8. ve 24. saatlerde pH'ları ölçülerek değişiklikler saptandı.

Tablo- 22 incelendiğinde 8. saatten sonra suşların tamamında pH 5'in altına düştüğü kaydedildi. İnkubasyonun 2. saatinde çok hızlı pH düşmesi 24, 36, 40, 68, 106 ve 119 numaralı suşlarda gözlemlendi. Laktoz aktivitesinin 36, 40, 68 ve 119 numaralı suşlarda kuvvetli, 24 ve 106 numaralı suşlarda ise zayıf olduğu saptandı. Suşlardan 62, 87, 95, 102 ve 103 numaralı olanlarında inkubasyonun 2. saatinde pH düşüşü daha yavaş şekillendi. Bu suşlardan 62 ve 87 zayıf, 102 ve 103 numaralı suşlarda orta seviyede laktoz kullanım aktivitesi kaydedildi.

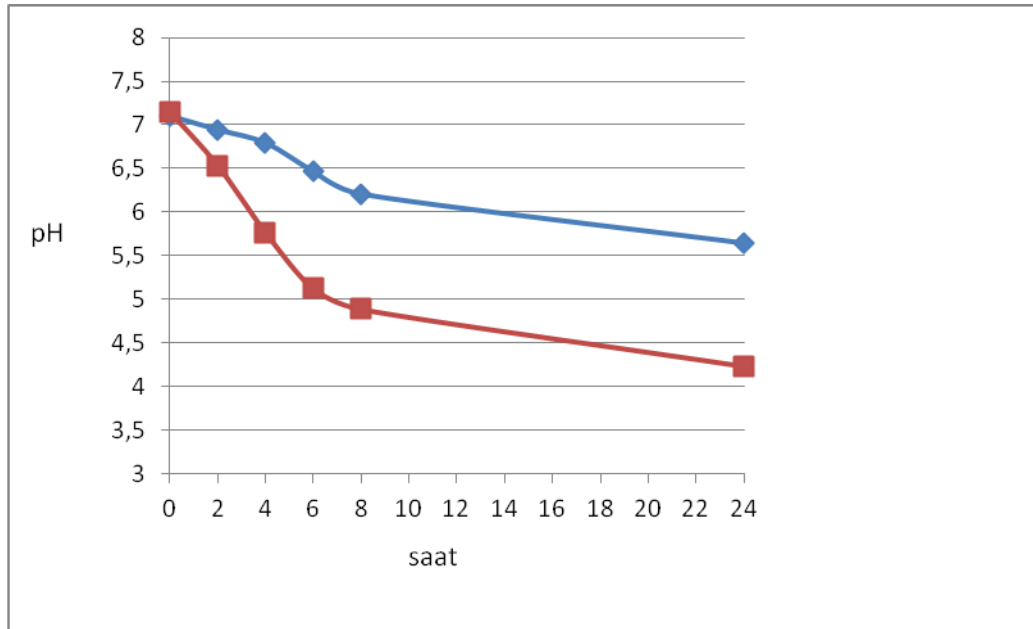
Tablo- 23: *S. thermophilus* suşlarının zamana bağlı pH değişimi

	Sıvı Besiyeri						Yağsız Süt Tozu					
	2	4	6	8	24	F	2	4	6	8	24	F
Ortalama	6,94a	6,79b	6,46c	6,20d	5,65e		6,53a	5,76b	5,12c	4,88d	4,23e	
S.sapma	0,108	0,236	0,363	0,417	0,143	219,76	0,415	0,711	0,774	0,699	0,233	139,448
S.hata	0,0132	0,0288	0,0444	0,0509	0,0174		0,0507	0,0869	0,0946	0,0855	0,0285	
Max	7,1	7,09	7,05	7,05	6,02		7,45	7,35	7,44	7,45	4,95	
Min.	6,55	6,09	5,79	5,68	5,14		5,6	4,59	4,24	4,1	3,83	

\*a,b,c,d, eaynı satırda farklı harfler taşıyan gruplar arasında farklılık ( $p < 0,01$ ) önemlidir.

*S. thermophilus* M17 sıvı besiyerinde pH değişimi incelendiğinde 24. saatteki en düşük pH değeri 5.14 en yüksek pH değeri ise 6.02 olarak ölçüldü. Gruplar (2, 4, 6, 8 ve 24. saat) arasında istatistiksel olarak Duncan testine tabi tutuldu  $p < 0,01$  gruplar arasındaki farklılık istatistikî açıdan önemli bulundu (Tablo- 23).

*S.thermophilus*'un yağsız süt tozu besiyerinde en düşük pH ortalaması 3.83 en yüksek pH değeri ortalaması ise 4.95 olarak ölçüldü. Gruplar (2, 4, 6, 8 ve 24. Saat) arasında istatistiksel olarak Duncan testine tabi tutuldu  $p < 0,01$  gruplar arasındaki farklılık istatistiki açıdan önemli bulundu (Tablo- 23).



Şekil- 20: *S. thermophilus* M17 sıvı besiyeri (◆) ve yağsız süt tozunda (■) zamana bağlı asitliğin artışı ve pH değişikliği

## L. delbrueckii Suşlarının MRS Sıvı Besiyerinde Glikolizisin Belirlenmesi

L. delbrueckii suşlarının buldukları ortamın pH'sını düşürme özellikleri tesbiti amacıyla logortimik fazın sonunda bulunan suşlar laktoz ile zenginleştirilmiş 10 ml MRS sıvı besiyeri içeren tüplere % 1 oranında ekim yapılarak 42 °C de inkubasyona bırakıldı. İnkubasyonu izleyen 2. 4. 6. 8. ve 24. saatlerde pH'ları ölçülerek laktoz ve laktik asit üretim değişiklikleri kaydedildi.

Tablo- 24: L. delbrueckii suşların pH değişimi

Suşlar kaynakları		MRS Sıvı Besiyeri(saat)					Yağsız Süt Tozu(saat)				
Suş	Numunenin kaynağı	2	4	6	8	24	2	4	6	8	24
1	G.yoğurt	5.50	5.54	5.55	5.45	5.02	6.8	6.85	6.86	6.23	5.76
2	G.yoğurt	5.6	5.57	5.59	5.00	4.04	6.8	6.88	6.85	5.08	3.38
3	Bitki	5.63	5.55	5.56	4.98	4.46	6.81	6.08	5.59	5.12	4.89
4	Bitki	5.61	5.53	5.61	4.56	3.98	6.80	6.84	6.85	4.98	3.46
5	G.yoğurt	5.51	5.49	5.45	4.58	3.80	6.78	6.67	6.34	4.68	3.97
8	G.yoğurt	5.46	5.42	5.35	4.63	4.29	5.84	5.72	5.81	4.02	3.49
9	G.yoğurt	5.50	5.43	5.41	4.23	3.91	6.40	5.76	5.45	4.78	4.12
10	G.yoğurt	5.36	5.29	5.19	4.59	3.93	5.23	5.24	5.13	4.67	4.34
11	G.yoğurt	5.52	5.39	5.38	4.56	3.79	6.27	5.83	5.68	5.00	4.69
19	Çiy Damlası	5.51	5.47	5.44	4.78	3.74	6.64	5.69	5.44	3.98	3.76
28	Bitki	5.40	5.36	5.39	4.98	3.81	5.92	5.51	5.24	4.87	4.28
42	G.yoğurt	5.41	5.36	5.26	4.86	3.86	5.96	5.55	5.23	4.98	4.48
44	Yağmur	5.60	5.60	5.59	5.1	3.85	6.8	6.84	6.87	4.04	4.56
51	G.yoğurt	5.37	5.27	5.10	4.87	3.85	6.02	5.55	5.22	4.58	4.20
58	Çiy Damlası	5.46	5.26	5.01	4.73	3.77	5.75	5.17	5.05	4.14	4.24
59	Çiy Damlası	5.37	5.10	5.97	4.56	3.95	5.87	5.44	5.47	4.05	3.9
63	Çiy Damlası	5.49	5.03	5.02	4.59	3.95	6.6	6.18	5.95	4.45	3.69
68	Çiy Damlası	5.48	5.38	5.16	4.89	4.08	6.33	6.12	5.94	4.94	4.43
71	Çiy Damlası	5.39	5.29	5.05	4.99	3.87	5.24	4.52	4.25	4.04	3.58
75	Çiy Damlası	5.39	5.29	5.10	4.87	3.76	5.53	4.68	4.37	4.23	3.48
78	G.yoğurt	5.33	5.22	5.36	4.89	4.08	5.57	5.25	5.26	4.45	3.76
79	G.yoğurt	5.37	5.85	5.31	4.87	3.84	5.69	5.08	4.99	4.32	3.36
81	Yağmur	5.56	5.44	5.39	5.00	4.01	6.44	5.65	5.28	4.86	4.72
95	G.yoğurt	5.61	5.55	5.56	4.89	3.87	6.89	6.75	6.78	4.65	4.02
96	G.yoğurt	5.52	5.37	5.00	4.78	4.02	6.16	5.40	4.78	4.17	3.96
97	G.yoğurt	5.56	5.56	5.58	4.85	4.23	6.79	6.74	6.63	4.78	3.78
98	G.yoğurt	5.49	5.43	5.21	4.96	3.75	6.13	5.10	4.63	3.97	3.25
99	G.yoğurt	5.54	5.54	5.34	4.74	4.25	6.78	6.73	6.73	4.04	4.56
100	G.yoğurt	5.59	5.57	5.56	4.82	3.98	6.75	6.76	6.74	4.56	3.96
101	G.yoğurt	5.49	5.49	5.14	4.84	4.25	6.42	5.65	4.91	4.65	4.28
102	G.yoğurt	5.51	5.35	5.17	4.29	3.78	6.28	5.34	4.78	4.34	4.26
103	G.yoğurt	5.51	5.48	5.24	5.00	4.01	6.25	5.55	4.89	3.96	3.69
104	G.yoğurt	5.48	5.42	5.36	5.02	4.02	5.48	4.72	4.53	3.84	3.25
105	G.yoğurt	5.51	5.46	5.46	4.95	4.14	5.65	5.02	4.91	4.09	3.67
106	G.yoğurt	5.42	5.40	5.40	4.83	4.36	5.40	5.37	5.35	4.57	3.91
107	G.yoğurt	5.45	5.45	5.45	5.05	4.22	5.15	5.06	4.98	4.44	4.09
108	G.yoğurt	5.45	5.45	5.45	5.11	4.02	5.44	5.16	5.21	4.38	4.08
109	G.yoğurt	5.48	5.43	5.42	4.82	4.11	5.07	4.99	4.79	4.51	4.17
110	G.yoğurt	5.48	5.48	5.46	4.76	4.16	5.64	5.52	5.40	4.31	4.17
111	Yağmur	5.36	5.36	5.36	5.12	4.26	5.21	5.17	5.18	4.59	3.90



112	Yağmur	5.40	5.40	5,39	5,06	4,04	5,12	4,88	4,61	4,32	4,04
113	Yağmur	5.38	5.38	5,38	4,84	4,21	5,42	5,26	5,03	4,56	3,98
114	Yağmur	5.37	5.41	5,41	5,69	4,20	5,45	5,45	5,23	4,32	4,05
115	Yağmur	5.40	5.39	5,39	5,03	4,41	5,57	5,07	4,79	4,34	4,06
116	Yağmur	5.38	5.35	5,41	5,06	4,32	4,90	4,70	4,52	4,08	3,90

\*Birbirinden bağımsız üç farklı ölçümün aritmetik ortalaması alınmıştır.

Tablo- 24 incelendiğinde bütün suşların ortam pH'sını 24 saatin sonunda 4 değerlerine kadar düşürdüğü saptandı. İnkubasyon takip edildiğinde pH'da meydana gelen düşmelerin özellikle 6. saatten sonra şekillendiği görüldü. Suşlardan 10, 51, 59, 63 ve 78 numaralılarda pH düşmesi hızlı olduğu saptandı. 10 ve 78 numaralı suşlarda laktoz aktivitesi kuvvetli olarak, 51, 59 ve 63 numaralı suşlarda ise zayıf olarak kaydedildi. Suşlardan; 1, 2, 3, 81, 44, 103, 104, 107, 108, 111, 114 ve 115 numaralı olanlarında pH'da azalmanın yavaş olduğu tesbit edildi. Laktoz aktiviteleri incelendiğinde 1, 2, 3, 81, 44, 107, 108 ve 114 numaralı suşlarda zayıf, 102 numaralı suшта orta, 104 ve 111 numaralı suşlarda ise kuvvetli olduğu saptandı. İnkubasyon sırasında meydana gelen pH düşmesinde yavaşlama besiyerinin tamponlama özelliğindedir.

#### ***L. delbrueckii* Suşlarının Yağsız Süt Tozunda Glikolizisin Belirlenmesi**

Suşların asidifikasyon yeteneği yağsız süt tozundan hazırlanmış besiyerinde inkübasyonu izleyen 2. 4. 6. 8. ve 24. saatlerde pH'ları ölçülerek değişiklikler kaydedildi.

