

TİCARİ YOĞURT ÖRNEKLERİNDEN CANLI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE SAYIMI¹

Yusuf DURAK¹, Ahmet UYSAL²†, Mustafa Onur ALADAĞ², Duygu AKIN³

¹ Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Kampüs, Konya, Türkiye

² Selçuk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Laboratuvar Bölümü,
Kampüs Konya, Türkiye

³ Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Anatomi Bölümü, Konya Türkiye

e-posta: ahuysal@selcuk.edu.tr

(Geliş:01 Haziran 2015; Düzeltme: 14 Ağustos 2015; Kabul: 02 Eylül 2015)

Özet: Bu çalışmada, marketlerde satılan çeşitli markalara ait yoğurt örneklerinin canlı laktik asit bakteri yoğunluğu araştırıldı. Yoğurt örnekleri satın alındı ve laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve sayımı yapıldı. Yoğurt kültürü bakterilerinden *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* 'un sayımında Terzaghi ve Sandine (1975), tarafından önerilen M17 agar (Oxoid) kullanıldı. İnoküle edilen plaklar 37°C'de 48 saat inkübe edildi ve sayımlar koloni oluşturan birim (kob)/g olarak belirtildi. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*'un sayımında ise de Man Rogosa Sharp Agar (MRS agar, Oxoid) kullanıldı. Plaklar 37°C'de 72 saat inkübe edildi ve sayımlar kob/g olarak belirtildi. İzole edilen kolonilerin mikroskopik ve makroskopik incelemeleri yapıldı. Yoğurt örneklerinin 1 gramındaki laktik streptokokların sayısı en düşük 10⁶ ve en yüksek 10⁸ kob olarak sayıldı. Laktobasillerin 1 g yoğurttaki kob sayıları en düşük 10⁵ ve en yüksek 10⁸ olarak belirlendi. Yoğurt kültürünü oluşturan bu bakterilerin birbirine oranının 1/1 oranına yakın olduğu görüldü. Dört yoğurt markasında, bir hafta ara ile yeniden alınan ve incelenen örneklerde yapılan iki sayımda da laktobasillere rastlanmadı. Bu markaya ait yoğurt örneklerindeki laktobasillerin inhibe olması nedeni ile yoğurt standardına uygun olmadıkları, diğer örneklerde belirlenen toplam canlı laktik asit bakteri sayılarının ise yoğurt standartlarındaki sayılara yakın değerde olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Ticari yoğurtlar; *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*; *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*; yoğurt kalitesi; bakteri sayımı.

¹Bu çalışma, 2009 Ulusal Biyoteknoloji Kongresi'nde poster bildiri olarak sunulmuş ve sadece özeti yayımlanmıştır.

ISOLATION AND COUNTING OF LIVING LACTIC ACID BACTERIA FROM COMMERCIAL YOGHURT SAMPLES

Abstract: In this study, intensity of live lactic acid bacteria in yoghurt samples of various brands sold on the market were investigated. Yoghurt samples were purchased and the isolation and enumeration of lactic acid bacteria were performed. M17 agar (Oxoid) advised by Terzaghi and Sandine (1975) was used to enumeration of *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* yoghurt culture bacteria. Inoculated plates were incubated at 37°C for 48 h and counts were expressed as colony performing unit (cfu)/g. Also de Man Rogosa Sharp Agar (MRS agar, Oxoid) was used for enumeration of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Plates were incubated at 37°C for 72 h and counts were expressed as cfu/g. Microscopic and macroscopic investigations of colonies which were isolated were done.

The numbers of lactic streptococci in 1 g of yoghurt samples were counted as minimum 10^6 and maximum 10^8 cfu. The cfu numbers of lactobacilli in 1 g of yoghurt were determined as the lowest 10^5 and the highest 10^8 . It was seen that the ratio of these bacteria, forming yoghurt culture, were found to be close to 1/1. In both enumerations in the examined samples lactobacilli were not found in four brands of yoghurt which were re-taken for a week. It was concluded that, due to the inhibition of lactobacilli in examined samples, four brands of yoghurt were not suitable according to yoghurt standards and the total numbers of live lactic acid bacteria identified in other samples were close to the number of standard yogurt values.

