

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MODEL SİSTEMLERDE
LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ
(Lactobacillus bulgaricus ve Lactococcus lactis)
ÜZERİNE STRES FAKTÖRLERİN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Aysun GÜNDÜZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

KONYA, 2010

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MODEL SİSTEMLERDE LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ
(*Lactobacillus bulgaricus* ve *Lactococcus lactis*)
ÜZERİNE STRES FAKTÖRLERİN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Aysun GÜNDÜZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

KONYA, 2010

Bu tez 20/09/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nihat AKIN

(Danışman)

Prof. Dr. Mustafa NİZAMLIOĞLU

(Üye)

Yrd. Doç. Dr. Cemalettin SARIÇOBAN

(Üye)

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MODEL SİSTEMLERDE LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ
(*Lactobacillus bulgaricus* ve *Lactococcus lactis*)
ÜZERİNE STRES FAKTÖRLERİN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ
Aysun GÜNDÜZ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nihat AKIN

2010, Sayfa: 94

Jüri: Prof.Dr. Nihat AKIN

Prof.Dr. Mustafa NİZAMLIOĞLU

Yrd.Doç.Dr. Cemallettin SARIÇOBAN

Bu araştırmada doğal ortamdan izole edilmiş iki adet laktik asit bakterisi (*Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* ve *Lc. lactis subsp. lactis*) üzerine sıcaklık, pH, tuz konsantrasyonu ve soğuk depolama süresi olmak üzere dört stres faktörünün etkisi belirlenmiştir. Bu amaçla her iki suş, 3 farklı sıcaklık (*Lb. bulgaricus* için 37, 42, 46 °C; *Lc. lactis* için 26, 32, 37 °C), 7 farklı tuz konsantrasyonu (%1 - %7), 10 farklı pH değeri (pH:4 - pH:9) ve 4 farklı soğuk depolama süresi (1., 7., 14. ve 30. Gün) ile muamele edilmiştir.

Çalışma sonunda stres faktörlerin sözkonusu iki bakterinin canlılıkları üzerinde kayda değer etkiler yarattığı görülmüştür. Stres etkenlerinin farklı değerleri suşa bağlı olarak spesifik etkiler yaratmıştır. *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* suşunun canlılığı için optimum değerler pH 6,5, %2 tuz konsantrasyonu, 46 °C inkübasyon sıcaklığı; *Lc. lactis subsp. lactis* suşu için ise pH 7,5, %1 tuz konsantrasyonu, 32 °C inkübasyon sıcaklığı olarak tespit edilmiştir. Soğuk depolama sürecinde ise her iki suşun canlılığında kayıplar meydana gelmiş ancak *Lc. lactis subsp. lactis* suşu *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* suşuna oranla donmaya karşı daha fazla direnç göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterisi, stres, canlılık, *Lb. bulgaricus*, *Lc. lactis*

ABSTRACT

Masters Thesis

DETERMINATION OF EFFECT ON LACTIC ACID BACTERIA (*Lactobacillus bulgaricus* and *Lactococcus lactis*) OF STRESS FACTORS IN MODEL SYSTEMS

Aysun GÜNDÜZ

Selcuk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Nihat AKIN

2010, Pages: 94

Jury: Prof. Dr. Nihat AKIN

Prof. Dr. Mustafa NİZAMLIOĞLU

Assist. Prof. Cemalitin SARIÇOBAN

The purpose of this study is to determine the survival of 2 lactic acid bacteria (*Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* ve *Lc. lactis subsp. lactis*) which were isolated from nature, under stress conditions. In this respect, the survival ratios of two strains were determined under different pH, temperature, NaCl concentration and cold storage period. For this purpose, each of these strains were treated with 3 different temperature (*Lb. bulgaricus*: 37, 42, 46 °C; *Lc. lactis*: 26, 32, 37 °C), 10 different pH value (pH:4 - pH:9), 7 different NaCl concentration (%1 - %7) and 4 different cold storage period (1st, 7th, 14th and 30th Days).

It was found that the effects of stress factors on strains viability were significant. Different values of stress factors have specific effects related to strains. pH 6,5, %2 NaCl concentration, 46 °C incubation temperature for *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*; pH 7,5, %1 NaCl concentration, 32 °C incubation temperature for *Lactococcus lactis subsp. lactis* were determined as optimal value for having the best survival ratio. Moreover; in cold storage period, the survival ratio of two lactic acid bacteria decreased as cold storage period increased; but *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* was more sensitive to freezing than *Lactococcus lactis subsp. lactis*.

Key words: Lactic acid bacteria, stress, survival ratio, *Lb. bulgaricus*, *Lc. lactis*.

ÖNSÖZ

Laktik asit bakterileri gıda ve farmakoloji endüstrisinde kullanılan önemli starterlerdir. Bu mikroorganizmaların canlılıkları, asitlik geliştirme, aroma üretimi, yapı oluşturma ve probiyotik özellikleri gibi teknolojik özelliklerinin optimizasyonu fermentasyon teknolojisinin en önemli kriteridir. Mikroorganizmalara özgü optimum gelişme koşullarının sağlanması fermentasyonda standart kalitenin sağlanması ve prosesteki başarızlıkların en aza indirgenmesi açısından önem arz etmektedir.

Bu çalışmada model iki laktik asit bakterisi (*Lb. bulgaricus* ve *Lc. lactis*) üzerine pH, sıcaklık, tuz konsantrasyonu ve soğuk depolama süresi olmak üzere 4 stres faktörünün etkisi kaydedilmiş ve sonuçlar istatistikî analiz yöntemi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler eşliğinde söz konusu mikroorganizmalar için optimum gelişme değerleri ortaya çıkarılmıştır.

Bana bu konuda çalışma imkânı sunan, tez çalışmam esnasında bilgi ve deneyimleri ile bana öncülük eden, çalışmalarımı büyük bir özveri ile yürüten tez danışmanım Prof. Dr. Nihat AKIN'a, yoğun laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan İntermak A.Ş. çalışanı Burcu ERİKLİ'ye ve Arş. Gör. Hacer Çoklar'a, istatistikî analizlerin yürütülmesine katkıda bulunan Arş. Gör. Durmuş SERT'e, dua ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili aileme ve her zaman yanımda olduğunu hissettiren, özveriyle bana destek olan Ekrem ORAÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu araştırmayı bir proje ile destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (S. Ü. BAP) çok teşekkür ederim.

Konya, 2010

Aysun GÜNDÜZ

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	iv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Laktik Asit Bakterileri.....	5
2.1.1. Lactobacillaceae familyası	6
2.1.1.1. <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	8
2.1.2. Streptococcaceae familyası	10
2.1.2.2. <i>Lactococcus lactis subsp. lactis (Streptococcus lactis)</i>	13
2.2 Stres Faktörler	16
2.2.1. Stresin tanımı	16
2.2.2. Bakterilerin strese karşı oluşturdukları yanıt	17
2.2.2.1. Adaptasyon.....	18
2.2.2.2. Tolerans.....	18
2.2.2.3. Yaralanma	19
2.2.3. Strese karşı meydana gelen yanıtın mekanizması	19
2.3 Stres Yanıtları.....	20
2.3.1.Genel stres yanıtı.....	20
2.3.2. Özel stres yanıtları	20
2.3.2.1. Sıcak stres	20

2.3.2.2. Soğuk stres	21
2.3.2.3. Asit stres.....	24
2.3.2.4 Ozmotik stres	25
3. MATERYAL ve METOT	27
3.1. Materyal	27
3.2. Metot	27
3.2.1 Kullanılacak bakterilerin analize hazırlanması	27
3.2.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri	27
3.2.2.1. MRS agar	28
3.2.2.2. M17 agar	28
3.2.2.3. M17 broth.....	29
3.2.2.4. MRS broth.....	30
3.2.3. Besiyerlerinin hazırlanması ve muhafazası	31
3.2.4. Örneklerin mikrobiyolojik analiz için hazırlanmaları ve besiyerlerine ekim.....	32
3.2.5. Canlı hücre sayımı	35
3.2.6. Koloni sayısının hesaplanması.....	36
3.2.7.Stres koşullarının hazırlanması	37
3.2.7.1. Farklı sıcaklıklara direnç testi	37
3.2.7.2. Donmaya direnç testi	37
3.2.7.3. Tuz konsantrasyonuna direnç testi	38
3.2.7.4. Farklı pH değerlerine karşı direnç testi.....	39
3.2.8 İstatistik değerlendirme	40

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	41
4.1. <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> Suşunun Çeşitli Stres Faktörlere Karşı Gösterdiği Tepki.....	41
4.1.1. Sıcaklık stresi	41
4.1.2. Soğuk stres	44
4.1.3. Ozmotik stres	48
4.1.4. Asit stres.....	52
4.2. <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> Suşunun Çeşitli Stres Faktörlere Karşı Gösterdiği Tepki.....	56
4.2.1. Sıcaklık stresi	56
4.2.2. Soğuk stres	58
4.2.3. Ozmotik stres	61
4.2.4. Asit stres.....	65
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
6. KAYNAKLAR	73

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 <i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> 'un Gram boyama yöntemiyle boyanmış görüntüsü.....	8
Şekil 2.2 <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> 'un elektron mikroskopundaki görüntüsü.....	10
Şekil 2.3 <i>Lactococcus lactis</i> 'in elektron mikroskopundaki görüntüsü	13
Şekil 2.4 <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> 'in Gram boyama yöntemiyle boyanmış görüntüsü.....	16
Şekil 3.1 Yayma Yöntemi	33
Şekil 3.2 Canlı sayımı için plak yöntemleri (a) Dökme plak metodu (b) Yayma plak metodu.....	34
Şekil 3.3 Besiyerlerine ekim ve canlı hücre sayısının tespiti.....	35
Şekil 3.4 Eppendorflardan stok bakteri aktarımı.....	38
Şekil 3.5 Titrasyon düzeneği.....	39
Şekil 3.6 Denemelerde kullanılan spektrofotometre.....	40
Şekil 4.1 <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> suşunun farklı sıcaklık uygulamalarına bağlı pH değişim grafiği.....	43
Şekil 4.2 <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> suşunun soğuk depolama süresine bağlı canlılık değişim grafiği(log cfu/g)	46
Şekil 4.3 <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> suşunun soğuk depolama süresine bağlı canlılık değişim grafiği(% Canlılık)	46
Şekil 4.4 Canlı hücre sayımı için yayma yöntemi ile ekimi yapılmış petri örnekleri	47

Şekil 4.5 <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> suşunun farklı tuz konsantrasyonlarına bağlı pH değişim grafiği	50
Şekil 4.6 <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> suşunun farklı tuz konsantrasyonlarına bağlı titrasyon asitliği değişim grafiği	50
Şekil 4.7 <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> suşunun farklı tuz konsantrasyonlarına bağlı titrasyon asitliği ve pH değişim grafiği.....	51
Şekil 4.8 <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> suşunun farklı pH değerlerine bağlı absorbans değişim grafiği	54
Şekil 4.9 İnkübasyon öncesi farklı pH değerlerine ayarlanmış MRS besiyerlerinin görünümü	55
Şekil 4.10 İnkübasyon sonrası MRS besiyerlerinin görünümü.....	55
Şekil 4.11 <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> suşunun farklı sıcaklık uygulamalarına bağlı pH değişim grafiği.....	57
Şekil 4.12 <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> suşunun soğuk depolama süresine bağlı canlılık değişim grafiği(log cfu/g)	60
Şekil 4.13 <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> suşunun soğuk depolama süresine bağlı canlılık değişim grafiği(% Canlılık).....	60
Şekil 4.14 <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> suşunun farklı tuz konsantrasyonlarına bağlı pH değişim grafiği.....	63
Şekil 4.15 <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> suşunun farklı tuz konsantrasyonlarına bağlı titrasyon asitliği değişim grafiği	64
Şekil 4.16 <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> suşunun farklı tuz konsantrasyonlarına bağlı titrasyon asitliği ve pH değişim grafiği.....	64

Şekil 4.17 <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> suşunun farklı pH değerlerine bağlı absorbans değişim grafiği	67
Şekil 4.18 İnkübasyon öncesi farklı pH değerlerine ayarlanmış M17 besiyerlerinin görünümü	69
Şekil 4.19 İnkübasyon sonrası M17 besiyerlerinin görünümü.....	69

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1 <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> 'un temel karakteristikleri.....	9
Çizelge 2.2 Bazı Streptococcus türlerinin ayırımında kullanılan test toleransları (Buchanan ve Gibbons 1974).....	12
Çizelge 2.3 <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> 'in temel karakteristikleri	15
Çizelge 3.1 MRS Agar (Merck 1,10660) bileşimi	28
Çizelge 3.2 M17 Agar (Merck 1,15108) bileşimi	29
Çizelge 3.3 M17 Broth (Merck 1,15029) bileşimi	30
Çizelge 3.4 MRS Broth (Merck 1,10661) bileşimi	30
Çizelge 4.1 Farklı sıcaklık uygulamalarının <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> suşunun asitlik geliştirme yeteneğine etkisi	42
Çizelge 4.2 Soğuk depolama sürelerinin <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> suşunun canlılık değerleri üzerine etkisi	45
Çizelge 4.3 Farklı tuz konsantrasyonlarının <i>Lactobacillus delbrueckii ssp.</i> <i>bulgaricus</i> suşunun asitlik geliştirme yeteneğine etkisi.....	49
Çizelge 4.4 Farklı pH değerlerinin <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> suşunun gelişimine etkisi	53
Çizelge 4.5 Farklı sıcaklık uygulamalarının <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> suşunun asitlik geliştirme yeteneğine etkisi	56
Çizelge 4.6 Soğuk depolama sürelerinin <i>Lactococcus lactis subsp.lactis</i> suşunun canlılık değerleri üzerine etkisi	59
Çizelge 4.7 Farklı tuz konsantrasyonlarının <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> suşunun asitlik geliştirme yeteneğine etkisi	62

Çizelge 4.8 Farklı pH değerlerinin <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> suşunun gelişimine etkisi	66
--	----

1. GİRİŞ

Laktik asit bakterileri insan ve hayvanlardan bitkilere kadar birçok farklı ortamda bulunan bakterilerin heterojen grubunu oluşturmaktadırlar. Bu bakteriler uzun zamandır hayvan (süt, et, balık vb.) ve bitkilerden (sebzeler, şarap, zeytin vb.) elde edilen çeşitli fermente ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır (Stiles, 1996). Gıda biyotransformasyonlarının endüstriyelmesi laktik asit bakterilerinin ekonomik değerini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca laktik asit bakterileri gıda biyotransformasyon proseslerinin düşük maliyete sahip bileşenleridir. Fermente ürünlerin organoleptik ve hijyenik kalitelerinin gelişiminde kritik rol oynamaktadırlar. Bu nedenle başarılı fermentasyonlar için starter kültürlerin sahip olduğu kalite ve fonksiyonel özellikler (aroma ve yapı), gelişim performansları önemli hale gelmiştir. Bu yüzden laktik asit bakteri suşları bakteriyofajlara karşı direçli olmaları, hızlı gelişim ve asidifikasyon sağlamaları, proteolitik özellikleri ve bakteriyosin dirençlerine göre seçilmektedir. Aşılar (Wells ve ark., 1996; Mercenier ve ark., 2000) ve probiyotik gıda takviyeleri (Schiffirin ve ark., 2001) gibi yeni uygulamaların gelişimi; sindirim bölgelerinde canlı kalabilen, bağırsak sisteminde tutunabilen ve sindirim ya da ürogenital mukozada kolonize olabilen laktik asit bakterilerine olan ihtiyacı arttırmıştır. Benzer şekilde doğada da; strese hızlı bir biçimde tepki gösterebilmek hayatta kalmak için gereklidir ve laktik asit bakterileri tıpkı diğer bakterilerde olduğu gibi kötü koşullara ve ani çevresel değişikliklere direnç göstermek için strese karşı savunma mekanizmaları geliştirmektedirler.

Laktik asit bakterilerinin korunmaları genellikle dondurma ya da dondurarak kurutma ile sağlanır (To ve Etzel, 1997). Böylece bakterilerin canlılıkları ve asitlik geliştirme, aroma üretimi, yapı oluşturma ve probiyotik özellikler gibi teknolojik özellikleri korunacaktır (Fonseca ve ark., 2003). Bunun yanı sıra bazı türler dondurma ve dondurarak kurutmaya karşı hassastır. Bu etki genellikle starter

kültürün performansının düşmesi şeklinde gözlemlenir. Bu duyarlılık çeşitli streslerden kaynaklanan hücrenin fizyolojik durumundaki bozulmalara bağlanmaktadır. Soğuk depolama sırasında meydana gelen soğuk stres bakteriyel aktivitedeki kayıpların ana sebebidir. Diğer istenmeyen koşullar ise sıcaklık stresi (Desmond ve ark., 2002), asit stres (De Angelis ve ark., 2001), besinsizlik (Maus ve Ingham, 2003), ozmotik stres (Guerzoni ve ark., 2001), oksidatif stres (Aubert ve ark., 2002) vb.'dir.

Laktik asit bakterilerinde strese adaptasyon tepkileri bakteri türü ve stres koşullarına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Ancak bunlardan iki tepki ön plana çıkmaktadır. Birincisi, özellikle soğuk ya da sıcak stres ve asit stres gibi stres koşullarında gözlemlenen bazı özel proteinlerin sentezidir. *Lactococcus lactis* (Wouters ve ark., 2001) ve *S. thermophilus* (Wouters ve ark., 1999) tarafından sıcaklığın ani düşüşü durumunda soğuk şok proteinleri diye adlandırılan (CspA-CspI) proteinler sentezlenmektedir. *Lc. lactis*'te sıcaklık şokuna tepki GroEL, Dna K, Dnaj ve Grp E gibi ısı şoku proteinlerin sentezlenmesi ile sağlanır (Broadbent ve ark., 1997). Kültür pH'sının 4,5'e düşmesi *Lactobacillus acidophilus*'ta 9 proteinin ve *Lc. lactis*'te de bazı ısı şok proteinlerinin (Frees ve ark., 2003) sentezine sebep olur. *Lactobacillus bulgaricus*'ta ise pH 4,75'te oluşan asit şoku 3 ısı şok proteini (GroES, GroEL ve DnaK) ile baskılanmaktadır.

İkinci tepki ise hücre zarı yağ asidi kompozisyonu ile ilişkilidir. Membran fosfolipidlerinin doymamış yağ asidi içeriğindeki artış ile soğuk şoku indirgenir. Böylelikle katıdan sıvıya sıcaklık akışı azaltılır ve membran akışkanlığı artar. Bu da doymuş ve doymamış yağ asitleri arasındaki oranın gelişme sıcaklığı ile korelasyon gösterdiği sonucunu açığa çıkarmaktadır. Örneğin *S. thermophilus*'ta fermentasyon pH'sındaki düşüş doymuş/doymamış yağ asidi oranını artırır ve bu durum da asidifikasyon aktivitesinin geri kazanımına katkıda bulunur.

Eski zamanlardan beri *Lc. lactis* gıda üretimi ve korunması ile anılmaktadır. Günümüzde *Lc. lactis*'in tanımlı starter kültürleri peynir üretiminde büyük ekonomik öneme sahiptir. Bu organizma peynirin yapı ve aromasında anahtar role sahiptir.

Endüstriyel açıdan bakıldığında fermentasyonda iyi performans gösterecek ve fermentasyon prosesi sırasında ortaya çıkan elverişsiz kötü koşullara dayanıklı türlerin seçimi önemlidir. Ayrıca; bazı suşlar ucuz ve elverişli olan işleme prosedürleri ve depolama esnasında hayatta kalabilmelidir. Bazı gıda ürünlerinde (örn. taze süt) *Lc. lactis* bozulmaya neden olan mikroorganizma olarak da görülebilmektedir. Gıda sistemlerinde *Lc. lactis*'in varlığı; spesifik koşulların seçimi ile arzu edilen alanlarda lactococal üremeye destek vererek; lactococal fermentasyona ihtiyaç olmadığına ürünlerdeki bozulmayı engellemek için kontrol altına alınabilir. Bazı fiziksel parametrelerle son ürünün güvenliği ve besinsel değerini değiştirmeden lactococci kontrol edilebilir. Bu nedenle; hangi koşulların uygun olduğu, hangilerinin bu organizmanın yaşamına zarar verdiği ve bu koşullar altında hangi mekanizmaların yaşam için zorunlu olduğunu bilmek önemlidir.

Lc. lactis; nitrojen ve karbonca zengin ve çok çeşitli bitki materyallerini içinde barındıran sütte bulunmaktadır (Sandine ve ark., 1972). Özellikle endüstriyel proseslerde *Lc. lactis* sıcaklık, pH, osmotik basınç gibi farklı koşullarla karşılaşmaktadır. Bu organizma; cheddar peyniri üretiminde kendi kritik sınırı olan 40 °C sıcaklık ile karşılaşmaktadır. Peynir olgunlaştırma (8-16 °C) ve dondurulmuş starter kültürlerin depolanmasında da düşük sıcaklıklar ile karşı karşıya gelmektedir. Osmotik basınç preslenmiş peynirlerde oldukça yükselmektedir. Birçok farklı stres koşulu sıklıkla bir arada meydana gelmektedir. Şeker fermentasyonu yüksek seviyelerde laktik asit oluşumuna yol açtığı için asit stresine ya da karbonhidrat yokluğuna sebep olmaktadır. Liyofilize ya da püskürterek kurutma yöntemiyle hazırlanmış starter kültürlerdeki kuru hücreler osmotik ve oksidatif strese maruz kalmaktadırlar. Hücreler yüksek sıcaklıklara ve UV radyasyonu ile karşı karşıya gelmektedir. Gelişim için optimum koşulları sağlamak zordur ve spesifik metabolik adaptasyonlar gerektirmektedir.

Laktobasiller; laktik asit bakterileri grubunda en geniş yere sahip olan türlerdir. İnsan, hayvan, bitki ve gıdalardan izole edilen fenotipik, biyokimyasal ve fizyolojik çeşitlilik gösteren çok fazla suşa sahiptir. Laktobasiller peynir, yoğurt, ekşi hamur ekmekleri, silaj, zeytin, turşu, fermente balık ve sosis-sucuk üretiminde starter olarak kullanılırlar ve fermente edilmemiş sebzelerde doğal biyolojik koruyucu

olarak ön plana çıkarlar. Gastrointestinal bölgede kolonize olan laktobasil türlerinin sağlığa yararlı etki (probiyotik) yarattığı rapor edilmiştir.

Laktobasillerin kullanıldığı yukarıdaki uygulamalarda; hücrelerin fizyolojik durumları ve özelliklerini etkileyebilen sıcaklık, pH, osmotik basınç, oksijen, yüksek basınç, besinsizlik gibi çeşitli çevresel streslerle karşılaşmaktadır. Bu durumda laktobasil yaşamı için hangi koşulların uygun hangi koşulların olumsuz olduğunu bilmek önemlidir.

Bu çalışmada doğadan izole edilmiş *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* ve *Lc. lactis subsp. lactis* suşları üzerine inkübasyon sıcaklığı, pH, tuz konsantrasyonu ve soğuk depolama süresi olmak üzere dört stres faktörünün etkisinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Suşa özgü optimum gelişme koşullarının sağlanması, fermentasyonda standart kalitenin sağlanması ve prosesteki başarısızlıkların en aza indirgenmesi açısından önem arz etmektedir. Elde edilen bu sonuçların gerek araştırma laboratuvarlarında gerekse endüstrinin ilgili kesimlerinde kullanılan mikroorganizmaların karakteristiklerinin oluşturulmasında ön bilgi sağlayacağı düşünülmektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri esitli gıdalardaki faaliyetleri sonucu karbondhidratlardan (heksozlardan) laktik asit üretme yetenegine sahip mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar cins ve tür özelliklerine bağlı olarak karbondhidratlardan laktik asit yanında asetik asit, karbondioksit, alkol ve bazı tat ve aroma maddeleri de üretebilmektedirler. Bu maddelerin retimiyile çok az da olsa gıdanın kalori degerinde bir değisim söz konusu olmaktadır. Ayrıca laktik asit bakterileri gıdaların bozulmasında rol oynayan mikroorganizmalar ve insanlarda hastalıklara neden olan patojen mikroorganizmalar üzerinde de ürettikleri asit ve bazı antimikrobiyal maddeler (bakteriosinler vb.) nedeniyle antogonistik etkiye sahiptirler. Bu nedenle laktik asit bakterilerinin faaliyetiyle üretilen fermente gıdalar gıda zehirlenmeleri ve enfeksiyonları düŐünüldüėünde insan sağlığı açısından daha güvenilir gıdalar olarak kabul edilebilir (Ünlütürk ve Turantaş, 2003).

Laktik asit bakterilerinin taksonomik sınırları henüz kesin olarak çizilememiŐtir ve bu konuda değişik genetik çalışmalar sürdürülmektedir. Şu ana kadar tanımlanmış ve laktik asit bakterileri grubuna dahil edilmiş mikroorganizmaların bazı genel zellikleri Őoyledir:

- a. Bu mikroorganizmalar geliŐebilmek için aminoasitler ve B grubu vitaminler gibi besin ögeleri ile pürin ve pirimidin bazlarına ihtiyaç duyarlar.
- b. Çoğu mezofilik mikroorganizmalardır. Ancak bazıları 5 C'nin altında, termofilik türler ise optimum 45 C gibi yüksek sıcaklıklarda gelişebilirler.

- c. Bu mikroorganizmaların çoğu optimum 4,0 – 4,5 pH’da gelişebilmelerine rağmen bazıları 3,2 gibi düşük ve 9,6 gibi yüksek pH’larda da gelişebilmektedir.
- d. Ayrıca bu mikroorganizmaların bazıları zayıf proteolitik ve lipolitik özelliğe sahiptir (Ünlütürk ve Turantaş, 2003).

Burada sadece tez kapsamında kullanılan laktik asit bakterilerinin özellikleri üzerinde durulacaktır.