Tablo- 24 incelendiğinde 8. saatten sonra suşların tamamında pH'nın 5 altına düştüğü kaydedildi. İnkubasyon izlendiğinde 8, 10, 63, 78, 79, 98, 104, 111, 113 ve 116 numaralı suşlarda pH'nın 3 seviyelerine çok hızlı bir şekilde düştüğü görüldü. Bu suşlardan 8, 10, 98, 104, 113 ve 116 numaralı olanlarda laktoz aktivitesi kuvvetli olarak, 63, 78, 79 ve 111 nolu suşlarda zayıf olarak değerlendirildi. 1, 2, 3, 11, 28, 42, 81, 44, 95 ve 101 numaralı suşlarda pH'nın yavaş düştüğü ve suşların tamamında laktoz aktivitesi zayıf olarak ölçüldüğü tesbit edildi.

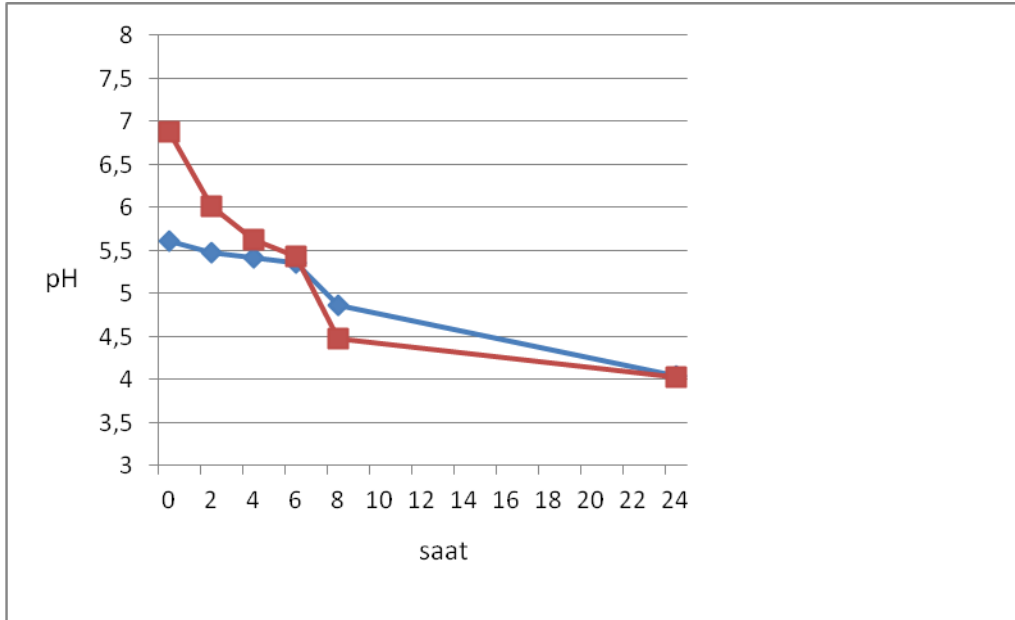
Tablo- 25: *L. delbrueckii* suşlarının zamana bağlı pH değişimi

	MRS Sıvı Besiyeri					F	Yağsız Süt Tozu					F
	2	4	6	8	24		2	4	6	8	24	
Ortalama	5,47 <b>a</b>	5,41 <b>ab</b>	5,36 <b>b</b>	4,86 <b>c</b>	4,05 <b>d</b>	437,071	6,00 <b>a</b>	5,63 <b>b</b>	5,43 <b>b</b>	4,48 <b>c</b>	4,03 <b>d</b>	83,545
S.sapma	0,08	0,135	0,191	0,254	0,244		0,415	0,711	0,774	0,699	0,233	
S.hata	0,0119	0,0201	0,0285	0,0379	0,0364		0,0901	0,1020	0,1134	0,0650	0,0704	
Max	5,63	5,85	5,97	5,69	5,02		6,89	6,88	6,87	6,23	5,76	
Min.	5,33	5,03	5	4,23	3,74		4,9	4,52	4,25	3,84	3,25	

a,b,c,d,e aynı satırda farklı harfler taşıyan gruplar arasında farklılık ( $p < 0,01$ ) önemlidir

*L. delbrueckii* suşlarının MRS sıvı besiyerinde pH değişimi incelendiğinde 24. saatteki en düşük pH değeri 3.74, en yüksek pH değeri ise 5.02 olarak ölçüldü. Gruplar arasında (2, 4, 6, 8 ve 24. saat) farklılık istatistiksel olarak Duncan testine tabi tutuldu. 2 ve 4 saatler ile 4 ve 6 saatler arası farklılık önemli bulunmazken, diğer karşılaştırma grupları olan 8 ve 24. saatler arasında farklılık istatistiksel açıdan  $p < 0,01$  önemli bulundu (Tablo- 25).

*L. delbrueckii* yağsız süt tozu besiyerinde pH değişimi incelendiğinde 24. saatteki en düşük pH değeri 3.25, en yüksek pH değeri ise 5.76 olarak ölçüldü. pH değişimi istatistiksel olarak Duncan testinde 4 ve 6 saatler farklılık önemli bulunmazken, diğer karşılaştırma grupları arasında (2, 8 ve 24. saat) farklılık istatistiksel açıdan  $p < 0,01$  önemli bulundu (Tablo- 25).



Şekil- 21: *L. delbrueckii* MRS sıvı besiyeri (◆) ve Yağsız Süt Tozunda (■) asidifikasyon sonucu pH değişim değerleri

## Yoğurt Bakterilerinin Proteoliz ve Laktoz Kullanımları

Suşların ekstraselluler proteolitik aktivitelerini ve laktoz kullanım özelliklerini petri kutusu üzerinde belirlemek üzere FSDA besiyeri ortamına yüzeye çizerek ekim yapıldı. İnkubasyon sonunda oluşan kolonilerin yapısı, büyüklüğü, rengi ve koloni çevresinde oluşan zon çapı değerlendirildi.

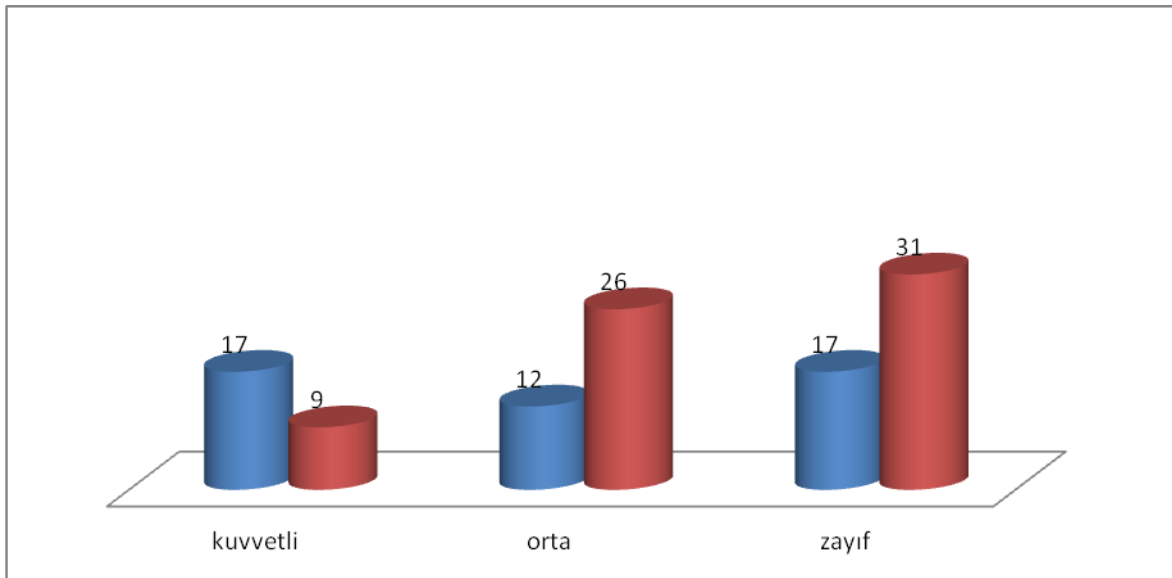
Tablo- 26: *L. delbrueckii* ve *S. thermophilus* suşlarının proteoliz ve laktoz kullanımları

Suş	İzolat Kaynağı	Laktobasil		Suş	İzolat Kaynağı	Streptokok	
		Proteoliz	Laktoz			Proteoliz	Laktoz
1	G.yoğurt	3	1	24	Bitki	1	1
2	G.yoğurt	2	1	35	Bitki	1	2
3	Bitki	3	1	36	Bitki	1	2
4	Bitki	3	1	40	Bitki	3	1
5	G.yoğurt	2	2	59	Çiy Damlası	1	2
8	G.yoğurt	3	3	60	Çiy Damlası	2	2
9	G.yoğurt	3	2	61	Çiy Damlası	2	1
10	G.yoğurt	3	3	62	Çiy Damlası	3	1
11	G.yoğurt	2	2	63	Çiy Damlası	1	1
19	Çiy Damlası	1	2	64	G.yoğurt	1	2
28	Bitki	2	1	65	G.yoğurt	1	1
42	G.yoğurt	3	1	66	G.yoğurt	1	1
44	Yağmur	1	1	67	Çiy Damlası	1	1
51	G.yoğurt	3	1	68	Çiy Damlası	1	3
58	Çiy Damlası	3	1	70	Çiy Damlası	1	1
59	Çiy Damlası	1	1	71	Çiy Damlası	1	2
63	Çiy Damlası	3	1	72	Çiy Damlası	1	2
68	Çiy Damlası	2	1	73	G.yoğurt	1	2
71	Çiy Damlası	3	1	74	G.yoğurt	1	1
75	Çiy Damlası	3	1	75	Çiy Damlası	1	1
78	G.yoğurt	2	1	76	Çiy Damlası	2	2
79	G.yoğurt	3	1	77	G.yoğurt	1	2
81	Yağmur	3	1	78	Yağmur	3	2
95	G.yoğurt	2	1	79	G.yoğurt	2	2
96	G.yoğurt	1	1	80	G.yoğurt	2	2
97	G.yoğurt	3	1	81	Yağmur	3	2
98	G.yoğurt	1	3	82	Yağmur	2	2
99	G.yoğurt	3	2	83	Yağmur	3	2
100	G.yoğurt	3	2	84	Yağmur	2	2
101	G.yoğurt	2	1	85	G.yoğurt	1	1
102	G.yoğurt	2	3	86	G.yoğurt	2	2
103	G.yoğurt	1	2	87	G.yoğurt	2	1
104	G.yoğurt	3	3	88	G.yoğurt	2	2
105	G.yoğurt	1	1	89	G.yoğurt	3	2
106	G.yoğurt	1	1	90	G.yoğurt	3	2
107	G.yoğurt	1	1	91	G.yoğurt	2	2
108	G.yoğurt	1	1	92	G.yoğurt	2	2
109	G.yoğurt	1	1	93	G.yoğurt	2	2
110	G.yoğurt	1	1	94	G.yoğurt	2	2
111	Yağmur	2	3	95	G.yoğurt	2	2
112	Yağmur	1	1	96	G.yoğurt	2	2
113	Yağmur	2	3	97	G.yoğurt	1	3

114	Yağmur	1	1	98	G.yoğurt	1	3
115	Yağmur	1	1	99	G.yoğurt	1	3
116	Yağmur	3	3	100	G.yoğurt	1	3
				101	G.yoğurt	1	1
				102	G.yoğurt	2	2
				103	G.yoğurt	2	2
				104	G.yoğurt	2	1
				105	G.yoğurt	1	3
				106	G.yoğurt	2	1
				107	G.yoğurt	1	2
				108	G.yoğurt	3	1
				109	G.yoğurt	1	3
				110	G.yoğurt	2	1
				111	Yağmur	1	1
				112	Yağmur	3	2
				113	Yağmur	2	3
				114	Yağmur	2	1
				116	Yağmur	1	2
				117	G.yoğurt	2	1
				118	G.yoğurt	2	1
				119	G.yoğurt	1	3
				120	G.yoğurt	2	1
				121	G.yoğurt	1	2
				122	G.yoğurt	1	2

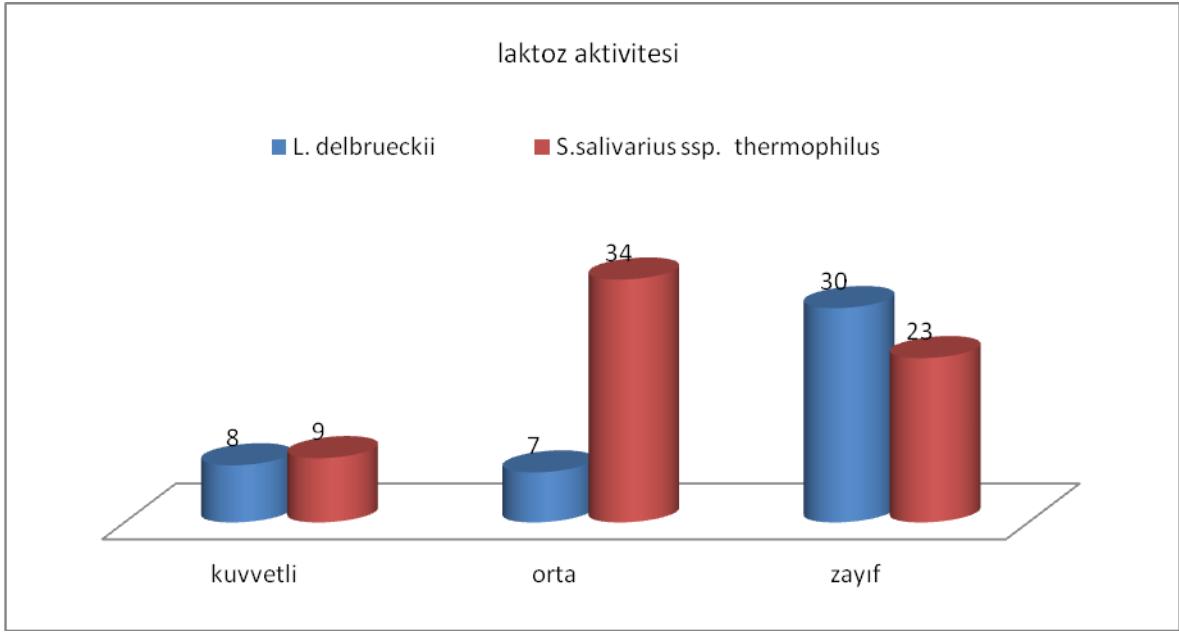
\*3kuvvetli, 2 orta, 1 zayıf proteolitik ve laktoz kullanım aktivitesi

*L. delbrueckii* suşlarının 17'si kuvvetli, 12'si orta ve 16 tanesi zayıf proteolitik aktivite gösterdi. *S. thermophilus* suşlarının 9'u kuvvetli, 26'sı orta ve 31 tanesi zayıf proteolitik aktivite saptandı (Şekil- 22).



