

## Tereyağı Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Bazı Endüstriyel Özelliklerinin Belirlenmesi

Gülden BAŞYİĞİT KILIÇ<sup>1\*</sup>, Hacer KAÇAR<sup>2</sup>, Samet ÖZKAN<sup>1</sup>,  
Seher BALLI<sup>1</sup>, Enes SÖNMEZ<sup>1</sup>, Ozan ERFİLİBELİ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Burdur

<sup>2</sup>Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Burdur

Geliş Tarihi (Received): 23.05.2020, Kabul Tarihi (Accepted): 10.09.2020

✉ Sorumlu Yazar (Corresponding author\*): gklic@mehmetakif.edu.tr

☎ +90 248 2132724 📠 +90 248 2132704

### ÖZ

Bu araştırmada Burdur, Afyon ve Antalya illerinde halk pazarlarından toplanan 20 adet tereyağı örneğinden izole edilen laktik asit bakterilerinin, endüstriyel tereyağı üretimi için bazı teknolojik özellikleri incelenmiştir. Araştırmada 101 adet laktik asit bakterisi izole edilmiş ve bu isolatların; sütü koagüle etme, optimum sıcaklık ve NaCl konsantrasyonunda gelişme özellikleri, diasetil üretimi, sitrat kullanımı, amilolitik ve lipolitik aktiviteleri incelenmiş, en iyi teknolojik özelliğe sahip olan suşların genetik tanısı yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda isolatların 70 adedi hızlı koagülasyon özelliğine sahipken, kalan 31 adet bakteri zayıf koagülasyon özelliği göstermiştir. Optimum sıcaklık ve NaCl konsantrasyonu deneyleri sonucunda; isolatların %10 tuz konsantrasyonunda ve 4°C'de gelişiminin zayıf olduğu gözlemlenmiştir. İzolatların 36 adedinde diasetil üretimi belirlenmiştir. İncelenen isolatların 38 adedinde sitrat kullanımı tespit edilirken, 57 adedinde amilolitik ve 19 adedinde ise lipolitik aktivite tespit edilmiştir. Teknolojik özellikler değerlendirilerek 7 adet bakteri seçilmiş ve genetik tanı testi yapılmıştır. Sonuçlara göre 1 adet *Enterococcus faecalis* (TY5-B), 2 adet *Enterococcus faecium* (TY3-3 ve TY5-1), 2 adet *Lactobacillus casei* (TY9-1 ve TY18-4) ve 2 adet *Pediococcus acidilactici* (TY11-1A ve TY15-2) tanımlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Laktik asit bakterileri, teknolojik özellikler, tereyağı

## Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Butter Samples and Determination of their Some Technological Properties

### ABSTRACT

In this study, some technological properties of lactic acid bacteria isolated from 20 butter samples collected from the public markets in Burdur, Afyon and Antalya provinces were investigated for industrial butter production. In the research, 101 lactic acid bacteria were isolated and these isolates were examined for milk coagulation, viability at optimum temperature and NaCl concentration, diacetyl production, utilization of citrate, amyolytic and lipolytic activity. The isolates with the best technological properties were genetically identified. As a result of the analysis, 70 of the isolates had fast coagulation properties while the remaining 31 bacteria showed weak coagulation properties. As a result of viability experiments at optimum temperature and NaCl concentration, weak growth of the isolates was observed at 10% salt concentration and at 4°C. Diacetyl production was determined in 36 of the isolates. While the citrate utilization was observed in 38 of the isolates examined, amyolytic activity was determined in 57 and lipolytic

Gülden BAŞYİĞİT KILIÇ, <https://orcid.org/0000-0003-1211-0568>

Hacer KAÇAR, <https://orcid.org/0000-0001-5516-3091>

Samet ÖZKAN, <https://orcid.org/0000-0002-8823-5386>

Seher BALLI, <https://orcid.org/0000-0001-6516-6376>

Enes SÖNMEZ, <https://orcid.org/0000-0003-2725-912X>

Ozan ERFİLİBELİ, <https://orcid.org/0000-0002-6591-8563>

activity was determined in 19 strains. According to the technological properties, 7 isolates were selected and genetically identified. In this respect, 1 strain of *Enterococcus faecalis* (TY5-B), 2 strains of *Enterococcus faecium* (TY3-3 and TY5-1), 2 strains of *Lactobacillus casei* (TY9-I and TY18-4) and 2 strains of *Pediococcus acidilactici* (TY11-1A and TY15 -2) were identified.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, technological properties, butter