2.1.1. Lactobacillaceae familyası

Süt ve mamullerinde çok rastlanan ve süt mikrobiyolojisinde büyük önemi bulunan bu bakteriler çubuk şeklindedir. Çok uzun ve çok narin incelikte çubuklar halinde bulunabildikleri gibi, çok kısa çubuklar (kokobasil) şeklinde de görülebilirler. Laktobasillerin zincir formlarına, genellikle gelişmelerinin logaritmik evresinin geç döneminde rastlanır. Çoğunlukla hareketsiz mikroorganizmalardır. Hareketli olanlarının flagellumları peritrik, *Sporolactobacillus inulinus* hariç spor yapmayan bu bakterilerin Gram reaksiyonları pozitifdir. Ancak ortamda asitliğin artmasına ve kültürün yaşına bağlı olarak Gram negatif reaksiyon verdikleri de bilinmektedir. Ayrıca yaşlı kültürlerde ara sıra önemli derecede pleomorfi görülmektedir. Bazı türlerde basit boyama ve Gram boyama ile kolayca görülebilen granüllü yapı dikkati çekmektedir. Şekerleri anaerob olarak katabolize etmelerine rağmen oksijenli ortamda da gelişebilirler. Ancak bazı türlerin izolasyonu için anaerob koşullar zorunludur. Mikroaerofilik ve anaerob olan bazı laktobasillerin anaerob koşulda izole edildikten sonra subkültürlerinin yapılması ile oksijenli ortamda gelişebildikleri dikkati çekmektedir.

Glikozun fermentasyonu sonunda oluşan karbonlu bileşiklerin en az yarısı laktik asittir. Ortamın pH’sı 1,0’e kadar düşebilir. Laktik asidi fermente edemezler. Son ürün olarak oluşan laktik asit yanında asetik, formik, süksinit asit, CO₂ ve etanol meydana gelebilir. 2 karbonludan daha yüksek karbonlu yağ asitleri oluşturamazlar.

Bu bakterilerde nitrata redükte etme yeteneği ender olarak görölür, jelatini sıvılaştıramazlar. İndol ve H₂S oluşturma yetenekleri de yoktur. Kazeini parçalayamazlar, ancak bazı türlerin bazı suşları bir miktar eriyebilir nitrojen oluşturabilirler.

Laktobasillerin katalaz testleri negatif olup porfirin sistemleri yoktur. Porfirinleri olmamasına karşın bazı suşlar yalancı katalaz ile peroksidi parçalayabilirler.

Laktobasillerin ender olarak pigment yaptıkları görölür. Pigment yapanlar sarı, portakal ve tuğla kırmızısı koloniler oluşturabilirler. Karmaşık beslenme istemleri vardır. Amino asitlerine, peptidlere, vitaminlere, fermente olabilir karbohidratlara, yağ asitlerine ve esterlerine, çeşitli tuzlara, nükleik asit ve türevlerine gereksinme duyarlar. Her tür için beslenme isteği genel olarak karakteristiktir.

Katı besiyerlerinde anaerobik koşulda ortamda % 5-10 CO₂ gazı bulunması halinde, yüzeyde iyi bir gelişme gösterirler. Optimum gelişme sıcaklığı 30-40 °C olan laktobasillerin gelişmesi için en düşük ve en yüksek sıcaklık dereceleri 5-53 °C arasında değişmektedir. Asidurik olan bu bakterilerin optimum pH istemi 5,5-5,8 veya daha düşüktür.

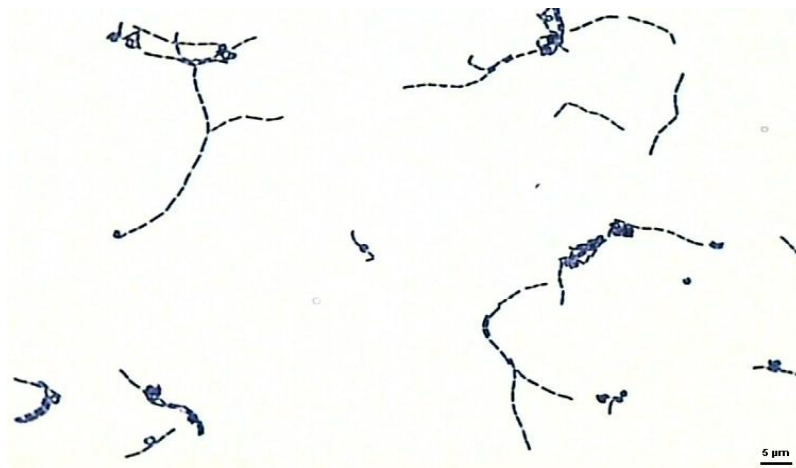
Laktobasillerin patojen özellikleri olmadığı gibi tersine ürettikleri laktik asit ve bazı antimikrobiyal maddelerle koruyucu etkileri mevcuttur. Bu familyaya giren türlerin DNA molekülündeki G+C oranı % 34,7-53,4 arasında değişmektedir. Bu familyaya giren birçok laktobasil türünden ancak süt ve mamulleri ile sütçölük tesisleri için önemli olanlardan söz edilecektir. Bunlar *L. lactis*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis* 'dir. Ayrıca *Lactobacillus curvatus* süttten izole edilmiş olmasına karşın bu mikroorganizmaya da *Lactobacillus corynoformis* gibi daha çok inek dışkısında ve süt hayvanlarının bulunduğu ahırların havasında rastlanır.

Süt teknolojisinde laktobasillerin kullanımı streptokoklara oranla farklılık gösterir. Laktobasiller asitliğe çok daha fazla dayanabilen bu nedenle de çok daha

fazla asitlik geliştiren bakterilerdir. Streptokok turleri % 1 kadar laktik asit oluşturdukları ve ancak pH'yı 4,3-4,5 kadar dūřurdıkları halde laktobasiller pH'yı 3,2-3,5'a kadar indirip, % 1 ile % 3 arasında laktik asit üretirler. Ayrıca laktobasillerin proteinleri parçalama yetenekleri daha yüksektir. Bu özellikleriyle laktobasiller her şeyden önce sert peynirlerin imalinde streptokoklarla birlikte önemli rol oynarlar. Teleme ve taze peynirlerde ilk önce streptokoklar gelişerek laktobasiller için ortamı uygun pH derecelerine ulaştırırlar. Böylelikle laktobasiller üremeye ve ortama hakim olmaya başlarken fazla asitliğe hassas olan streptokoklar inhibe olurlar. Bu nedenle bu tip peynirlerin olgunlaşmasında proteinleri parçalama ve aroma maddeleri oluşturma özellikleriyle laktobasiller streptokoklara oranla daha etkindirler.

2.1.1.1. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

Bu bakteri ilk olarak 1900'lü yıllarda Bulgar Grigoroff tarafından tanımlanmıştır. Morfolojik olarak *Lb. delbrueckii ssp. lactis*'ten ayırmak oldukça zordur. Oluşturduğu laktik asit miktarı, konsantrasyonu, DNA yapısındaki G+C oranı, hücre duvarı yapısı ve antijen grubu itibariyle hemen hemen aynıdır. Tek ayırıcı özellik maltozu kullanamamasıdır (Accolas ve ark., 1980).



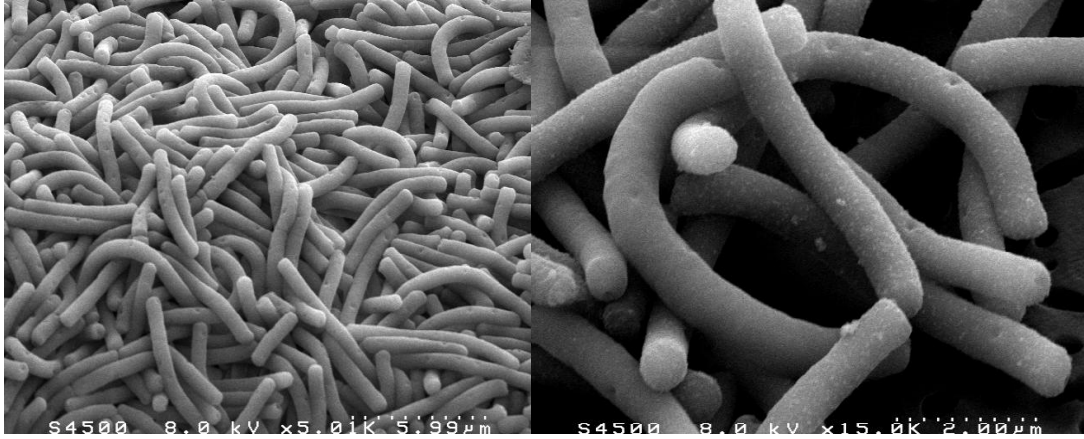
şekil 2.1 *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*'un Gram boyama yöntemiyle boyanmış görüntüsü

Çizelge 2. 1 *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*'un temel karakteristikleri

Ekoloji	Süt ve süt ürünleri
Fenotipik karakteristikleri	
Morfolojisi	Yuvarlak uçlu kök şeklinde, yaşa bağlı olarak değişiklik gösterir, tek veya kısa zincirli olabilir, hücreler metamorfik granüllü
Katalaz reaksiyonu	-
15 °C üreme	-
45 °C üreme	+
Sütteki reaksiyonu	+ (sütü kaoagule eder)
Laktik asit izomeri	D (-)
Teknolojik karakteristikleri	
Aktivitesi (organik asit üretimi)	Obligatif homofermentatif ve sitrat negatif, laktik asit üretimi (sütte % 1.7)
Proteolitik aktivitesi	+ (serbest amino asit)
Lipolitik aktivitesi	Zayıf
Aroma/flavur maddeleri üretimi	+ (asetaldehit, diasetil, asetoin, aseton)
Gaz üretimi	-
Polisakkaritleri üretimi	+ (kuvvetli/ değişik olabilir)
Alkol üretimi	± (etilalkol, iz miktarda)
H ₂ O ₂ üretimi	-
Vitamin üretimi	+ (niasin, folik asit, B ₆ , B ₁₂)
Diğerleri	Benzoik asit üretimi

Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus süt endüstrisinde çok önemli görevler üstlenmektedir. Yoğurt üretimi için hazırlanan saf kültürlerde *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* ile birlikte bulunur. Her iki bakteri arasında önemli bir ilişki söz konusudur. Bu ilişki proto-kooperasyon olarak isimlendirilmiştir. Bu olayda, yani yoğurdun oluşumu sırasında (her iki bakteriyi içeren kültürle aşılandıktan sonra) sütte önce *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* faaliyet göstererek laktozu parçalar ve az da olsa bir miktar (L+) laktik asit oluşturur, ortam pH'sını düşürür ve oksijeni kullanarak *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* için anaerob

ortam yaratır. Bu arada *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*'un oluşturduğu folik asit, bu bakterinin gelişmesini hızlandırır. *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* ise kendisi için hazırlanan ortamda laktozu hızla parçalar ve % 1,8 oranında (D-) tipte laktik asit oluşturur. Optimum gelişme sıcaklığı 42-45 °C'ler arasındadır. DNA'da % G+C oranı 50,3 dolayındadır. Hücre duvarında peptidoglikan yapısı L-lisin, D-aspartat şeklindedir. Çiğ süt ve sert peynirlerde doğal olarak bulunması yanında (Fransa'da Grana, İsviçre'de Emmental, İtalyan peynirleri Mozzarella ve Taioggo gibi) sert, pıhtısı pişirilen peynirlerde kültür olarak kullanılmaktadır (Accolas ve Auclair, 1983; Dellaglio ve ark., 1994).



Şekil 2.2 *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*'un elektron mikroskobundaki görüntüsü

2.1.2. Streptococcaceae familyası

Çapları 2 µm ve daha küçük olan streptokoklar sıvı besiyerinde çift halde veya zincirler halinde bulunurlar. Bakterilerin bölünerek üremeleri tek boyutlu olur. Katalaz testleri negatif olan streptokokların identifikasyonlarında serolojik gruplandırılmalarından ve hemoliz durumlarından yararlanılır. Streptokokların pek çoğu genellikle hücre duvarlarında oluşturdukları bir grup spesifik polisakkaritler nedeniyle farklı serolojik gruplara girerler. Bu spesifik polisakkaritler hücreden arındırılarak antijen adını alır ve serolojik testlerde kullanılır. İlk defa 1933 yılında

Lancefield, böyle bir serolojik gruplandırmayı başarmıştır. Grup antijenlerine bağlı olarak streptokoklar A, B, C, D, E, F, G, H, K, N serolojik gruplarına ayrılmışlardır. Bu grup antijenlerinin kimyasal yapıları ve hücrede lokalize oldukları yerler farklıdır. Streptokokların şimdiye değin 21 türü identifiye edilerek serolojik özellikleri saptanmıştır. Ancak bunlardan 5 tür, gösterilebilir grup antijenine sahip değildir. Örneğin *S. thermophilus* ve *Streptococcus mitis* grup antijeni göstermediklerinden fizyolojik özelliklerine göre saptanması gereken türlerdir.

Streptokokların kapsüllü ve kapsülsüz türleri vardır. Genelde kapsülsüzdürler, kapsül bulunuyor ise esas maddesini hiyaluronik asit oluşturur. Spor yapmayan streptokokların bazı türlerinin ender olarak pigment yaptıkları bilinmektedir. Uygun çevre koşullarında Lancefield'in serolojik sınıflanmasına göre B ve D grubuna giren streptokoklardan bazıları tuğla kırmızısı veya sarı renkli pigment yaparlar. Streptokoklar bakteriyel boyalarla kolaylıkla boyanırlar.

Kanlı agar besiyerinin üzerinde gelişen kolonilerin hemoliz durumları cinslerin ayırımında bir ip ucuudur. Kanlı agar üzerinde kolonilerin etrafında berrak zonlar oluşuyorsa β -hemoliz yapan β -hemolitik streptokoklar tanımlanmış olur. Yeşilimsi, bulanık zonlar oluşuyorsa α -hemoliz yapan α -hemolitik streptokoklar ve kanlı agarda hiçbir değişim görülüyorsa γ -hemolitik streptokoklar saptanmış olur. Çoğunlukla pneumokoklar da γ -hemolitiklerdir. Ancak streptokokları pneumokoklardan ayırmada safra çözünürlüğü testinden yararlanılır. Pneumokokların safralı besiyerinde gelişebilmektedir. Ancak bu özellik *S. pneumoniae* için geçerli değildir.

Streptokok kolonileri agarlı besiyeri üzerinde genellikle küçük, konveks hafif granüllü, kenarları parçalanmamış, düzgün ve yarı saydam olarak gelişirler. Eğer koloniler parlak ve saydam değil de daha mat ve buğulu görünümde ise bunlar virulent olan β -hemolitik Streptokok kolonileridir.

Streptokokların homofermantatif olup karbohidratları FDF yolu ile katabolize ederler ve enerjilerini substrat fosforilasyonu ile kazanırlar. Son ürün laktik asittir. Bazı türleri malik, sitrik asit gibi organik asitlerle serin, arjinin gibi aminoasitleri fermente edebilme yeteneğindedirler.

Streptokokların beslenme istemleri oldukça karmaşıktır. Türlerin çoğu glutamin, riboflavin, pantoten asidi, pridoksin, nikotin asidi, biotin ve 13-14 amino asidin ortamda bulunmasını isterler. A grubu streptokoklar ise ayrıca nükleik asit derivatlarına da gereksinme duyarlar. İçlerinde sadece *S. bovis* diğerlerinin aksine anorganik tuz amonyum ve glikoz bulunan ortamda gelişir.

Bazı Streptococcus türlerinin ayırımında kullanılan test toleransları Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2. 2 Bazı Streptococcus türlerinin ayırımında kullanılan test toleransları (Buchanan ve Gibbons 1974).

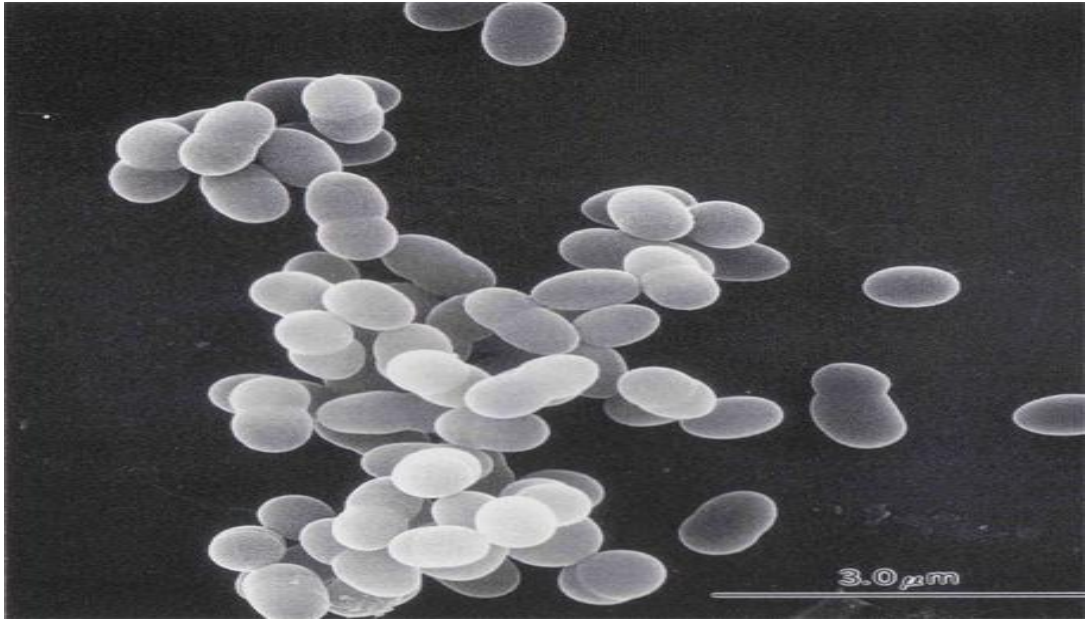
Türler	10 ⁰ C	45 ⁰ C	%0.1 metilen mavis	%6.5 NaCl	%40 safra tuzu	pH 9.6 da gelişme	60 ⁰ C'ye 30 dk tolerans
<i>Str.thermophilus</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>Lc.lactis ssp. lactis</i>	+	-	+	-	+	-	d
<i>Lc.lactis ssp. cremoris</i>	+	-	d	-	+	-	d

+: %90 oranında pozitif, -: %90 oranında negatif, d: değişken sonuç

Streptokokların optimum gelişme sıcaklıkları 37⁰ C'dir. Bu cinsin gruplandırılmasında fizyolojik özelliklerinden yararlanılarak yapılan sınıflandırma bugün için geçerlidir. Fizyolojik kriterlere göre ilk sınıflamayı 1937 yılında Sherman yapmıştır. Özellikle belli sıcaklık derecelerinde üreme, 9,6 pH da gelişme, % 6.5 NaCl'lü ortamda gelişme ve % 0,1 metilen mavis bulunan sütte üreme durumları esas alınarak Streptokoklar piyogenik, viridans, laktik ve fekal olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Yeni sınıflandırmada laktik streptokoklar Lactococcus cinsi altında, fekal streptokoklar ise Enterococcus cinsi altında toplanmışlardır. Streptokoklardan starter olarak kullanılan sadece termofil karakterli olan *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*'dur.

2.1.2.2. *Lactococcus lactis subsp. lactis* (*Streptococcus lactis*)

Lister tarafından izole edilen bu bakteri 1873 yılında *Bacterium lactis* olarak isimlendirilmiştir. 0,5-1,0 µm çapındaki oval hücreler zincir oluşturmaya eğilimlidirler. Bazı kültürlerde çok uzun zincir formları görülmekle birlikte genellikle ikili ve kısa zincir formlarında bulunurlar. Peptidoglukan yapısı bakımından *S. Pyogenes*'e çok benzemektedir. Peptid zincirinde L-alanin, D-isoflutarin, L-lisin, D-alanin yer almakta peptid ünitesine D-alanin ve L-lisin ile bağlanmaktadır ancak enlemesine bağlantıda D-izoasparagin yer almaktadır.



Şekil 2.3 *Lactococcus lactis* ' in elektron mikroskopundaki görüntüsü

Serolojik gruplandırmada N grubuna giren *Lc. lactis* grup antijeninin kimyasal yapısına gliserin taykoik asit, D-alanin ve glaktoz fosfat girmekte ve antijen hücre duvarı ile membran arasında yer almaktadır.

Lc. lactis, glukoz, maltoz, ksiloz, arabinoz, sakkaroz, trehaloz, mannitol ve salisini bazı hallerde fermente edebilmekte bazı hallerde de fermente edememektedir. Ancak rafinoz, inulin, gliserol veya sorbitolden asit oluşturmadığı kesin olarak

bilinmektedir. Tirosinin de bu bakteri tarafından dekarboksile edilemediği saptanmıştır.

Bazı *Lc. lactis* suşlarının antibiyotik olarak nisin ürettiği 1951 yılında Hirsch tarafından ortaya konmuştur. Nisin üzerindeki ilk araştırmalar bu maddenin Gram pozitif mikroorganizmalar üzerinde etkili olduğunu buna karşılık bu maddenin hayvanlarda görülen tüberküloz ve mastitis hastalıklarının tedavisinde kullanılamayacağını göstermiştir. Bunun nedeni de alkali reaksiyon gösteren kanda bu madde eriyememekte, buna bağlı olarak da damarlarda toplanma meydana getirmektedir. Polipeptid yapıda olan $C_{143}, H_{228}, O_{87}, N_{42}, S_7$ şeklinde genel olarak formüle edilen nisin biyolojik aktivitesi Reading Unit (R.Ü.) terimi ile belirtilmektedir. *S. lactis* ve diğer süt asidi bakterileri kullanılarak bugün ticari preparatlar halinde hazırlanan ve satılan nisin, nisaplin adıyla piyasada bulunmaktadır. Nisinin mikroorganizmaların gelişmesi üzerine olan etkisi hem vejatif hem de spor formlarında olmaktadır. Nisinin gıda maddelerinde koruyucu (prezervatif) etkisini belirlemek amacıyla yapılan pek çok araştırma mevcuttur ve birçok bozulmaların nisin kullanılarak bazı gıda maddelerinde önlenebileceği gösterilmiştir. *Lc. lactis*, içinde % 6,5 NaCl bulunan besiyerinde gelişmemesine karşılık % 4,0 NaCl içeren besiyerinde üreyebilir, yine benzer şekilde pH 9,6'da üreyememesine karşılık pH 9,2'de gelişebilir. % 0.1-0,3 metilen mavisi bulunduran sütte gelişme göstermektedir. *Lc. lactis*'in bazı suşları süt ve mamullerinde nisin amino asidini 3, metilbutanole çevirerek malt kokulu bir aromanın süt veya ürününe geçmesine neden olur. 3, metilbutanolün 0,5 ppm miktarında sütte bulunmasının süte malt aroması vermeye yeterli olduğu saptanmıştır.

Bu aromayı oluşturan *Lc. lactis* suşlarına birçok literatürde *B. lactis var. maltigenes* adı ile rastlanır. Bundan başka sütü yavaş koagüle etmesiyle *Lc. lactis*'den ayrılan suşlar *Str. lactis var. tardus* olarak isimlendirilir. *Str. lactis var. anaxyphilus* ise litmuslu sütü önce koagüle edip sonra litmusu indirgemesiyle ayrıcalık gösteren bakteridir. *S. lactis var. hollandicus* da sütte sünme (ropiness) denilen, sütün kıvamlı bir hal alarak bozulmasına neden olan, normal *Lc. lactis* kültürlerinden kapsül yapması ile ayrılan varyetedir. Ancak bütün bu

mikroorganizmalar "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" deki sınıflamada yer almamaktadır.

Çizelge 2.3 *Lactococcus lactis subsp. lactis*'in temel karakteristikleri

Ekoloji	Süt ve süt ürünleri
Fenotipik karakteristikleri	
Morfolojisi	Yuvarlak uçlu kök şeklinde, yaşa bağlı olarak değişiklik gösterir, tek veya kısa zincirli olabilir, hücreler metamorfik granüllü
Katalaz reaksiyonu	-
15 °C üreme	-
45 °C üreme	+
Sütteki reaksiyonu	+ (sütü kaoagule eder)
Laktik asit izomeri	D (-)
Teknolojik karakteristikleri	
Aktivitesi (organik asit üretimi)	Obligatif homofermentatif ve sitrat negatif, laktik asit üretimi (sütte % 1.7)
Proteolitik aktivitesi	+ (serbest amino asit)
Lipolitik aktivitesi	Zayıf
Aroma/flavur maddeleri üretimi	+ (asetaldehit, diasetil, asetoin, aseton)
Gaz üretimi	-
Polisakkaritleri üretimi	+ (kuvvetli/ değişik olabilir)
Alkol üretimi	± (etilalkol, iz miktarda)
H ₂ O ₂ üretimi	-
Vitamin üretimi	+ (niasin, folik asit, B ₆ , B ₁₂)
Diğerleri	Benzoik asit üretimi

10-40 °C arasında gelişebilen *Lc. lactis*'in optimum gelişme sıcaklığı 30 °C'dir. 63 °C'de 30 dakikalık pastörizasyonla tamamen yok olduğundan pastörize sütte bulunması süütün sonradan mikroorganizma ile bulaştığına işarettir. Süütün yaklaşık olarak ml'sinde 0,15 ünite penisilin veya 0,5 ünite aurcrisin bulunması *Lc. lactis*'in gelişimini tamamen engeller.



Şekil 2.4 *Lactococcus lactis ssp. lactis*'in Gram boyama yöntemiyle boyanmış görüntüsü

2.2 Stres Faktörler

2.2.1. Stresin tanımı

Stres ilgili olduğu alana göre farklı anlamlar taşımaktadır. Bir fizikçiye göre stres, birim alana uygulanan kuvvet anlamına gelmektedir. Ancak bir biyolog için ise suboptimal fiziksel şartlar, toksik kimyasallar ve zararlı besinsel ortamların zorla kabul ettirilmesi anlamına gelmektedir. Kısacası mikroorganizmaların gelişmesini veya üremesini olumsuz yönde etkileyen herhangi bir zararlı faktöre/ortama stres adı verilmektedir. İşlenmiş gıda ürünleri birçok stres faktörünü bünyesinde barındırmaktadır. Ancak bunların seviyeleri (şiddetleri) farklılık göstermektedir (Yousef ve Courtney, 2003).