Şekil- 22: *L. delbrueckii* (mavi), *S. thermophilus* (kırmızı) suşlarının proteolitik aktivitesi

*L. delbrueckii* suşlarının laktoz kullanım yönünden incelendiğinde 8'i kuvvetli, 7'si orta ve 30 tanesi zayıf aktivite gösterdiği saptandı. Suşlardan 10, 104 ve 116 numaralı olanlar hem proteolitik aktivite hemde laktoz kullanımları kuvvetli olarak tespit edildi. *S.thermophilus* suşlarının laktoz kullanım yönünden incelendiğinde 9 suşun kuvvetli, 34 suşun orta ve 23 suşun zayıf aktivite gösterdiği saptandı. Suşlardan 78, 81, 83, 89, 90 ve 112 numaralı olanlar kuvvetli proteolitik aktivite, orta derecede laktoz kullanımlarının olduğu tespit edildi (Şekil- 23).



Şekil- 23: *L. delbrueckii* (mavi), *S. thermophilus* (kırmızı) suşlarının laktoz kullanımı

### İzole Edilen Suşların Bakteriyolitik Aktiviteleri

Suşlar logaritmik fazda besi ortamından alındıktan sonra, peptidoglikan tabaka üretim imakanın olmayacağı tamponlanmış (potasyum fosfat, 100mM, pH 7, 30 °C ) ortamda 37 °C de inkubasyonu izleyen 2. Saatte bakteriyoliz hız ve 24. saatte bakteriyolizin ulaştığı son değer ölçülerek kaydedildi. Buradaki amaç yüksek bakteriyoliz hızına sahip izolatların tespit edilmesidir. Elde edilen sonuçlar tablo- 27'de verildi.

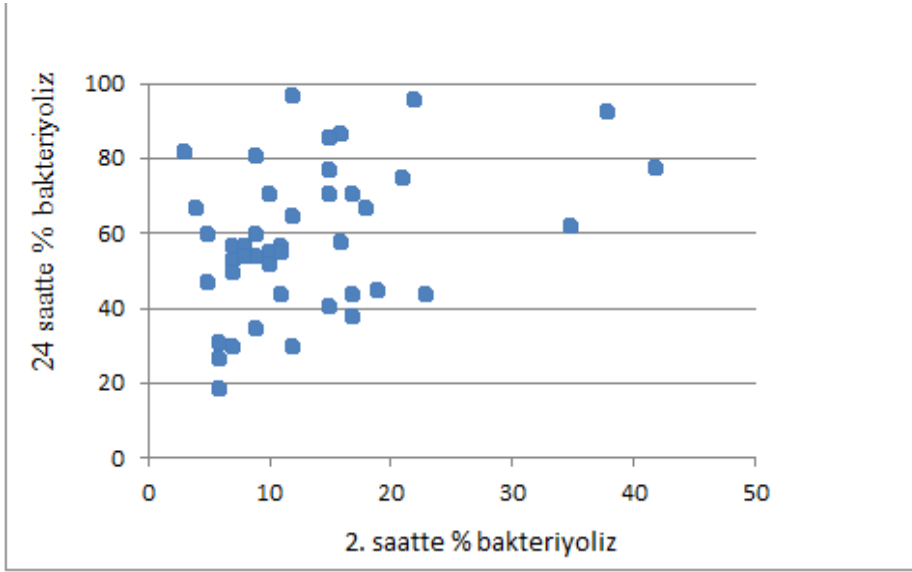
Tablo- 27: *L. delbrueckii* ve *S.thermophilus* suşlarının tamponlanmış ortamda bakteriyolizi

Suş	İzolasyon Kaynağı	Laktobasillerde Bakteriyoliz (%)		Suş	İzolasyon Kaynağı	Streptokoklarda Bakteriyoliz (%)	
		2 saat	24 saat			2 saat	24 saat
1	G.yoğurt	11	43	24	Bitki	17	16
2	G.yoğurt	10	54	35	Bitki	18	43
3	Bitki	7	52	36	Bitki	43	56
4	Bitki	5	46	40	Bitki	8	40
5	G.yoğurt	18	66	59	Çiy Damlası	7	46
8	G.yoğurt	7	56	60	Çiy Damlası	29	17
9	G.yoğurt	6	30	61	Çiy Damlası	13	30
10	G.yoğurt	4	66	62	Çiy Damlası	4	36
11	G.yoğurt	9	53	63	Çiy Damlası	13	39
19	Çiy Damlası	11	56	64	G.yoğurt	11	61
28	Bitki	17	70	65	G.yoğurt	10	38
42	G.yoğurt	5	59	66	G.yoğurt	12	50
44	Yağmur	23	43	67	Çiy Damlası	19	36
51	G.yoğurt	15	40	68	Çiy Damlası	16	28
58	Çiy Damlası	6	26	70	Çiy Damlası	15	28
59	Çiy Damlası	17	43	71	Çiy Damlası	30	28
63	Çiy Damlası	9	34	72	Çiy Damlası	10	36
68	Çiy Damlası	7	29	73	G.yoğurt	4	16
71	Çiy Damlası	16	57	74	G.yoğurt	11	35
75	Çiy Damlası	38	92	75	Çiy Damlası	27	67
78	G.yoğurt	21	74	76	Çiy Damlası	16	32
79	G.yoğurt	16	57	77	G.yoğurt	12	69
81	Yağmur	10	70	78	Yağmur	9	47
95	G.yoğurt	12	29	79	G.yoğurt	8	45
96	G.yoğurt	9	80	80	G.yoğurt	42	43
97	G.yoğurt	8	55	81	Yağmur	17	59
98	G.yoğurt	11	54	82	Yağmur	19	33
99	G.yoğurt	8	56	83	Yağmur	18	48
100	G.yoğurt	7	49	84	Yağmur	8	46
101	G.yoğurt	8	53	85	G.yoğurt	12	57
102	G.yoğurt	15	70	86	G.yoğurt	18	54
103	G.yoğurt	22	95	87	G.yoğurt	12	62
104	G.yoğurt	42	77	88	G.yoğurt	12	37
105	G.yoğurt	6	18	89	G.yoğurt	7	18
106	G.yoğurt	15	76	90	G.yoğurt	3	40
107	G.yoğurt	16	86	91	G.yoğurt	7	30
108	G.yoğurt	15	85	92	G.yoğurt	13	53
109	G.yoğurt	3	81	93	G.yoğurt	11	28
110	G.yoğurt	17	37	94	G.yoğurt	9	19
111	Yağmur	10	51	95	G.yoğurt	22	35
112	Yağmur	12	96	96	G.yoğurt	28	33
113	Yağmur	19	44	97	G.yoğurt	10	26
114	Yağmur	9	59	98	G.yoğurt	10	36
115	Yağmur	35	61	99	G.yoğurt	6	25
116	Yağmur	12	64	100	G.yoğurt	4	42

				101	G.yoğurt	10	45
				102	G.yoğurt	9	40
				103	G.yoğurt	13	28
				104	G.yoğurt	13	30
				105	G.yoğurt	22	77
				106	G.yoğurt	14	53
				107	G.yoğurt	17	57
				108	G.yoğurt	5	61
				109	G.yoğurt	9	61
				110	G.yoğurt	8	47
				111	Yağmur	10	39
				112	Yağmur	7	51
				113	Yağmur	12	50
				114	Yağmur	9	39
				116	Yağmur	12	49
				117	G.yoğurt	12	46
				118	G.yoğurt	9	51
				119	G.yoğurt	13	61
				120	G.yoğurt	33	40
				121	G.yoğurt	8	45
				122	G.yoğurt	9	47

\*Birbirinden bağımsız 2 farklı ölçümün aritmetik ortalaması alınmıştır.

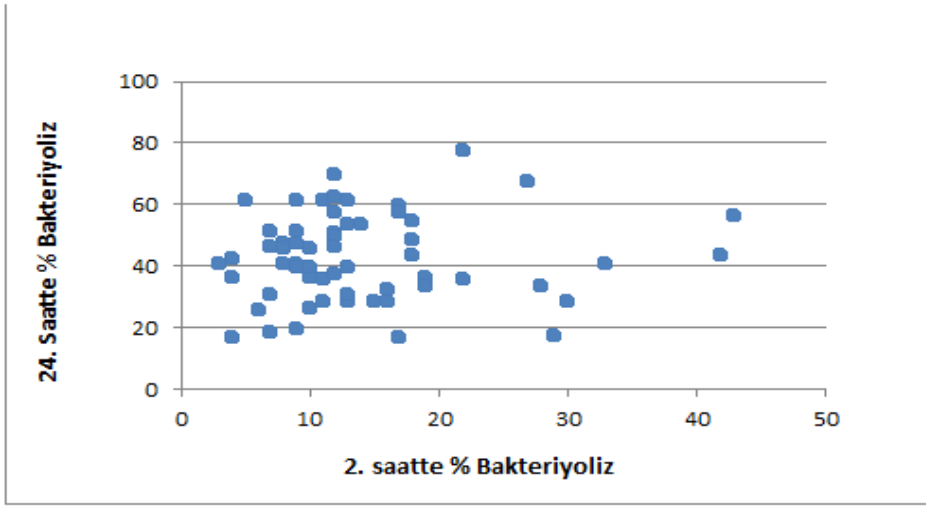
*L. delbrueckii* suşlarında bakteriyolizin 2. saattinde yapılan ölçümlerde suşların çoğunluğunda bakteriyoliz hızları % 7- 17 arasında olarak hesaplandı. En düşük bakteriyoliz hızı % 3 ile 10 numaralı sušta ölçüldü. En yüksek 2. saateki bakteriyoliz hızı ise % 42 ile 104 numaralı sušta ölçüldü. Yüksek bakteriyoliz aktivitesi 44, 75, 78, 104 ve 115 numaralı suşlarda saptandı. Bakteriyolizin 24.saatte ulaştığı son nokta değerine bakıldığında suşların çoğunda % 40 ile 65 arasında olduğu tesbit edildi. En düşük bakteriyoliz hızı % 18 ile 105 numaralı sušta, en yüksek bakteriyoliz ise % 96 ile 112 numaralı sušta saptandı. Ortalamanın üstünde bakteriyoliz hızı 75, 78, 96, 103, 104, 106, 107, 108, 109, 112 ve 114 numaralı suşlarda tesbit edildi. Suşların 2. Saateki bakteriyoliz hızı ve 24. saateki bakteriyoliz son noktası şekil- 24’de verilmiştir.



Şekil- 24: *L. delbrueckii* suşlarının 2 ve 24 saatlerdeki bakteriyolizi

*S. thermophilus* suşlarında bakteriyolizin 2. saatinde yapılan ölçümlerde suşların çoğunda bakteriyoliz hızları % 7- 19 gözlemlendi. En düşük bakteriyoliz hızı % 3 ile 90 numaralı sušta saptanırken en yüksek bakteriyoliz hızı ise % 43 ile 36 numaralı sušta saptandı. Yüksek bakteriyoliz aktivitesine 36, 60, 71, 75, 80 ve 120 numaralı suşların sahip olduğu tesbit edildi. Bakteriyolizin 24.saatte ulaştığı son nokta değerine bakıldığında suşların çoğunda % 40 ile 60 arasında olduğu görüldü. En düşük bakteriyoliz hızı % 16 ile 24 ve 73 numaralı suşlarda, en yüksek bakteriyoliz hızı ise % 77 ile 105 numaralı sušta tesbit edildi. Ortalamanın üstünde bakteriyoliz 75, 77, 87, 105 ve 108 numaralı suşlarda tesbit edildi. Bakteriyolizinin yüksek olduğu suşlarda bu karakter litik özelliğe sahip bir bakterifaj varlığına bağlı olabilir. Ancak detaylı çalışmaların yapılması gereklidir. Suşların 2. bakteriyoliz hızı ve 24. saatteki bakteriyoliz son noktası şekil- 25’de verilmiştir.