Keywords: Commercial yoghurts; *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*; *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*; quality of yoghurt; bacteria enumeration

1. Giriş

Süt ve süt ürünleri ile ilgili çalışmaların geçmişi insanlık tarihi kadar eskidir. Günümüzden 4500 yıl öncesine ait bir Mezopotamya mühründe, bereket tanrıçasının önünde bir keçinin sağlığı gösterilmektedir. Kutsal kitaplarda da süt sığırları ile süt, yağ, peynir ve süt ürünlerinin ekonomiye olan katkılarından söz eden 150'ye yakın genel referansa rastlanmaktadır. Süt eski Mısır ve Hindistan'da dini merasimlerde kullanılırken, bazı ülkelerde de ilaç yerine kullanılmıştır. Orta Asya'da Kırgızların, Arabistan'da bedevilerin ve Afrika'da Bantus'ların temel gıda maddelerinin süt ve süt ürünleri olduğu bilinmektedir. Sütçülüğün çok eski geçmişi olmasına rağmen, gelişmesi oldukça geç ve yavaş olmuştur. Kimya, biyoloji, fizyoloji, bakteriyoloji, zooloji, beslenme ve insan sağlığı gibi birçok bilim dallarında görülen gelişmeler, süt endüstrisinin de gelişmesine katkı sağlamıştır. Pastör'ün 1850'lerin sonlarına doğru yayınladığı "Laktik Asit Fermentasyonu" adlı çalışması, süt teknolojisinin gelişmesine ivme kazandırmıştır (Konar 1998).

Süt, insanlar için olduğu kadar, mikroorganizmalar için de çok önemli bir besin kaynağıdır. Sağlıklı hayvanlardan hijyenik şartlarda ve uygun bir sağım tekniği ile elde edilen çiğ süt, çok az sayıda mikroorganizma barındırır. Mikroorganizmalar süte iki yol ile bulaşır: 1. Sağımdan önce hastalıklı hayvanın meme bezlerinden (Örn: Tüberküloz ve Malta humması etkeni bakteriler); 2. Sağımdan sonra ortamdan bulaşma (Örn: *Salmonella* ve *Staphylococcus* cinsi bakteriler). Mikroorganizmalar süt içerisinde hızla çoğalır. Bir damla kesilmiş sütte 50 milyon kadar bakteri hücresi bulunur. Sütte hem yararlı hem de zararlı mikroorganizmalar bulunabilir. Bunlar; bakteriler, küfler, mayalar ve bakteriyofajlardır. Sütte en çok bulunan bakteriler, laktozu parçalayabilen ve ekşimeye neden olanlardır. Asitlik belirli bir sınırı aşarsa süt hemen kesilir. Bunların bir grubu laktozu yalnız laktik aside dönüştürdüğü için homofermentatif, diğer bir grubu ise laktik asit ile birlikte aset aldehit, alkol ve gazları meydana getirdiği için heterofermentatif olarak adlandırılırlar (Konar 1998; Tekinşen ve ark., 2002).

Yoğurt, Türk Standartlar Enstitüsü'nün 1330 sayılı standardında "çiğ süt veya pastörize süt standartlarına uygun, tercihen homojenize edilmiş sütlerin *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*'un etkisiyle laktik asit fermentasyonu