Bir mikroorganizma karşılaşmış olduğu strese, farklı yanıtlar verebilir. Bakteriler zayıf stres (mild) olarak adlandırılan sublethal bir stres ile karşılaştıklarında, sayılarında bir azalma meydana gelmemektedir. Fakat üreme oranında durma veya azalma ile sonuçlanmaktadır. Mikroorganizmanın orta şiddetli (moderate) bir stres ile karşılaştığında mikrobiyel gelişimin durmasının yanında, bakterilerin yaşama kabiliyetlerinde azalma da meydana gelmektedir. Şiddetli (extreme) stres olarak adlandırılan stres ise bakteri hücreleri için ölümcül bir durum

oluşturmaktadır ve bakteri popülasyonunun çoğunluğunun ölümü ile sonuçlanmaktadır (Yousef ve Courtney, 2003). Gıdalarda bulunan bakteriler, ham maddenin elde edilmesi sırasında kontrol edilemeyen stres faktörleri (kuruma vb.) ve hammaddenin işlenmesi esnasında bilinçli olarak uygulanan koruyucu faktörler ile karşılaşabilmektedir. Gıdanın üretimi ve işlenmesi esnasında mikroorganizmaların maruz kalabilecekleri stresler aşağıdaki gibi sıralanabilir.

- Isı, basınç, elektrik akımı, ultrasonik dalgalar, ışık/radyasyon ve ozmotik şok gibi fiziksel stresler,
- Asitler, tuzlar ve oksitleyiciler gibi kimyasal stresler,
- Mikrobiyel metabolitler, antagonizma ve yarışmacı flora gibi biyolojik streslerdir.

Gıdalardaki bakteriler yavaş yavaş artan veya ani streslere maruz kalabilirler. Özellikle ani maruziyet durumlarında “şok” adı verilen durum söz konusu olmaktadır. Örneğin, gıdalar ile birlikte alınan bakteriler mide ortamında ani pH değişikliğine veya asit şokuna maruz kalırlarken, bir gıdanın fermentasyonu esnasında yavaş yavaş artan bir asitlik ile karşılaşabilirler.

2.2.2. Bakterilerin strese karşı oluşturdukları yanıt

Herhangi bir strese maruz bırakılmamış bir bakteri ilk maruz bırakıldığı strese karşı duyarlıdır. Duyarlı olduğu stres karşısında bakterilerde membran geçirgenliğinde değişimler (soğuk şoku), hücre protein yapısında değişimler, ribozomal hasarlar (ısı) ve nükleik asitlerin olumsuz etkilenmesi (γ radyasyon) gibi hücresel aktiviteleri olumsuz etkileyen çeşitli değişiklikler ortaya çıkabilmektedir. Moleküler düzeyde incelenecek olursa, bu olumsuz durumlarda hücrelerde şok düzenleyici proteinlerin sentezi meydana gelebilmektedir. Böylece bakteri; sentezlenen proteinler ile maruz kaldığı stres ile baş edebilecek düzeye ulaşabilmektedir. Strese karşılık oluşan mikrobiyel yanıt aşağıdaki gibi sonuçlanabilir (Yousef ve Courtney, 2003).

- Stres karşısında meydana gelen hasarı onarabilen, hücrenin yaşamını devam ettirebilen veya stres ajanlarını elemine edebilen proteinlerin üretimi,
- Stres faktörlerine karşı toleransın veya rezistansın kısa sürede şekillenmesi,
- Hücrenin transformasyona uğrayarak sporlanması veya yaşayabilen fakat kültürü yapılamayan (Viable But Not Culturable- VBNC) duruma geçmesi,
- Konakçı olduğu organizmanın savunma sisteminden kurtulması.

2.2.2.1. Adaptasyon

Mikroorganizmalar strese maruz kaldıkları zaman, koruyucu veya adapte edici yanıt oluşturabilmektedirler. Uygulanan strese karşılık oluşan yanıt, benzer veya farklı streslere karşılık da çeşitli seviyelerde adaptasyona (çapraz koruma) neden olabilmektedir. Bu fenomen; adaptiv yanıt, indüklenmiş tolerans, alışma terimleriyle de tanımlanmaktadır.

2.2.2.2. Tolerans

Tolerans, mikroorganizmaların strese karşı yaşayabilme yeteneği olarak tanımlanmaktadır. Her mikroorganizmanın belli bir strese karşı tolerans seviyesi farklıdır. Fakat uyarılan bu tolerans seviyesi geçici olabildiği gibi, adaptiv tolerans da oluşabilir. Örneğin, laktik asit bakterilerinin doğal asit toleransı, diğer bakterilere oranla çok daha fazla olabilmektedir. Ayrıca aside adapte edilen bakterilerin asit toleransı daha da artabilmektedir. Bu kavramların anlatımında kullanılan direnç ve tolerans kavramları ise birbirine çok yakın anlamlar içermektedir.

2.2.2.3. Yaralanma

Mikroorganizmalar bir veya birden fazla zararlı faktöre karşılık duyarlılık gösterebilmekte ve bu durumda hücrel yapılar zarara uğrayabilmektedir. Bu değişikliklere yaygın olarak yaralanma adı verilmektedir. Yaralanma daha çok strese maruz bırakılmış hücrelerde özel bir ajana karşılık duyarlılık şeklinde oluşabilmektedir. Yani strese uğramış hücrelerin maruz bırakıldığı ajan, sağlıklı hücrelere uygulandığında kolaylıkla canlılığını sürdürürken, strese uğramış hücrelerde bu ajan yaralanmalara sebep olabilmektedir. Hücrelerdeki yaralanma ve strese adaptasyon kavramları tam olarak karakterize edilememiştir. Fakat yaralanma, bakterinin maruz bırakıldığı strese karşılık oluşan stres yanıtındaki yetersizlik, yanıtta bir gecikme veya adaptasyon yanıtındaki yetersizlikten kaynaklanabilir. Yaralanmış olan hücrelerin sonu ya ölüm ya da iyileşme ile sonuçlanmaktadır. Leistner (2000), farklı stres faktörlerine maruz bırakılan bakterilerin enerji tüketiminin arttığını, metabolik yorgunluk ve homeostazisin bozulması yoluyla bakterilerde ölüme yol açtığını işaret etmektedir.

2.2.3. Strese karşı meydana gelen yanıtın mekanizması

Strese karşılık bakterilerde oluşan tepkiler, ani (şok) yanıtlar ve/veya uzun süreli adaptasyonlar şeklinde olmaktadır. Pek çok durumda ani ve uzun süreli adaptasyon yanıtları benzer şok proteinler aracılığı ile meydana getirilmektedir. Ayrıca genel stres yanıtları bazı özel streslere karşı korunmada yardımcı olabildiği gibi, pek çok strese karşı da çapraz koruma sağlayabilmektedir. Bu durum pek çok özel ve genel stres yanıtlarının oluşması için gerekli olan proteinlerin birbirine benzemesinden kaynaklanmaktadır (Neidhardt ve VanBogelen, 2000; Yousef ve Courtney, 2003; Arsene ve ark., 2002).

Bakteri hücresi bir stres faktörüne maruz kaldığında eğer genetik kodunda bir direnç mekanizması varsa, ilgili proteinleri üreterek korunmaya çalışır. Uygulanan stres neticesinde bakteri DNA'sında transkripsiyon sonucu mRNA oluşmakta ve bu mRNA ribozomlarda translasyon sonucunda ilgili stresi düzenleyici şok proteinini

sentezlemiş olmaktadır. Sentezlenen düzenleyici şok proteini bakterinin fizyolojisini etkileyerek, uygulanan stres ile mücadele etmesini sağlamaktadır. Sentezlenen protein tek bir stres faktörüne karşı etkili olabildiği gibi birden fazla stres faktörüne karşıda etkili olabilmektedir. Ayrıca her bakterinin bir strese karşı aktive ettiği direnç mekanizmaları aynı olabildiği gibi farklı da olabilmektedir. Hatta aynı bakterinin farklı gelişim evrelerindeki (lag faz, log faz, durgun faz) aynı strese karşı oluşturduğu direnç mekanizması da farklı olabilmektedir.

2.3 Stres Yanıtları

2.3.1.Genel stres yanıtı

Genel stres yanıtı çeşitli stres faktörleri ile aktive edilebildiği gibi çoklu stres faktörleri tarafından da uyarılabilir. Genel stres yanıtının aktive edilmesi, genellikle gelişme oranındaki yavaşlama veya durgun faza geçiş esnasında meydana gelmektedir (Arsene ve ark., 2000). *E. coli* ve diğer Gram (-) bakterilerde en iyi bilinen genel stres yanıtı sistemleri, alternatif sigma faktör (σ) tarafından kontrol edilmektedir. Gram (+) bakterilerde ise σ^B tarafından kontrol edilmektedir. Alternatif sigma faktör ve σ^B tarafından uyarılmış genlerin DNA onarımını ve osmoprotektan alımını sağladığı ve böylece ozmotik ve oksidatif streslere hücreyi hazırladığı bildirilmiştir (Cronan, 2002; Hecker ve ark., 1996).

2.3.2. Özel stres yanıtları

2.3.2.1. Sıcak stres

Gıda kaynaklı bakteriler, gıdaların işlenmesi veya korunması amacıyla yapılan işlemler sırasında sık sık ısıya maruz kalmaktadır. Sıcaklık hücresel komponentlerde makro moleküler hasar meydana getirmektedir. Yüksek sıcaklığın en büyük etkisi protein denatürasyonudur. Isı stresi hücre içi pH'ta düşüşe yol açan

hücre zarından proton geçişini etkilemektedir (Piper, 1993; Weitzel ve ark., 1987). Hücreler ısı şokuna maruz bırakıldığında; ısı şok proteinlerinin artan sentezi ile karşılık verirler (Hecker ve ark., 1996). Sıcaklık ile sentezlenen proteinler, oluşan hasarı onarır veya hasarlı komponentleri yıkımlar. Pek çok ısıl işlem ile uyarılmış stres proteinleri, ısı hasarına uğramış proteinleri toplamakta ve hücrenin bu hasarlı proteinler ile mücadele etmesine yardımcı olmakta (*GroEL* ve *DnaK* vb.) veya hasara uğramış protein miktarını (*Lon* ve *ClpAP* vb.) azaltmaktadır (Hecker ve ark., 1996; Arsene ve ark., 2000). Bu değişikliklere ek olarak bazı bakterilerde hücre membranında trans-cis yağ asiti oranı değişmektedir. Bu yapısal değişikliklerin yanında ortam sıcaklığı arttığında membran akışkanlığını azaltmaktadır (Cronan, 2002).

Laktobasillerdeki ısı stresi gelişim, ısı toleransı ve protein sentezi üzerine etkisi incelenerek analiz edilir. Suşlar arasındaki genetik varyasyon, hücrelerin fizyolojik durumları ve diğer çevresel faktörler (gelişme ortamı, pH, su aktivitesi, tuz içeriği ve koruyucular) laktobasillerin ısı stresine olan dirençlerini etkilemektedir (Casadei ve ark., 2001; Desmond ve ark., 2001). Çoğalma fazındaki *Lb. bulgaricus* hücreleri; % 0,0001-0,015 aralığındaki hücre geri kazanım oranı ile 65 °C'de 10 dakika sıcaklık değişimine duyarlılık göstermektedir. Artış fazındaki bu hücreler ölüm sıcaklığından önce 50 °C'de 30 dk. bekletilince canlılık, suşa bağlı olarak 10 ile 1000 kat artış göstermektedir.

2.3.2.2. Soğuk stres

Optimum gelişme sıcaklığı açısından bakıldığında laktik asit bakterileri ya mezofilik ya da termofiliktir. Starter kültürlerin soğuk depolanması, peynir olgunlaştırma esnasında düşük sıcaklıkta fermentasyon ve fermente ürünlerin buzdolabı koşullarında depolanması gibi endüstriyel prosesler sırasında; laktik asit bakterileri optimum gelişme sıcaklıklarının oldukça altında sıcaklıklara maruz kalırlar. Düşük sıcaklıklar ve dondurma esnasında laktik asit bakterilerinin optimal canlılığı türlerin endüstriyel performansına katkıda bulunmaktadır. Düşük sıcaklık ve dondurmaya duyarlılık, fermentasyon prosesi, ürünlerin depolanması ve koruma

koşullarının optimizasyonu açısından önemlidir. Canlı hücreler sıcaklık düşüşüne maruz bırakıldığında önemli fizyolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Bu etkilerin üstesinden gelmek için mikroorganizmalar soğuk şok duyarlılığı diye adlandırılan bazı adaptasyonlar geliştirmektedirler.

Soğuk stresi sonucu bakterilerde, membran akışkanlığını optimize etmek için membran yağ asiti kompozisyonunda değişiklikler, çift zincirli nükleik asit üzerindeki soğukun etkisini stabilize eden DNA ve RNA'ya bağlı proteinlerin sentezi ve sitoplazma ile uyumlu maddelerin hücre içine transferi şeklinde fiziksel değişiklikler meydana gelmektedir (Russell ve ark., 1995; Phadtare ve ark., 1999; Angelidis ve ark., 2002).

Soğuk yanıtında meydana gelen protein sentezi, *Csps* (Soğuk şoku proteinleri - Cold shock proteins) veya *Caps* (Soğuk şoku alıştırma proteinleri - Cold shock acclimation proteins) diye sınıflandırılmaktadır. *Csps* hızlı, fakat soğuk yanıtında geçici olarak sentezlenir. *Caps* düşük sıcaklıklarda çoğalma esnasında sentezlenir ve çabuk uyarılırlar. Sıcaklık düşürüldüğü zaman bütün hücrelerde çift katmanlı fosfolipid membranların akışkanlığı azalmaktadır. Optimum akışkanlığı sürdürmek için hücreler, membranlarındaki doymamış yağ asiti miktarını artırır veya membran yağ asitlerinin uzunluklarını azaltarak düşük sıcaklıklarda akışkanlığı arttırabilirler.

Geleneksel olarak; laktik işletme kültürü hazırlığı geniş miktarlarda kültür açığa çıkarmak için bazı alt kültür işlemlerini gerektirir. Bazı aşamalar mandıralarda günlük olarak tekrarlanır ve stok kültürün transferi ve geliştirilmesi için deneyimli personele ihtiyaç vardır. Bu nedenle son birkaç yıldır işletme ve direkt inokülasyon için dondurulmuş konsantre kültürler ticari olarak yaygın hale gelmiştir.

Bakteriler donmaya ve kurutmaya karşı farklı dirençler gösterirler. Bu çoğunlukla suş, tür, gelişme koşulları, yaş, gelişme ortamının tabiatı, donma ve depolama koşullarına göre değişim gösterir (Moss ve Speck, 1973; Ray ve Speck, 1973). Birçok araştırma dondurulmuş kültürlerde maksimum aktiviteyi korumak için optimum koşulları tespit etme üzerine yoğunlaşmıştır.

Bakteri hücrelerinde donmadan kaynaklanan hasarı göz önüne alan birkaç genel prensip aşağıdaki araştırmalardan ortaya çıkmıştır:

- Hücre ölümü uzun süreli depolama ile artar (Gibson ve ark., 1965; Moss ve Speck, 1973; Ray ve Speck, 1973).
- Düşük depolama sıcaklıkları hücre ölüm oranını düşürür (Bauman ve Reinbold, 1966; Gibson ve ark., 1965; Ray ve Speck, 1973).
- Hücre konsantrasyonu yükseldikçe donmadan kaynaklanan hasara olan direnç artar (Ray ve Speck, 1973).
- Durgun gelişme fazında olan hücreler, artan(log) fazdaki hücrelere oranla daha fazla donma koşullarında hayatta kalırlar (Lamprech ve Foster, 1963; Moss ve Speck, 1973; Ray ve Speck, 1973)
- Kriyoprotektif ajanlar donma hasarına karşı koruma sağlarlar (Bauman ve Reinbold, 1966; Farr, 1969; Gibson ve ark., 1966; Heinemann, 1958; Lamprech ve Foster, 1963; Lloyd, 1975; Ray ve Speck, 1973; Stadhouders ve ark., 1971).

Maksimum hücre canlılığı ve kültür aktivitesinin tespitinde dordurma oranı önemlidir. Hızlı soğutma ile maksimum hücre canlılığı sağlanmaktadır (Bauman ve Reinbold, 1966; Chang, 1980). Bakterinin donma hasarı üzerine oluşturulan yeni teoriler hücre hasarın yüksek çözelti konsantrasyonu ve hücre içi buz kristalleri tarafından hücre zarının yıkımı ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Litvan, 1972; Ray ve Speck, 1973). Hızlı dondurmada; su hücre zarın izin verdiği orandan daha hızlı bir biçimde serbest kalır. Bu da hücre zarında hücre içi içeriğin sızmasına olanak veren küçük deliklerin oluşmasına ya da hücre zarının tamamının yıkımına sebep olur (Ray ve Speck, 1973). Dondurma sırasında sistem sıcaklığı çok hızlı bir biçimde düşürülürse; hücre içi ve dışı çözeltilerin dengesini sağlayacak dehidrasyon mekanizması için yeterli su hücreden ayrılamaz. Bu nedenle yeterli hızlı soğutmanın üzerine çıkıldığında hücre içi buz oluşumu başlar (Diller, 1975). Hızlı dondurma oranları küçük buz kristali üretir bu da daha az hücre hasarla sonuçlanacaktır. Ayrıca hızlı dondurma esnasında yeterli hücre su kalırsa; küçük hücre içi buz

kristali karasız olma eğilimi gösterir ve rekristalizasyonla boyutça geliyeceklerdir. Hatta bu durum düşük depolama sıcaklıklarında da görülebilir. Donma ve rekristalizasyon sırasında oluşan buz kristalleri hücre zarında hasarlara yol açabilmektedir (Chang, 1980; Ray ve Speck, 1973).

Kriyoprotektant ilavesi; su bağlama ve hücre içi ve hücre dışı buz kristali oluşumunun inhibisyonu ile dondurarak depolama esnasında yüksek yaşam oranlarına sebep olur. Birçok kriyoprotektantın varlığı kristal buzun yerine şekilsiz hücre dışı buzların oluşumuna yol açmaktadır (Litvan, 1972).

Laktik asit bakterilerinin donma ve depolama sürecindeki canlılığı suşa bağlı olarak değişmektedir (Morichi ve ark., 1963; Tsvetkov ve Shishkova, 1982; Picgue ve ark., 1992). Aynı zamanda bu süreç öncesindeki çevresel koşullar da önem arz etmektedir (Morice ve ark., 1992; Brashears ve Gilliland, 1995; Champagne ve ark., 1996). Rumian ve ark. (1993) ve Soxena ve ark. (1994) asidifikasyon testi sırasındaki koşullarının önemli olduğunu iddia etmektedir. Donmaya karşı direncin gliserol gibi kriyoprotektant madde ilavesi ile geliştirilebileceği savunulmaktadır (Lamprech ve Foster, 1963; Font de Valdez ve ark., 1983; Barbour ve Priest, 1986; Desmons ve ark., 1998). Bunun yanı sıra donma ve depolama sürecindeki asitlik aktivitesindeki kaybın ölçümü için uygun olan standart bir metot henüz geliştirilmemiştir.

2.3.2.3. Asit stres

Laktik asit bakterilerinin gelişimi; hücre dışı ortamda biriken asidik fermentasyon son ürünlerinin oluşumu ile karakterize edilir. Bu bakterilerin organik asit üretimi diğer birçok organizma için istenmeyen bir ortam yaratır. Bu özellik fermentasyon yoluyla gıda koruma metodlarının temelini oluşturur. Ayrıca bu bakteriler tüketim sonrası midede asidik ortamla karşılaşabilirler. Probiyotiklerin gelişimi sindirim bölgesindeki laktik asit bakteri canlılığı için önem arz etmektedir. Streptokok ve laktobasil gibi ağız yoluyla alınan laktik asit bakterilerinin canlılığı; düşük pH'larda asitlik geliştirme ve düşük pH'da fonksiyon göstermelerine bağlıdır

(Harper ve ark., 1984; Quivey ve ark., 2000). Bazı *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Oenococcus* suşları hariç laktik asit bakterileri nötrofildir (gelişme pH aralığı: 5-9). Asit stresin bakteri fizyolojisine olan etkisi detaylı bir biçimde bilinmemektedir. Bu asitler dolaylı yoldan hücre zarından geçerek sitoplazma içine girerler, hızlıca protonlarına ayrılırlar (Presser ve ark., 1997). Protonların hücre içinde birikimi hücre içi pH'sını düşürür ve böylece zar pH'sı da etkilenir.

Bakteriler asit stresine karşılık DNA'yı tamir eden enzimlerin uyarılması, amino asit katabolizmasının arttırılması, proton taşınmasının (proton efflux) arttırılması ve hücre membranındaki kompozisyon değişikliklerini içeren pek çok yolla karşılık vermektedirler (Yousef ve Courtney, 2003). Pek çok bakteri subletal bir pH'da uyarılan (koruyucu proteinlerin sentezlenmesi) ve düşük pH'larda yaşamı sağlayan asit tolerans yanıtı (Acid Tolerance Response – ATR) olarak adlandırılan bir fenomene sahiptir. ATR, bakteri türleri arasında çok farklı düzeylerde olduğu gibi, aynı bakterinin fizyolojik fazları (gelişim-durgun faz) arasında bile farklılık bulunmaktadır. Asit şoku ile indüklenen yanıt, hücre içi veya hücre dışı pH'sının değişimiyle uyarılabilir.

Asidifikasyon; hücresel fizyoloji (hücre zarı hasarı, enzimatik aktivite ve transfer sistemlerinin inhibisyonu) üzerindeki pleiotrofik etkileri provoke eder (Hutkins ve Nanen, 1993; Poolman ve ark., 1987a). *L. Lactis*'in hücresel duyarlılığı da pleiotrofik etkidir. pH'daki artış sitoplazmik asidifikasyonu minimize etmekte böylece asit stres hasarı etkisiz hale getirmektedir. Asidik koşullar altında çeşitli organik asit üreten bakteriler de pH'ta artış gözlemlemiştir (Nanen ve Hutkins, 1991a,b; Hutkins ve Nanen, 1993; Mercade ve ark., 2000; Siegumfeldt ve ark., 2000).

2.3.2.4 Ozmotik stres

Bakteriler gıdaların içerisinde yüksek şeker ve tuz gibi veya kurutulmuş ürünlerde olduğu gibi çeşitli ozmotik streslere maruz bırakılırlar. Aktif bir metabolizma için, hücre içi koşullar; iyonik bileşim, pH ve metabolit seviyeleri

açısından sabit kalmak zorundadır (Csonka ve ark., 1991). Bu durumlarda özellikle turgor basıncı (şişme) ve de hidrasyon (su kaybetme) bakteriler için çok önemlidir. Bu mekanizma bakterilerde ara sıra oluşan hiperozmotik durumlarda veya orta şiddetli ozmotik şartlarda ortaya çıkmaktadır (Yousef ve Courtney, 2003). Ortamın osmolaritesindeki değişim dolayısı ile bakteri hayatta kalabilmek için çevresel değişime adaptasyon göstermek zorundadır. Genellikle, bakteriler bunu; hiperosmotik koşullar altında uygun çözeltilerin (dışardan alım ya da sentez yoluyla) biriktirilmesi ve hipoosmotik koşullar altında ise serbest bırakılması yoluyla sağlamaktadırlar. Bu sıvılar polar (kutupsal) yapıdadır ve yüksek derecelerde hücre içinde çözülebilen bileşiklerdir. Çok yüksek konsantrasyonlarda bile hücre fonksiyonları etkilemeden ozmotik basınç ile mücadele edebilirler. Glycine betain, proline, ectoine, carnitine, choline ve trehalose en yaygın olarak bilinen uyumlu maddelerdir. Bu bileşiklerin sitoplazma içinde birikimi, direkt olarak değişmiş enzim aktivitesiyle veya gen transkripsiyon seviyesi ile düzenlenmektedir (Bremer ve Krämer, 2000).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada laktik asit bakterisi materyali olarak İntermak A.Ş.'nin doğal ortamdan izole edilmiş, identifikasyonu gerçekleştirilmiş laktik asit bakteri stokundan sağlanan X kodlu (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) ve Y kodlu (*Lactococcus lactis subsp. lactis*) bakterileri kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1 Kullanılacak bakterilerin analize hazırlanması

Çalışmada kullanılan bakteriler $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de ; %20-25 gliserol içeren MRS ve M17 sıvı besiyerinde 1 ml'lik eppendorflar içinde muhafaza edilmiştir. Analiz öncesinde donmuş halde olan eppendorflar termal şoktan sakınılması sebebi ile oda sıcaklığında bekletilerek eritilmiş ve analize hazır hale getirilmiştir. Analize hazır hale gelen Lactococci suşları M17 broth (Merck)'de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de; Lactobacilli suşları MRS broth (Merck)'da $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 16 saat inkübasyona bırakılmış ve analizlerde inokulant olarak kullanılmıştır.

3.2.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri

Lactococci suşları ile yapılan analizler için M17 agar (Merck) ve M17 broth (Merck); Lactobacilli suşları için ise MRS agar (Merck) ve MRS broth (Merck) kullanılmıştır. Bu katı besiyerlerinin bileşimi Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2'de ve sıvı besiyerlerin bileşimi Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4'de verilmiştir.