Şekil- 25: *S. thermophilus* suşlarının 2 ve 24 saatlerdeki bakteriyolizi

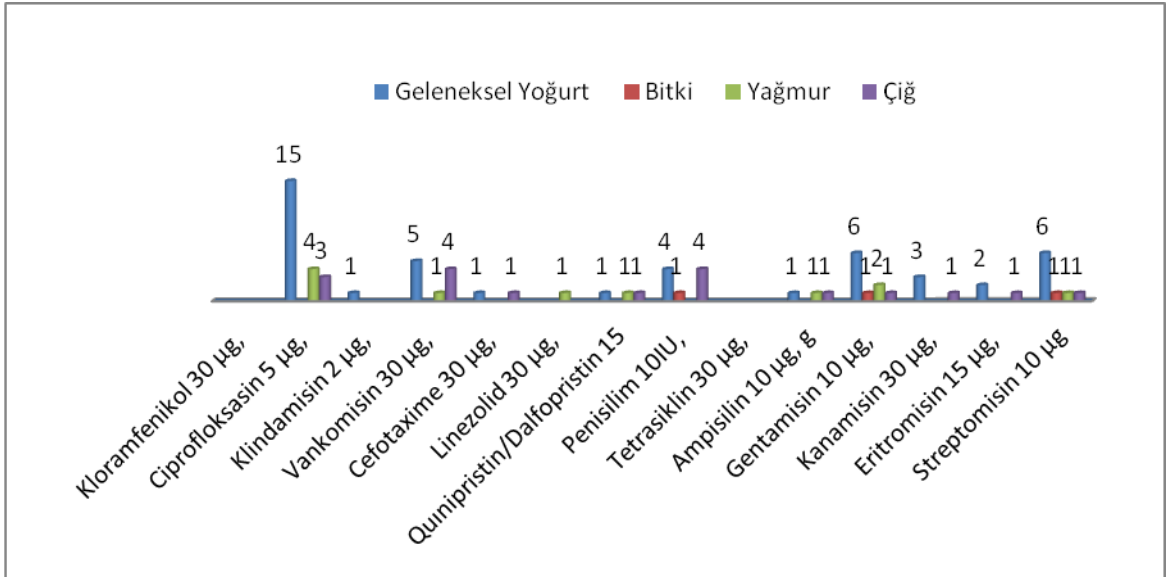
### Yoğurt Bakterilerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi

Yoğurt bakterilerinin antibiyotik dirençliliklerinin belirlemek için 14 farklı antibiyotik disk preparatı kullanıldı. Bu antibiyotikler quinipristin/dalfopristin, gentamisin, tetrasiklin, klindamisin, vankomisin, sefotaksime, linezolid, kloramfenikol, penisilim, siprofloksasin, ampisilin, gentamisin, kanamisin, eritromisin ve streptomisindir. Suşların antibiyotiklere karşı göstermiş oldukları direnç durumları tablo- 28, 29'da verilmiştir.

Tablo- 28: *L. delbrueckii* antibiyotik dirençliliği

NO	Quinpristin /Dalfopristi n 15 µg	Ampisilin 10 µg	Vankomisin 30 µg	Linezolid 30 µg	Gentamisin 10 µg	Siprofloksas in 5 µg	Streptomisi n 10µg	Tetrasiklin 30 µg	Clindamisin 2 µg	Eritromisin 15 µg	Cefotaxime 30 µg	Kanamisin 30 µg	Kloramfeni kol 30 µg	Penisilim 10IU
1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
2	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
4	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
5	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	I	S	R
8	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	I	S	S
9	I	S	S	S	I	I	R	S	S	R	I	I	I	S
10	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S
11	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S	I	S	R
19	S	S	R	S	I	I	S	S	S	I	S	S	S	I
28	S	I	S	I	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R
42	S	S	S	S	R	S	S	S	S	I	S	I	S	I
44	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
51	I	S	S	S	R	I	R	S	S	I	S	S	S	R
58	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S	I
59	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
63	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R
68	S	I	R	R	S	R	R	S	S	R	I	R	S	R
71	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R
75	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	I	S	R
78	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
79	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	I	S	R
81	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	I	S	I
95	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
96	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
97	S	S	R	S	S	R	I	S	S	S	S	R	S	S
98	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S
99	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
100	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S
101	S	S	R	S	R	S	I	S	R	S	R	I	S	S
102	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S
103	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
104	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
105	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
106	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
107	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
108	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	I	S
109	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
110	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
111	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
112	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
113	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
114	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
115	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
116	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

*L. delbrueckii* için tablo- 28 incelendiğinde en yüksek dirençlilik oranı siprofloksasine karşı olduğu görülmektedir. (22 suş; 1, 2, 5, 58, 68, 75, 79, 81, 96, 97, 98, 100, 103, 104, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 ve 113). Vankomisin ve gentamisine 10 suşun (% 22), streptomisin ve penisiline 9 suşun (% 20), kanamisine 4 suşun (% 9), ampisilin ve eritromisine 3 suşun (% 7), sefotaksime 2 suşun (% 4), linezolid ve klindamisine de 1 suşun (% 2) dirençli olduğu tespit edildi. Suşların tamamı quinupristin/dalfopristin, tetrasiklin ve kloramfenikole karşı duyarlı olarak tespit edildi. 3, 4 (bitki), 59 (çiy damlası), 95, 99 (g. yoğurt), 114, 115, 116 (yağmur damlası) numaralı suşların tüm test edilen antibiyotiklere duyarlı olduğu; 1, 2, 8, 10, 42, 78, 96, 100, 102, 105, 106, 107, 108, 109, 110 (g. yoğurt), 19, 58, (çiy damlası), 44, 81, (yağmur damlası) numaralı suşların ise sadece bir antibiyotiğe dirençli oldukları saptandı. Test edilen suşlar arasında bazılarının çoklu direnç gösterdikleri de belirlendi. Ayrıca 68 numaralı suş (çiy damlası) 7 farklı antibiyotiğe karşı direnç sergilerken, 75 (çiy damlası) ve 98 (g. yoğurt) numaralı suşlar 5 farklı antibiyotiğe direnç gösterdiler. Bu sonuçlar genel olarak doğadan izole edilen bu suşlarda antibiyotik dirençliliğinin çok yüksek olmadığını ancak bazı suşların çoklu dirence sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil- 26: Farklı ortamlardan izole edilen *L. delbrueckii* suşlarının antibiyotik türlerine dirençlilikleri

Suşların izole edildikleri kaynağa göre bakıldığında, geneksel yoğurtlardan izole edilen 95, 99 ve 100, yağmur suyundan izole edilen 114, 115 ve 116 ve bitkilerden izole edilen 3, 5 numaralı suşlar kullanılan 14 antibiyotik türünün tamamına duyarlı olduğu saptandı.

Tablo- 29: *S. thermophilus* antibiyotik direçliliği

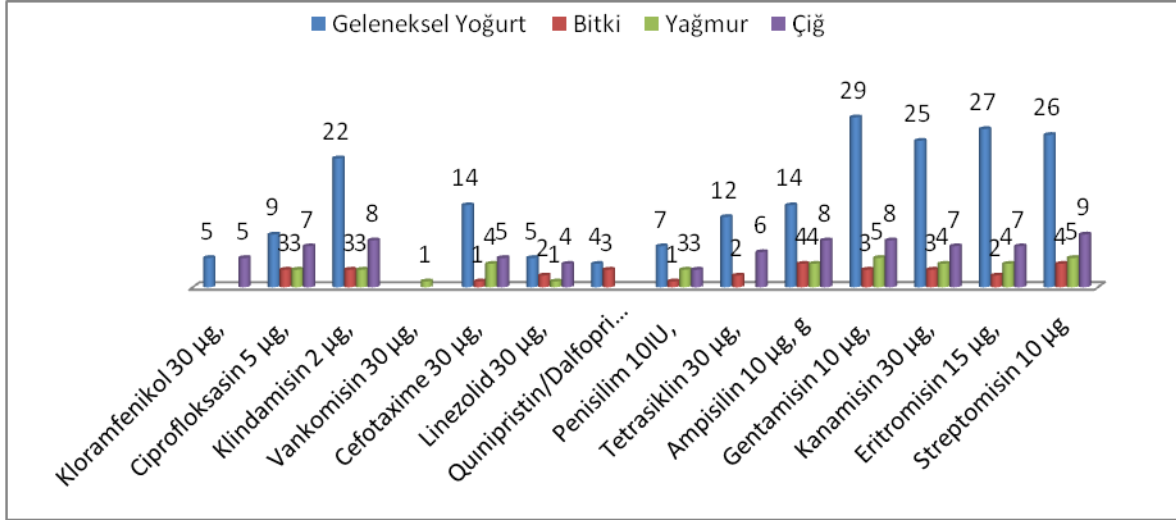
NO	Ounipristin /Dalfopristi n 15 µg	Ampisilin 10 µg	Vankomisin 30 µg	Linezolid 30 µg	Gentamisin 10 µg	Ciprofloksasin 5 µg	Streptomisi n 300 µg	Tetrasiklin 30 µg	Clindamisin 2 µg	Eritromisin 15 µg	Cefotaxime 30 µg	Kanamisin 30 µg	Kloramfeni kol 30 µg	Penisilin 10IU
24	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R
35	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S
36	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S
40	I	R	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S
59	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I
60	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
62	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
65	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
72	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
73	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
74	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
61	I	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S	I
63	I	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
64	I	S	S	S	R	I	R	S	R	R	R	R	S	S
66	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
67	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S
68	I	R	I	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R
69	I	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
70	I	R	S	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R
71	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	I
75	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S
76	S	S	S	S	R	S	I	S	R	S	S	S	S	S
77	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S
78	S	S	S	S	R	S	R	R	S	R	I	R	S	S
79	S	S	S	S	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S
80	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	R	R	S	S
81	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R
82	S	R	S	S	R	S	R	I	R	R	S	R	S	I
83	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	I
84	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	R	S	R	R
85	I	R	I	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
86	S	I	S	S	I	S	R	R	S	R	R	R	R	S
87	I	I	S	S	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S
88	I	I	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S
89	I	R	S	S	R	I	R	S	R	R	R	R	S	S
90	S	R	S	I	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S
91	I	R	S	S	R	I	R	R	R	R	R	R	S	S
92	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
93	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S
94	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	S	R	S	S
95	S	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S
96	I	R	S	S	R	I	R	S	S	S	R	R	S	S
97	I	R	S	S	R	I	R	I	S	R	R	R	S	S
99	S	R	S	R	R	S	R	S	S	R	S	I	S	R
100	S	R	S	S	R	S	S	S	I	S	S	R	S	S

101	S	R	S	S	I	S	S	S	R	R	R	R	S	S
102	S	I	S	S	R	R	R	S	S	I	S	R	S	S
103	S	R	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R
104	I	I	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S
105	I	I	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
106	I	S	S	S	R	I	R	S	R	R	R	R	S	S
107	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
108	S	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	I
109	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
110	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
111	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
112	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
113	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
114	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	S	S
116	S	R	S	S	R	R	I	S	R	S	S	S	S	R
117	I	S	I	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	S
118	I	S	S	S	S	S	I	S	R	R	S	R	S	S
119	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R
120	S	R	S	S	R	S	I	S	R	R	S	R	S	S
121	S	I	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S
122	R	R	S	S	R	I	S	S	S	R	R	S	S	S

*S. thermophilus* suşlarının genel olarak daha yüksek antibiyotik dirençliliğine sahip oldukları görülmektedir. Tablo- 29 incelendiğinde dirençlilik oranları sırasıyla gentamisine (45 suş -% 68), streptomisine (43 suş -% 65), eritromisine (40 suş-% 61), kanamisine (39 suş-% 59), klindamisine (36 suş-% 55), ampisiline (32 suş-% 48), sefoksasime (25 suş-% 38), siproflaksasine (23 suş-% 35), tetrasikline (20 suş-% 30), penisiline (14 suş -% 21), linezolid (12 suş- % 18), kloramfenikole (10 suş-% 15), quinupristin/dalfopristin (7 suş - %11) ve vankomisine (1 suş- % 1.5) karşı direnç gösterdi. Vankomisin dirençliliği streptokoklarda normalde görünmeyen bir dirençliliğdir, bu açıdan detaylı analizlerin yapılması gerekmektedir.

Test edilen suşlar arasından 62 (çiy damlası), 72 (g. yoğurt), 73 (g. yoğurt), 74 (çiy damlası), 109 (g. yoğurt), 111 (yağmur damlası), 112 (yağmur damlası) ve 113 (yağmur damlası) numaralı suşlar test edilen tüm antibiyotiklere duyarlı profili gösterirken, 65 (g. yoğurt), 110 (g. yoğurt)ve 119 (g. yoğurt) numaralı suşların ise sadece 1 antibiyotiğe dirençli oldukları saptanmıştır. Çoklu dirençlilik profili streptokok suşları arasında oldukça yaygın bir fenotipik özellik olarak belirdi. 66 (g. yoğurt) ve 107 (g. yoğurt) numaralı suşlar 12 adet (quinupristin/dalfopristin, gentamisin, tetrasiklin, klindamisin, linezolid, kloramfenikol, penisilin, siprofloksasin, ampisilin, gentamisin, kanamisin, eritromisin ve streptomisin) antibiyotiklerine karşı direnç gösterdi. Aynı şekilde 69 (çiydamlası) 11 antibiyotiğe, 24 (bitki), 36 (bitki), 59 (çiydamlası) ve 71 (çiy damlası)

numaralı suşlarda 10 farklı antibiyotiğe karşı direnç gösterdiler. Genel olarak değerlendirildiğinde streptokokların oldukça yüksek oranda antibiyotik dirençliliğine sahip oldukları gözlemlendi. Test edilen suşların antibiyotik dirençlilikleri şekil- 27’da verilmiştir.