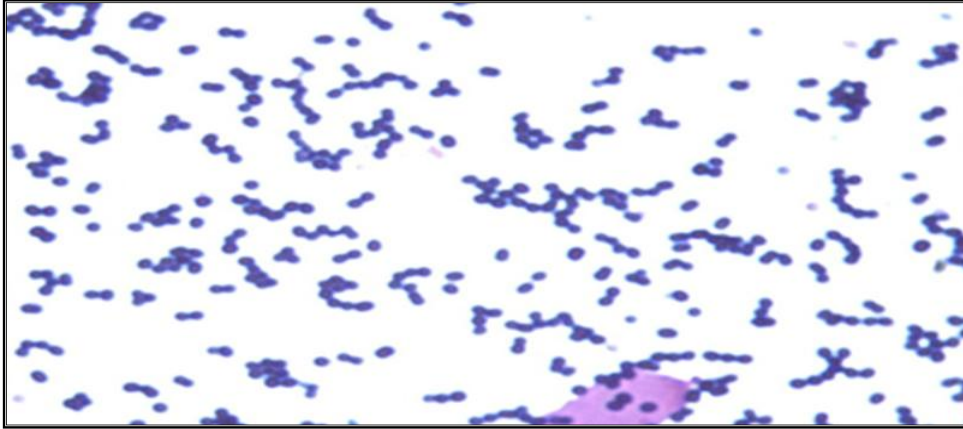
sonucu elde edilen ve yoğurt kültürlerini canlı olarak içeren fermente bir süt ürünüdür” şeklinde tanımlanmıştır (Konar 1998; Tekinşen ve ark., 2002; Durak ve ark., 2008).

Çalışmamızda, ticari yoğurt örneklerindeki canlı bakterilerin kültürü, izolasyonları ve sayımları yapılarak, yoğurdun içerdiği laktik asit bakterileri yönünden kalitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

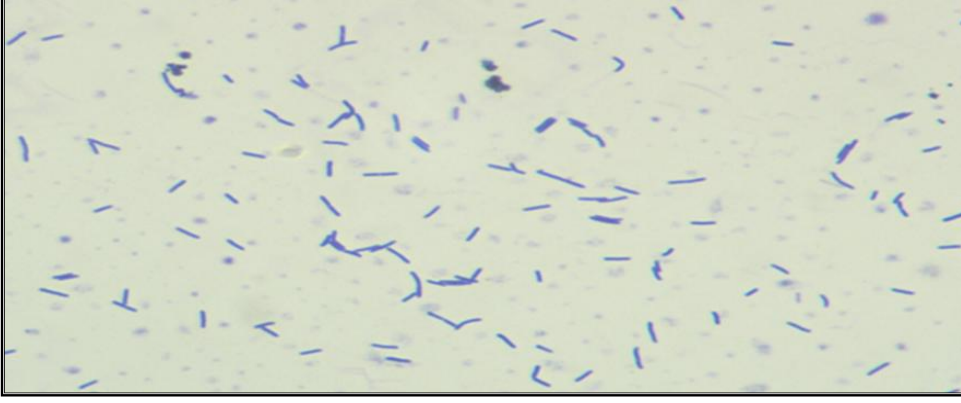
Konya İl merkezindeki hipermarketlerde satılan 16 farklı markadan Yoğurt örnekleri satın alındı. Kullanılıncaya kadar buzdolabında + 4°C’de saklandı. Örneklerin dilüsyonu için % 0.9’lık steril serum fizyolojik, laktik asit bakterilerinin incelenmesi için, de Man Rogosa Sharpe (MRS, Oxoid) Agar ve M17 Agar besiyerleri kullanıldı (Anonim 1982).