3.2.2.1. MRS agar

MRS Agar (Merck 1,10660)'dan 68,2 g tartılmış, tartılan miktar 1000 ml distile suda çözündürülmüştür. Ardından otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklav sonrası 45-50 °C'a soğutulup, steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülmüştür. Besiyeri hazırlandıktan sonra hemen kullanıldığı için 45 °C'ye soğutularak kullanıma hazır hale getirilmiştir (Anonymous, 2002a). Hazırlanmış besiyerinin berrak, kahverengi ve 25 °C'da pH'sı $5,7\pm 0,2$ olduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 3. 1 MRS agar (Merck 1,10660) bileşimi

Bileşen	Bileşim Miktarı(g/L)
Proteaz pepton	10,0
Sığır eti ekstraktı	10,0
Maya ekstraktı	4,0
Glikoz	20,0
Di potasyum fosfat	2,0
Tween 80	1,0
Di amonyum hidrojen sitrat	2,0
Sodyum asetat	5,0
Magnezyum sülfat	0,2
Manganez sülfat	0,04
Agar agar	14,0

3.2.2.2. M17 agar

M 17 Agar (Merck 1,15108)'dan 55 g tartılmış, tartılan miktar 1000 ml distile su ile tamamlanarak çözündürülmüştür. Daha sonra otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Besiyeri hazırlandıktan sonra hemen kullanıldığı için 45 °C'ye soğutularak kullanıma hazır hale getirilmiştir (Anonymous, 2002b). Kullanıma hazır

hale getirilen agar, steril petri kutularına 12,5'er mL dökülmüştür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kahverengi olup, 25 °C'da pH'sı 7,2±0,2'dir.

Çizelge 3. 2 M17 agar (Merck 1,15108) bileşimi

Bileşen	Bileşim Miktarı(g/L)
Soya pepton	5,0
Kazein pepton	2,5
Sığır eti pepton	2,5
Maya ekstraktı	2,5
Sığır eti ekstraktı	5,0
Laktoz monohidrat	5,0
Askorbik asit	0,5
Sodyum β- Gliserofosfat	19,0
Magnezyum sülfat	0,25
Agar agar	12,75

3.2.2.3. M17 broth

M17 broth toz besiyerinden 42,5 g tartılarak 1 L distile su içinde çözüldürülmüştür. Kullanım amacına uygun olarak deney tüplerine ve/veya numune kaplarına uygun hacimlerde (10 ila 100 ml) dağıtılarak 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Kullanılacak besiyerleri oda sıcaklığına kadar soğutularak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Stoklanması gereken besiyeri kalmış olduğu durumlarda buzdolabı sıcaklığında en fazla 1 hafta muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3. 3 M17 broth (Merck 1,15029) bileşimi

Bileşen	Bileşim Miktarı(g/L)
Soya unu peptonu	5
Et peptonu	2,5
Kazein peptonu	2,5
Et ekstraktı	2,5
D(+) laktoz	5
Askorbik asit	5
Sodyum β -gliserofosfat	19
Magnezyum sülfat	0,25

3.2.2.4. MRS broth

Çizelge 3. 4 MRS broth (Merck 1,10661) bileşimi

Bileşen	Bileşim Miktarı(g/L)
Kazein peptonu	10,0
Et ekstraktı	8,0
Maya ekstraktı	4,0
D(+) glikoz	20,0
Di potasyum hidrojen fosfat	2,0
Tween 80	1,0
Di amonyum hidrojen sitrat	2,0
Sodyum asetat	5,0
Magnezyum sülfat	0,2
Manganez sülfat	0,04

MRS broth toz besiyerinden 52,2 g tartılarak 1 L distile su içinde çözüldürülmüştür. Kullanım amacına uygun olarak deney tüplerine ve/veya numune kaplarına uygun hacimlerde (10 ila 100 ml) dağıtılarak 121 °C’de 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kahverengi olup, 25 °C’da pH’sı 5,7±0,2’dir. Kullanılacak besiyerleri oda sıcaklığına kadar soğutulularak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Stoklanması gereken besiyeri kalmış olduğu durumlarda buzdolabı sıcaklığında en fazla 1 hafta muhafaza edilmiştir.

3.2.3.Besiyerlerinin hazırlanması ve muhafazası

Kurutulmuş haldeki besiyerleri higroskopik özellikte olup, ısıya, ışığa ve neme duyarlıdır. Muhafaza koşulları orijinal kutuları üzerinde belirtilmekte olup, genellikle toz besiyerlerinin 25 °C’nin altında, düşük rutubetli ortamda saklanmaları önerilmektedir. Kullanım sırasında son kullanma tarihleri dikkate alınmalı, belirtilen süre içinde tüketilebilecek miktarlarda satın alınmalıdır. Topaklanmış, akışkanlığı kaybolmuş besiyerleri kullanılmamalıdır.

Besiyerinin hazırlanması sırasında deiyonize, damıtık veya ters osmoz yöntemiyle elde edilmiş sular kullanılmalıdır. Suyun pH’i kontrol edilmeli 5,5 değerinin altında ise ısıtılarak CO₂ uzaklaştırılmalıdır. Homojen bir karışım sağlanması, kolay karıştırılabilmesi için besiyeri toplam hacminin iki misli hacimde bir erlende hazırlanmalıdır.

Besiyeri önce gerekli miktarın yarısı kadar su içinde karıştırılmalı, geri kalan su erlenin kenarlarına yapışan besiyerini yıkayacak şekilde erlene ilave edilmelidir. Bu basamak önemlidir, çünkü erlen kenarlarında kalan toz halindeki besiyerleri otoklavda tam sterilize olmamakta ve kontaminasyona neden olabilmektedir.

Agar içeren besiyerleri otoklavlama öncesi, yanmaya neden olmayacak şekilde kaynama noktasına kadar ısıtılarak eritilmelidir. Otoklavlanmayacak besiyerleri bu kaynatma işlemi takiben petrilere veya uygun muhafaza kaplarına dağıtıma hazır duruma gelmiş olur. Besiyerlerinin çoğunluğu 121 °C’de 15 dakika sterilize edilmektedir. Besiyerleri sterilizasyon sonrası 25 °C’de orijinal ambalajları

üzerinde belirtilen pH değerlerini sağlayacak şekilde formüle edilmiştir. Bu nedenle sterilizasyon öncesi pH ayarlaması yapılmamalıdır.

Hazırlanan besiyerleri 50°C'deki su banyosuna alınmalı ve bu sıcaklığa indikten sonra petrilere dökülmeli, su banyosunda 3 saatten fazla bekletilmemelidir ve hava kabarcığı oluşmayacak şekilde karıştırılmalıdır. Petri kutularının kapaklarında yoğunlaşma olması ve foto-oksidasyon sonucunda inhibitör bileşikler oluşması nedeniyle besiyeri içeren petrilere güneş ışığında bekletilmemelidir. Isıya duyarlı katkıları besiyeri sıcaklığı 50 °C'ye düşürüldükten sonra ortama ilave edilmelidir. Soğuk sıvı haldeki bir katkı ilavesinde agarın katılaşabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Katkıların ilavesinden sonra besiyeri iyice karıştırılarak (köpük oluşturmadan) petrilere veya muhafaza edilecekleri kaplara mümkün olduğu kadar kısa sürede dağıtılmalıdır.

Hazırlanmış olan besiyerlerinin muhafaza süreleri besiyeri cinsine göre farklılıklar göstermektedir. Ağzı vidalı kapaklı kaplarda "nutrient broth" veya agar 12-16 °C'de 6 ay muhafaza edilebilmektedir. Besiyerleri ışıktan korunmalı, agarlı petri kutuları kurumaları önlemek için, hava almayacak şekilde ambalajlanarak, önerilen sürelerde 2-8 °C'de muhafaza edilmeli ve hiçbir şekilde dondurulmamalıdır. Bazı besiyerleri kısa sürede inaktive olan katkı içerdikleri için muhafaza süreleri oldukça kısadır. Genel olarak besiyerlerinin fazla bekletilmesinden kaçınılmalıdır. Kullanılan besiyerleri ve diğer malzemeler sterilize veya dezenfekte edildikten sonra atılmalı, çevrede kontaminasyonlara neden olmamalıdır.

3.2.4. Örneklerin mikrobiyolojik analiz için hazırlanmaları ve besiyerlerine ekim

Katı besiyeri kullanılan standart mikroorganizma analiz yöntemleri dökme, yayma ve damlatma olarak üç ana grupta ele alınır.

Bunlardan dökme yönteminin uygulanışında, steril Petri kutusuna analizi yapılacak sıvı gıda maddesinden doğrudan ya da uygun seyreltisinden 1 mL aktarılıp,

üzerine donma sıcaklığının biraz üzerinde (yaklaşık 45 °C) agarlı besiyeri dökülür ve karıştırılır. Agar donunca Petri kutusu inkübasyona bırakılır.

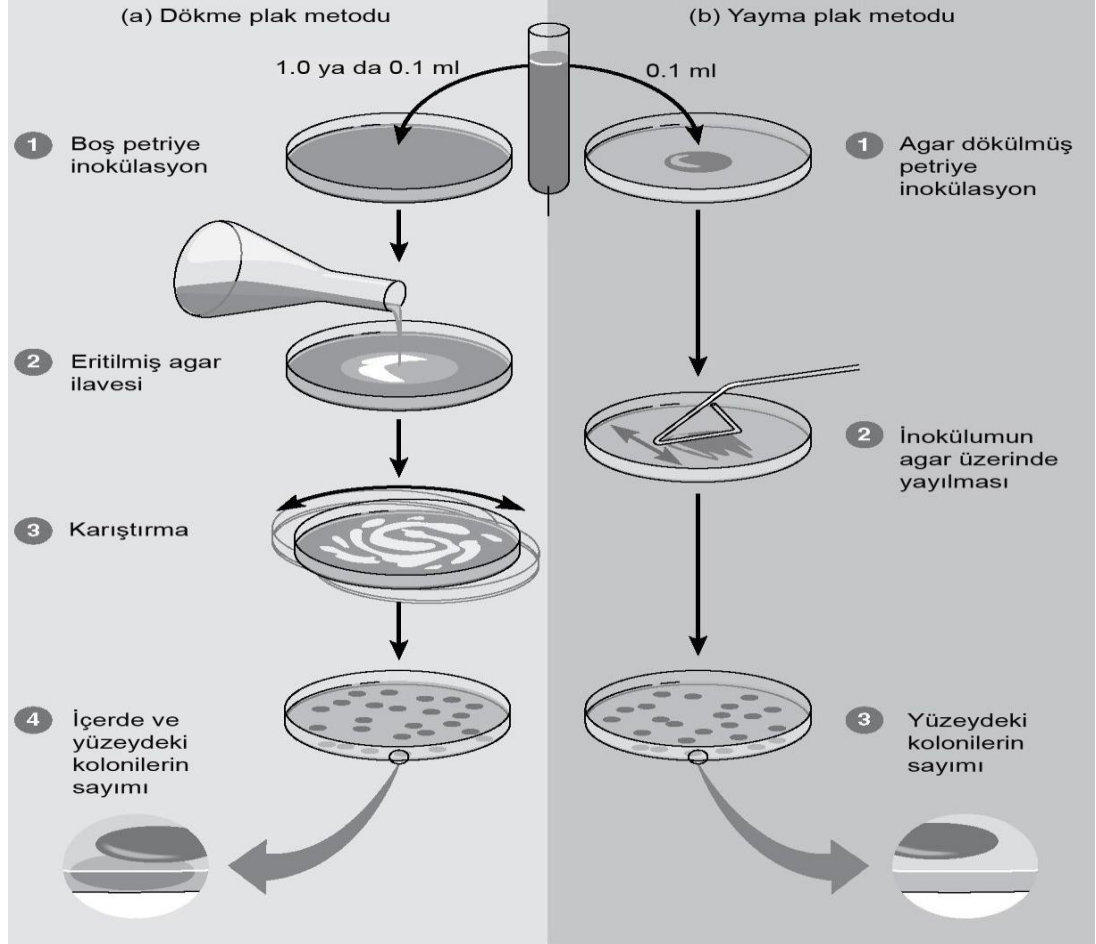
Yayma yönteminde ise, Petri kutusuna önce agarlı besiyeri dökülür, katılaştıktan sonra sıvı gıda maddesinden doğrudan ya da uygun seyreltisinden 0,1 mL aktarılıp, "Drigalski spatülü" olarak adlandırılan cam çubuk ile yayılır (Şekil 3,1). Drigalski spatülünün metal ya da tek kullanımlık olanları da vardır. Gıdadaki mikroorganizma sayısı bu yöntemin kullanılabilceği kadar yüksek ise, dökme yöntemine tercih edilmelidir. Bu konuda, analiz edilecek gıdadaki mikroorganizma sayısı bağlayıcı olmakla beraber, laboratuvarın tercihleri de önemlidir.



Şekil 3.1 Yayma Yöntemi

Damlatma yönteminde, daha önceden dökülüp katılaşmış besiyerine 10 µL (0,01 mL) damlatılır ve kendi halinde kurumaya bırakılır. Potato Dextrose Agar gibi besiyerleri damlayı çok iyi emdiği için, 50 µL damlatma yapılabilir. Kuruma sırasında yaklaşık 2 cm çaplı bir daire içinde oluşan koloniler genellikle büyüteç altında sayılır. Bu yöntemin en büyük avantajı tek Petri kutusu üzerine 4–6 damla aktarılması, diğer bir deyiş ile besiyerinden 4–6 misli tasarruftur. Ancak, kolonilerin sağlıklı bir şekilde sayılamaması nedeni ile hiçbir koşulda günlük analizde kullanılmaz.

Yaygın olarak kullanılan iki yöntemin uygulama şekli Şekil 3.2.'de belirtilmiştir.

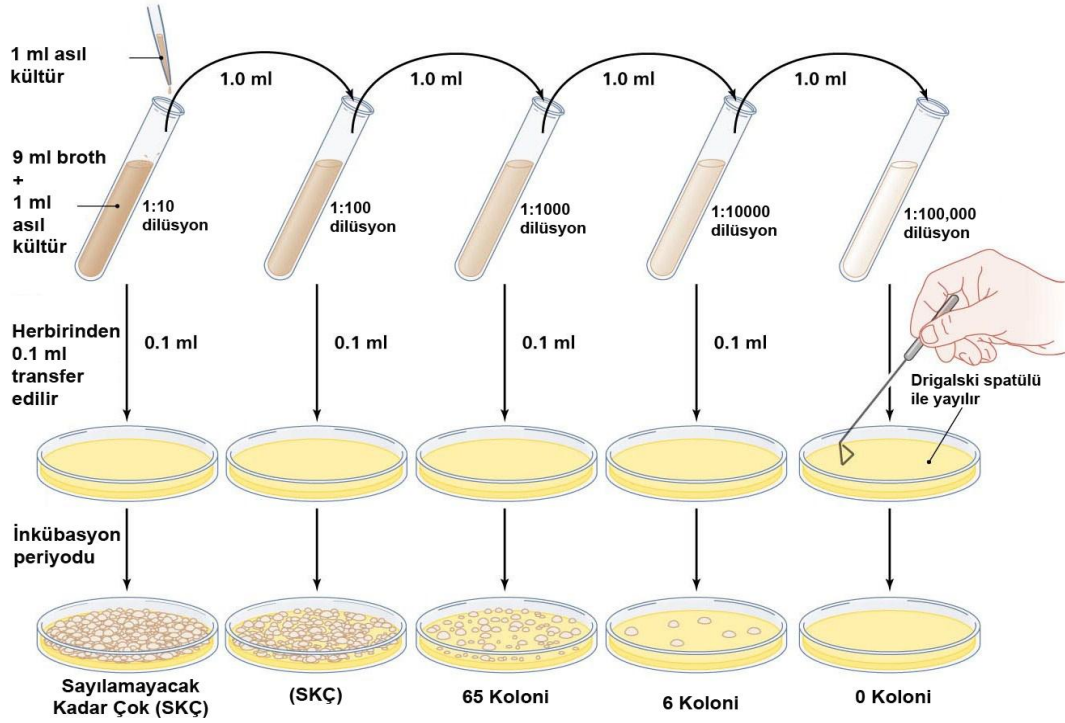


Şekil 3.2 Canlı sayımı için plak yöntemleri (a) Dökme plak metodu (b) Yayma plak metodu

Bu çalışmada yayma yöntemi kullanılmıştır.

Çalışmada aseptik koşullar altında; sterilize edilmiş 20 ml'lik deney tüplerine 9 ml steril $\frac{1}{4}$ Ringer çözeltisi aktarılmış ve bu çözeltinin üzerine daha önce dondurucudan çıkarılarak eritilmiş eppendorf içinden 1 ml stok bakteri ilave edilerek iyice karıştırılıp homojen hale getirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan 10^{-1} lik seyreltiden 10^{-10} 'a varan seyreltiler yapılarak son üç seyreltiden 0,1 ml alınarak daha önceden

petri kutularına dökülmüş M17 ve MRS agara aseptik koşullarda drigalski spatülü yardımıyla yayılmıştır (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3 Besiyerlerine ekim ve canlı hücre sayısının tespiti

3.2.5. Canlı hücre sayısı

Katı besiyeri kullanılarak yapılan sayımın prensibi "her canlı hücrenin belirli bir inkübasyon sonunda 1 adet koloni oluşturması"dır. Bununla birlikte, canlı olduğu halde hasar görmüş ve gelişip koloni oluşturamayacak canlı hücreler de gıda maddesinde bulunabilir. Bu nedenle sayım sonuçları "sadece koloni oluşturabilenlerin" sayıldığını göstermek üzere "koloni oluşturan birim; kob (colony forming unit; cfu)" olarak verilmektedir.

3.2.6. Koloni sayısının hesaplanması

Kolonilerin sayımı

1. Belirtilen inkübasyon süresinden sonra, 15 ilâ 300 koloniye sahip plaklar üzerindeki Lactobacilli ve lactococci özelliklerini gösteren koloniler sayılır.
2. Plâklar azaltılmış ışık altında incelenir. Saymayı kolaylaştırmak için, uygun koloni sayım cihazı kullanılabilir. İğne ucu koloniler için çözünmemiş numune taneciklerinin veya çökmüş maddenin yanıltmamasına dikkat edilir. Kolonileri yabancı maddelerden ayırt etmek için, gerektiğinde daha yüksek büyütme bir mercekle kullanılarak şüpheli nesnelere dikkatlice incelenir.

Hesaplama

1. Sayımlar için elde edilen plâklardan 15 ve 300 arasında koloni içerenler kullanılır.
2. Deney numunesindeki her bir karakteristik mikroorganizma sayısı aşağıdaki bağıntı kullanılarak hesaplanır:

Burada;

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

N : Deney numunesinin gramı başına karakteristik mikroorganizma sayısı,

ΣC : Sayılan bütün plaklardaki kolonilerin toplamının sayısı,

n_1 : Birinci seyrelti kullanılarak sayılan plakların sayısı,

n_2 : İkinci seyrelti kullanılarak sayılan plakların sayısı,

d : Plakta bulunan seyreltilmemiş deney numunesi ile birinci seyreltinin, gram cinsinden, kütlesidir.

Üç seyrelti durumunda; deney numunesindeki her bir karakteristik mikroorganizma sayısı aşağıdaki bağıntı kullanılarak hesaplanır:

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1 n_2 + 0,01 n_3) d}$$

Burada; n_3 üçüncü seyrelti kullanılarak sayılan plâkların sayısıdır.

3.2.7. Stres koşullarının hazırlanması

3.2.7.1. Farklı sıcaklıklara direnç testi

Süt tozu yardımıyla %10 kuru maddeli süt hazırlanmıştır. Hazırlanan süt 10 ml'lik miktarlarda deney tüplerine aktarılmış ve otoklavda 110 ° C'de 20 dk sterilize olması sağlanmıştır. Sterilizasyonun ardından inokülasyon sıcaklığına soğutulan sütlere 16 saat inkübasyona bırakılan bakterilerin bulunduğu M17 ve MRS sıvı besiyerinden (Merck) %2 oranında inokülasyon yapılmıştır. *Lc. lactis* suşu ile aşılansmış sütlere 26, 30 ve 37 °C'de; *Lb. bulgaricus* suşu ile aşılansmış sütlere ise 37, 42 ve 46 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. 1 saatlik süreçlerle sütlere asitlik gelişimi pH metre (WTW pH 330i) yardımı ile ölçülmüş ve elde edilen sayısal veriler kaydedilmiştir. Bu veriler yardımı ile asitlik gelişim eğrileri çizilmiş ve farklı sıcaklıkların bakteri gelişimi ve dolayısı ile asitlik gelişimi üzerine etkisi gözlemlenmiştir.

3.2.7.2. Donmaya karşı direnç testi

Stoktan alınan bakteriler MRS ya da M17 sıvı besiyerleri aşılansmış ve 16 saat gelişmesi sağlanmıştır. Bu süre sonunda sıvı besiyerinden 0,1 ml alınıp MRS ya da M17 agara (Merck) ekim yapılmıştır. Aynı sıvı besiyerinin üzerine %20-25 arasında gliserol (kriyoskopik madde) ilave edilmiş ve vorteks yardımı ile yeterli süre karıştırıldıktan sonra bu karışım daha önce 121 °C'de 15 dakika süre ile steril edilmiş endoporfllara doldurularak -60 °C'lik dondurucuya kaldırılmıştır.



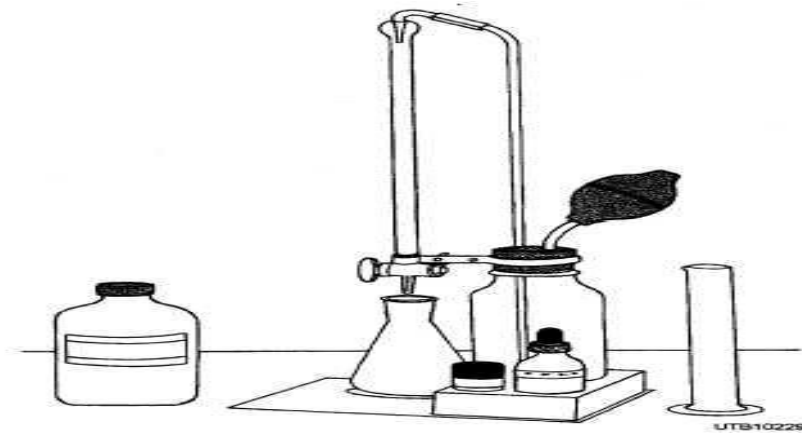
Şekil 3.4 Eppendorflardan stok bakteri aktarımı

Dondurma işleminin ardından bir gün, bir hafta ve dört hafta sonra dondurucudan çıkarılan eppendorflar termal şoklardan sakınılması sebebi ile oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiş ve yeterli erimenin sağlanmasının ardından dilüe edilerek yayma plak yöntemi ile ilgili katı besiyerlerine ekimleri gerçekleştirilmiştir. M17 agar için 48 saat ve MRS agar için 72 saatlik inkübasyonun ardından canlı hücre sayıları koloni oluşturma birimi (kob/ml) cinsinden tespit edilmiştir. Donma öncesi ve sonrası canlı hücre sayıları karşılaştırılarak dondurma işleminin bakteri canlılığı üzerine etkisi tespit edilmiştir.

3.2.7.3. Tuz konsantrasyonuna direnç testi

Her iki bakterinin aktivitesi gelişme ortamında farklı sodyum klorid oranları kullanılarak belirlenmiştir. Aktivitenin izlenmesi için Horral-Elliker testi uygulanmıştır. Yağsız süttozu yardımı ile hazırlanmış %10 KM'li süt 100 ml'lik numune kutularına aktarılmış ve 110 °C'de 20 dakika sterilizasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sıcaklığına soğutulmuş steril sütlere % 0-7 aralığındaki konsantrasyonlarda sodyum klorid ilave edilmiştir. Son olarak 16 saat inkübasyona bırakılan bakterilerin bulunduğu M17 ve MRS sıvı besiyerinden % 3 oranında inokülasyon yapılmış ve inkübasyona bırakılmıştır. 3,5 saat inkübasyonun ardından farklı konsantrasyonlarda sodyum klorid içeren sütlere 10 ml örnek alınmış ve bu

örneklerin üzerine birkaç damla fenol fitaleyn indikatörü ilave edilmiş ve ardından 0,1 N NaOH ile titrasyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5). Sarfedilen NaOH miktarına bağlı olarak % laktik asit miktarları hesaplanmıştır. Hiç sodyum klorid ilavesi yapılmamış örneğin asitlik yüzdesi baz alınarak gitgide artan tuz konsantrasyonunun bakteri gelişimine olan etkisi tespit edilmiştir.



Şekil 3.5 Titrasyon düzeneği

3.2.7.4. Farklı pH değerlerine karşı direnç testi

MRS ve M17 sıvı besiyerleri kullanım talimatına uygun olarak hazırlanmış, 10 ml'lik deney tüplerine aktarılmış ve 121 °C'de 15 dakika sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Steril sıvı besiyerlerinin pH'ları 5 M NaOH ve 0.01 M fosforik asit yardımı ile pH 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0'e ayarlanmıştır. 16-18 saat kendilerine özgü sıvı besiyerlerinde (M17 ve MRS) geliştirilmiş olan suşlar inokülant olarak kullanılmıştır. Bu inokülantlardan pH'ı ayarlanmış sıvı besiyerlerine % 1 oranında inokülasyon yapılmış ve 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda 600 nm dalga boyunda Spektrofotometre (HITACHI/ U1800) ile okuma yapılmış, hiç bakteri inoküle edilmemiş MRS ve M17 sıvı besiyerleri negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Elde edilen verilere göre absorbans eğrileri çizilmiş ve farklı pH değerlerinin bakteri gelişimine olan etkisi tespit edilmiştir.