Şekil- 27: Farklı ortamlardan izole edilen *S. thermophilus* suşlarının antibiyotik dirençlilikleri

Test edilen laktobasil ve streptokok suşlarının antibiyotik dirençlilikleri/duyarlılıkları tablo-30’da verilmiştir.

Tablo-30: *L. delbrueckii* ve *S. thermophilus* antibiyotik dirençliliği

Antibiyotikler	<i>L. delbrueckii</i> (n=45)			<i>S. thermophilus</i> (n=66)		
	R	I	S	R	I	S
Ounipristin/Dalfopristin15 µg	-	3	42	7	20	39
Ampisilin 10 µg	3	3	39	33	8	25
Vankomisin30 µg	10	-	35	1	3	62
Linezolid 30 µg	1	1	43	12	1	53
Gentamisin 10 µg	10	2	33	45	3	18
Siprofloksasin 5 µg	22	5	18	22	6	38
Streptomisin 10µg	9	5	31	43	5	18
Tetrasiklin 30 µg	-	-	45	20	1	45
Klindamisin 2 µg	1	-	44	36	1	29
Eritromisin 15 µg	3	5	37	40	1	25
Sefotaksime 30 µg	2	2	41	24	2	40
Kanamisin 30 µg	4	12	29	39	1	26
Kloramfenikol 30 µg	-	2	43	10	1	55
Penisilim 10IU	9	5	31	14	6	46

\* R: Dirençli I: Orta düzey duyarlı S: Duyarlı

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Süt ve süt ürünlerini üreten işletmelerde kaliteli ve standart yoğurt üretimi yapabilmek; tat, koku, kıvam ve görünüşü kapsayan duyuşal nitelikler ile konsistens, viskozite ve serum ayrılması gibi reolojik özellikleri sağlayarak, gerek tüketici sağığını korumak gerekse tüzük ve standartlara uygun yoğurt üretimi amaçlanmaktadır. Bütün bu olayların dengeli ve istenilen düzeyde olması yoğurtta arzu edilen aroma ve kıvamın oluşmasını sağlamaktadır. İstenilen kalite ve aromada yoğurt üretebilmek, yoğurt prosesine ve starter kültürlerin aktivitelerine bağıdır. Starter kültür ise yoğurtta istenilen duyuşal, tekstürel ve reolojik özellikleri kazandıran ve son üründe standart kalite özelliklerinin oluşmasını sağlayan, seçilmiş tek ya da karışık suşları içeren mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmaları Türkler Anadoluya göç etmelerinden önce geleneksel yöntemlerle yoğurdu üretmişlerdir. Yoğurtları üretirken doğada bitkiler, yağmur suyu ve çiy damlasında bulunan laktik asit bakterilerinden faydalanmışlardır.

Tez çalışmasında iki kaynaktan yoğurt elde edilerek çalışılmıştır. Birincisi özellikle bahar aylarında (nisan-mayıs) doğadaki bitki, yağmur ve çiy damlasında bulunan mikroorganizmalardan üretilen yoğurtlardan ve ikinci kaynak olarak organoleptik özelliklerine bakılarak kırsal alanda geleneksel yöntemlerle üretilen ticari kültürlerle bulaşmamış geleneksel yoğurt örnekleri kullanılmıştır. Yoğurt örneklerinden yoğurt bakterilerinin izolasyonu, biyokimyasal ve MALDİ-TOF MS tekniğı ile tanımlanması amaçlanmıştır. Bitki, yağmur ve çiy damlasından üretilen yoğurtlardan identifikasyonu yapılan suşların yoğurt inkubasyonları sırasındaki 1, 3, 6, 12, 24 saatlerdeki kimyasal değışiklikler ile aynı zaman dilimlerindeki toplam aerop bakteri sayıları, *Lactobacillus spp.* ve *Streptococcus spp.* sayılarına bakılmıştır. Bitki, yağmur ve çiy damlasından üretilen yoğurtlarda 1, 7 ve 14. günlerdeki +4 °C deki buzdolobı koşullarında meydana gelen mikrobiyal, kimyasal ve duyuşal kaliteleri incelenmiştir. Aynı zamanda bitki, yağmur ve çiy damlasından ve geleneksel yöntemlerle üretilen yoğurtlardan identifikasyonu yapılan bütün suşların glikolitik özellikleri, proteolitik aktiviteleri, laktoz kullanımları, bakterioliz aktiviteleri ve antibiyotik dirençlilik profilleri analiz edildi.

Doğal örneklerden 100 çiy damlası örneğinden 18'i, 100 yağmur suyu örneğinin 20'si, 100 bitki örneğinin 17 tanesinde yoğurt kıvam ve tadı oluştu. Suşlarda fenotipik identifikasyon ve MALDİ-TOF MS tekniğı ile geleneksel yöntemle üretilen yoğurtlarda 27 tanesinde (% 60), bitki numunelerinde 3 tanesinde (% 12) yağmur suyu numunelerinde 8

tanesinde (% 38.09), çiy damlası numunelerinde 7 tanesinde (% 36.8) *L.delbrueckii* tanımlandı. *S. thermophilus* ise geleneksel yöntemlerle üretilen yoğurtların 42'si (% 65.6), bitki numunelerinde 4'ü (% 15.38) yağmur suyu numunelerinde 8'i (% 38.09), çiy damlası numunelerinde 12'si (%54.4) tanımlandı. Michaela ve arkadaşları (23) Bulgaristan'ın 4 farklı bölgesinde 665 adet çeşitli bitki örneğinden 24 tanesinde (% 3.6) *L.delbrueckii sp. bulgaricus* ve *S. thermophilus 'u* spesifik primerler kullanılarak (ThI/ThII) PCR ile identifikasyon sonuçlarını rapor etmişlerdir. Türkiye'de Erkuş ve arkadaşları (7) geleneksel yöntemle üretilen yoğurtlardan izole ettikleri 71 basil'den tamamı, 66 kok'dan 7 tanesi şeker fermantasyonuna göre *L.delbrueckii* ve *S. thermophilus* olarak tanımlamıştır. Moleküler karakterizasyonda türe özgü PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve 16S dizileme analizlerine göre tamamını tanımlamıştır. Gezginc ve arkadaşları (126) Ülkemizin farklı illeri ve bu illere bağlı köylerden temin ettikleri yaklaşık 120 adet yoğurt örneğinden PCR metodunda izolasyon ve tanımlama sonucunda 80 adet *S. thermophilus* ve 20 adet *L. bulgaricus* izolatu elde edilmiştir. Bizim çalışmamız yapılan literatür tarama sonucuna göre ilk olarak çiy damlaları ve yağmur suyunda yoğurt bakterileri izole edilmektedir. Çalışma da ayrıca bitki, yağmur, çiy damlası ve geleneksel yöntemlerle üretilmiş yoğurtlardan iki yoğurt bakterisi dışında 22 adet suş *L. plantarum*, 1 adet suş *L. paraplantarum*, 12 adet suş *L. fermentum*, 1 adet suş *L. acidophylus*, 13 adet suş *P. acidilacti* ve 1 adet suş *B.subtulis* olarak tanımlandı. Koklarda ise 21 adet suş *E. faecium*, 5 adet suş *E. faecalis* ve 1 suş *S. uberis* olarak tanımlandı. Ulusal ve uluslararası geleneksel yöntemlerle üretilmiş yoğurtlar ile yapılan çalışmalarda *Bifidobacterium spp.* *Pediococcus spp.* *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. lactis*, *L. helveticus*, *E. faecium* ve tanımlanmamış mayalara rastlandığını rapor etmişlerdir (78, 79).

Bitki, yağmur ve çiy damlasından yoğurt üretimi sırasında ilk inkubasyonda *Lactobacillus spp.* ve *Streptococcus ssp.* sayıları 1, 3, 6, 12, 24 saat inkubasyonda sayılmış 0 ile 1. saatlerde 4 logoritmik koloni oluşturan birim artış kaydedildi. Ölçümlerin gerçekleştiği diğer zaman dilimlerinde yaklaşık bir logoritmik koloni oluşturan birim artış olduğu görüldü. Bitki, yağmur ve çiy damlası numunelerinde bulunan laktik asit bakterilerinin yoğurt kıvam ve tadını oluşturması için gerekli olan sayıya ( $10^7-10^8$  kob/g) ilk inkübasyonu takiben 12. saatten sonra ulaştığı tespit edildi. Bu durumda doğal kaynaklardan toplanan numunelerdeki laktik asit bakterilerinin 12. saatte fermantasyon için gerekli sayıya ulaşacakları anlaşılmaktadır. Bitki, yağmur ve çiy damlasından yoğurt



üretimi sırasında inkubasyonun 1, 3, 6, 12, 24 saatlerinde pH değişimleri incelendiğinde 12. saatte pH'nın 5'in altına düştüğü, 24. saatin sonunda pH yoğurtta istenilen değerlere (4.2- 4.4) düştüğü saptandı. Michaela ve arkadaşları (23) Bulgaristan'da yaptıkları çalışmada bitki örneklerinden elde ettikleri yoğurtlarda pH 16. saatte istenilen yoğurt pH değerine düşmüştür. Çalışmamızda bitki, yağmur ve çiy damlasından üretilen yoğurtlarda 1,7 ve 14. günlerdeki +4 °C de muhafaza koşullarında duyuşal özellikleri olan; görünüş, kıvam, koku ve tat duyuları 1- 5 arasında puanla değerlendirildi. Duyusal analiz sonuçlarına göre sırası ile 1, 7 ve 14. günlerde görünüş ortalama puanı 4.35 – 3.7 – 1.55, kıvam ortalama puanı; 4 – 3.35 – 1.35 koku ortalama puanı; 3.6 – 2.95 – 1.35, tat ortalama puanı; 3.55 – 2.65 – 1.2 olarak kaydedildi.

Bu durumda doğal kaynaklardan ve geleneksel yöntemler ile üretilen yoğurtlarda depolama koşullarına çok dayanıklı olmadıkları görülmüştür. Bitki, yağmur ve çiy damlasından üretilen yoğurtlarda 1, 7 ve 14. günlerdeki pH değişimleri bakıldığında 4.39 – 4.16 – 3.97 kadar düşme devam ettiği görüldü. Depolama süresince oluşun görünüş, kıvam ve tadtaki bozukluklar pH düşmesinin devam etmesi ile açıklanabilir. Sezgin ve arkadaşları (127) yerli ve yabancı yoğurt starterlerinin depolama süresince kalite ölçütlerini karşılaştırmaları sonucunda yabancı starterlerin depolama sırasında yerli starterlere göre daha çok puan aldıklarını tespit etmişlerdir.

*L. delbrueckii* bütün suşlarında glikoliz ve asidifikasyon yetenekleri belirlemek için MRS sıvı besiyeri ve yağsız süt tozunda inkubasyona bırakıldı. MRS sıvı besiyerinde izolatların 24. saatin sonunda ortam pH'sını 4 değerine kadar düştüğü ölçüldü. Suşlarda pH'da meydana gelen düşmelerin özellikle 6. saatten sonra şekillendiği saptandı. *L. delbrueckii* MRS sıvı besiyerinde pH değişimi istatistiksel olarak Ducan testine tabi tutulmuş, 2 ve 4 saatler ile 4 ve 6 saatler farklılık önemli bulunmazken, diğer karşılaştırma (8 ve 24 saat) grupları arasında farklılık istatiki açıdan  $p < 0,01$  düzeyinde önemli bulundu. *L. delbrueckii* yağsız süt tozunda glikoliz ve asidifikasyon MRS sıvı besiyerine göre çok daha hızlı ve kısa zamanda 8. satten sonra izoltaların tamamında pH'nın 5'in altına düştüğü kaydedildi. Yağsız süt tozunda *L. delbrueckii* izolatlarının istatistiksel olarak Ducan testinde 4 ve 6 saatler farklılık önemli bulunmazken, diğer karşılaştırma grupları (2, 8 ve 24 saat) arasında farklılık istatistiki açıdan  $p < 0,01$  düzeyinde önemli bulundu.