## GİRİŞ

Süt ve mamulleri arasında önemli bir yeri olan tereyağı, ekonomik değeri bakımından da önemli bir süt ürünüdür. Laktik asit bakterileri (LAB)'nin gıda teknolojisinde önemli bir rolü bulunmaktadır ve gıda üretimi ve muhafazasında kullanımı insanlık tarihi kadar eskidir. Fermentasyonda rol oynayan mikroorganizmaların doğal olarak hammaddede yeterli düzeyde bulunduğu gıdalarda, fermentasyon başlatıcı kültür ilave edilmeden doğal olarak gerçekleştirilebilmesine karşın, başlatıcı kültür kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyonlar, standart ve daha yüksek kalitede ürünlerin üretilmesine olanak sağlamaktadır (Holzapfel, 1997). Tereyağı üretimi genellikle başlatıcı kültürler ilave edilmeden, her zaman standart olmayan geleneksel tekniklere dayanmaktadır. Bu sebeple, fermentasyon işlemi tamamen süttten ve çevreden kaynaklanan doğal mikrobiyal flora ya bağlıdır. Fermente süt ürünlerinin üretimi için kullanılan başlatıcı kültürler; koruma, organoleptik kalite ve besin değeri açısından son ürün kalitesinde önemli bir rol oynar. Ürün kalitesi üzerindeki etki, büyük ölçüde suşa bağlıdır ve suşlar arasındaki metabolik yolların varlığı ve aktivitesindeki farklılıklardan kaynaklanır (Van Hylckama Vlieg ve Hugenholtz, 2007). Geleneksel tereyağından yabani tip suşların izolasyonu, bunların tanımlanması ve özelliklerinin belirlenmesi gıda fermentasyonları için yeni başlatıcı/destek kültürleri elde etmek için izlenen klasik bir yöntemdir (Abdelbasset ve Djamila, 2008). Seçilen bu bakteriler kullanılarak fermente gıdaların, karakteristik lezzetini ve özelliklerini kaybetmeden büyük ölçekli üretimi gerçekleştirilebilir (Ammor ve ark., 2006).

Tereyağı üretiminde kullanılan başlatıcı kültürler veya doğal florada bulunan mikroorganizmaların gelişmesi sonucu meydana gelen laktik asit, diasetil, CO<sub>2</sub>, asetoin, uçucu yağ asitleri ile ürüne özgü tat ve aroma oluşmaktadır (Bilgin ve ark. 2014). Tereyağı ve fermente süt ürünlerinde kullanılan kültürlerin aroma maddeleri ve karbondioksit oluşturma özelliklerinin yüksek olması istenmektedir. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (*Lc. cremoris*), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (*Lc. diacetylactis*)'e göre daha iyi aroma sağlamaktadır. Aroma oluşmasında rol oynayan bileşikler arasında en önemlisi diasetildir (Sağdıç ve ark., 2002). Diasetil, tereyağı gibi fermente süt ürünlerinde temel aroma maddesi olan ve yapısı kimyasal olarak asetona oldukça benzeyen, süt ürünlerinin aromasını etkileyen en önemli bileşiklerden biridir ve ürünlere tereyağına

benzer bir lezzet verir (Madera ve ark., 2003; Karaca ve ark., 2010). Diasetil tereyağı, ayrıran ve taze peynir gibi birçok süt ürününde düşük konsantrasyonlarda gereklidir (Hugenholtz ve ark., 2000). Sitrattan diasetil sentezi için başlatıcı kültürlerle diasetil üretebilen LAB suşlarının eklenmesi gerekmektedir. LAB genel olarak zayıf lipolitik aktiviteye sahiptir, ancak bazı suşların esas olarak orta uzunlukta zincirlere sahip yağ asitleri içeren trigliseritleri hidrolize ettiği belirlenmiştir (Katz ve ark., 2002). Yapılan bu çalışmada halk pazarlarından tereyağı örnekleri toplanmış ve LAB izolasyonu yapılmıştır. İzolatların bazı teknolojik özellikleri belirlenmiş ve en iyi teknolojik özelliğe sahip olan suşların genetik tanısı yapılmıştır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırmada Burdur, Afyon ve Antalya illerindeki halk pazarlarından ev tipi yöntemle yapılan 20 adet tereyağı örneği toplanmıştır. Örnekler steril kaplar içerisinde ve soğuk koşullarda laboratuvara getirilmiştir.