Şekil 3.6 Denemelerde kullanılan spektrofotometre

Yukarıda belirtilen yöntem ek olarak görsel açıdan farklı pH'larda asitlik gelişimini izleyebilmek için MRS ve M17 sıvı besiyerleri hazırlanmış, 10 ml'lik deney tüplerine aktarılmış ve 121 °C'de 15 dakika sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Steril sıvı besiyerlerinin pH'larının 5 M NaOH ve 0.01 M fosforik asit yardımı ile pH 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0'e ayarlanmasının ardından her besiyerine pH indikatörü olarak birkaç damla bromocresol purple ilave edilmiş ve 48 saat sonunda renk değişimleri izlenmiştir. Rengin mordan sarıya dönüşmesi pH'ın düştüğünü ifade etmekte dolayısı ile asitlik ve hücre gelişimindeki artışa işaret etmektedir. İnkübasyon öncesi ve inkübasyon sonrası gözlemlenen renkler kaydedilerek renkteki değişim tespit edilmiştir.

3.2.8 İstatistik değerlendirme

Çalışma kapsamında yapılan denemeler sonucu elde edilen veriler; COSTAT istatistik değerlendirme programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Bu çalışmada doğal ortamdan izole edilmiş ve identifikasyonu gerçekleştirilmiş laktik asit bakterilerinden X kodlu (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) ve Y kodlu (*Lactococcus lactis subsp. lactis*) bakterileri; pH, sıcaklık, osmotik stres gibi bazı stres faktörlere maruz bırakılmıştır. Söz konusu bakterilerin stres sebebi faktörlere karşı gösterdiği tepkiler çeşitli analiz yöntemleri ile tespit edilmiş ve elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

4.1. *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* Suşunun Çeşitli Stres Faktörlerine Karşı Gösterdiği Tepki

4.1.1. Sıcaklık stresi

Lb. bulgaricus suşu 37, 42, 46 °C olmak üzere 3 farklı sıcaklık derecesinde inkübasyona bırakılmış ve gelişiminin asitliğe olan etkisi her saat pH ölçümü yapılarak tespit edilmiştir. Çizelge 4.1 üzerinde çalışılan *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* suşunun farklı uygulama sıcaklıklarına olan tepkisini göstermektedir.

Çizelge 4.1’de görüldüğü üzere 0. saatte uygulanan tüm sıcaklıklara karşılık elde edilen pH değeri 6,40’tır. 37 °C’de 5. saatte bu değer 4, 49’a düşüş gösterirken, 42 °C’de 4,31; 46 °C’de ise 4,19 değerleri elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara istatistiki kontroller için varyans analizi uygulanmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre 0. saat ile 4. saat aralığında farklı sıcaklıklara bağlı olarak elde edilen pH değerleri arasında istatistiki olarak fark bulunamamıştır. Ancak inkübasyonun 4. ve 5. saatlerinde elde edilen pH değerleri arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Varyans analizinde istatistiki olarak önemli bulunan sonuçlara Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Buna ait sonuçlar Çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus yoğurt starter kültür bakterilerinden biridir. Yoğurt üretiminde inkübasyon süresi önemli bir kavramdır. Endüstriyel yoğurt

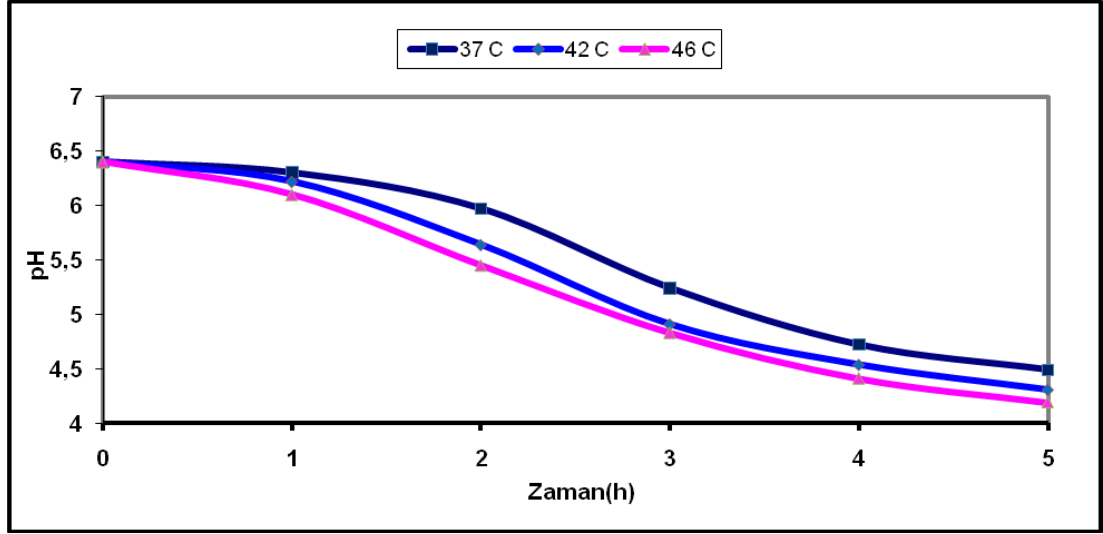
üretimi için optimum olan inkübasyon süre aralığı 4-5 saattir. Dolayısı ile bu analizde 4 ve 5. saatlerdeki pH değerleri ticari üretim açısından önem arz etmektedir.

Çizelge 4.1 Farklı sıcaklık uygulamalarının *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* suşunun asitlik geliştirme yeteneğine etkisi

SICAKLIK °C	ZAMAN (Saat)					
	0.s	1.s	2.s	3.s	4.s *	5.s *
37	6.40	6.30	5.97	5.24	4.72 a	4.49 a
42	6.40	6.22	5.64	4.91	4.54 ab	4.31 ab
46	6.40	6.10	5.45	5.26	4.41 b	4.19 b

*p<0.05 düzeyinde önemli

Şekil 4.1'deki asitlik gelişim eğrisinde de daha iyi gözlemleneceği üzere 46 °C diğer sıcaklıklarla karşılaştırıldığında inkübasyon sonunda maksimum asitlik gelişimi sağlamıştır. *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* termofilik bir bakteri olması sebebi ile yüksek sıcaklıklarda iyi gelişim gösterebilmektedir. Bu nedenle 37 °C inkübasyon sıcaklığı sözkonusu bakteri üzerinde stres yaratmış ve gelişimini engellemiş olabilir. 46 °C sıcaklık değeri inkübasyonun 4. ve 5. saatlerinde 37 °C' ye göre istatistiki olarak fark yaratmıştır. 42 °C ile 46 °C arasında rakamsal olarak farklılık gözlemlenebilmektedir ancak bu farklılık istatistiksel olarak önemli değildir. Farklı inkübasyon sıcaklıklarının asitlik geliştirme yeteneğine olan olumlu ve olumsuz etkisi Şekil 4.1'de görülmektedir.



Şekil 4.1 *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* suşunun farklı sıcaklık uygulamalarına bağlı pH değişim grafiği

Masud ve ark. (1991) *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* 'un doğal suşlarının optimum gelişme koşulları hakkında bir çalışma gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada *Lb. bulgaricus* 'un gelişimi için 3 farklı sıcaklık (37, 40, 45 °C) denenmiştir. 15 farklı *Lb. bulgaricus* suşu üzerinde yapılan çalışmalarda 45 °C'nin diğer sıcaklıklarda karşılaştırıldığında maksimum gelişme sağladığı tespit edilmiştir. Breed ve ark. (1957) *Lb. bulgaricus* için optimum gelişme sıcaklığının 45-50 °C aralığında değiştiğini ifade etmişlerdir. Randke-Mitchell ve Sandine'in (1986) 10 *Lb. bulgaricus* suşu ile yaptığı çalışmalarda ise optimum gelişme sıcaklığının 43-46 °C gibi dar bir sıcaklık aralığında gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Yu ve ark. (1983) ise *Lb. bulgaricus*'un 43 °C'de optimum asitlik ve gelişme süresi gösterdiğini rapor etmişlerdir. Benzer yönde sonuçlar Breed ve ark. (1957); Martly (1983) tarafından da alınmıştır.

Sonuç olarak inkübasyon sıcaklığı ile yapılan çalışmalardan elde edilen bulguların ilgili çalışmalar sonucu elde edilen bulguları destekler nitelikte olduğu görülmüştür.

4.1.2. Soğuk stres

Lb. bulgaricus suşunun farklı depolama sürelerindeki canlılık değerleri Çizelge 4.2’de sunulmuştur. *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* suşunun dondurma işleminden önceki canlı hücre sayısı 10.51 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Dondurma işleminin akabinde bu değer 10.47 log kob/g’a gerilemiştir. Dondurma işleminden 1 hafta sonra canlı hücre sayısı 10.46 log kob/g ölçülürken 2. ve 4. haftalarda bu değer 10.45 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Belirlenen sonuçlara istatistiki kontroller için varyans analizi uygulanmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre soğuk depolama süresine bağlı canlı hücre sayısındaki farklılıklar istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur.

Soğuk depolama süreleri sonundaki canlı hücre sayıları ile dondurma öncesi canlı hücre sayısı karşılaştırıldığında (% Canlılık) elde edilen değerler arasında kayda değer farklılıklar gözlemlenmiştir. Donma öncesi canlılık oranı %100 iken donmanın ardından bu değer 91,55’e düşüş göstermiştir. 1. hafta sonunda canlılık biraz daha azalarak 89,95’e gerilemiştir. 2. hafta ve 4. hafta sonundaki canlılık yüzdeleri ise sırası ile 88,10 ve 86,09 olarak tespit edilmiştir. 1 aylık soğuk depolama sürecinde ~ % 14 canlılık kaybı gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlara istatistiki kontroller için varyans analizi uygulanmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre soğuk depolama süresine bağlı canlılık yüzdeleri arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). Varyans analizinde istatistiki olarak önemli bulunan sonuçlara Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Buna ait sonuçlar Çizelge 4.2’de sunulmuştur.

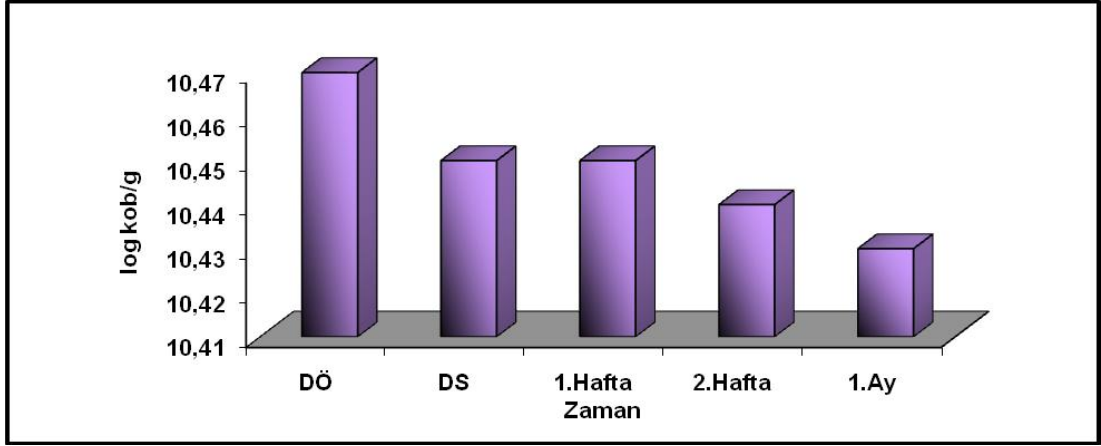
Çizelge 4.2 Soğuk depolama sürelerinin *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* suşunun canlılık değerleri üzerine etkisi

Zaman	Log kob/g	Canlılık(%) **
D.Ö	10.51	100 a
D.S	10.47	91.55 b
1.Hafta	10.46	89.85 bc
2.Hafta	10.45	88.10 cd
1.Ay	10.45	86.09 d

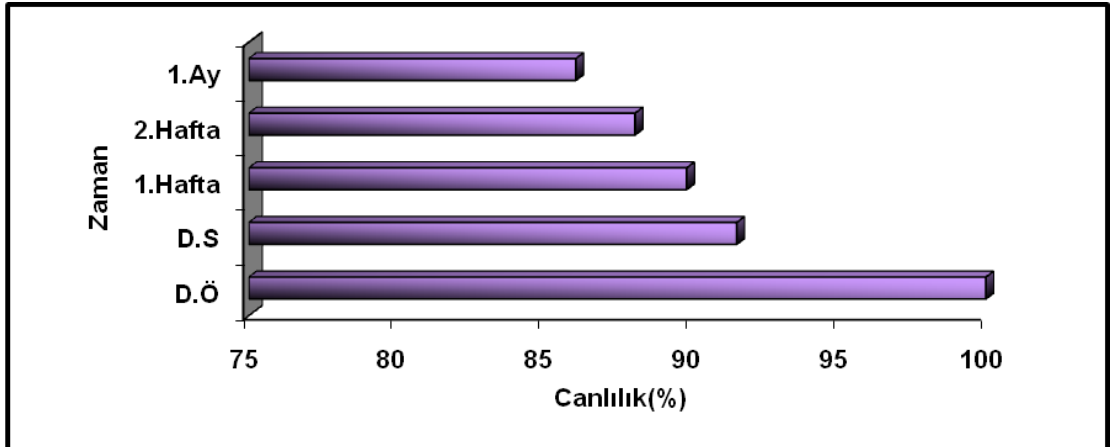
** p<0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 4,2’de görüleceği üzere soğuk depolama süresi arttıkça canlılıktaki kayıpta artmaktadır. Fonseca ve ark. (1999) 4 termofilik suşun donmaya direnci hususunda yaptıkları çalışmada; çalışılan suşlar arasında en düşük direnci *Lb. bulgaricus*’un gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu sonuç daha önce Tsvetkov ve Shishkova (1982) ve Bozoğlu ve ark. (1987) tarafından da bulunmuştur. Beal ve Corrieu’da (1994) *S. thermophilus*’la karşılaştırıldığında *Lb. bulgaricus* ‘un donmaya ve dondurarak kurutmaya direncinin daha az olduğunu savunmaktadırlar. Tüm bu bulgular çalışmada kullanılan *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* suşunun morfolojik olarak çubuk şeklinde bir bakteri olduğu için donma sırasında kok şekilli bakterilere oranla çok daha fazla zarar görebileceğini açıklar niteliktedir.

Canlı hücre sayısında meydana gelen kayıplar Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te sunulmuştur.



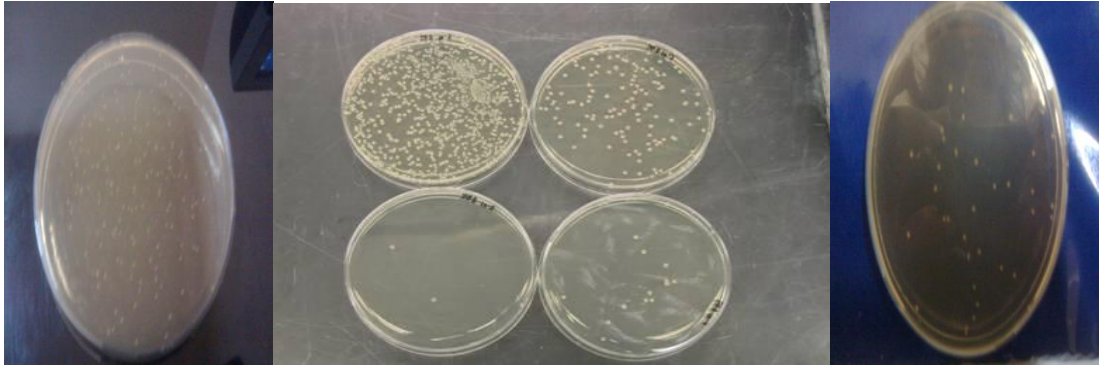
Şekil 4.2 *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* suşunun soğuk depolama süresine bağlı canlılık değişim grafiği(log cfu/g)



Şekil 4.3 *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* suşunun soğuk depolama süresine bağlı canlılık değişim grafiği (% Canlılık)

Mikroorganizmalar sıcaklıkta ani düşüğe maruz kaldıklarında; membran akışkanlığında düşüş, DNA seviyelerinde değişiklik, replikasyonu düzenleyen DNA ve RNA ikincil yapılarının oluşumu gibi bazı fizyolojik rahatsızlıklar gösterirler. Bu

inhibe edici etkilerin üstesinden gelmek, düşük sıcaklıkta korunmayı sağlayacak hücresel aktiviteyi sağlamak için bakteri soğuk şokuna karşı adaptasyonu sağlayacak duyarlılıklara sahip olmak zorundadır (Graumann ve Marahiel, 1998; Thieringer ve ark., 1998). Düşük sıcaklığa adaptasyon hayati öneme sahiptir. Çünkü laktobasillerle yapılan birçok fermentasyon; donma koşullarında yüksek canlılık kapasitesine sahip dondurulmuş ya da liyofilize starterlerin ilavesi ile başlamaktadır



Şekil 4.4 Canlı hücre sayımı için yayma yöntemi ile ekimi yapılmış petri örnekleri

Laktobasiller doğal olarak sıcaklık düşüşlerine adapte olabilirler. Optimum gelişme sıcaklıklarının 20 °C altındaki sıcaklıklarda bile gelişmeye devam ederler. *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* vb. basiller optimum olarak 30 °C ya da 37 °C'de gelişirler. 15 °C'de gelişim gösterebilirler ancak 7 °C'de gelişim sonlanır. Dondurma karışık stres koşulların oluşumuna yol açar. Hücreler bu durumda bazı hasarlar alabilir; bu sadece buz kristali oluşumundan değil; yüksek konsantrasyondaki hücre içi çözeltilerden kaynaklanan yüksek osmolariteden kaynaklanabilir. Zarların birleşmesi ya da makromoleküllerin denatürasyonunun donma sonrası canlılığın tespitindeki önemli faktörler olduğu bildirilmiştir (Franks, 1995). Tür ve suş çeşitliliği, gelişme koşulları, kültürün yaşı, süspanse ortamın doğası; donma sonrası laktobasillerin canlılığını etkileyen bazı faktörlerdir (Bâati ve ark., 2000; Champagne ve ark., 1991).

Elde edilen veriler incelendiğinde donma öncesi ve donma sonrası canlılık yüzdeleri arasındaki fark ~ % 8,5 iken donma sonrasındaki haftalar arasındaki fark %

1-4 aralığındadır. Yukarıdaki çalışmalar incelendiğinde çalışmada kullanılan *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* suşunun donma anında strese girip canlılığının bir kısmını yitirdiğini; ancak donma sonrası süreçlerde soğuka karşı adaptasyon göstererek canlı hücre sayısında donma anına oranla daha az kayıplara uğradığı söylenebilir.

4.1.3. Ozmotik stres

Bu çalışmada gelişme ortamına farklı konsantrasyonlarda (%1-7) NaCl ilave edilmiş ve *Lb. bulgaricus* suşunun bu ortamdaki gelişimi takip edilmiştir. Hiç NaCl ilave edilmemiş gelişme ortamı kontrol örneği olarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* suşunun farklı konsantrasyonlardaki NaCl'ye karşı gösterdiği tepki Çizelge 4.3'te bildirilmiştir. Hiç NaCl ilave edilmemiş kontrol örneğinin pH değeri 5,20 olarak ölçülmüştür. Gelişme ortamına %1 NaCl ilave edildiğinde bu değer 5,18'e düşerken % 2 NaCl ilavesi asitlik gelişimini arttırarak pH'ı 5,16'ya düşürmüştür. % 3 NaCl ilavesi yapıldığında pH değeri tekrar yükselmiş ve 5,26 olarak ölçülmüştür. Bu değer hiç NaCl ilavesi yapılmamış ortamdaki asitlik gelişiminden daha düşüktür. %3 ve üzerindeki NaCl ilavelerinde pH gitgide artış göstererek % 7 NaCl ilavesinde 5,44 değerine ulaşmıştır. Elde edilen sonuçlara istatistiki kontroller için varyans analizi uygulanmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre farklı NaCl konsantrasyonlarına bağlı pH değerleri arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). Varyans analizinde istatistiki olarak önemli bulunan bu sonuçlara Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Buna ait sonuçlar Çizelge 4.3'de bildirilmiştir.

Farklı NaCl konsantrasyonlarının *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* suşunun asitlik geliştirme yeteneğine olan etkisini izleyebilmek için pH ölçümünün yanı sıra titrasyon asitliği ölçümleri de yapılmıştır. Hiç NaCl ilave edilmemiş gelişme ortamının titrasyon asitliği 0,510 bulunmuştur. % 1 ve % 2 NaCl ilavesi ile asitlik gelişimi artış göstermiş ve sırası ile 0,512 ve 0,520 değerleri elde edilmiştir. %3 NaCl ilavesinde ise bu değer 0,482'ye gerilemiştir. %3 ve üzerindeki NaCl konsantrasyonlarında asitlik gittikçe azalarak 0,421 değerine ulaşmıştır. Bulunan

sonuçlara istatistiki kontroller için varyans analizi uygulanmıştır. Ancak varyans analizi sonuçlarına göre farklı NaCl konsantrasyonlarına bağlı titrasyon asitliği değerleri arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Titrasyon asitliğindeki değişim varyans analizi sonuçlarına göre istatistiki olarak önemsiz bulunmuşsa da rakamsal farklılıklar önem arz etmektedir. NaCl ilavesi yapılmamış gelişme ortamının titrasyon asitliği değeri 0,510 iken % 7 NaCl ilavesi sonunda bu değer 0,421'e düşmüştür.

Çizelge 4.3 Farklı tuz konsantrasyonlarının *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* suşunun asitlik geliştirme yeteneğine etkisi

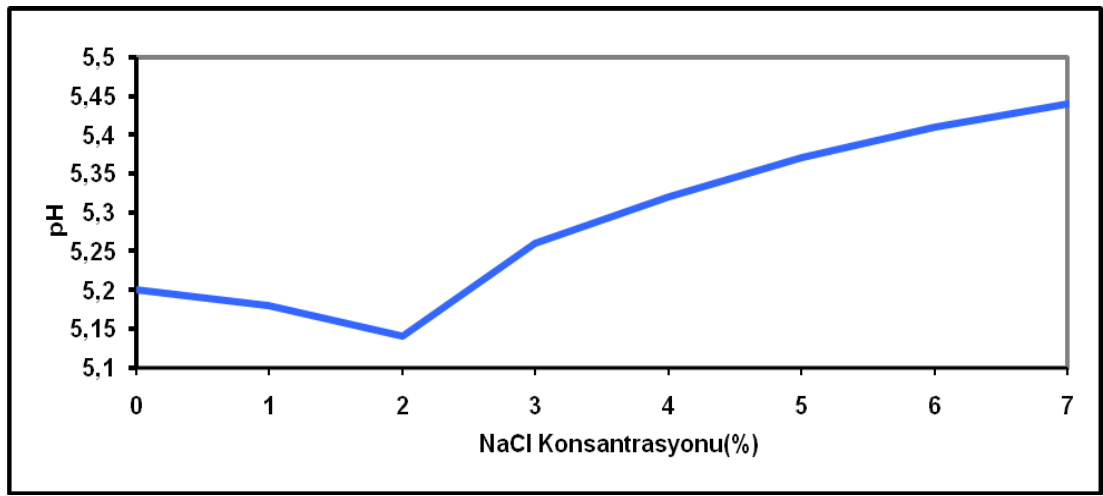
NaCl Konsantrasyonu (%)	pH **	Titrasyon Asitliği (% LA)
0	5.20 abc	0.510
1	5.18 bc	0.512
2	5.14 c	0.520
3	5.26 abc	0.482
4	5.32 abc	0.458
5	5.37 abc	0.448
6	5.41 ab	0.438
7	5.44 a	0.421

**p<0.01 düzeyinde önemli, LA : Laktik asit

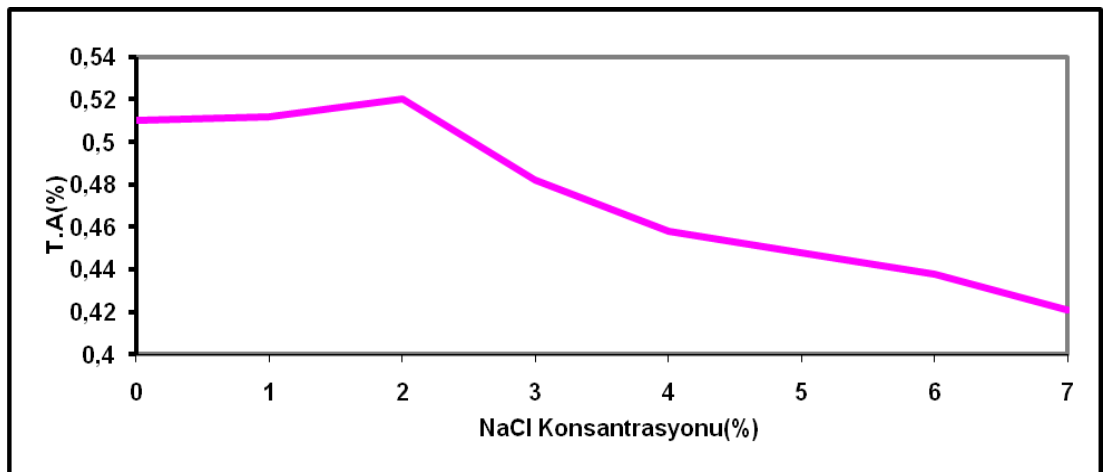
Çizelge 4.3'de görüleceği üzere % 1 ve % 2 NaCl ilave edilmiş örneklerdeki asitlik gelişimi hiç NaCl ilave edilmemiş örnekteki oranla daha yüksek değerler vermiştir. Elde edilen bu değerlerden % 1-2 NaCl ilavesinin *Lb. bulgaricus* gelişimini stimüle ettiği yargısına varılabilir. % 2 NaCl ilavesi en iyi asitlik gelişimine sebep olmuştur. Ancak % 3 ve üzerindeki konsantrasyonlar *Lb. bulgaricus* gelişiminde yavaşlamaya neden olmuştur. NaCl konsantrasyonu arttıkça

asitlik gelişimi azalmıştır. Elde edilen verilerden yola çıkılarak sözkonusu *Lb. bulgaricus* suşu üzerine % 3 ve üzeri NaCl konsantrasyonlarının osmotik strese sebep olduğu söylenebilir.