*S. thermophilus* bütün izolatlarında glikoliz ve asidifikasyon yetenekleri belirlemek için M17 sıvı besiyerinde ve yağsız süt tozunda inkubasyona bırakıldı. *S.thermophilus*'un identifikasyonu yapılan suşların tamamında M17 sıvı besiyerinde ortam pH'sını 5

değerinin altına düşürmediği saptandı. İnkubasyon sırasında meydana gelen pH değerinin 5 altına inmemesi besiyerinin tamponlama özelliğinden kaynaklandığı düşünülmüştür (120). İnkubasyon takip edildiğinde suşlarda pH'da meydana gelen düşmelerin özellikle 8. saatten sonra şekillendiği görülmüştür. *S. thermophilus* M17 sıvı besiyerinde pH değişimi istatistiksel olarak Ducan testine tabi tutulmuş  $p < 0,01$  bütün gruplar arasındaki farklılık istatistikî açıdan önemli bulundu. *S. thermophilus* izolatları yağsız süt tozunda glikoliz ve asidifikasyon yeteneklerini daha uygun bir şekilde açığa çıkarttığı görüldü. İnkubasyon takip edildiğinde pH'da 8. saatten sonra suşların tamamında pH'nın 5 değerinin altına düştüğü kaydedildi. İlk iki saatte çok hızlı pH düşüşü 24, 36, 40, 68, 106 ve 119 numaralı suşlarda gözlemlendi. *S. thermophilus* yağsız süt tozu besiyerinde pH değişimi istatistiksel olarak Ducan testine tabi tutulmuş  $p < 0,01$  gruplar arasındaki farklılık istatistikî açıdan önemli bulundu.

Yağsız süt tozunda *L. delbrueckii* suşlarının asidifikasyon sonuçlarına bakıldığında geleneksel yoğurtlardan izole edilen suşların 12'si kuvvetli asit oluşumu 26'sı orta seviyede asit oluşumu ve 7 izolatta zayıf asit oluşumu şekillendi. Bitkilerden izole edilen 2 sušta kuvvetli asit oluşumu, 1 sušta zayıf asit oluşumu şekillendi. Yağmur suyundan izole edilen 8 suşun tamamında kuvvetli asit oluşumu şekillendi. Çiy damlasından izole edilen 7 suşun tamamında kuvvetli asit oluşumu şekillendi. Zayıf asit oluşumu, suşlarda bakteriofaj varlığından kaynaklanmış olabilir.

Yağsız süt tozunda *S. thermophilus* suşlarının asidifikasyon sonuçlarına bakıldığında geleneksel yoğurtlardan izole edilen suşların 16 tanesinde kuvvetli asit oluşumu 13 tanesinde orta seviyede asit oluşumu ve 13 tane sušta zayıf asit oluşumu şekillendi. Bitkilerden izole edilen 4 sušta kuvvetli asit oluşumu şekillenmiştir. Yağmur suyundan izole edilen 5 sušta kuvvetli asit oluşumu, 2 sušta orta ve 1 sušta zayıf asitlik şekillendi. Çiy damlasından izole edilen 4 sušta kuvvetli asit oluşumu ve 8 sušta orta düzeyde asitlik şekillendi. Zayıf düzeyde asit oluşumu, suşlarda bakteriofaj varlığından kaynaklanmış olabilir. Öztürk (99) 83 adet *S. thermophilus* ve 40 adet *L. bulgaricus* suşu ile yaptığı çalışmasında kuvvetli ve orta asitlik gösteren suşlarda bakteriofaj dirençlilikleri, duyuşal analizleri ortaya konulduktan sonra uygun olanlar starter kültür olarak kullanılabilceğini ileri sürmüştür.

Yoğurt fermantasyonunda proteolitik aktivite, süt kazeininin proteinaz ve peptidaz enzimleriyle parçalanarak serbest aminoasit ve nitrojen kaynağını oluşturmasıdır. Bu kompleks olayın ilk basamağı hücre duvarında lokalize olan proteaz ile kazeinin

oligopeptidlere, oligopetitlerinde daha sonra hücre duvarından geçebilen endo peptidazlar ile daha küçük peptitlere ve serbest aminoasitlere parçalanması ile son bulan biyokimyasal bir reaksiyondur. Bu biyokimyasal reaksiyon sonunda yoğurdun aromatik uçucu bileşikleri meydana gelir (91). Shihata ve arkadaşları (91) ve Kamuran ve arkadaşları (128) yoğurt bakterilerinin proteolitik aktiviteleri üzerine yaptıkları çalışmalarda her ikisinde her iki yoğurt bakterisinin kendi suşları içerisinde farklı proteolitik aktivite de olduklarını tanımlamışlardır. Bu çalışmada ise *L. delbrueckii* proteolitik aktivitesi: geleneksel yoğurtlardaki 11 suшта kuvvetli, 7 suшта orta ve 9 suшта zayıf olarak şekillendi. Bitki izolalarında 2 suшта kuvvetli 1 suшта zayıf şekillendi. Yağmur suyu suşlarında 2 suшта kuvvetli, 2 suшта orta ve 4 suшта zayıf şekillendi. Çiy damlası suşlarında ise 4 suшта kuvvetli, 1 suшта orta ve 2 suшта zayıf şekillendiği saptandı. Özellikle *L. delbrueckii* kuvvetli proteolitik aktivitesi yoğurtlarda acı tat oluşumuna neden olmaktadır.

Bakteriyolizi belirlemek amacı ile suşları besinsel olarak kısıtlanmış, hücre duvarı sentezinin engellendiği ve gelişmelerinin durduğu ancak bakteriyoliz enzim aktivitesinin devam ettiği bir ortamda spektrofotometre ışığı dalga boyu 650 nanometre (OD650nm) kuvvetlerdeki bakteri tamponu, saf tampon körüne göre 0,40- 0,70 nm tamponla ayarlandıktan sonra test edilmiştir (129). *L. delbrueckii* suşlarında yüksek bakteriyoliz oranları 104, 115, 44, 75, 78, 113 ve 5 numaralı suşlarda tesbit edildi. En yüksek 2. saatteki bakteriyoliz % 42 ile geleneksel yöntemlerle üretilmiş yoğurtlardan 104 numaralı suшта kayıt edildi. Bitki suşlarında 2 ve 3 numaralı suşlarda yağmur suyu suşlarında 111 ve 114 numaralı suшта, çiy damlası suşlarından 58, 63 ve 68 numaralı suşlarda düşük bakteriyoliz oranı tespit edildi. *S. thermophilus* suşlarında yüksek bakteriyoliz oranları 36, 60, 67, 71, 75, 95, 96, 105 ve 120 numaralı suşlarda saptandı. En yüksek 2. saatteki bakteriyoliz % 42, 75 ile bitki örneklerinden üretilmiş yoğurtlardan 36 numaralı suшта kaydedildi. Geleneksel yöntemlerle üretilen yoğurtlardan izole edilen suşların çoğunda bakteriyoliz düşük kaydedildi. Bitki suşlarında 40 numaralı suшта, yağmur suyu suşlarında 78, 84, 111 ve 112 numaralı suшта, çiy damlası suşlarından 59, 61, 62 ve 63 numaralı suşlarda düşük bakteriyoliz oranı tesbit edildi. Sun ve arkadaşları (60) yapmış oldukları çalışmada yüksek otoliz oranına sahip suşlarda laktik asit üretimi negatif yönde etkilendiği bunun sonucunda yoğurtta pıhtılaşma zamanının uzamasına, su tutma kapasitesinde azalmaya ve serumda su salma gibi kusurların oluşmasına neden olduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda düşük bakteriyoliz oranına sahip yoğurt

bakterilerinin belirlenerek yoğurt endüstrisinde kullanılması, yoğurt inkübasyon zamanının kısılmasına ve pıhtılaşmanın istenilen düzeyde oluşmasına olanak sağlayacaktır.

Bu çalışmada identifiye edilen *L. delbrueckii* ve *S. thermophilus* suşlarının antibiyotik duyarlılık profilleri incelendiğinde; *L. delbrueckii* için siproflaksasine 22, vankomisine 10, streptomisine 9, linezolide 1, kanamisin ve ampisiline 4, eritromisine 3 penisiline 8, linezolid, klindamisine 1, ve sefotaksime 2 adet suşun dirençli oldukları tesbit edildi. Suşların tamamı quinipristin/dalfopristin, tetrasiklin ve kloramfenikol antibiyotiklerine karşı duyarlılık gösterdi. Bitkilerden izole edilen 3 ve 4, çiy damlasından izole edilen 59, yağmur suyundan izole edilen 114, 115 ve 116, geleneksel yoğurtlardan izole edilen 95 ve 99 numaralı suşlar kullanılan 14 çeşit antibiyotiğe duyarlı oldukları tesbit edildi. Önal ve arkadaşları (130) geleneksel yöntemlerle yapılmış yoğurtlardan izole ettikleri 23 adet *L. delbrueckii* suşlarından % 72'si aztreonama, % 72'si netilmisine, % 96'sı siproflaksasine ve % 98'i ofloksasine dirençli olduğunu, ayrıca % 76'sı gentamisine ve % 75'nin tetrasikline duyarlı olduklarını rapor etmişlerdir. Zhou ve arkadaşları (52) Çin yoğurtlarında izole edilen *L. delbrueckii* % 29'unun ampisiline, % 23'ünün penisiline, % 94.1'nin tetrasikline, % 100 kanamisine, % 94.1'i streptomisin, neomisin ve gentamisine dirençli olduklarını rapor etmişlerdir.

*S. thermophilus* suşlarının gentamisin antibiyotiğine karşı 45, streptomisine 44, eritromisine 40, kanamisine 39, klindamisine 36, ampisiline 32, quinipristin/dalfopristine 7 ve vankomisine 1 adet suşun dirençli oldukları saptandı. Geleneksel yöntemlerle üretilen yoğurtlarda identifiye edilen 73, 74 ve 109 numaralı suşlar, çiy damlasından identifiye edilen 62 ve 72 numaralı suşlar ve yağmur suyundan identifiye edilen 111, 112 ve 113 numaralı suşlarda kullanılan 14 çeşit antibiyotiğe duyarlı oldukları tesbit edildi. Kullanılan antibiyotiklere duyarlılık gösteren bu suşlar, doğadaki genetik çeşitliliği koruma ve çalışılmamış izolatlar olmaları açısından önem arz etmektedir. Önal ve arkadaşları (130) geleneksel yöntemlerle yapılmış yoğurtlardan izole ettikleri 25 adet *S. thermophilus* suşlarından 23 tanesinin aztreonama, netilmisine, siproflaksasine ve ofloksasine dirençli olduklarını 2 suşun amoksisiline duyarlı olduklarını rapor etmişlerdir. Aynı şekilde Zhou ve arkadaşları (64) Çin yoğurtlarında izole edilen *S. thermophilus* suşlarında neomisin ve kanamisin dirençliliğinin % 100, tetrasiklin ve gentamisin dirençliliğinin % 89, streptomisin % 66, ampisiline % 44, olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacıların yaptığı bu çalışmada suşların tümünün penisiline duyarlılık gösterdiği belirtilmiştir.

Gram pozitif bakterilerin sebep olduğu hastane infeksiyonlarında son çare antibiyotiğin vankomisin, klinik uygulamalarda daha az kullanılmasına rağmen *L. delbrueckii* suşlarının 10 tanesinin ve *S. thermophilus* 1 suşun vankomisine dirençli olması sebebiyle, büyük önem taşımaktadır (131). Streptokoklarda vankomisin dirençliliği olağan üstü bir durumdur. Bu açıdan genetik olarak detaylı çalışmaların ve MIK testlerinin yapılması son derecede önemlidir. Laktik asit bakterilerinde de antibiyotik dirençlilikleri yıllar içerisinde artış göstermektedir. Bu yüzden antibiyotik kullanımı ve seçimi konusunda çeşitli tedbirler alınmalı ve uygulanmalıdır.

Tez çalışmasında geleneksel yöntemlerle üretilen yoğurtlar ile bitki, yağmur suyu ve çiy damlasından elde edilen yoğurtlardan yoğurt bakterilerinin izolasyonu ve identifikasyonu yapılmıştır. İdentifikasyonu yapılan suşların teknolojik özellikleri incelendiğinde *L.delbrucekii* olarak tanımlanan 29 suşun (2, 3, 4, 5, 8, 10, 19, 42, 44, 51, 59, 63, 81, 95, 96, 99, 100, 102, 105, 106, 107, 108, 109, 110,112, 113, 114, 115, 116) ve *S. thermophilus* olarak tanımlanan 24 suşun (60, 62, 65, 72, 73, 74, 91, 92, 93, 96, 100, 101, 103, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 117, 118, 119, 121, 122) uygun özellikte oldukları tespit edilmiştir. *L.delbrucekii* suşlarının, süt endüstrisinde kullanımına temel oluşturulabilmesi için asidifikasyon yeteneği orta ve yüksek seviyede olan suşlardan *L.delbrucekii* alttür *bulgaricus* olarak, biyokimyasal ve PCR tür düzeyinde identifikasyonunun yapılması gerekmektedir. İkinci aşamada proteoliz kısmı sadece ilk basamaktaki proteazların aktivitelerini test edecek seviyededir. Protolitik aktivitenin daha uygun ve kapsamlı belirlenebilmesi için spektrometrik yöntemlerin hatta metabolizmadan sorumlu enzimlerin invitro ve invivo koşullarda test edilip belirlenmesi gerekmektedir. Böylece *L. delbrueckii* 'nin bu özelliği dikkate alınarak orta ve zayıf proteolitik aktivite gösteren suşların seçilmesi yoğurtta acı tat oluşumu önlenebilecektir. Uygun olan suşların antibiyotik dirençliliğinden sorumlu olan genlerin çalışılmasıyla antibiyotik direnç profilleri çıkarılarak insan sağlığı açısından önemli olan antibiyotiklere duyarlı starter kültürler tespit edilebilir. Bakterifaj dirençliliklerinin çıkarılıp tüm bu dirençli suşlar belirlendikten sonra uygun olan suşlardan yoğurt üretilerek yoğurtların asetaldehit gibi organoleptik özelliklerinin ortaya çıkarılması ile starter kültürlerini yurt dışından alan yerli süt ve süt ürünleri endüstrisi için, yerli kültürlerin kullanım olanakları sağlanmış olacaktır.