### Tereyağı Örneklerinin İzolasyon için Hazırlanması

Tereyağı örneklerinden LAB izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla tartılan 10 g tereyağı örneği 90 ml steril ¼ ringer çözeltisi ile homojen hale getirilmiş ve ¼ steril ringer çözeltisi ile 1/10 oranında seyreltilerek seri dilüsyonları hazırlanmıştır.

### İzolasyonda Kullanılan Besiyerleri

Tereyağı örneklerinden *Lc. diacetylactis*, *Lc. cremoris* izolasyonu için M17 agar besiyeri (Merck), diğer LAB için %0,01 sikloheksimid ilaveli deMan, Rogosa and Sharpe (MRS) agar besiyeri kullanılmıştır (Ravula ve Shah, 1998). Ekim yapılan Petri kutuları anaerob jar içerisinde Anaerocult A mini kit (Merck) kullanılarak 42°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında izolatların koloni morfolojisi, Gram reaksiyonları ve katalaz aktiviteleri incelenmiştir (Erkkila ve Petaja, 2000). Kok ve çubuk şekilli, sporsuz, Gram pozitif, katalaz negatif olan kolonilerin saf kültürleri elde edilip stoklanmıştır (Hartemink ve ark., 1997).

### İzolatların Sütü Koagüle Etme Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolatların sütü koagüle etme özelliğinin belirlenmesi için 110°C'de 10 dk sterilize edilerek hazırlanan %10'luk

yağsız süt tozu besi ortamına % 2 oranında aktif kültür aşılansarak 42°C'de 36 saate kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 16.ve 36. saatlerinde ortam pH'sı ölçülmüştür. 16 saate kadar sütü koagüle eden kültürler hızlı koagülasyon özelliğine sahip olarak, 36 saate kadar sütü koagüle edemeyen suşlar ise zayıf koagülasyon özelliğine sahip olarak nitelendirilmiştir (Hebert ve ark., 2001).

### **İzolatların Optimum Sıcaklık ve NaCl Konsantrasyonunda Gelişiminin Belirlenmesi**

Aktif kültürlerden steril MRS sıvı besi yerine %1 oranında inokülasyon yapılmış ve 4, 15, 30 ve 45°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda MRS sıvı besi yerinde bulanıklık oluşumuna göre değerlendirme yapılmıştır. Bulanıklık görülen tüpler pozitif, görülmeyenler ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Tuz toleransı için %2, 6 ve 10 NaCl içeren MRS sıvı besi yerine izolatlar %1 oranında aşılansmıştır. Bulanıklık görülen tüpler pozitif, görülmeyenler ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Morales ve ark., 2011; Cui ve ark., 2012).

### **İzolatların Diasetil Üretiminin Belirlenmesi**

İzolatlar 10 ml UHT süte inoküle edilmiş ve 30°C'de 24 s inkübe edilmiştir. Her hücre kültüründen 1 ml alınarak, üzerine 0,5 ml 1-naphthol (1% w/v) (Merck) ve KOH solüsyonu (16% w/v) damlatılmış ve 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Tüplerin yüzeyinde oluşan kırmızı halka diasetil oluşumu olarak değerlendirilmiştir (Franciosi ve ark., 2009).

### **İzolatların Sitrat Kullanımının Belirlenmesi**

Sitrat kullanımının belirlenmesi için kalsiyum sitrat agarda gelişen kolonilerin etrafında şeffaf zon oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Oliszewski ve ark., 2006).

### **İzolatların Amilolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi**

Yüzeyi kurutulmuş nişasta agar besi ortamına (Gordon ve ark., 1973) 24 saatlik kültürler inoküle edilmiş ve 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra besi yeri üzerine iyodin solüsyonu damlatılarak 15-30 dakika bekletilmiş ve amilolitik aktivite için şeffaf zon oluşumu incelenmiştir.

### **İzolatların Lipolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi**

Test edilecek bakteriler MRS sıvı besi yerinde geliştirildikten sonra tributyrin agara inoküle edilmiştir (Leuschner ve ark., 1997). Petriyer 4 gün boyunca 37°C'de inkübe edilmiş ve koloni etrafında oluşan şeffaf zonun çapı (mm) ölçülmüştür.