Yoğurt kültürü bakterilerinden *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*’un izolasyonu ve sayımı için Terzaghi ve Sandine (1975), tarafından önerilen M17 besiyeri kullanıldı. 48.25 g toz halindeki besiyeri 950 ml distile su içerisinde süspanse edildi ve kaynama derecesine kadar ısıtıldı. Otoklav’da 121°C’de 15 dakika steril edildi. 50°C’ye soğutulduktan sonra 50 ml steril laktoz solüsyonu (% 10 w/v) ilave edildi. Besiyeri çok hızlı bir şekilde steril 9 cm çapındaki petri kutularına 25’er ml olarak dağıtıldı. Her yoğurt örneğinden 10 gram tartılarak 90 ml steril SF bulunan erlenmayer içerisinde homojenize edildi. Buradan alınan 10 ml’lik süspanسیون (1:10 g/ml), onar katlı ilerletilen seri dilüsyonlar halinde 10⁻⁵ oranına kadar seyreltildi. Her dilüsyon tüpünden alınan 0.1 ml’lik süspanسیونlar iki paralelli olarak M17 Agar besiyeri plaklarının yüzeyine cam baget yardımı ile homojen bir şekilde dağıtıldı. Plaklar 37°C’de 48 saat inkübe edildi. 24 ve 48 saat sonra plaklar incelendi. Plaklarda gelişen kolonilerden gram boyama ve katalaz testi yapıldı. Gram (+) ve katalaz (-) olanlar *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* olarak doğrulandı (Şekil 1) (Terzaghi ve Sandine, 1975).



Şekil 1. Gram pozitif Streptokoklar

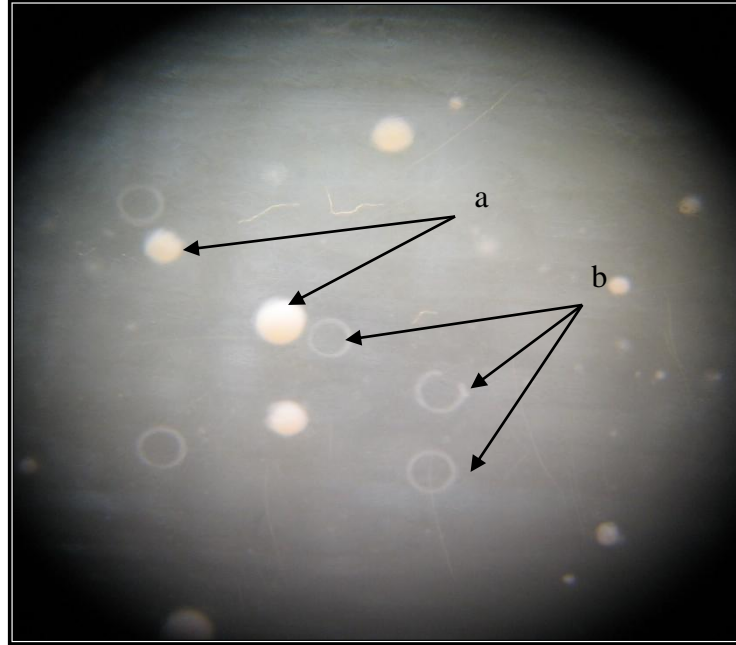
Yoğurt kültürü bakterilerinden *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*’un sayımında ise MRS Agar (Oxoid) kullanıldı. 62 g toz halindeki besiyeri 1000 ml distile su içerisinde süspanse edildi. Besiyeri homojen hale gelinceye kadar kaynatıldı. 121°C’de 15 dakika steril edildi. 45-50°C sıcaklıkta iken 9 cm çapındaki steril petri kutularına 15’er ml olarak dağıtıldı. Katılaştıran bu alt tabakaya her dilüsyon tüpünden alınan 0.1 ml’lik süspanسیونlar iki paralelli olarak cam baget yardımı ile homojen bir şekilde dağıtıldı. Geri kalan besiyeri eritilerek, her bir ekilmiş plağın üzerine 10’ar ml olarak ilave edildi. Katlı ekim tarzındaki bu plaklar 37°C’de 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda plaklar incelendi. Üreme gösteren kolonilerden gram boyama yapılarak *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*’un ön tanısı gerçekleştirildi (Şekil 2) (Terzaghi ve Sandine, 1975).



Şekil 2. Gram pozitif Laktobasiller

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

İnkübasyon süresi sonunda M17 Agar besiyeri üzerinde gelişen 3-4 mm çapındaki laktoz (+) normal streptokok kolonileri (Şekil 3a), 1 mm'den daha küçük çaptaki laktoz (-) mutant streptokok kolonileri ve laktik streptokoklara özgü olan faj plakları (Şekil 3b) ayrı ayrı sayılarak dilüsyon yüzdeleri ile çarpıldı ve 1 g yoğurttaki sayıları belirlendi (Tablo 1).