## KAYNAKLAR

1. ÖZDEN A. Yoğurdun tarihi. Güncel Gastroentoloji, 2: 128-132, 2008.
2. TAMIME AY, ROBINSON RK. Introduction in yoghurt. Science and Technology, Pergamon Pres, Great Britain, page 1-5, 1985.
3. OĞUZ B. Türkiye halkının kültür kökenleri-1. Giriş-Beslenme Teknikleri, İstanbul matbaası, 627-641, 1976.
4. DAĞDEVİREN M. Tuzlu yoğurt. Yemek Kültürü, sayı 8, 2007.
5. İNCE O. İlk yoğurt nasıl mayalandı ? . Bilim Teknik, 34: 458, 2007.
6. ÖZDEMİR S, BODUR A. Yoğurt üretimi sırasında oluşan fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonlar. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 3: 479-487, 1994.
7. ERKUŞ O. Yoğurt kültürlerinin izolasyonu fenotipik ve genotipik karakterizasyonu. Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Fakültesi Doktora tezi, Haziran 2007.
8. YEŞİLLİK S, YILDIRIM N, DİKİCİ A, YILDIZ A, YESİLLİK S. Antibacterial effects of some fermented commercial and homemade dairy products and 0,9 % lactic acid against selected foodborne pathogens. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 2: 189- 195, 2011.
9. BİBEROĞLU Ö, CEYLAN Z. Geleneksel olarak üretilen yoğurtların bazı kimyasal özellikleri. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi 8 (1): 43- 51, 2013.
10. KILIÇ S. Süt endüstrisinde laktik asit bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 542, s:421, 2001.
11. Anonim. Türk Standartları Yoğurt TS 1330 Nisan 2006.
12. DALGLEISH DG, BANKS JM. Formation of complexes between serum proteins and fat globules during the heating of whole milk. Milchwissenschaft, 46 (2): 75-78, 1991.
13. WOUTERS JTM, EMAN HE, AYAD JH, GERRİT S. Microbes from raw milk for fermented dairy products. International Dairy Journal, 12: 91- 95, 2002.
14. RIEMELT I, BARTEL B, MALCZAN M. Milchwirtschaftliche Mikrobiologie. B. Behr' s Verlag GmbH 382 p., Hamburg 1996.
15. TEKİNŞEN C. Süt ürünleri teknolojisi. Selçuk Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Yayın Ünitesi, 325 s. Konya 1997.
16. SEZGİN E. Yoğurt teknolojisi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi ders notu, 2000.
17. OKUR Ö, ARTAN D, SEYDİM EZ. Fonksiyonel özellikleri geliştirilmiş yoğurt üretimi. GIDA, 33 (2) : 57-67, Isparta 2008.
18. ÖZERB. Yoğurt bilimi ve teknolojisi. Sidas Matbaacılık. İZMİR, 168-169, 2006.
19. GÖNÇ S. Süt teknolojisinde homejenizasyon. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:457 s.65, 1990.
20. SHAH N. The product and its manufacture. In Encyclopedia of Food Science and Nutrition, Academic Press, United Kingdom, pp. 6252-6259, 2003.
21. MICHAEL E, STILES W, HOLZAPFEL H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology, 36: 1-29. 1997.
22. NISSEN HJ, DAMEROW P, EGUND RK. Frühe Schrift und Techniken der Wirtschaftsverwaltung im alten Vorderen Orient. Informations-speicherung undverarbeitung vor 5000 Jahren.2. Auflage Verlag Franzbecker, Bad Salzdetfurth 32-37, 1991.
23. MICHAELA M, MINKOVA S, KATSUNORI K, TAKASHI SKS. Isolation and characterization of *Lactobacillus delbrueckii ssp.bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* from plants in Bulgaria. FEMS Microbiology Letters Volume, 269:1,160-169, April 2007.

24. ORLA-JANSEN S. The Lactic Acid Bacteria. Fred Host and Son. Copenhagen 1919.
25. SHERMAN JM. The streptococci. Bacteriology Reviews I: 3-7, 1937.
26. SHERMAN JM. WING HU. *Streptococcus durans* N. SP. Journal of Dairy Science, 20: 165.-167, 1937.
27. SCHLEIFER KH, KILPER R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus firecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. Nov and *Enterococcus facium* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 34: 31-34, 1984.
28. SCHLEIFER KH, KILPPER B R. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 10: 1-19, 1987.
29. LANCEFIELD RC. Serological differentiation of human and other group: of hemolytic streptococci. The Journal of Experimental Medicine, 57: 571-595, 1933.
30. SCHLEIFER KH. Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters 46: 201- 203, 1987.
31. VANDAMME P, POT B, GILLIS M, KERSTER K. Polyphasic taxonomy a consensus approach to bacterial cystematics. Microbiology and Molecular Biology Reviews vol. 60, 2: 407-438, 1996.
32. KILIÇ S. Süt endüstrisinde laktik asit bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Baskı 542: 37-53, 2001.
33. GARVIE EI. Taxonomy and identification of bacteria important in cheese and fermented dairy products. Advances in The Microbiology and Biochemistry pf Cheese and Fermented Milk, Elsevier Applied Science Publishers London, 260: s.35-36, 1974.
34. ROSISARTD E, LUQUET H. Bacteries lactiques lorica. La societe Texel , pp.1219 F:38410, 1994.
35. AXELSSON L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. Lactic Acid Bacteria: microbiology and functional aspects, 1-72, 1998.
36. CHRISTENSEN JE, DUDLEY EG, PEDERSON JA STEELE JL. Peptidase and aminoacid catabolism in lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek, 76: 217-246, 1999.
37. CARR FJ, CHILL D, MIADA N. The lactic acid bacteria: a Literature survey. Critical Reviews in Microbiology, 28: 281-370, 2002.
38. SALMINEN S, WRIGHT VA. Lactic acid bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Third Edition (Food Science and Technology) Hardcover – July 23, 2004.
39. TATLI D. Geleneksel süt ürünlerinden izole Edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans tezi Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana 2009.
40. GEZGİNC Y, AKSOY İ, KULEY E, ÖZOĞUL F. Biogenic amines formation in *Streptococcus thermophilus* isolated from home-made natural yogurt. Food Chemistry 1: 655-662, 2013.
41. FRANCA R, MARTZOTTO M, CREMONESE S, RIZZOTTI L, TORRIANI S. Diversity of *Streptococcus thermophilus* in bacteriocin production: inhibitory spectrum and occurrence of thermophilin genes. Food Microbiology, 1: 27-33, 2013.
42. KITAZAWA H, YASUYUKI I, UEMURA J, KAWAI Y, SAITO T, KANEKO T, NODA K, ITOH T. Augmentation of macrophage functions by an extracellular phophopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. Food Microbiology. 17: 109-118, 2000.
43. BONCZAR G, WSZOLEK M, SIUT A. The effects certain factors on the properties of yoghurt made from ewe's milk. Food Chemistry 79: 85-91, 2002.

44. YILMAZ R, TEMİZ A. *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 'un klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanması ve karakterizasyonu. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi 3: 19-42, 2003.
45. AMMOR S, RACHMAN C, CHAILLOU S, PREVOST H, DOUSSET X, ZAGOREC M, DUFOUR E, CHEVALLIE R. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. Food Microbiology, 5: 373-382, 2005.
46. BULUT C, GUNEŞ H, OKUKLU B, HARSA S, KILIÇ S, COBAN HS, YENİDÜNYA AF. Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese, Comlek peyniri from Cappadocia region. Journal of Dairy Research, 72: 19-24, 2005.
47. ERKUS O, OKUKLU B, YENİDÜNYA AF, HARSA S. High genetic and phenotypic variability of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from artisanal Yuruk yoghurts. LWT - Food Science and Technology, 2: 348-354, 2014.
48. Batt CA. *Lactobacillus*: Introduction" in *Encyclopedia of Food Microbiology*, edited by C. Batt, P. Patel, R. Robinson. Academic Press, United Kingdom, 1134-1136, 1999.
49. KIRAN F, OSMANAĞAOĞLU Ö. Laktik asit bakterilerinin (LAB) identifikasyonunda/tiplendirmesinde kullanılan moleküler yöntemler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 1: 62-74, 2011.
50. BEN AMOR K, VAUGHAN EE, MDEVOS W. Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria 1-3. Journal Nutrition, 3: 741-747, 2007.
51. AKYAR I. Kütle spektrometrisinin mikrobiyolojide kullanımı. Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 4: 177-183, 2011.
52. HASÇELİK G. Mikrobiyolojik tanıda yeni yöntemler. ANKEM Dergisi, 27:154-156, 2013.
53. SİMON M, LOVEDA Y, ANESHA S, SINGH H. İnnovative yoghurts: Novel processing technologies for improving acid milk gel texture. Trends in Food Science Technology 33: 5-20, 2013.
54. YÜKSEKDAĞ Z.N, BEYATLI Y. Kefir mikroflorası ile laktik asit bakterilerinin metabolik, antimikrobiyal ve genetik özellikleri. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi 01, 02: 49-69, 2003.
55. PESUMAL M, HEBERT EM, MOZZI F, FONT DE VALDEZ G. Hydrolysis of whey proteins by *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* grown in a chemically defined medium. Journal of Applied Microbiology, 5: 1364-5072, 2007.
56. ROBINSON RK. Fermented milks/Yoghurt. In . Encyclopedia of Food Microbiology. Eds. R.K. Robinson,. Academic Press, London,784-791, 1999.
57. KILIÇ S. Yoğurt yapımında yararlanılan *L.Bulgaricus* ve *S.thermophilus*'un proteolitik aktivitelerinin belirlenmesi üzerine araştırma. GIDA, 16, 4: 249-253, 1991.
58. ÇIBİK R. *Lactobacillus pentosus* 'un otolitik aktivitesinin ve peptidoglikan hidrolaz enzimlerinin karakterize edilmesi. Türkiye 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs. Bolu 2006.
59. LINKO S, ENWALD S, VAHVASELKA M, ANNIKA M. Optimization of the production of P-Galactosidase by an autolytic strain of *Streptococcus salivarius subs. thermophilus*" Annals New York Academy of Sciences, 3: 583-594, 1992.
60. SUN J, SHEN J, WANG X, TIAN Y, JIAPING L, LIU L. Effects of yogurt starters autolysis on quality of yogurt. Chinese Society of Agricultural Engineering, 6: 287-292, 2012.
61. XIAO-YANG P, WEN-MING C, LIU L, SHU- WEN Z. Gene knockout and overexpression analysis revealed the role of N-Acetylmuramidase in autolysis of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Journal plosone, 9: 1- 8, 2014.



62. ALP D, ÖNER Z. Bazı laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençlilikleri ve aroma maddeleri oluşturma özelliklerinin belirlenmesi. *GIDA*, 39, 6: 31-40, 2014.
63. HONGMEI Z, LISI X, WENYAN Z, WENYUAN Z, JIANYU S, JINGCHUN L. The association of biofilm formation with antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented foods. *Journal of Food Safety*, 2: 114-120, 2013.
64. ZHOU N, ZHANG J X, FAN M T, WANG J, GUO G, WEI X Y. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Chinese yogurts. *Journal Dairy Science* 95: 4775-4783, 2012.
65. SHALINI M, RAMESHWAR S. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria. A review. *International Journal of Food Microbiology*, 105: 281- 295, 2005.
66. ASLIM B, BEYATLIY. Antibiotic resistance and plasmid DNA Contents of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Turkish yogurts. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science*, 28: 257-263, 2004.
67. SOYKURT E A, TUNAIL N. *Lactobacillus bulgaricus* fajlarının restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi, protein profilleri ve konakçı özgüllüklerine göre tanımlanması. *GIDA*, 2: 95-102, 2014.
68. SOYKUT A. E, TUNAIL N. Süt endüstrisinde sorun yaratan termofilik fajlar. *Gıda*, 2: 107-113, 2009.
69. MCGRATH S, VAN SINDEREN D, FITZGERALD G F. Bacteriophage-derived genetic tools for use in lactic acid bacteria *International Dairy Journal*, 12: 3-15 2002.
70. ZHANG X, KONG J, QUL Y. Isolation and characterization of a *Lactobacillus fermentum* temperate bacteriophage from Chinese yogurt. *Journal of Applied Microbiology* 2: 607, 2007.
71. ZINNO P, JANZEN T, BENNEDSEN M, ERCOLINI D, MAURIELLO G. Characterization of *Streptococcus thermophilus* lytic bacteriophages from mozzarella cheese plants. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 31: 137-144, 2010.
72. QUIBERONI A, MOINEAU S, ROUSSEAU G. M, REINHHEIMER J, WOLFGANG H. *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *International Dairy Journal*, 10: 657-664, 2010.
73. ÖZKAYA F D, ASLIM B, ÖZKAYA M T. Effect of exopolysaccharides (EPS) produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains to bacteriophage and nisin sensitivity of the bacteria *LWT - Food Science and Technology*, 3: 564-568, 2007.
74. EVREN M, ALBAYRAM C, APAN M. Laktik asit bakterilerinin oluşturduğu antimikrobiyel maddeler. *Türkiye 9. Gıda Kongresi; Bolu, 24-26 Mayıs 2006*.
75. SIMOVA E D, BESHKOVA D B, DIMITROV Z P. Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian dairy products. *Journal of Applied Microbiology* 2: 692-701, 2009.
76. VILLANI F, PEPE A, MAURIELLO G, SALZANO B, MOSCHETTI G, COPPOLA A. Antilisterial activity of thermophilin 347, a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Microbiology* 25: 179-190, 1995.
77. ROSSI F, MARZOTTO M, CREMONESE S, RIZZOTTI L. Diversity of *Streptococcus thermophilus* in bacteriocin production; inhibitory spectrum and occurrence of thermophilin genes Sandra Torriani. *Food Microbiology*, 1: 27-33, 2013.
78. SFAXI I H, GHAISS E, AHMADOVA A, BATDORJ B, LE BLAY G, BARBIER G, HAERTLE T, CHOBERT J M. Antimicrobial activity and safety of use of *Enterococcus faecium* PC4.1 isolated from Mongol yogurt. *Food Control*, 12: 2020-2027, 2011.
79. ASLIM B, YÜKSEKDAĞ Z N, SARIKAYA E, BEYATLI E. Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *LWT - Food Science and Technology*, 6: 691-694, 2005.