### **İzolatların Genetik Tanısının Yapılması**

İzolatların genomik DNA'ları ticari DNA ekstraksiyon kiti (Pure Link Genomic DNA Kit, Invitrogen K) kullanılarak, kullanma kılavuzunda belirtildiği şekilde ekstrakte edilmiştir. Elde edilen DNA 30 µl yıkama çözeltisi içerisinde toplanmış ve -20 °C'de saklanmıştır. 16S-ITS bölgesi literatürde belirtilen EGE1/L1 primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. Bu amaçla; İleri primer 5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3' (Dajonchio ve ark., 1998) ve Geri primer 5'-CAAGGCATCCACCGT-3' (Jensen ve ark., 1993) kullanılmıştır. Bu primerler 1800-2000 bp gen bölgesini çoğaltmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) 50 µl olarak hesaplanmış ve özel ince duvarlı PZR tüplerinde ve termal döngü cihazında (Bio-Rad, T100™ Thermal Cycler, ABD) gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonu için 1 örneğe toplamda 50 µl olacak şekilde 4 µl genomik DNA, 5 µl 10xreaksiyon buffer (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, ABD), 3 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM) (Fermentas, ThermoFisherScientific, ABD), 30,70 µl steril dH<sub>2</sub>O, 1 µl ileri primer (10 mM), 1 µl geri primer (10 mM), 5 µl dNTP karışımı (her biri 2 mM) (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, ABD), 0.30 µl Taq DNA polimeraz (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, ABD) hazırlanmıştır. Bu karışımın reaksiyonu termal döngü cihazı kullanılarak; 5 dakika boyunca 94°C'de, 1 dakika 40 döngüde 94°C'de denatürasyon, 1 dakika 42°C'de bağlanma, 1 dakika 72°C'de uzama ve 10 dakika 72°C'de son uzaması gerçekleştirilmiştir. 16S-ITS bölgesinin belirlenemediği örneklerde ise 16S rRNA bölgesi EGE1 (5'AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3') ve EGE2 (5'CTACGGCTACCTTGTTACCA-3') primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. Bu primerler için reaksiyon termal döngü cihazında 5 dakika boyunca 94°C'de, 1 dakika 40 döngüde 94°C'de denatürasyon, 1 dakika 56°C'de bağlanma, 1 dakika 72°C'de uzama ve 10 dakika 72°C'de son uzama olarak gerçekleştirilmiştir. PZR ürünleri %1'lik agaroz jelinde yürütülmüştür. Baz büyüklüğü tespiti için 1 kb DNA ladder (Fermentas SM0311) kullanılmıştır. Toksik olmayan GelRed (Biotium) boyası ile boyanan jel, görüntüleme sisteminde (Bio-Rad, Gel Doc™ Ez Imager, ABD) görüntülenmiştir.

### **Dizi Analizi**

Bakterilerin dizi analizi BM Lab. Sis.Ltd.Şti'ne yaptırılmıştır. Elde edilen elektroferogramlar FinchTV ve BioEdit software programı kullanılarak analiz edilmiş ve DNA dizileri Nucleotide Blast (URL-1, 2020) kullanılarak karşılaştırılmıştır.

### **BULGULAR VE TARTIŞMA**

20 adet tereyağı örneğinden 101 adet LAB izole edilmiştir. İzolatların sütü koagüle etme özellikleri incelendiğinde; izolatların 70 adedi hızlı koagülasyon özelliğine

sahipken, inkübasyon sonrası izolatların 31 adedinin 16 saatte pH'yı 6.0'nın altına düşüremediği belirlenmiş ve bu izolatlar zayıf koagülaz olarak tanımlanmıştır. 60 izolatin pH'sı 5-6 arasında tespit edilirken, 10 adet izolatin ise (TY8G, TY9H, TY14C1, TY16E, TY16F, TY18C, TY18F, TY18K, TY20B ve TY20C) pH'yı 4 ile 5 arasında düşürdükleri belirlenmiştir. Haddadin (2005) tarafından yapılan araştırmada *Lactococcus lactis* suşunun 30°C'de 6 saatlik inkübasyonda en hızlı pıhtılaşmayı gösterdiği belirtilmiştir. Bir başka çalışmada ise, Iduoi ve Karam (2008) inek sütünden yapılan geleneksel tereyağından izole edilen *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus curvatus*'un en hızlı asit üretici olduğunu belirtmiştir. Joković ve ark. (2014) kaymak üretiminde kullanılan süt ve üç adet kaymak örneğinden 178 LAB izolatu elde etmiştir. Yapılan araştırmada streptokokların dört adedinin inkübasyondan 6 saat sonra pH'yı 5,30 civarına düşürdüğü belirlenmiştir. Laktokok suşlarının süt ortamında başlangıç pH'sının streptokoklardan daha düşük olduğu ancak 24 saatlik inkübasyon sonunda pH'nın 4.40'a düştüğü belirlenmiştir. Araştırmada enterokok suşlarının zayıf asit üreticisi oldukları belirlenmiş ve izolatların hiçbirinin 24 saat sonunda pH'yı düşüremediği belirtilmiştir.