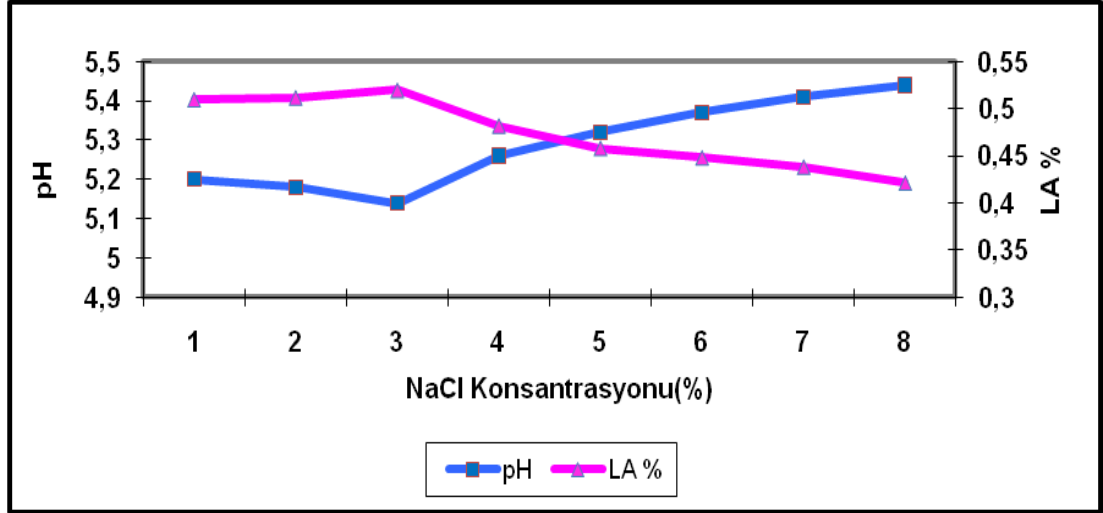
Titrasyon asitliğine bağlı verilerde istatistiki olarak fark görülmemesine karşın; her iki durumda elde edilen sonuçlar grafiğe aktarıldığında (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6) NaCl konsantrasyonundan kaynaklanan farklılıklar açıkça gözlemlenebilmektedir. Sözkonusu grafikler incelendiğinde iki grafiğin birbirine uyum gösterdiğini de söylemek mümkündür (Şekil 4.7).



Şekil 4.5 *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* suşunun farklı tuz konsantrasyonlarına bağlı pH değişim grafiği



Şekil 4.6 *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* suşunun farklı tuz konsantrasyonlarına bağlı titrasyon asitliği değişim grafiği



Şekil 4.7 *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* suşunun farklı tuz konsantrasyonlarına bağlı titrasyon asitliği ve pH değişim grafiği

Laktobasiller; sıklıkla kendi doğal habitatlarında bulunan çözelti konsantrasyonlarındaki değişikliklere maruz kalırlar. Ancak sitoplazmik çözelti konsantrasyonları sabit olmak zorundadır (Poolman ve Glaasker, 1998). Çevrelerindeki osmolaritedeki ani bir artış (hiperosmotik stres) suyun hücre dışına hareketine sebep olur. Bu da hücre turgor basıncında kayıplara yol açar ve hücre hacminde ve hücre içi çözelti konsantrasyonlarında değişiklikler meydana gelir. Hiperosmotik stresle karşılaşıldığında (% 18 NaCl-2 saat) *Lb. bulgaricus* 'un artış fazının ortalarındaki hücrelerin canlılığı % 46 kayba uğrar. Hücreleri 1 saatliğine % 2 NaCl konsantrasyonuna maruz bırakmak hücrelerin yavaş yavaş canlılıklarının artmasına ve NaCl'ye karşı adaptasyon göstermelerine sebep olacaktır. Korkeala ve ark. (1992) yaptıkları çalışmada laktik asit bakteri gelişiminin % 1-2 NaCl ilavesi yapılan ortamlarda hiç NaCl ilave edilmemiş ortamlara göre daha iyi olduğunu bulmuşlardır. % 3'ün üzerine çıkan NaCl konsantrasyonlarının laktik asit bakteri gelişimini inhibe edici etkiye sebep olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuç olarak NaCl konsantrasyonlarına bağlı asitlik gelişimi ile yapılan çalışmalardan elde edilen bulguların ilgili çalışmalar sonucu elde edilen bulguları destekler nitelikte olduğu görülmüştür.

Birçok laktik asit bakterisi suşu % 6 ve üzeri NaCl konsantrasyonlarında gelişim gösterememektedir. Araştırmada kullanılan *Lb. bulgaricus* suşu % 7 NaCl konsantrasyonunda bile az da olsa gelişim gösterebilmiştir. Bu durumun da araştırmada kullanılan bakterinin doğadan izole edilmiş, vahşi bir tür olmasından kaynaklanabileceği; dolayısı ile doğal ortamda yüksek NaCl konsantrasyonlarına adaptasyon göstermiş olabileceği düşünülmektedir.

4.1.4. Asit stres

Sıvı besiyerlerinin pH'ları farklı değerlere ayarlanmış ve bu besiyerlerinde *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* suşunun gelişimi izlenmiştir. Analiz sonucunda elde edilen absorbans değerleri Çizelge 4.4'te belirtilmiştir. Bakteri inokülasyonu gerçekleştirilmemiş sıvı besiyerinin ölçülen absorbans değeri 0,265'tir. pH'sı 4.0'a ayarlanan sıvı besiyerinin absorbans değeri de 0.265 ölçülmüştür. İki besiyeri arasında hiç bir fark oluşmamıştır. pH 4,5'a ayarlandığında absorbans değeri 1.888'e yükselmiştir. Bu artış pH 6,5'a kadar devam etmiş; pH 6,5'ta maksimum değer olan 2.786'ya ulaşmıştır. Bu maksimum değerinden sonra pH arttıkça absorbansta düşüş gözlemlenmiştir. pH 9'da besiyeri ortamının absorbansı 2.110 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen verilere istatistiksel kontroller için varyans analizi uygulanmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre farklı pH değerlerine bağlı absorbans seviyeleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). Varyans analizinde istatistiksel olarak önemli bulunan bu sonuçlara Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'de sunulmuştur.

Çizelge 4.4 Farklı pH değerlerinin *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* suşunun gelişimine etkisi

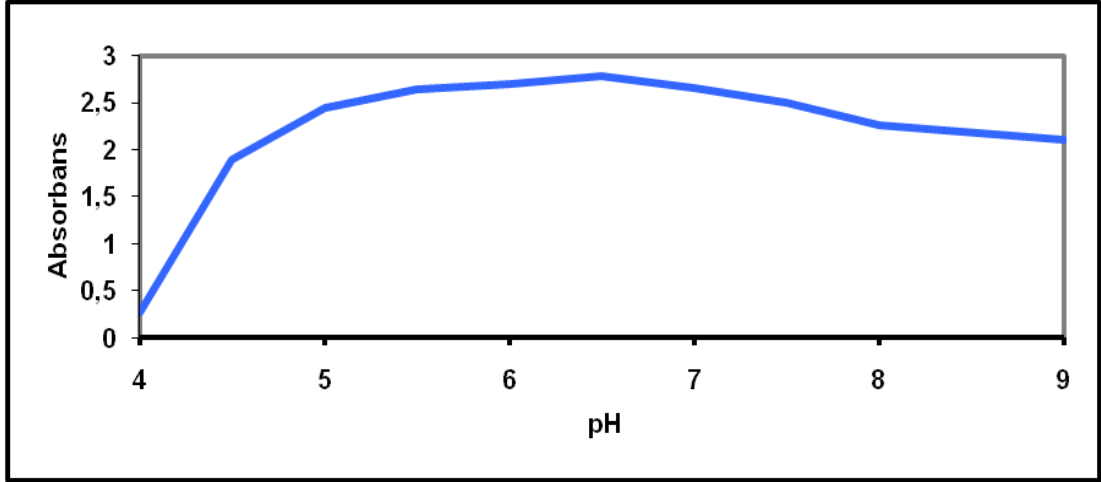
pH	Absorbans **
4,0	0.265 e
4,5	1.888 d
5,0	2.447 abc
5,5	2.641 ab
6,0	2.705 ab
6,5	2.786 a
7,0	2.657 ab
7,5	2.506 abc
8,0	2.261 bcd
9,0	2.110 cd

**p<0.01 düzeyinde önemli

Bakteri inokülasyonu yapılmamış sıvı besiyeri absorbans değeri 0.265'tir.

Çizelge 4.4'de görüldüğü üzere farklı pH'larda elde edilen absorbans değerleri arasında kayda değer farklılıklar gözlemlenmiştir. Hiç bakteri inokülasyonu yapılmamış sıvı besiyerinin absorbans değeri 0.265'tir. Dolayısıyla ile pH'ı 4'e ayarlanmış besiyerinde herhangi bir bakteri gelişiminin olmadığı söylenebilir. Yüksek asit oranları *Lb. bulgaricus* için bir stres faktörüdür. pH 4,5 itibari ile *Lb. bulgaricus* gelişim göstermeye başlamıştır. Çizelgeden de görüleceği üzere pH 6,5'teki absorbans değeri en yüksektir. Bu da en yoğun bakteri gelişiminin bu pH'ta gerçekleştiğinin bir göstergesidir. pH 6,5'tan sonra gelişim tekrar azalmaya

başlamıştır (Şekil 4.8). Buradan belli bir değerin üzerindeki bazik ortamların *Lb. bulgaricus* suşu üzerinde stres yarattığı söylenebilir.

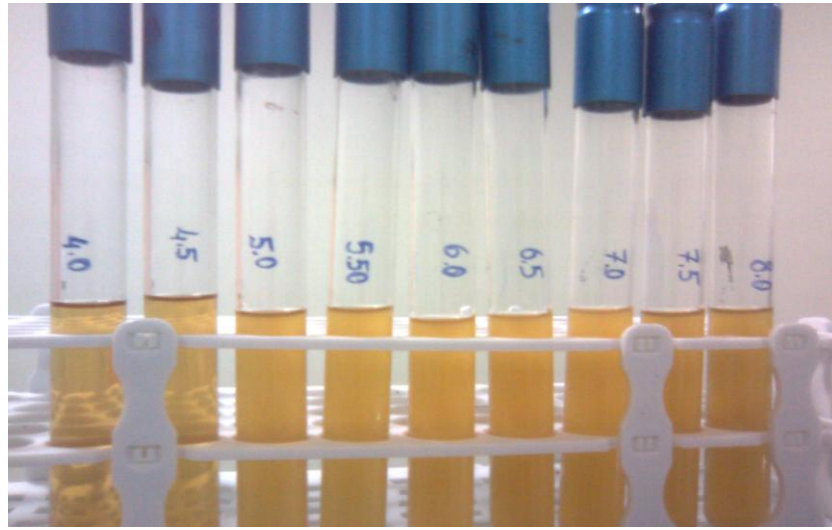


Şekil 4.8 *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* suşunun farklı pH değerlerine bağlı absorbans değişim grafiği

Görsel açıdan farklı pH'larda gelişimi izleyebilmek için sıvı besiyerlerinin pH'larının ayarlanmasının ardından her besiyerine pH indikatörü olarak bromocresol purple ilave edilmiş ve 48 saat sonunda renk değişimleri izlenmiştir. Rengin mordan sarıya dönüşümü pH'ın düştüğünü ifade etmekte dolayısı ile asitlik gelişimini ve hücre gelişimini ifade etmektedir. Şekil 4.9 da inkübasyon öncesi, Şekil 4.10 da ise 48 saatlik inkübasyon sonundaki besiyeri görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.9 İnkübasyon öncesi farklı pH değerlerine ayarlanmış MRS besiyerlerinin görünümü



Şekil 4.10 İnkübasyon sonrası MRS besiyerlerinin görünümü

Şekil 4.10 incelendiğinde pH 5'ten itibaren tüm besiyerlerinde gelişimin gerçekleştiği, rengin mordan sarıya döndüğü; pH 4,5'a ayarlanmış besiyerinin az bulanık olduğu ancak pH 4'e ayarlanmış besiyerinin berrak olduğu dolayısı ile hiçbir gelişimin olmadığı gözlemlenmiştir.

4.2. *Lactococcus lactis subsp. lactis* Suşunun Çeşitli Stres Faktörlerine Karşı Gösterdiği Tepki

4.2.1. Sıcaklık stresi

L. lactis subsp. lactis suşu 26, 32, 37 °C olmak üzere 3 farklı sıcaklık derecesinde inkübasyona bırakılmış ve gelişimin asitliğe olan etkisi her saat pH ölçümü yapılarak tespit edilmiştir. Çizelge 4.5 üzerinde çalışılan *L. lactis subsp. lactis* suşunun farklı uygulama sıcaklıklarına olan tepkisini göstermektedir.

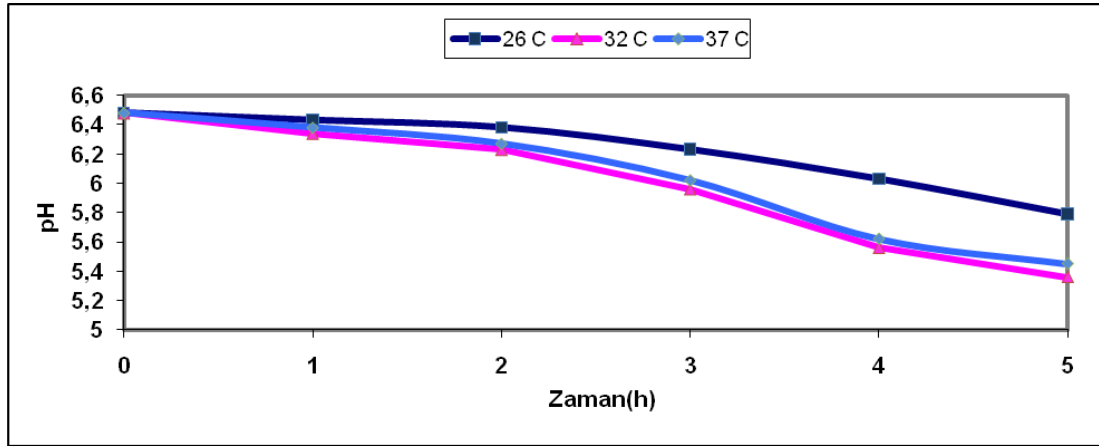
Çizelge 4.5’de görüldüğü üzere 0. saatte uygulanan tüm sıcaklıklara karşılık elde edilen pH değeri 6,48’dir. 26 °C’de 5. saatte bu değer 5,79’a düşüş gösterirken, 32 °C’de 5,36; 37 °C’de ise 5,45 değerleri elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara istatistiki kontroller için varyans analizi uygulanmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre 0. saat ile 5. saat aralığında farklı sıcaklıklara bağlı olarak elde edilen pH değerleri arasında istatistiki olarak fark bulunamamıştır. Ancak inkübasyonun 5. saatinde elde edilen pH değerleri arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Varyans analizinde istatistiki olarak önemli bulunan sonuçlara Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Buna ait sonuçlar Çizelge 4.5’de sunulmuştur.

Çizelge 4.5 Farklı sıcaklık uygulamalarının *Lactococcus lactis subsp. lactis* suşunun asitlik geliştirme yeteneğine etkisi

SICAKLIK °C	ZAMAN (Saat)					
	0.s	1.s	2.s	3.s	4.s	5.s *
26	6.48	6.43	6.38	6.23	6.03	5.79 a
32	6.48	6.34	6.23	5.96	5.56	5.36 b
37	6.48	6.38	6.27	6.02	5.62	5.45 b

* $p<0.05$ düzeyinde önemli

Çizelge 4.5 incelendiğinde *L. lactis subsp. lactis* suşunun 32-37 °C aralığındaki inkübasyon sıcaklıklarında en iyi gelişim gösterdiği görülmüştür. İnkübasyonun ilk saatlerinde sıcaklıklar arasında istatistiki açıdan fark oluşmamıştır. Ancak 5. saatte; 26 °C de elde edilen pH değeri ile 32 ve 37 °C’de elde edilen pH değerleri arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($p < 0.05$). 26 °C’de 5 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen pH değeri diğer sıcaklıklarda gelişim sonucu elde edilen değerlerden oldukça yüksektir. Buradan 26 °C gelişme sıcaklığının *Lc. lactis subsp. lactis* suşu üzerinde stres yaratmış olabileceği düşünülebilir. 32 ve 37 °C’de elde edilen asitlik değerleri arasındaki fark ise istatistiki olarak önem arzemesede rakamsal olarak en iyi asitlik gelişiminin 32 °C’de elde edildiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.11 *Lactococcus lactis subsp. lactis* suşunun farklı sıcaklık uygulamalarına bağlı pH değişim grafiği

L. lactis subsp. lactis ile yapılan bir çalışmada 5-20 ° C aralığındaki sıcaklıklarda inkübasyonun inaktivasyona sebep olduğu görülmüştür. Sıcaklık 25 ° C’ye doğru yükseltildiğinde hücre gelişimin başladığı ve 31-33 ° C aralığında maksimum gelişmeye ulaşıldığı bildirilmiştir. 40 ° C ve üzeri sıcaklıklarda ise hücresel gelişim sonlanmıştır (Şimşek ve ark., 2009). İnkübasyon sıcaklığı ile yapılan çalışmalardan elde edilen bulguların ilgili çalışmalar sonucu elde edilen verileri destekler nitelikte olduğu görülmüştür. Söz konusu çalışmada en iyi asitlik gelişiminin 32-37 ° C sıcaklık aralıklarında gerçekleştiği görülmektedir. Bu sıcaklık

değerlerinin altındaki ve üstündeki sıcaklık değerlerinin inaktivasyona sebep olarak asitlik gelişimini yavaşlatmış olabileceği düşünülmektedir. İstatistiki olarak sıcaklıklar arasında çok fazla fark görülmemesine rağmen; Şekil 4.11 deki asitlik geliştirme eğrilerinde fark açıkça görülmektedir. *Lc. lactis* mezofilik karakterde bir bakteridir. Dolayısı ile birçok akademik çalışmada 30-32 °C aralığı optimum gelişme sıcaklığı olarak verilmiştir. Yapılan denemelerde 37 °C'deki gelişim değerlerinin 32 °C'dekine yakın olmasının çalışmalarda kullanılan suşun doğadan izole edilmiş vahşi bir tür olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4.2.2. Soğuk stres

Lc. lactis subsp. lactis suşunun farklı depolama sürelerindeki canlılık değerleri Çizelge 4.6'da sunulmuştur. *Lc. lactis subsp. lactis* suşunun dondurma işleminden önceki canlı hücre sayısı 10.47 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Dondurma işleminin akabinde bu değer 10.45 log kob/g'a gerilemiştir. Dondurma işleminden 1 hafta sonra canlı hücre sayısı 10.45 log kob/g ölçülürken 2. ve 4. haftalarda bu değerler sırası ile 10.44 ve 10.43 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Belirlenen sonuçlara istatistiki kontroller için varyans analizi uygulanmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre soğuk depolama süresine bağlı canlı hücre sayısındaki farklılıklar istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur.

Soğuk depolama süreleri sonundaki canlı hücre sayıları ile dondurma öncesi canlı hücre sayısı karşılaştırıldığında (% Canlılık) elde edilen değerler arasında kayda değer farklılıklar gözlemlenmiştir. Donma öncesi canlılık oranı %100 iken donmanın ardından bu değer 95.7'e düşüş göstermiştir. 1. hafta sonunda canlılık biraz daha azalarak 84.7'e gerilemiştir. 2. hafta ve 4. hafta sonundaki canlılık yüzdeleri ise sırası ile 93.3 ve 92.0 olarak tespit edilmiştir. 1 aylık soğuk depolama sürecinde % 8 canlılık kaybı gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlara istatistiki kontroller için varyans analizi uygulanmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre soğuk depolama süresine bağlı canlılık yüzdeleri arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). Varyans analizinde istatistiki olarak önemli bulunan

sonuçlara Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Buna ait sonuçlar Çizelge 4.6'da sunulmuştur.

Çizelge 4.6 Soğuk depolama sürelerinin *Lactococcus lactis subsp.lactis* suşunun canlılık değerleri üzerine etkisi

Zaman	Log kob/g	Canlılık(%) **
D.Ö	10.47	100 a
D.S	10.45	95.7 ab
1.Hafta	10.45	94.7 b
2.Hafta	10.44	93.3 b
1.Ay	10.43	92.0 b

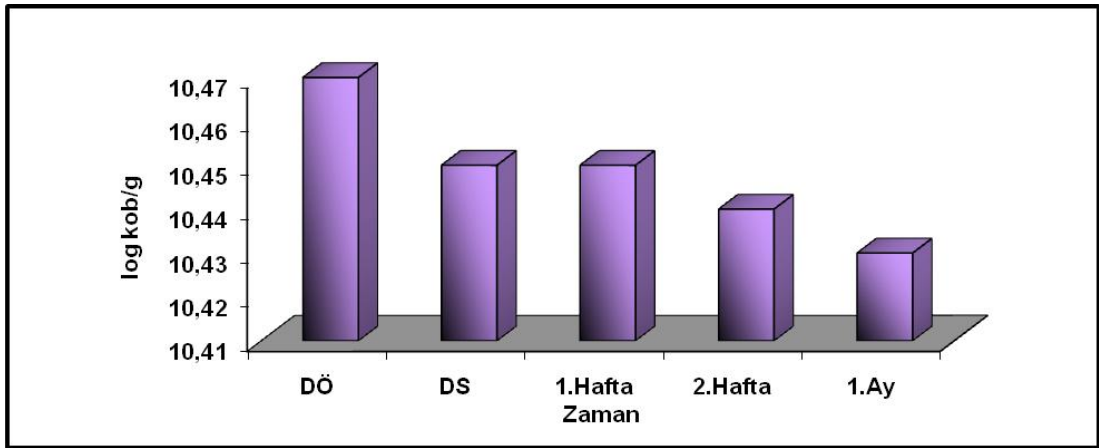
**p<0.01 düzeyinde önemli

Soğuk depolama sürelerinin canlı hücre sayısına etkisi birbirleri arasında istatistiki olarak farklı değildir. Ancak depolama süreleri sonundaki canlı hücre sayısı ile dondurma öncesi canlı hücre sayısı arasında kayda değer farklılıklar gözlemlenmiştir. Donma öncesi canlılık oranı % 100 iken 1 ay soğuk depolama sonucunda bu oran % 92'ye düşmüştür. Çizelge 4.6'da görüleceği üzere soğuk depolama süresi arttıkça canlılıktaki kayıpta artmaktadır. *Lc. lactis subsp. lactis* suşu morfolojik olarak kok şeklinde bir bakteri olduğu için donma sırasında çubuk şekilli bakterilere oranla daha az zarar görmektedir. 1 aylık soğuk depolama sonuçları incelendiğinde *Lb. bulgaricus* suşunda canlılık % 86'lara düşerken (Çizelge 4.2) *Lc. lactis* suşunda bu değer % 92'lerde kalmıştır (Çizelge 4.6). Bu da kok şeklindeki bakterilerin çubuklara oranla soğuka karşı daha az strese girdiğinin bir göstergesi olabilir.

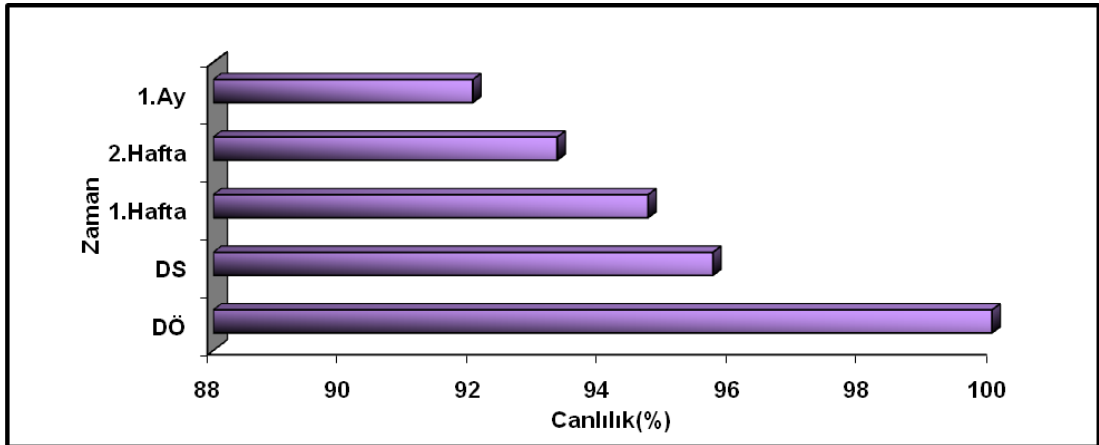
Elde edilen veriler incelendiğinde donma öncesi ve donma sonrası canlı hücre sayıları arasındaki fark % 5 civarlarında iken ilerleyen haftalarda bu fark % 1'e

düşmüştür. Buradan söz konusu suşun donma anında strese girip canlılığının bir kısmını yitirdiği; ancak donma sonrası süreçlerde soğuka karşı adaptasyon göstererek canlı hücre sayısında donma anına oranla daha az kayıplara uğradığı söylenebilir.

Canlı hücre sayısında meydana gelen kayıplar Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te açıkça görülmektedir.