80. HİLMİ A, GÖKALP HY. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal metabolitleri ve etki şekilleri. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 30: 180-190, 2000.
81. YENİEL N. *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* suşlarının melas, peynir altı suyu ve pancar suyunda ekzopolisakkarit (EPS) ve laktik asit üretimlerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara, 2006.
82. KLEIN G, PACK A, BONAPARTE C, REUTER G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. International Journal Food Mikrobiyoloji, 41: 103-125, 1998.
83. BULUT C, GUNEŞ H, OKUKLU B, HARSA S, KILIÇ S, COBAN HS, YENİDÜNYA AF. Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese, Comlek peyniri from Cappadocia region. Journal of Dairy Research, 72: 19-24, 2005.
84. EVREN M, APAN M, TUTKUN E, EVREN S. Geleneksel fermente gıdalarda bulunan laktik asit bakterileri. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi, TR 1: 11-17, 2011.
85. ROBINSON RK. Yoghurt, role of starter cultures. In Encyclopedia of Dairy Science, edited by H. Roginski, J. Fuquay, page 1059-1063, 2002.
86. LEE, WJ. and LUCEY JA, Formation and physical properties of yogurt Asian-Australasian Association of animal Production Societies, 9: 1127-1136, 2010.
87. KİLARA A, SHAHANİK M. B-galaktosidase activity of cultured and acidified dairy products. Journal Dairy, 57: 592-598, 1974.
88. PERMİ L, WE S, ELLİKERP R. Lactose-hydrolysing enzymes of *Lactobacillus* species. Applied and Environmental Microbiology, 1:57-57,1972.
89. LUCEY JA. Formation, structural properties and rheology of acid-coagulated milk gels. In Cheese: Chemistry, Physics and Mikrobology. Ggeneral Aspets 3rd ed. Elsevier Academic Press, London. 105-122, 2004.
90. TRACHOO N. The fermented milk. Food Science Technology, 734-742, 2002.
91. SHİHATA A, SHAH NP. Proteolytic profiles of yogurt and probotic bacteria. İnternational Dairy Journal, 10: 401-408, 2000.
92. SHORİ AB, BABA AS, CHUAHPF. The effects fish collagen on the proteolysis of milk proteins, ACE inhibitory activity and sensory evaluation of plain and *Allium sativum*-yogurt. Journal of the Taiwan institute of Chemical Engineers, 44: 701-706, 2013.
93. TAMİNE AY, DEETH HC. yogurt: tecnology and biochemistry. Journal of Food Protection, 43: 939-977, 1980.
94. YERLIKAYA O. AKPINARA, KILIC S. Physicochemical, microbiological, rheological and sensory properties of set – type yogurt produced with *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strainsi. İtaly Jounal Food, 4: 412-421, 2013.
95. SERRA MA, TRUJİLO J, PEREDA J, GUAMİS B, FERRAGUT V. Quantification of lipolysis and lipid oxidation during cold storage of yogurts produced from milk treated by ultra-high pressure homogenization. Journal of Food Engineering, 1: 99-104, 2008.
96. GÜLER Z, ALEV C, BALCI G. Evaluation of volatile compounds and free fatty acids in set types yogurts made of ewes' ,goats' milk and their mixture using two different commercial starter cultures during refrigerated storage. Food Chemistry, 3: 1065-1071, 2011.
97. CHENG H. Volatile flavor compounds in yogurt: A Review, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 50: 938-950, 2010.
98. CODEX Alimentarius. Codex Standart 243: Standard of fermented milks. Milk Products. Vol.12. Codex Alimentarius, Paris, France2003.
99. ÖZYURT Ş. Doğal *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* suşlarında endüstriyel öneme sahip özelliklerin

araştırılması. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı doktora tezi, Ankara 2005.

100. MURIEL C, GABRIEL D, FAURIE F, QUERE J L, BERTHIER F. Multiple interactions between *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* strongly affect their growth kinetics during the making of hard cooked cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 30: 10-19, 2009.

101. DIMITROV Z, MICHAYLOVA M, MINCOVA S. Characterization of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from Bulgarian yoghurt, cheese, plants and human faecal samples by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis of cell-wall proteins, ribotyping and pulsed field gel fingerprinting. *International Dairy Journal*, 15: 998-1005, 2005.

102. WEINRICHTER B, LUGINBUHL W, ROHM H, JIMENO J. Differentiation of facultatively heterofermentative lactobacilli from plants, milk, and hard type cheeses by SDS-PAGE, RAPD, FTIR, energy source utilization and autolysis type. *Lebenson Wiss Technol*, 34: 556-566, 2001.

103. Anonim International Dairy Federasyon (IDF). Levains lactiques de cultures de bacteries lactiques. Norme de composition. IDF standart 149A, Brussels, Belgium, 1997.

104. KAO YT, LIU YL, SHYU TY. Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. *Department of Horticulture National Taiwan University*, 1: 71-79, 2007.

105. MATHARA JM, SCHILLINGER U, KUTIMA PM, SAMUEL K, MBUGUA W, HOLZAPFEL H. Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of kule naota: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 269-278, 2004.

106. ASMAHAN A. Isolation and identification of lactic acid bacteria isolated from yogurt in Khatoum state. *Sudan' Curent Research Bacteriology*, 16: 22-11, 2011.

107. BEUKES E, BERNIE M, BESTER H, JOHANNES F: Mostert 'The microbiology of South African traditional fermented milks. *International Journal of Microbiology*, 63: 189-197, 2001.

108. COLLADO CM, HERMANDEZ M. Identification and differentiation of *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* species in fermented milk products with bifidobacteria. *Microbiological Research*, 1: 86-92, 2007.

109. GISELLE I. C, RACHAD S, CORRIEU G, BEAL C. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from fermented milk "laban". *International Journal of Food Microbiology*, 1: 52-61, 2006.

110. SIAMAK P Y, HENNING S, LARSEN H JS, GOGSTAD G. Use of magnetic beads for Gram staining of bacteria in aqueous suspension. *Journal of Microbiological Methods*, 3: 369-371, 2001.

111. ANONİM. Katalaz testi. Ulusal mikrobiyoloji standartları (UMS) sürüm: 1. 1 / B-TP-10 / Test Prosedürleri / Bakteriyoloji. 01.01.2015.

112. BADIS A, GUETARNI D, MOUSSA BOUDFEMA B, HENNI DE, KIHAL M. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 5: 579-588, 2004.

113. AKYAR I, CAN S. *Salmonella* türlerinin hızlı tanısında kromojenik besiyeri ile birlikte "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry" yönteminin phoenix otomatize sistemi ile kıyaslanması. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2: 325-330, 2013.

114. DOAN NTL, VAN HOORDE K, CNOCKAERT M, BRANDT E D, AERTS M, LE THANH, VANDAMME P. Validation of MALDI-TOF MS for rapid classification and

- identification of lactic acid bacteria, with a focus on isolates from traditional fermented foods in Northern Vietnam. *Letters in Applied Microbiology*, 4: 265-273, 2012.
115. FAO. Manual of Food Quality Control. 4. Rev.1. "Microbiological Analysis". Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, pp 43-56 1992.
116. DEMİRKAYA AK, CEYLAN ZK. Bilecik'te tüketime sunulan yoğurtların kimyasal ve mikrobiyolojik kalitesinin araştırılması. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi ; 3: 202-20, 2013.
117. SALVATIERRA MA, GAMBOA M M, ARIAS ML. Evaluation of the effect of probiotic cultures on two different yogurt brands over a known population of *Staphylococcus aureus* and the production of thermonuclease. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 3: 298- 302, 2004.
118. İRKİN R, VAPUR EREN U. A research about viable *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* numbers in the market yoghurts world. *Journal of Dairy & Food Sciences*, 1: 25-28, 2008.
119. YEDİKARDAŞ E. Yağ oranlarının kayısı lifi katkılı probiyotik kültür ile üretilen yoğurtların kalite özellikleri üzerine etkisi. Çukurova üniversitesi fen bilimleri enstitüsü gıda mühendisliği anabilim dalı yüksek lisans Tezi, Adana 2010.
120. ERSOY M. Yerel peynirlerden izole edilen laktokokus suşlarının bazı teknolojik özelliklerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi sağlık bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Bursa, 2009.
121. ASLIM B, BEYATLI Y, HALKMAN K. Yoğurt starter kültür metabolitlerinin inhibisyon etkisi. *Turkish Journal Biology*, 24: 65-78 TÜBİTAK, 2000.
122. MASUDA T, HIDAKA A, KONDO N, URA T, ITOH T. Intracellular enzyme activities and autolytic properties of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus gasseri*. *Food Science Technology Resiewes*, 3: 328-331, 2005.
123. ÇIBİK R, CHAPOT- CHARTIER MP. Autolysis of dairy leuconostocs and detection of peptidoglycan hydrolases by renaturing SDS-PAGE. *Journal of Applied Microbiology*, 5: 862-869, 2000.
124. ANONİM. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. M100S22, Vol.32, No.3 (90-94), Wayne, PA, USA, January 2012.
125. JANKOWSKA A, WISNIEWSKA K, REPS A, GRZESKIEWIC Z. Antibiotic resistance of pressurized strains of the *Lactobacillus* species. *High Pressure Research*, 4: 713-720, 2009.
126. GEZGİNÇ Y, AKYOL İ. Geleneksel yoğurtlardan izole edilen *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus*' ların tanımlanması. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi, 2: 23-29, 2010.
127. SEZGİN E, ATAMER M, GÜRSEL A. Yerli ve yabancı starter kullanılarak yapılan yoğurtların kalite üzerine bir araştırma. *Gıda*, 1:11-20, 1988.
128. KAMURAN A, DURLU ÖF, TUNAIL N. Commercially important characteristics of Turkish origin domestic strains of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. *International Journal Dairy Technology*, 3: 150-157, 2005.
129. ÇIBİK R, CHAPOT-CHARTIER M-P, Characterization of autolytic enzymes in *Lactobacillus pentosus*. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 459-463, 2004.
130. ÖNAL D, ASLIM B, BEYATLI Y. Yoğurtlardan izole edilen muhtemel probiyotik *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. Türkiye 9. Gıda Kongresi; Bolu, 24-26 Mayıs 2006.
131. KHAN SA, NAWAZ MS, KHAN AA, HOPPER SL, JONES RA, CERNIGLIA CE. Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus spp.* from poultry and dairy

farms: detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 19: 27-34, 2005.

## TEŐEKKÖR

Doktora çalıőmam boyunca bana yol gösteren, her konuda yardımcı olan ve bana karşı göstermiş olduğu sabrından dolayı danıőmanım Prof. Dr. Recep ÇIBIK'a, doktora süresince yardımlarını esirgemeyen Dr.Tülay ELAL MUŐ'a Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı tüm çalıőanlarına ve desteklerini her zaman hissetiğim BA Susurluk meslek yüksekokulu mesai arkadaőlarıma sonsuz Őükranlarımı ve teőekkürlerimi sunuyorum. Doktoraya baőlamama ve bitirmeme çok büyük katkısı olan, bu konuda her türlü özveriye gösteren sevgili eőim Ŗznur'a ve biricik kızım Ceyda'ya sevgilerimi ve saygılarımı sunuyorum.

## ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Balıkesir’de doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi babamın memur olmasından dolayı Türkiye’nin birçok il ve ilçesinde okudum. 100. Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden 2000 yılında mezun oldum. Mezuniyet sonrası Balıkesir damızlık yetiştiriciler birliğinde veteriner hekim olarak çalıştıktan sonra 2001 yılında Balıkesir Üniversitesi Susurluk meslek yüksekokulunda öğretim görevlisi kadrosunda çalışmaya başladım. 2009 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalında doktora başladım. Evli; Ceyda adında bir kız babasıyım.