Optimum sıcaklık ve NaCl konsantrasyonu deneyleri sonucunda; %10 tuz konsantrasyonunda ve 4°C de bakteri gelişiminin zayıf olduğu gözlemlenmiştir. LAB'nin yüksek tuz konsantrasyonu ve düşük sıcaklıklarda zayıf gelişme gösterdiği bilinmektedir. Yaptığımız deneylerde bu sonucu doğrulamaktadır. Yapılan testler sonucunda örneklerin 15, 30 ve 45°C'de tamamına yakınının iyi geliştiği belirlenmiştir. 15°C'de 2 adet zayıf gelişme belirlenirken, 45°C'de 1 tane zayıf gelişme tespit edilmiş, 2 adedinde ise gelişme olmadığı görülmüştür. 4°C'de bakterilerin yaklaşık %52'si zayıf gelişme gösterirken, %47'si gelişmemiştir. Bakteriler %2 ve 6 NaCl konsantrasyonunda iyi gelişme göstermişlerdir; ancak %10 NaCl konsantrasyonunda yaklaşık %41'i zayıf gelişme gösterirken, %32'sinin %10 NaCl'yi tolere edemedikleri tespit edilmiştir. Iduoi ve Karam (2008) tarafından yapılan araştırmada geleneksel tereyağından elde edilen 26 izolattan Gram pozitif basil olanlardan 21 tanesi 15°C'de gelişirken, hiçbirisi 45°C'de ve %6,5 tuz oranında gelişmemiştir. Gram pozitif kok olan 4 izolatin ise 10°C'de gelişebildiği ancak 45°C ve %6,5 tuz konsantrasyonunda gelişemedikleri belirlenmiştir.

Bakterilerin diasetil oluşumunun belirlenmesi için yapılan deneyde 101 izolatin 6 adedinde yoğun gelişme, 6

adedinde normal gelişme, 24 adedinde ise zayıf gelişme tespit edilirken, 65 adedinde diasetil üretimi tespit edilmiştir. Diasetil belirli LAB tarafından üretilen sitrat metabolizması ürünü olan uçucu bir bileşiktir ve lezzet oluşumuna doğrudan katkıda bulunması sebebiyle endüstriyel üretimde bakterilerde aranan önemli bir özelliktir (Rincon-Delgadillo ve ark., 2012). Ribeiro ve ark. (2013) yaptıkları araştırmada, *Lc. lactis*'in en yüksek diasetil üreticisi olduğunu, 4 *Enterococcus* suşunun orta seviyede diasetil üretirken, sadece bir *Enterococcus* suşunda (L3A1M3) diasetil üretiminin tespit edilmediğini belirtmişlerdir.