Şekil 4.12 *Lactococcus lactis subsp. lactis* suşunun soğuk depolama süresine bağlı canlılık değişim grafiği(log cfu/g)



Şekil 4.13 *Lactococcus lactis subsp. lactis* suşunun soğuk depolama süresine bağlı canlılık değişim grafiği (% Canlılık)

Kriyoprotektif ajanlar olmaksızın starter kültürlerin depolanmasına yönelik çalışmalar -40°C ve altındaki sıcaklıkların optimum olduğunu göstermiştir. Bunun yanı sıra sıvı nitrojende depolama ya da dondurma (-110°C - -196°C) en yüksek hücre canlılığını sağlamaktadır (Bauman ve Reinbold, 1966; Daily ve Higgens, 1973; Cowmann ve Speck, 1963; Gibson ve ark., 1966; Lloyd, 1975; Stadhouders ve ark., 1971). Genellikle peynir fabrikalarında yaygın olarak -20 ve -40°C depolama sıcaklıkları ile karşılaşmaktadır. -20 ve üstündeki sıcaklıklarda kültür depolama hücre canlılığı ve aktivitesinde belirgin düşüşlerle sonuçlanmaktadır ve sıklıkla kriyoprotektif ajan kullanımı gerektirmektedir. Ayrıca bazı ajanlar eşliğinde bile -40°C üzerindeki sıcaklıklarda depolanan kültürler suş bazında yaşamsal farklılıklar gösterebilmektedir (Gibson ve ark., 1965). Yüksek sıcaklıklarda geliştirme hücre için inhibe edici etki yaratırken; düşük sıcaklıklarda geliştirme sadece biyolojik proseslerin yavaşlamasına sebep olmaktadır. Laktokokal kültürlerin çiftleşme süresi 30°C 'de 48 dakika iken 16°C 'de 3,5 saat, 8°C 57 saat, 4°C 'de ise 7 güne kadar uzamaktadır (Panoff ve ark., 1994). Log fazdaki hücreler durgun fazdaki hücrelere göre dondurmaya karşı daha fazla direnç göstermektedir (Kim ve Dunn, 1997). Tüm bu çalışmalar *Lc. lactis* suşlarının soğuk depolama karşısında canlılık kaybı gösterdiğini belirtmektedir. Yapılan çalışmada da bu çalışmalarını destekler nitelikte bulgular elde edilmiştir. Soğuk depolama süresi arttıkça canlılık oranı düşmüştür. Buradan donma ve soğuk depolama süresinin *Lc. lactis subsp. lactis* suşu üzerinde bir stres etkeni olabileceği söylenebilir.

4.2.3. Ozmotik stres

Bu çalışmada gelişme ortamına farklı konsantrasyonlarda NaCl ilave edilmiş ve *Lc. lactis subsp. lactis* suşunun bu ortamdaki gelişimi takip edilmiştir. Hiç NaCl ilave edilmemiş gelişme ortamı kontrol örneği olarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan *Lc. lactis subsp. lactis* suşunun farklı konsantrasyonlardaki NaCl'ye karşı gösterdiği tepki Çizelge 4.7'de bildirilmiştir. Hiç NaCl ilave edilmemiş kontrol örneğinin pH değeri 6,05 olarak ölçülmüştür. Gelişme ortamına %1 NaCl ilave edildiğinde bu değer 5,99'a düşerken % 2 NaCl ilavesi asitlik gelişimini yavaşlatarak pH'ı 6,06'ya yükseltmiştir. Bu değer hiç NaCl ilavesi yapılmamış

ortamdaki asitlik gelişiminden daha düşüktür. %2 ve üzerindeki NaCl ilavelerinde pH gitgide artış göstererek % 7 NaCl ilavesinde 6,30 değerine ulaşmıştır. Elde edilen sonuçlara istatistiki kontroller için varyans analizi uygulanmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre farklı NaCl konsantrasyonlarına bağlı pH değerleri arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). Varyans analizinde istatistiki olarak önemli bulunan bu sonuçlara Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Buna ait sonuçlar Çizelge 4.7’de bildirilmiştir.

Çizelge 4.7 Farklı tuz konsantrasyonlarının *Lactococcus lactis subsp. lactis* suşunun asitlik geliştirme yeteneğine etkisi

NaCl Konsantrasyonu(%)	pH **	T.A % **
0	6.05 cd	0.321 ab
1	5.99 d	0.331 a
2	6.06 cd	0.317 abc
3	6.09 cd	0.311 abc
4	6.12 bc	0.304 bcd
5	6.17 bc	0.294 cd
6	6.23 ab	0.285 de
7	6.30 a	0.263 e

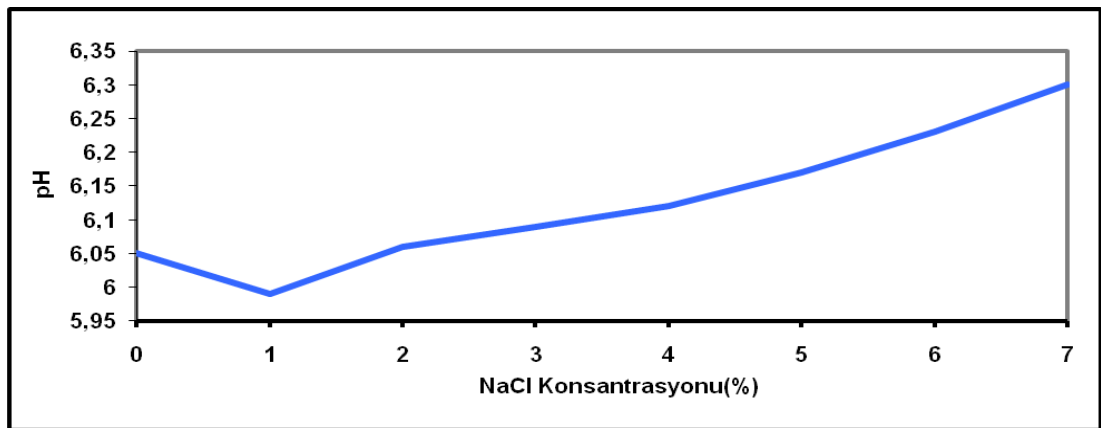
** $p < 0.01$ düzeyinde önemli

Farklı NaCl konsantrasyonlarının *Lc. lactis subsp. lactis* suşunun asitlik geliştirme yeteneğine olan etkisini izleyebilmek için pH ölçümünün yanı sıra titrasyon asitliği ölçümleri de yapılmıştır. Hiç NaCl ilave edilmemiş gelişme ortamının titrasyon asitliği 0,321 bulunmuştur. % 1 NaCl ilavesi ile asitlik gelişimi artış göstermiş ve 0,331 değeri elde edilmiştir. %2 NaCl ilavesinde ise bu değer

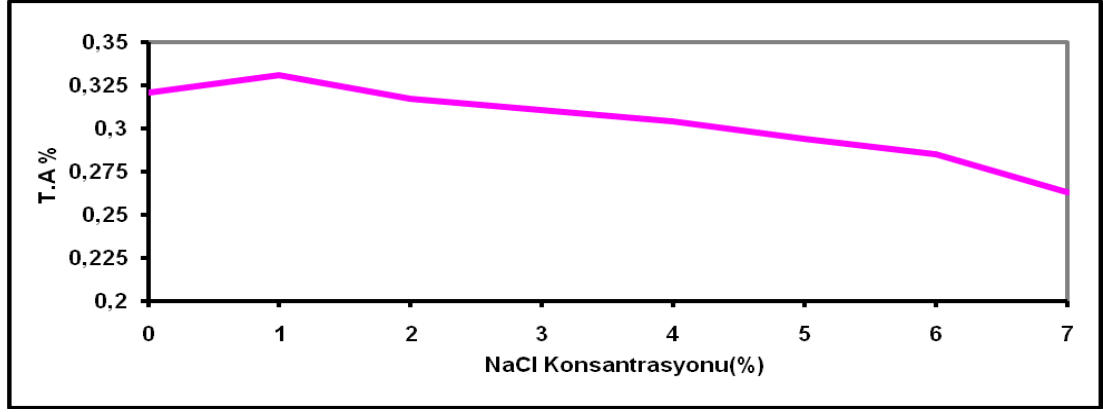
0,317'ye gerilemiştir. %2 ve üzerindeki NaCl konsantrasyonlarında asitlik gittikçe azalarak 0,263 değerine ulaşmıştır. Bulunan sonuçlara istatistiki kontroller için varyans analizi uygulanmıştır. Yapılan varyans analizi sonuçlarına göre farklı NaCl konsantrasyonlarına bağlı titrasyon asitliği değerleri arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). Varyans analizinde istatistiki olarak önemli bulunan bu sonuçlara Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Buna ait sonuçlar Çizelge 4.7'de sunulmuştur.

Çizelge 4.7'de görüldüğü üzere % 1 NaCl ilave edilmiş örneklerdeki asitlik gelişimi hiç NaCl ilave edilmemiş örnekteki oranla daha yüksek değerler vermiştir. Elde edilen bu değerlerden % 1 NaCl ilavesinin *Lc. lactis* suşunun gelişimini stimüle ettiği yargısına varılabilir. Ancak % 3 ve üzerindeki konsantrasyonlar *Lc. lactis* gelişiminde yavaşlamaya neden olmuştur. NaCl konsantrasyonu arttıkça asitlik gelişimi azalmıştır. Elde edilen verilerden yola çıkılarak sözkonusu *Lc. lactis* suşu üzerine % 2 ve üzeri NaCl konsantrasyonlarının osmotik strese sebep olabileceği söylenebilir.

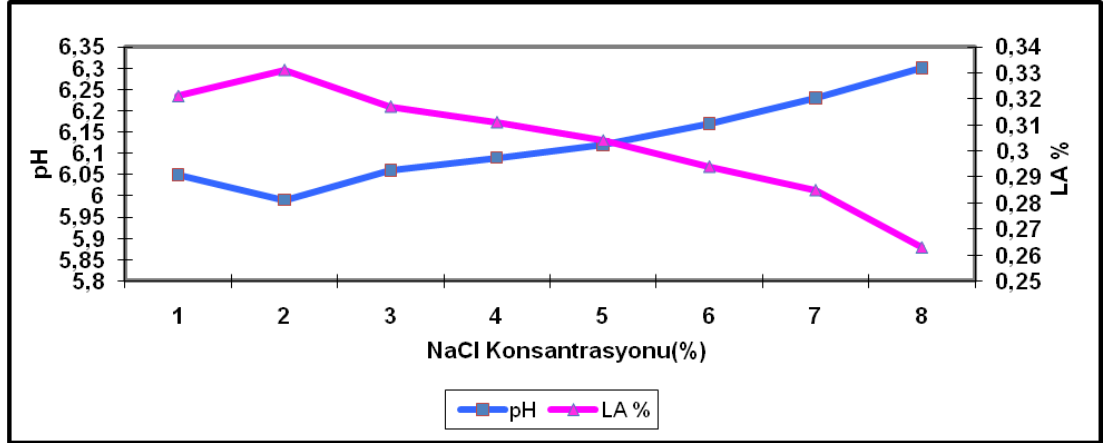
Titrasyon asitliği ve pH ölçümlerinden elde edilen sonuçlar grafiğe aktarıldığında (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15) NaCl konsantrasyonundan kaynaklanan farklılıklar açıkça gözlemlenebilmektedir. Sözkonusu grafikler incelendiğinde iki grafiğin birbirine uyum gösterdiğini de söylemek mümkündür (Şekil 4.16).



Şekil 4.14 *Lactococcus lactis subsp. lactis* suşunun farklı tuz konsantrasyonlarına bağlı pH değişim grafiği



Şekil 4.15 *Lactococcus lactis subsp. lactis* suşunun farklı tuz konsantrasyonlarına bağlı titrasyon asitliği değişim grafiği



Şekil 4.16 *Lactococcus lactis subsp. lactis* suşunun farklı tuz konsantrasyonlarına bağlı titrasyon asitliği ve pH değişim grafiği

Bakteriyel hücre zarları suyu geçirmektedir. Bu nedenle; gelişme ortamının osmolaritesindeki artış suyun hızlı bir biçimde sitoplazmadan atılması ile sonuçlanır. Hücre içinde suyun tutulması ve turgor basıncının korunması için bakteri; hücre fizyolojisini etkilemeyen özel çözeltilerin biriktirilmesini sağlayan sistemlere sahiptir. Bazı uyumlu çözeltiler ya çevreden alınır ya da sitoplazma içinde sentezlenir. *L. lactis*'in gelişimi yüksek NaCl konsantrasyonlarında inhibisyona uğramaktadır: % 2,5 NaCl, stressiz haldeki % 50'lik gelişim oranını % 25'e düşürmektedir (Kilstrup

ve ark., 1997). *L. lactis*'in hAB mutanı % 4 NaCl varlığında M17 ortamında gelişemez ve vahşi tip suşlar çok daha yüksek NaCl konsantrasyonlarında gelişim gösterirken bu mutant % 1 NaCl varlığında oldukça yavaş gelişim göstermektedir. Bu çelişkinin; türlerin membranla ilişkili proteinlerindeki farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

L. lactis subsp. lactis suşlarının yaşam oranı NaCl konsantrasyonu arttıkça düşüş göstermektedir. Birçok *L. lactis subsp. lactis* suşu %3 NaCl konsantrasyonuna kadar gelişim gösterebilmektedir ancak daha yüksek konsantrasyonlar inaktivasyona sebep olmaktadır (Şimşek ve ark., 2009). Bu denemede de %1 NaCl ilavesi *Lc. lactis* suşunun gelişimini stimüle etmiş ve dolayısı ile asitlik gelişimi artmıştır. %1-3 aralığında NaCl ilavesi hiç NaCl ilavesi yapılmamış besi ortamındaki asitlik gelişimine yakın değerler verirken %3'den yüksek NaCl konsantrasyonlarının suşun gelişimini inhibe edebileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak; NaCl konsantrasyonu ile yapılan çalışmalarda tuz konsantrasyonu arttıkça yaşam oranı düşmüş dolayısı ile asitlik gelişimi yavaşlamıştır.

4.2.4. Asit stres

Lc. lactis subsp. lactis suşu pH 4-9 aralığındaki sıvı besiyerlerine inoküle edilmiş ve 24 saatlik inkübasyonun ardından her bir pH'ın absorbans değeri tespit edilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen absorbans değerleri Çizelge 4.8'de belirtilmiştir. Bakteri inokülasyonu gerçekleştirilmemiş sıvı besiyerinin ölçülen absorbans değeri 0,314'tür. pH'sı 4,0'a ayarlanan sıvı besiyerinin absorbans değeri de 0,314 ölçülmüştür. İki besiyeri arasında hiç bir fark oluşmamıştır. pH 4,5'e ayarlandığında absorbans değeri 0,511'e yükselmiştir. Bu artış pH 7,5'e kadar devam etmiş; pH 7,5'da maksimum değer olan 2,507'ye ulaşmıştır. Bu maksimum değerinden pH arttıkça absorbansta düşüş gözlemlenmiştir. pH 9'da besiyeri ortamının absorbansı 2,148 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen verilere istatistiki kontroller için varyans analizi uygulanmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre farklı pH değerlerine bağlı absorbans seviyeleri arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmuştur($p < 0.01$). Varyans analizinde istatistiki olarak önemli bulunan bu

sonuçlara Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8’de sunulmuştur.

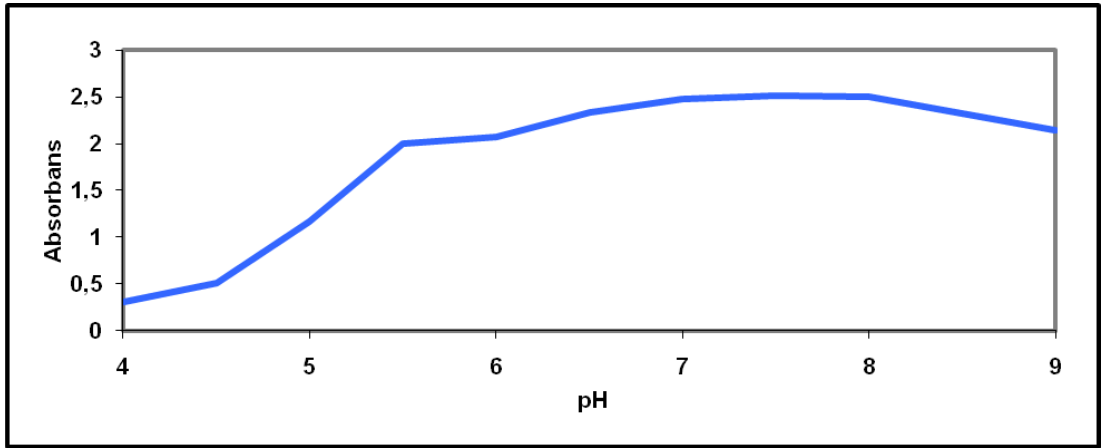
Çizelge 4.8 Farklı pH değerlerinin *Lactococcus lactis subsp. lactis* suşunun gelişimine etkisi

pH	Absorbans **
4,0	0.314 c
4,5	0.511 c
5,0	1.161 b
5,5	1.998 a
6,0	2.067 a
6,5	2.333 a
7,0	2.472 a
7,5	2.507 a
8,0	2.500 a
9,0	2.148 a

**p<0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.8’de görüldüğü üzere farklı pH’larda elde edilen absorbans değerleri arasında kayda değer farklılıklar gözlemlenmiştir. Hiç bakteri inokülasyonu yapılmamış sıvı besiyerinin absorbans değeri 0.265’tir. Dolayısıyla ile pH’ı 4’e ayarlanmış besiyerinde herhangi bir bakteri gelişiminin olmadığı söylenebilir. Yüksek asit oranları *Lc. lactis* için bir stres etkenidir. pH 4 ile 4,5’te elde edilen absorbans değerleri istatistiki olarak farklı değildir. pH 5 itibari ile *Lc. lactis* kayda değer gelişim göstermeye başlamıştır. Çizelgeden de görüleceği üzere pH 5-9

aralığında ölçülen değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsizdir. Ancak rakamsal olarak değerlendirildiğinde pH 7,5'teki absorbans değeri en yüksektir. Bu açıdan en yoğun bakteri gelişiminin bu pH'da gerçekleştiği söylenebilir. pH 7,5'ten sonra gelişim tekrar azalmaya başlamıştır. pH 9'da elde edilen absorbans değeri ile diğer değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Buradan belli bir değer üzerinde bazı ortamların yüksek asit seviyelerinde olduğu gibi *Lc. lactis subsp. lactis* suşu üzerinde stres yarattığı söylenebilir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17 *Lactococcus lactis subsp. lactis* suşunun farklı pH değerlerine bağlı absorbans değişim grafiği

Bazı veriler *L. lactis*'in asitleşmeye karşı hücresel duyarlılığının var olduğuna işaret etmekte ve bu da asit stres olarak tanımlanmaktadır. *L. lactis*; ısı şok proteinleri ve proteinazlar gibi bazı proteinlerin sentezi ile asit strese tolerans göstermektedir (Rallu ve ark., 1996; Hartke ve ark., 1996; Kim ve ark., 1999; O'Sullivan ve Condon, 1997, 1999). Bunun yanı sıra şu da bilinmelidir ki; laktik asit üretiminden kaynaklanan pH'taki düşüş gelişimin hızla inhibisyonuna ve sonunda yaklaşık pH: 4 civarlarında durmasına sebep olmaktadır. pH 4 değerinin hücre içi pH cinsinden değeri ise 5,4- 5,9 aralığıdır (Hutkins ve Nanen, 1993; O'Sullivan ve Condon, 1997; Mercade ve ark., 2000). Kim ve ark. (1999), *Lc. lactis subsp. lactis* suşlarını pH 1,5-7 aralığında geliştirmişler ve her pH'taki canlı hücre sayısını tespit etmişlerdir. Çalışma sonunda sözkonusu suşların canlı hücre sayılarında pH 4-7 aralığında artışın

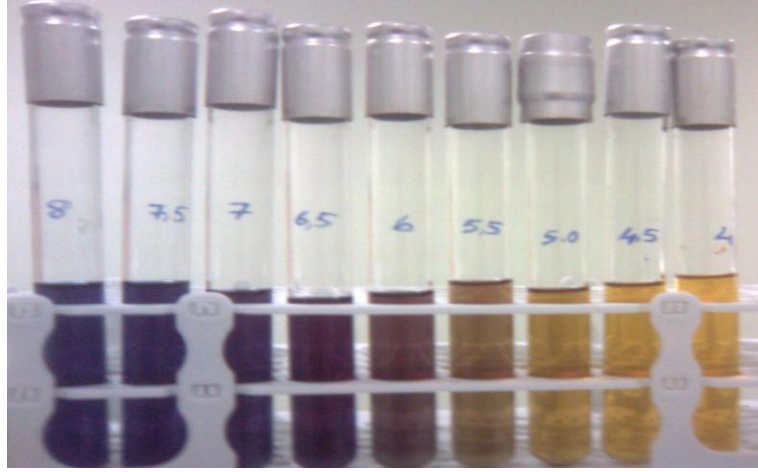
gözlemlendiği, pH 2,5, 3,0 ve 3,5'ta ise canlı hücre sayısının kayda değer biçimde düştüğü ve sonunda tüm hücrelerin ölümü ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Hutkins ve Nanen (1993) *Lactococcus lactis*'in optimum gelişme pH aralığı 6,3-6,9 olan nötrofilik bir bakteri olduğunu ifade etmişlerdir. Ancak denemelerde kullanılan *Lc. lactis* subsp. *lactis* suşu için optimum pH değeri 7,5 bulunmuştur. Benzer şekilde iki *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* suşu ile yapılan streslere duyarlılık çalışmasında maksimum gelişmenin sırası ile pH 6,8 ve pH 7,9'ta gerçekleştiği görülmüştür (Şimşek ve ark., 2009). Bu farklılık stres yaratan pH'ların suşa bağlı olarak değişim gösterdiğinin açık bir kanıtıdır.

Laktik asit bakterileri şeker fermentasyonu sırasında laktik asit üretirler. Bu durumda asit strese yol açmaktadır. Laktik asidin zayıf bir organik asit olduğu, düşük pH'ta değişmediği ve proton formunda hücre zarından kolayca geçebildiği unutulmamalıdır. Hücre içi ve hücre dışı pH'ta gözden kaçırılmamalıdır. Hücre dışı pH HCl ile 6,75'ten 5,0'a düşürüldüğünde; *L. lactis* hücrelerinin hücre içi pH'ı 7'den 6'ya düşmektedir. Ancak hücre dışı pH laktik asitle ayarlanırsa hücre içi pH lineer olarak 7'den 5,25'e düşmektedir (Cook ve Russel, 1994). Gelişme gösteren kültürlerde ölçüm yapılırsa hücre içi pH'ın hücre dışı pH ile birlikte düştüğü gözlemlenecektir. Bu yolla delta pH 0,7 birim bulunacaktır. *L. lactis* pH 4,5'ta (HCl ile birlikte) hayatta kalabilir ancak pH 4'te inkübe edilirse canlılık hızlı bir biçimde düşüş gösterir. Kim ve ark. (1999) *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının 2,5 pH'a kadar canlı kalabildiklerini savunmaktadır. Laktik asit ya da HCl ile ayarlanmış M17 ortamının pH'ı 15 dakika süre için pH 5,5'e adapte edilirse hücreler düşük pH'ta canlı kalabilirler (Hartke ve ark., 1996; Rallu ve ark., 1996). Diğer bir çalışmada da (Kim ve ark., 1999) önceden adapte edilmiş ve gelişme fazındaki 3 *L. lactis* subsp. *lactis* suşunun ölüm pH'ına(2,5) maruz bırakıldığında hayatta kalabildiği gözlemlenmiştir. pH 5,5'ta 30 dk. adaptasyon 33 proteinin (DnaK, GroEL, ClpP vb.) sentezini tetiklemektedir.

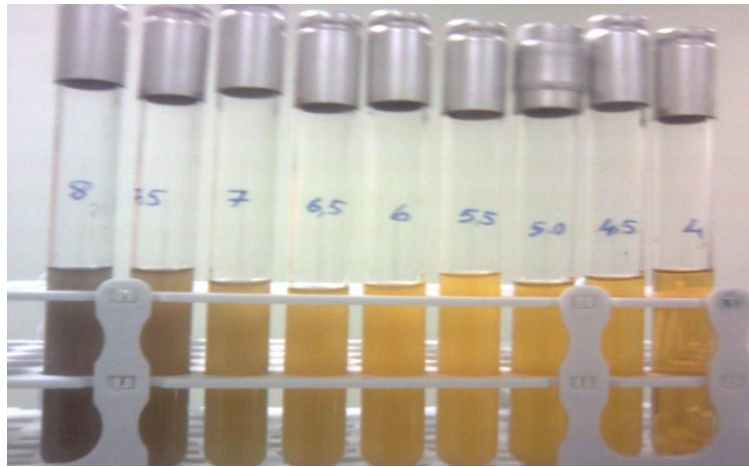
Yapılan çalışmada hiç bakteri inokülasyonu yapılmamış sıvı besiyerinin absorbans değeri 0.314'tür. Dolayısı ile pH'ı 4'e ayarlanmış besiyerinde herhangi bir bakteri gelişiminin olmadığı söylenebilir. Yüksek asit oranları *Lc. lactis* için stres yaratmaktadır. pH 4,5-5 itibari ile *Lc. lactis* gelişim göstermeye başlamıştır. pH

7,5'tan sonra gelişim tekrar azalmaya başlamıştır. Sonuç olarak pH'a bağlı absorban değerleri ile yapılan çalışmalardan elde edilen bulguların ilgili çalışmalar sonucu elde edilen bulguları destekler nitelikte olduğu görülmüştür.