İncelenen izolatların 38 adedinde sitrat kullanımı, 57 adedinde ise amilolitik aktivite tespit edilmiştir. Joković ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada, kaymak üretiminde kullanılan süt ve üç adet kaymak örneğinden 178 LAB izole edilmiştir. Araştırmada incelenen *Lc. lactis* ve *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* suşları iyi asidifikasyon ve proteolitik özellik gösterirken, *Leuconostoc mesenteroides* suşlarının sitratı metabolize edebildiği ve endüstriyel kaymak üretiminde başlatıcı kültür olarak kullanılabilirlikleri belirtilmiştir. Araştırmamızda amilolitik aktivite, incelenen 101 izolattan 57 adedinde belirlenmiştir. İncelenen 44 izolatta amilolitik aktivitenin tespit edilememesi, bu izolatların nişasta substratlarının sakkarifikasyonunda ve sıvılaştırılmasında etkili olmadıkları şeklinde açıklanabilir (Mechai ve ark., 2014). Bakterilerin lipolitik aktiviteleri incelendiğinde 82 izolatta lipolitik aktivite tespit edilmezken, sadece 19 adedinde lipolitik aktivite belirlenmiştir. Lipoliz, lipidlerin lipaz gibi lipolitik enzimlerin etkisi ile gliserin ve yağ asitlerine hidrolize edildiği işlemdir. LAB'nin lipaz aktivitesi, cins ve türe göre değişir. Süt, yoğurt ve tereyağı gibi ürünlerde lipolitik aktivite çok istenirse de, bazı peynir türlerinde aroma ve yapı oluşumu açısından belirli bir lipoliz seviyesi istenir (Yerlikaya, 2019). Fermente süt ürünlerinde LAB'nin diğer mikroorganizma gruplarına kıyasla genellikle zayıf lipolitik olduğu düşünülmektedir (Papamanoli ve ark., 2003; Mechai ve ark., 2014). Ammor ve ark. (2006) tarafından yapılan araştırmada da *Lactobacillus* suşlarının çoğunda lipolitik aktivite belirlenmemiştir. Bettache ve ark. (2012), Cezayir'in batı bölgesinden topladıkları 5 adet tereyağ örneğinden 76 adet LAB izole etmişlerdir. İncelenen izolatlardan sadece 1'er adet *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşunda lipolitik aktivite tespit edilmiştir.

**Tablo 1.** Genetik tanısı yapılmış bakterilerin örneklerinin alındığı şehirler, tanımlama güvenilirliği, kullanılan primerler ve nükleotid dizi erişim numaraları

Bakteriler	Örneğin Alındığı Şehir	Tanımlama Güvenilirliği	Kullanılan Primer Çifti	Nükleotid Dizi Erişim Numarası
<i>Ent. faecium</i> TY3-3	Antalya	99	E1/L1	MK007100
<i>Ent. faecalis</i> TY5-B	Burdur	100	E1/L1	MK007103
<i>Ent. faecium</i> TY5-1	Afyonkarahisar	100	E1/L1	MK007101
<i>L. casei</i> TY9-I	Burdur	99	E1/L1	MK007102
<i>P. acidilactici</i> TY11-1A	Burdur	100	E1/L1	MH879585
<i>P. acidilactici</i> TY15-2	Burdur	99	E1/L1	MH879582
<i>L. casei</i> TY18-4	Burdur	99	E1/L1	MK007104

**Tablo 2.** Genetik tanısı yapılmış bakterilerin farklı sıcaklık, tuz konsantrasyonunda gelişme ve koagülasyon özellikleri

Bakteriler	15°C	30°C'	45°C'	% 2 NaCl	% 6 NaCl	% 10 NaCl	pH 16 s	pH 32 s
<i>Ent. faecium</i> TY3-3	+	+	+	+	+	ZG	5,31	5,03
<i>Ent. faecalis</i> TY5-B	+	+	+	+	+	+	5,94	5,28
<i>Ent. faecium</i> TY5-1	+	+	+	+	+	-	5,20	5,03
<i>L. casei</i> TY9-I	+	+	+	+	+	+	5,49	4,67
<i>P. acidilactici</i> TY11-1A	+	+	+	+	+	ZG	5,43	5,03
<i>P. acidilactici</i> TY15-2	-	+	-	+	+	ZG	5,19	5,10
<i>L. casei</i> TY18-4	+	+	+	+	+	ZG	5,12	5,09

(Z.G): Zayıf Gelişme, (+): Gelişme var, (-): Gelişme yok

**Tablo 3.** Genetik tanısı yapılmış bakterilerin diasetil üretimi, lipolitik, amilolitik aktivite ve sitrat kullanım özellikleri

Bakteri adı	Diasetil Üretimi	Lipolitik Aktivite (mm)	Amilolitik Aktivite	Sitrat Kullanımı
<i>Ent. faecium</i> TY3-3	-	19,06	+	-
<i>Ent. faecalis</i> TY5-B	+++	-	+	-
<i>Ent. faecium</i> TY5-1	+++	19,69	+	+
<i>L. casei</i> TY9-I	+++	-	+	-
<i>P. acidilactici</i> TY11-1A	+++	-	+	+
<i>P. acidilactici</i> TY15-2	+	-	+	+
<i>L. casei</i> TY18-4	++	-	+	+

(-): Gelişme yok, (+): Gelişme var, (++) : Normal gelişme, (+++) : Yoğun gelişme

Yapılan deneyler sonucunda farklı özellikler gösteren 7 adet izolat seçilip genetik tanı testi yapılmıştır. Genetik tanı sonuçlarına göre seçilen izolatlar *Enterococcus faecalis* TY5-B, *Enterococcus faecium* TY3-3, TY5-1 *Lactobacillus casei* TY9-1 ve TY18-4 ve *Pediococcus acidilactici* TY11-1A, TY15-2 olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan bakterilerin özellikleri Tablo 1, 2 ve 3'de belirtilmiştir. Bettache ve ark. (2012)'nin izole ettiği 76 adet LAB içerisinde baskın floranın *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* olduğu belirlenmiştir. Tanımlanan diğer gruplar piyogenik streptokok ve enterokoklardır. Baskın laktokok türleri *Lc. lactis* olarak tespit edilirken, *Leuconostoc*'ların %83'ü *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* olarak belirlenmiştir. Tanımlanan diğer bakteriler ise *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ve *L. plantarum*'dur. Joković ve ark. (2014)'nin araştırmasında, süt örneklerinde *Lc. lactis* ve *Ent.faecium* baskın olarak bulunurken, kaymak örneklerinde *Leu. mesenteroides* ve *Enterococcus durans*'ın baskın olduğu belirlenmiştir. Mourad ve Bettache (2018) tarafından yapılan çalışmada ise, Kuzey Cezayir'in Djelfa bölgesinden toplanan 5 adet tereyağı örneğinden izole edilen 177 adet izolatın 79 adet LAB tanımlanmıştır. Araştırma sonunda en baskın bulunan türler *Lactobacillus alimentarius* (%15,19), *L. plantarum* (%22,78), *Lactobacillus fermentum* (%18,99), *Lactobacillus brevis* (%6,33), *Lc. lactis* (%12,66), *Lc. cremoris* (%6,33), *Leu. mesenteroides* (%6,33) ve *Ent. faecalis* (%11,39) olarak belirlenmiştir. Enterokokların patojenitesine ilişkin kaygılara rağmen, son çalışmalar gıda ve et enterokoklarının, özellikle *Ent.faecium*'un klinik suşlardan çok daha düşük bir patojenite potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (Hugas ve ark. 2003).

Yapılan bu çalışmada *halk pazarlarından toplanan* tereyağı örneklerinden izole edilen LAB'nin bazı teknolojik özellikleri belirlenmiş ve en iyi teknolojik özelliğe sahip olan suşların genetik tanısı yapılmıştır. Bu çalışmada teknolojik özellikleri belirlenmiş olan *L. casei* TY9-1, TY18-4 ve *P. acidilactici* TY11-1A, TY15-2 suşlarının farklı tereyağların üretiminde kullanılacağı yeni araştırmaların planlanması önemlidir. Yapılacak yeni araştırmalarla teknolojik özellikleri incelenmiş olan diğer izolatların genetik tanısının yapılması ve LAB'nin endüstriyel uygulamalarda önemli olan diğer teknolojik özelliklerinin belirlenmesi planlanmaktadır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma 2018 yılı TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı tarafından desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Abdelbasset, M., Djamila, K. (2008). Antimicrobial activity of autochthonous lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk "Raïb". *African Journal of Biotechnology*. 7: 2908-2914.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1 – screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*. 17: 454-461.
- Bettache, G., Fatma, A., Miloud, H., Mebrouk, K. (2012). Isolation and identification of lactic acid bacteria from Dhan, a traditional butter and their major technological traits. *World Applied Sciences Journal*. 17(4): 480-488.
- Bilgin, M., Kirbaşlar, Ş., Özcan, Ö., Dramur, U. (2014). Bütirik asidin ekstraksiyonunda çözücü seçimi. 6. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, UKMK-6. İzmir, Türkiye.
- Cui, F., Wan, C., Li, Y., Liu, Z., Rajashekara, G.B. (2012). Coproduction of lactic acid and *Lactobacillus rhamnosus* cells from whey permeate with nutrient supplements. *Food Bioprocess Technology*. 5: 1278–1286.
- Dajonchio, D., Borin, S., Consolandi, A., Mora, D., Manachini, P.L., Sorlini, C. (1998). 16S-23S rRNA internal transcribed spacers as molecular markers for the species of the 16S rRNA group of the genus *Bacillus*. *FEMS Microbiology Letters*. 163: 229-236.
- Erkkilä, S., Petaja, E. (2000). Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*. 55: 297-300.
- Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A., Poznanski, E. (2009). Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal*. 19(1): 3–11.
- Gordon, R. E., Haynes, W. C., Pang, C. H.N. (1973). *The Genus Bacillus*. Washington, D.C. United States Department of Agriculture.
- Hartemink, R., Van Laere, K.M.J., Rombouts, F.M. (1997). Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*. 83: 367-374.
- Hebert, E.M., De Giori, G., Raya, R. (2001). Isolation and characterization of a slowly milk-coagulating variant of *Lactobacillus helveticus* deficient in purine biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 1846–1850.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T. (2003). Functionality of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology*. 88(2-3): 223–233.
- Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., Starrenburg, M., Delcour, J., De Vos, W., Hols, P. (2000). *Lactococcus lactis* as a cell factory for high-level diacetyl production. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (9): 4112–4114.
- Holzappel, W. (1997). Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control*. 8: 241-258.
- Idoui, T., Karam, N. (2008). Lactic acid bacteria from Jijel's traditional butter: isolation, identification and major technological traits. *Grasas Y Aceites*. 59(4): 361-367.
- Jensen, M.A., Webster, J.A., Straus, N. (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 945-95.
- Joković, N., Rajković, J., Veljović, K., Tolinački, M., Topisirović, L. (2014). Screening of lactic acid bacteria isolated from