Görsel açıdan farklı pH'larda gelişimi izleyebilmek için sıvı besiyerlerinin pH'larının ayarlanmasının ardından her besiyerine pH indikatörü olarak bromocresol purple ilave edilmiş ve 48 saat sonunda renk değişimleri izlenmiştir. Rengin mordan sarıya dönüşümü pH'ın düştüğünü ifade etmekte dolayısı ile asitlik gelişimini ve hücre gelişimini ifade etmektedir. Şekil 4.18'de inkübasyon öncesi, Şekil 4.19'da ise 48 saatlik inkübasyon sonundaki besiyeri görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.18 İnkübasyon öncesi farklı pH değerlerine ayarlanmış M17 besiyerlerinin görünümü



Şekil 4.19 İnkübasyon sonrası M17 besiyerlerinin görünümü

Şekil 4.19 incelendiğinde pH 4,5-7 aralığındaki tüm besiyerlerinde gelişimin gerçekleştiği, rengin mordan sarıya döndüğü; pH 4'e ayarlanmış besiyerinin berrak olduğu dolayısı ile hiçbir gelişimin olmadığı görülmüştür. pH 7'den sonraki besiyerlerinde sarı-mor renk gözlemlendiği için bu pH'larda asitlik gelişiminin yavaşladığı kanısına varılmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doğadan izole edilmiş *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* ve *Lc. lactis subsp. lactis* suşları üzerine etki eden stres faktörlerin belirlenmesini amaçlayan çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

Denemelerde sıcak stresi, soğuk stresi, asit stresi ve osmotik stres olmak üzere dört stres faktörü üzerinde durulmuştur. Denemelerde kullanılan iki bakterinin birinin termofilik-basil diğeri ise mezofilik-kok olması stres faktörlerin etkisinin tayininde parametrelerin farklı tutulmasını gerektirmiştir.

Denemede kullanılan *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* suşu 37, 42, 46 °C'de inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda optimum inkübasyon sıcaklığı 46 °C olarak belirlenmiştir. Gelişme ortamının pH'ı 4-9 aralığında ayarlanmış ve optimum gelişme pH'ı 6,5 bulunmuştur. pH 4'te hiçbir gelişme gözlemlenmezken; 4,5-6,5 pH aralığında gelişme artmış ve 6,5 pH'tan sonra ise gerilemeye başlamıştır. Besi ortamına % 1-7 aralığında NaCl ilave edildiğinde ise % 2 NaCl ilavesinin gelişimi stimüle ettiği tespit edilmiştir. % 2'nin üzerindeki NaCl konsantrasyonları gelişimi olumsuz yönde etkilemiştir. Söz konusu suş 1-4 hafta aralığında soğuk depolamaya bırakılmış ve dondurmanın canlılığa etkisi tespit edilmek istenmiştir. Elde edilen sonuçlar dondurmanın *Lb. bulgaricus* suşu üzerine stres yarattığı ve soğuk depolama süresi arttıkça canlılık kaybının arttığını göstermiştir.

Lc. lactis subsp. lactis suşu ile yapılan çalışmalarda ise; 26, 32, 37 °C inkübasyon sıcaklıklarından en iyi sonuç 32 °C'de alınmıştır. Bu derecenin altı ve üstündeki sıcaklıklar strese sebep olarak asitlik gelişimin yavaşlamasına sebep olmuştur. % 1-7 NaCl konsantrasyonlarında geliştirilen *Lc. lactis* suşu için % 1 NaCl oranının gelişimi stimüle edici etki yarattığı görülmüştür. Bu konsantrasyonun üzerindeki oranlar inaktivasyona sebep olarak gelişimi yavaşlatmıştır. pH 4-9

aralığındaki besi ortamlarında geliştirme sonucunda optimum pH değerinin 7,5 olduğu ortaya çıkarılmıştır. *Lb. bulgaricus*'a benzer biçimde pH 4'te gelişme gözlemlenememiştir. 4-7,5 pH aralığında gelişim yükselme gösterirken pH 7,5'ten sonra tekrar düşüşe geçmiştir. 1-4 hafta aralığında soğuk depolamaya bırakılan *Lc. lactis* suşu donmaya karşı *Lb. bulgaricus* suşuna oranla daha fazla direnç göstermiştir. Ancak depolama süresi arttıkça az da olsa canlı kaybı artmıştır.

Elde edilen sonuçlar genel olarak incelendiğinde gerek *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* gerek *Lc. lactis* subsp. *lactis* suşunun canlılığında stres faktörlerin önemli bir yer teşkil ettiği görülmüştür. Çalışma sonucunda sıcaklık, pH, tuz konsantrasyonu ve soğuk depolama süresi gibi stres etkenlerinin her suş üzerinde farklı etkiler yaptığı tespit edilmiştir. Stres etkenine karşı oluşturulan tolerans mikroorganizmaya bağlı olarak farklılık göstermiştir. Suşa özgü optimum gelişme koşullarının sağlanması fermentasyonda standart kalitenin sağlanması ve prosesteki başarısızlıkların en aza indirgenmesi açısından önem arz etmektedir.

Yeni fonksiyonellikler, gelişmiş besinsel değerler, yüksek duyusal kalite, zamanında üretim, sabit ve tahmin edilebilir ürün kalitesi, tekrarlanabilir üretim akışı için gıda fermentasyonlarında rol oynayacak mikroorganizmaların stres faktörlere karşı optimizasyonun sağlanması gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abadias, M., Benabarre, A., Teixo, N., Usasll, J., Vinas, I., 2001, Effect of Freze-Drying and Protectants on viability of the Biocontrol Yeast *Candida sake*. Int. J. Food Microbiol., 65, 173-182.
- Accolas, J. P., 1979, Taxonomic Features and Identification of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. Rapport presente du group F. E44 (Lait Fermentes), Milan, 23 Juillet.
- Accolas, J. P., Hemme, D., Desmazeaud, M. J., Vassal, L., 1980, Les Levaines Thermophiles: Proprietes et Comportement en Technologie Laitiere., UneRevue., 487-524 Le Lait, LX.
- Accolas J. P., Auclair, J., 1983, Thermophilic Lactic Starters. Ir. J. Food Science and Technology, 7-27.
- Andersson, R., 1989, Food Processing, Lactic Acid Bacteria in the Production of Food. SIK-Publication, Food Laboratory Newsletter, 14: 17.
- Arsene, F., Tomoyasu, T., Bukau, B., 2000, The heat shock response of *Escherichia coli*. Int Food Microbiol., 55:3-9.
- Barbour, E.A. and Preist, F.G., 1986, The preservation of lactobacilli a comparison of three methods. Letters in Applied Microbiology, 69-71.
- Batt, A. C., 1986, Genetic engineering of lactobacillus. Food Technol., 95-98, 112.
- Bâati, L., Fabre-Gea, C., Auriol, D., Blanc, P. J., 2000, Int. J. Food Microbiol., 59, 241-247.
- Baumann, D. P., and G. W. Reinbold, 1964, Preservation of lactic cultures. J. Dairy Sci., 47:674.
- Baumann, D. P., and G. W. Reinbold., 1966, Freezing of lactic cultures. J. Dairy Sci. 49:259.
- Beal, C. and Corrieu, G., 1994, Viability and acidification activity of pure and mixed starters of *S. salivarius ssp. thermophilus* 404 and *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* 398 at the different steps of their production. Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie, 86-92.
- Bergere, J. L., 1968, Production massive de cellules de streptocoques lactiques. III. Production de differentes souches en culture a pH constant. Le Lait, 48:131.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1974, 8th ed.

- Bozoğlu, T. F. , Özilgen, M. ve Bakır, U., 1987, Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freze drying. *Enzyme and Microbial Technology*, 531-537.
- Branen, A., and Kenan, T., 1996, Identification of a stimulant for *Lactobacillus casei* produced by *Streptococcus lactis*. *Appl. Microbiol.*, 20:757.
- Breed, S., Murray E. and Smith N. R., 1957, *Bergey's Manual of Determination Bacteriology*. 7 th ed., William And Wikins Co. Waverly. Pres. INC, Baltimore, Md USA.
- Bremer, E., Krämer, R., 2000, Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria, In *Bacterial Stress Responses*. G. Storz and R. Hengge-Aronis. Eds. Washinton. D.C.: American Society for Microbiology, 99-116.
- Buchanan, R. E., Gibbons, N. E., 1974, *Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology*. Eight edition. The Williams And Wilkins Company/Baltimore.
- Burkey, L. A., and Rogosa, M., 1940, Adaptability of thermophilic lactic acid bacterial cultures to certain enviromental conditions. *J. Bact.*, 39:96.
- Camsan, E. P., and Rettger, L. F., 1933, Limitation of bacterial growth at higher temperatures. *J. Bact.*, 26: 77-123.
- Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., Gibbs, P., 2004. Relevant Factors for the Preparation of Freze-dried Lactic Acid Bacteria. *Int. Dairy Journal*.
- Champagne, C. P., Gardner, N., Brochu, E., Beaulieu, 1991, *Inst. Sci. Technol. J.*, 24, 118–125.
- Chang, W.T.H., 1980, The relationship of freezing and thawing temperature to the survival of directset starter culture. In *Developments in industrial microbiology*. Vol. 21. L. Underkofler and M. Wulf, ed. Soc. Ind. Microbiol., Arlington
- Cook, G. M., and Russell J. B., 1994, The effect of extracellular pH and lactic acid on pH homeostasis in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus bovis*. *Curr. Microbiol.* 28:165–168
- Cowman, R. A. and Speck, M. L., 1963, Activity of Lactic Streptococci Following Ultralow-Temperature Storage. *J. Dairy Sci.*, 46: 609.
- Cowman, R. A., and Speck M. L., 1965, Ultra low temperature storage of lactic streptococci. *J. Dairy Sci.*, 48:1531.
- Çon, A. H., Gökalp, H. Y., 2000, Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Metabolitleri ve Etki Sekilleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 30: 180-190.

- Cronan, J.E., 2002, Phospholipid modifications in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 5:202-205.
- Dahiya, R. S., and Speck M. L., 1963, Identification of stimulatory factor involved in symbiotic growth of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *J. Bacteriol.* 85: 585.
- Daily, W. A., and Higgins C. E., 1973, Preservation and storage of microorganisms in the gas phase of liquid nitrogen. *Cryobiology*, 10: 364.
- De Giulio, B., Orlando, P., Barba, G., Coppola, R., De Rosa, M., Sada, A., De Prisco, P. P., Nazzaro, F., 2005, Use of Alginate and Cryo-protective Sugars to Improve the Viability of Lactic Acid Bacteria After Freezing and Freeze-drying. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol: 21, No: 5. 739-746.
- Deibel, R. H., Seeley, M. W., 1974. Streptococcaeae, the genus *Streptococcus*, 490-509.
- Dellaglio, F., De Roissard, H., Torriani, S., Curk, M. C., Janssens, D., 1994, *Caracteristiques Generales des Bacteries Lactiques*, 25-116.
- DeMan, J. C., Rogosa, M., Sharpe, M. E., 1960, A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bact.*, 23 (1) 130-135.
- Diller, K. R., 1975, Intracellular freezing: Effect of extracellular supercooling. *Cryobiology*, 12:480.
- Dirar, H., and Collins E. B., 1972, End- products, fermentation balances and molar growth yields of homofermentative lactobacilli. *J. Gen. Microbiol.*, 73:233
- Elliker P. R., Anderson A. W., and Hannesson G., 1956, An agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. *J. Dairy Sci.*, 39:1611.
- Farr, S. M., 1969, Milk fermenting product and method of making same. US Pat. 3, 420, 742.
- Franks, F., 1995, *Adv. Protein Chem.*, 46, 105–139.
- Garvie, E. I., and Mabbit.L. A., 1956, Acid production in milk by starter cultures. The effects of peptone and stimulatory compounds. *J. Dairy Res.*, 23:305.
- Gasser, F., Montel, M. G., Talon, R., Champomier, M., 1994, *Taxonomie Moleculaire Appliquee a la Classification des Bacteries Lactiques*, 117-139.
- Gibbs, B. M., Skinner, F. A., 1966, *Identification Methods for Microbiologist*. Academic Pres London, New York 145.
- Gibson, C. A., Landerkin, G. B., and Morse, P. M., 1965, Survival of Strains of Lactic Streptococci During Frozen Storage. *J. Dairy Research*, 32: 151

- Gibson, C. A., Landerkin G. C. and Morse P. M., 1966, Effects of additives on the survival of lactic streptococci in frozen storage. *Appl. Microbiol.* 14: 665.
- Graumann, P., Marahiel, M. A., 1998, *Trends Biochem. Sci.*, 23, 286–290.
- Gunsalus, L. C. and Niven C. F., 1942, The effect of pH on lactic acid fermentation. *J. Biol. Chem.*, 145:131- 136.
- Halkman, A. K., Akyol, E., Çavus, A., 1986, Liyofilizasyon Süresinin Yoğurt Bakterilerinin Canlılığı Üzerine Etkisi, *Gıda* 11 (2) 95-99.
- Harrigan, W. F., McCance, M. E., 1966, *Laboratory Methods in Microbiology.* Academic Pres London, New York, 362.
- Hartke, A., Bouche S., Gansel X., Boutibonnes P. and Auffray Y., 1994, Starvation-induced stress resistance in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:3474–3478.
- Hartke, A., Bouche, S., Giard, J.C., Benachour, A., Boutibonnes, P. and Auffray, Y., 1996, The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Curr. Microbiol.*, 33,194-199.
- Harvey, R. J., 1965, Damage to *Streptococcus lactis* resulting from growth at low pH, *J. Bact.*, 90, 1330.
- Hecker, M., Schumann, W., Volker, U., 1996, Heat shock and general stress response in *Bacillus subtilis*, *Mol Microbiol.*, 199:417-428.
- Heinemann, B., 1958, Preserving the activity of lactic cultures. *J. Dairy Sci.*, 41:705.
- Hutkins, R. W. and Nannen, N. L., 1993, pH homeostatis in lactic acid bacteria. *J. Dairy. Sci.*, 2354-2365.
- Karlsson, J. O. M. and Toner, M., 1996, Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues, *Biomaterials*, 243- 256.
- Kashket, E. R., 1987, Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance, *Fed. Eur. Mimbriol. Soc. Microbiol. Rev.*, 46:233.
- Kılara, A., Shahani, K. M., Das, N. K., 1976, Effect of Cryoprotective Agents on Freze Drying and Storage of Lactic Cultures. *Cultured Dairy Prod.*, J. 11 (2) 8-11.
- Kılıç, S., 2001, Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 542. Sayfa: 37-55. ISBN 975-483-488-1. Bornova-İzmir.
- Kilstrup, M., Jacobsen, S., Hammer, K. and Vogensen, F.K., 1997, Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1826-1837.

- Kim, W.S. and Dunn, N.W., 1997, Identification of a cold shock gene in lactic acid bacteria and the effect of cold shock on cryotolerance, *Curr. Microbiol.*, 35, 59-63.
- Kim, W. S., Ren, J. and Dunn, N. W., 1999, Differentiation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and subsp. *cremoris* strains by their adaptative response to stresses. *FEMS Microbiol. Lett.* 57-65.
- Kobayashi, H., Suzuki, T. and Unemoto, T., 1986, Streptococcal cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-translocating ATPase, *J. Biol. Chem.*, 627-630.
- Kosikowski, F. V., 1977, *Cheese and Fermented Milk Foods*, 2nd Ed. Booktandale, New York.
- Kothari, S. L., and Nambudrapid V.K. N., 1972, Isolation and identification of stimulatory substance involved in associative growth of cheese starters. *J. Dairy Sci.*, 56:423.
- Kösker, Ö., 1976, Genel Mikrobiyoloji Uygulama Kılavuzu. A. Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları no: 586. Ankara Üniversitesi Matbaası, Ankara, 138.
- Kösker, Ö., 1977, Genel Mikrobiyoloji (Ziraat Mikrobiyolojisine Giriş). A. Ü. Ziraat Fak. Teksir no: 8 Ankara 272 .
- Lagoda, I. V., Bannikova, L. A., 1975b, Stability of Freze Dried Lactic Acid Bacteria, *Dairy Sci. Abst.*, 37 (12) 778.
- Lamprech, E. D., and Foster E. M., 1963, The survival of starter organisms in concentrated suspensions, *J. Appl. Bacteriol*, 26:359-369.
- Lapage, S. P., Shelton, E. S., Mitchell, T. G., Mackenzie, A. R., 1970, *Culture Collections and the Preservation of Bacteria*.
- Le Bourgeois, P., Lautier, M., van den Berghe, L., Gasson, M.J. and Ritzenthaler, P., 1995, Physical and genetic map of the *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 chromosome comparison with that of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* IL1403 reveals a large genome inversion. *J. Bacteriol.* 177, 2840-2850.
- Leach, R. D. and Sandine W. E., 1976, Numerical relationship between strains in frozen concentrates of lactic streptococcal starter cultures, *J. Dairy Sci.*, 59:1392.
- Leistner, L., 2000, Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int Food Microbiol.*, 55:181-186.
- Lee, D. A., and Collins E. B., 1976. Influences of temperature on growth *Streptococcus cremoris* and *Streptococcus lactis*, *J. Dairy Sci.* 59: 405.

- Litvan, G., 1972, Mechanism of cryoinjury in biological systems, *Cryobiology* 9:182.
- Lloyd, G. T., 1975, The production of concentrated starters by batch culture: II. Studies on the optimum storage temperature. *Australian J. Dairy Technol.*, 30:107.
- London, J., 1976, The ecology and taxonomic status of the lactobacilli. *Annu. Rev. Microbiol.*, 30:279-301.
- Martley, F.G., 1983, Temperatures sensitives of thermophilic starter strains. *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.*, 191-196.
- Masud, T., Sultana, K., 1991, Incidence of lactic acid bacteria isolated from indigenous dahi, *A.J.A.S.*, 329-331.
- Masud, T., Sultana, K. and Kauser, R., 1992, Comparative studies on indigenous starter culture strains for their rate of acid production, *A. J. A. S.*, 559-561.
- Mazur, P., 1960, Physical Factors Implicated in the Death of Microorganisms at Subzero Temperatures. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 85: 610.
- Mazur, P., 1970, Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*, 939-949.
- Mercade, M., Lindley, N. D. and Loubiere, P. 2000). Metabolism of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG 1363 in acid stress conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, 161-165.
- Meryman, H. T., 1966, *Freeze-Drying; Cryobiology*. Ed. H. T. Meryman. Academic Press, London, New York.104
- Mitic, S., Otenhajmer, I., 1974, Reconstitution and Activation of Freeze-dried Lactic Acid Bacteria. *Dairy Sci. Abs.* 36 (7) 363.
- Mohannan, K. R., P. A. Shunker and H. Laxminaryana, 1983, Growth and acid production of Dahi starter culture at suboptimum temperature. *Indian J. Dairy Sci.*, 177-181.
- Morichi, T., Irie, R., Yano, N., Kembo, H., 1967, Death of Freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* During Rehydration. *Ag. Biol. Chem.*, 31 (2) 137-141.
- Morichi, T., 1974, Preservation of Lactic Acid Bacteria by Freeze-drying. *Dairy Sci. Abst.*, 36 (1) 41.
- Moss, C. W. and Speck M. L., 1963, Injury and death of *Streptococcus lactis* due to freezing and frozen storage. *Appl. Microbiol.* 11:326-329.
- Nannen, N. L., and Hutkins R. W., 1991, Intracellular pH effects in lactic acid bacteria, *J. Dairy Sci.*, 74:741-746.

- Neidhardt, F.C. and VanBogelen, R.A., 2000, Proteomic analysis of bacterial stress response, in *Bacterial Stress Responses*. G. Storz and R. Hengge-Aronis, Eds. Washington, DC.: American Society for Microbiology Press, 445-452.
- Nickerson, J. T., Sinskey, A. J., 1974, *Microbiology of Food and Food Processing*. American Elsevier Publishing Company, New York, 306
- Nierlich, D. P, 1978, Regulation of bacterial growth, RNA and protein synthesis. *Annu. Rev. Microbiol.*, 393-432.
- O' Sullivan, E. and Condon, S., 1997, Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stresses in *Lactococcus lactis*. *Applied Env. Microbiol.*, 4210-4215
- O' Sullivan, E. and Condon, S., 1999, Relationship between acid tolerance, cytoplasmic pH and ATP and H-ATPase levels in chemostat cultures of *Lactococcus lactis*, *Applied. Environ. Microbiol.*, 2287-2293.
- Özalp, E., Özalp, G., 1978, Yoğurt Kültürü Elde Edilmesi Üzerinde Araştırmalar, A. Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 15 (2) 315-322.
- Panoff, J.M., Legrand, S., Thammavongs, B. and Boutibonnes, P., 1994, The cold shock response in *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Curr. Microbiol.*, 29, 213-216.
- Pannoff, J. M., Thammavongs, B., Gueguen, M., 2000, *Cryobiology*, 40, 264–269.
- Piper, P. W., 1993, *FEMS Microbiol. Rev.*, 11, 339–355.
- Poolman, B., Driessen, A. J. M. and Konings, W. N., 1987, Regulation of solute transport in streptococci by external and internal pH values, *Microbiol. Rev.*, 498-508.
- Poolman, B., Glaasker, E., 1998, *Mol. Microbiol.*, 29, 397-407.
- Radke- Mitchell, L.C. and Sandine, W.E., 1986, Influence of temperature on associated growth of *S. thermophilus* and *L. Bulgaricus*, *J. Dairy Sci.*, 2558-2568.
- Rallu, F., Gruss A., and Maguin, E., 1996, *Lactococcus lactis* and stress. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70:243–251.
- Ray, B., and Speck, M. L., 1973, Freeze-injury in bacteria, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 4:161.
- Reif, G. D., Reinbold, G. W. and Vedamuthu, E. R., 1967, Effect of frozen storage upon lactic cultures grown at 15 and 21 C, *J. Dairy Sci.*, 50:945.
- Sanders, J. W., Venema, G. and Kok, J., 1999, Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*, *FEMS Microbiol. Rev.*, 483-501.

- Sandine, W.E., Radich, P.C. and Elliker, P.R., 1972, Ecology of the lactic streptococci, A review. *J. Milk Food Technol*, 35, 176-184.
- Schlegel, H. G., 1986, *General Microbiology*, Cambridge University Press, Cambridge, 587.
- Sharpe, M. E., Fryer, T. F., Smith, D. G., 1966, Identification of the Lactic Acid Bacteria, "Gibbs, M. M., Skinner, F.A. (ed): Identification Methods for Microbiologist" Part A. Academic Press, New York, 245.
- Sharpe, M. E., 1979, Identification of Lactic Acid Bacteria. F. A. Skinner ve D. W. Lovelock (Ed) Identification Methods for Microbiologists. London Academic Press. 233-259.
- Sherwood, I. R., 1939, The relation of certain lactic acid bacteria to open texture in Cheddar Cheese, *J. Dairy Res.*, 10: 326.
- Siegmund, H., Rechner, K. B. and Jakobsen, M., 2000, Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH, *Appl. Environ. Microbiol*, 2330-2335.
- Sinha, R. N., Nambudripad, V. K. N., Dudani, A. T., Laxminarayana, H., 1972, Effect of Suspending Media on the Viability of Freeze-Dried Culture of *Streptococcus lactis*. *J. Food Sci. Technol.*, 9 (2) 85-89.
- Speckman, C. A., 1975, Preparation, Evaluation and Use of Lyophilized, Concentrated Dairy Starter Cultures in Cheese and Yoghurt Manufacture. Ph. D. Thesis. Oregon.
- Stadhouders, J., Jansen L. A., Hup, G., 1969, Preservation of Starters and Mass Production of Starter Bacteria, *Netherlands Milk Dairy*, J. 23: 182-199.
- Stadhouders, J., G. Hup, and L. A. Jansen, 1971, A study of the optimum conditions of freezing and storing concentrated mesophilic starters, *Netherlands Milk Dairy J.* 25:229.
- Stadhouders, J., 1986, The control of cheese starter activity. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 155-173.
- Şimşek, Ö., Buzrul, S., Alpas, H., Akkoç, N., Akçelik, M., 2009, Stress response kinetics of two nisin producer strains of *Lactococcus lactis subsp. lactis*. *Appl. Biochem Biotechnol.*, 158: 387-397.
- Tamime, A. Y., Robinson, R. K., 1976, Recent Developments in the Production and Preservation of Starter Cultures for Yogurt. *Dairy Ind. Int.*, 41 (11) 408-411. 106
- Terzaghi, B. T., Sandine, W. E., 1975, Improved Medium for Lactic Streptococci and Their Bacteriophages, *Applied Microbiol.*, 7, 29, 6, 807-813.

- Teixeira, P., Castro, H., Mohacsi-Farkas, C., Kirby, R., 1997, Appl. Microbiol., 83, 219–226.
- Thieringer, H. A., Jones, P. G., Inouye, M., 1998, Bioassays, 20, 49–57.
- Tsvetkov, T. and Shishkova, I., 1982, Studies on the effects of low temperatures on lactic acid bacteria, Cryobiology 211-214.
- Tunail, N., Kösker, Ö., 1981, Süt Mikrobiyolojisi ve Hijyeni, Ankara Üniversitesi Ziraat Fak. Ankara Üniv. Matbaası.
- Ünlütürk, A., Turantas, F., 2003, Gıda mikrobiyolojisi (ed.). Sayfa: 427-430. ISBN 975-483-383-4. İzmir.
- Weitzel, G., Pilatus, U., Rensing, L., 1987, Exp. Cell Res., 170, 64–79.
- Whitaker, R. D., and C. A. Batt., 1991, Characterization of the heat shock response in *Lactococcus lactis subsp. lactis*, Appl. Environ. Microbiol., 57: 1408–1412.
- Whitehead, W. E., Ayers, J. W., and Sandine, W. E., 1993, A review of starter media for cheese making, J. Dairy Sci., 76: 2344–2353.
- Yaygın, H., Kılıç, S., 1993, Süt Endüstrisinde Saf Kültür, Altındag Matbaası, S: 108.
- Yaygın, H., Kılıç, S., Kavas, G., Uysal, H., Kınık, Ö., 2006, Süt Endüstrisinde Saf Kültür ve Kullanımı, ISBN 975-8377-47-7. İstanbul.
- Yousef, A.E., Courtney, P.D., 2003, Basics of stres adaptation and implications in new generation foods. “Microbial Stres Adaptation and Food Safety” AE Yousef and VK Juneja. CRC Pres, New York. Syf:1–25.
- Yu. R. S. T., Hung T. V. and Azad A. A., 1983, Plasmid complement and sequence homology of same technological strains of lactic streptococci, Aust. J. Dairy Technol., 104-109.