- Serbian kajmak for use in starter cultures. *Biologica Nysana*. 5(1): 37-46.
- Karaca, H., Dincer, E., Merih, K. (2010). Metabolik mühendisliğinde laktik asit bakterileri. *Akademik Gıda*. 8(1): 32-38.
- Katz, M., Medina, R., Gonzalez, S., Oliver, G. (2002). Esterolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria isolated from ewe's milk and cheese. *Journal of Food Protection*. 65: 1997-2001.
- King, N. (1948). Modification of the voges-proskauer test for rapid colorimetric determination of acetylmethyl carbinol plus diacetyl in butter cultures. *Dairy Industry*. 13: 860-866.
- Leuschner, R.G., Kenneally, P.M., Arendt, E.K. (1997). Method for the rapid quantitative detection of lipolytic activity among food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 37: 237-240.
- Madera, C., Garcia, P., Janzen, T., Rodriguez, A., Suarez, J.E. (2003). Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. *International Journal of Food Microbiology*. 86: 213-222.
- Mechai, A., Debabza, M., Kirane, D. (2014). Screening of technological and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk products. *International Food Research Journal*. 21(6): 2451-2457.
- Morales, F., Morales, J., Hernández, C., Hernández-Sánchez, H. (2011). Isolation and partial characterization of halotolerant lactic acid bacteria from two Mexican cheeses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 164: 889-905.
- Mourad, G., Bettache, G. (2018). Characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional butter produced in Djelfa province of Algeria. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 15(3): 737-746.
- Oliszewski, R., González, S.N., Pérez Chaia, A.B. (2006). Identification and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from goat milk and artisanal cheeses of the Argentine Northwest. *Revista Argentina de Lactología*. 24: 47-58.
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., Kotzekidou, P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*. 65: 859-867.
- Ravula, R.R., Shah, N.P. (1998). Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurts and fermented milk drinks. *Biotechnology Techniques*. 12: 819-822.
- Ribeiro, S.C., Coelho, M.C., Todorov, S.D., Franco, B.D.G.M., Dapkevicius M.L.E., Silva C.C.G. (2013). Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from pico cheese an artisanal cow's milk cheese. *Journal of Applied Microbiology*. 116: 573-585.
- Rincon-Delgadillo, M. I., Lopez-Hernandez, A., Wijaya, I., Rankin, S. A. (2012). Diacetyl levels and volatile profiles of commercial starter distillates and selected dairy foods. *Journal of Dairy Science*. 95(3): 1128-1139.
- Sağdıç, O., Arıcı, M., Şimşek, O. (2002). Selection of starters for a traditional Turkish yayık butter made from yoghurt. *Food Microbiology*. 19: 303-312.
- URL-1 (2020). <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (Erişim Tarihi: 22.05.2020)
- Van Hylckama Vlieg, J.E.T., Hugenholtz, J. (2007). Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavour and health benefits. *International Dairy Journal*. 17(11): 1290-1297.
- Yerlikaya, O. (2019). Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. *Journal of Dairy Science*. 102: 1.