Şekil 3a. Sağlıklı laktik streptokok kolonilerinin mikroskopik görünümü (4x10)

3b. Laktik streptokoklara ait faj plaklarının mikroskopik görünümü (4x10)

Tablo 1. *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* bakteri suşlarının ve oluşan faj plaklarının incelenen yoğurt örneklerindeki dağılımları ve sayıları

Örnek No	M17 Agar			MRS Agar
	Normal Streptokok (kob/g)	Mutant Streptokok (kob/g)	Faj Plakları (pob/g)	Laktobasil
1	4.4x10 ⁶	5.5x10 ⁶	3.9x10 ⁶	1.5x10 ⁸
2	1.8x10 ⁷	3x10 ⁸	Ø	2.6x10 ⁷
3	7.7x10 ⁷	1.3x10 ⁸	Ø	6x10 ⁶
4	2.8x10 ⁷	Ø	Ø	6.4x10 ⁸
5	2.1x10 ⁶	Ø	Ø	6.3x10 ⁶
6	7x10 ⁶	3x10 ⁶	Ø	Ø
7	4x10 ⁸	2.1x10 ⁸	Ø	5.7x10 ⁷
8	2.3x10 ⁸	2.4x10 ⁸	Ø	4.9x10 ⁷
9	1.6x10 ⁸	1.1x10 ⁸	Ø	3x10 ⁷
10	2.5x10 ⁸	1.6x10 ⁸	Ø	Ø
11	1.7x10 ⁸	1.8x10 ⁸	Ø	Ø
12	2.1x10 ⁸	2.5x10 ⁸	Ø	Ø
13	2.3x10 ⁸	Ø	Ø	1x10 ⁵
14	4.8x10 ⁷	2x10 ⁷	Ø	4x10 ⁵
15	2.9x10 ⁷	4.4x10 ⁷	Ø	3.6x10 ⁸
16	2.1x10 ⁷	Ø	Ø	1x10 ⁶

Ø: Belirlenemedi. Kob: koloni oluşturan birim Pob: Plak oluşturan birim

Tabakalı bir şekilde hazırlanan ve ekilen MRS agar besiyeri içinde, inkübasyondan sonra üreme gösteren yoğun görümlü veya tüylü görümlü küçük, opak ve beyaz renkli koloniler sayıldı (Şekil 4) (Tablo 1).

Normal koloni görümlü laktik streptokoklar en düşük 10⁶ ve en yüksek 10⁸ kob/g olarak belirlendi. Laktobasiller ise en düşük 10⁵ ve en yüksek 10⁸ kob/g olarak sayıldı. Yoğurt kültürünü oluşturan bu bakterilerin birbirine oranının 1/1 oranına yakın olduğu görüldü. 1 nolu örnekte 3.9x10⁶ plak oluşturan birim/gram (pob/g) sayıda faj plakları görüldü. 4, 5, 13, 16 nolu örneklerde mutant streptokok kolonileri üremedi. Diğer örneklerde üreyen mutant streptokok koloni sayıları, aynı örneklerdeki normal streptokok koloni sayıları ile benzerlik gösterdi. 6, 10, 11 ve 12 nolu örneklerden bir hafta ara ile alınan ve ikinci kez incelenen örneklerinden de laktobasiller izole edilemedi (Tablo 1).

Şireli ve Özdemir (1998), yoğurt kültürünü oluşturan *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* bakteri sayılarını meyveli yoğurt örneklerinde genel olarak 10⁶-10⁸ kob/ml arasında bulduklarını bildirmişlerdir. Bu sayılar, çalışmamızda aynı tür bakterilerin bulunan sayıları ile yakın değerlerde görüldü (Tablo 1). Güven ve ark.(2004), kefir mikroflorasını araştırdıkları çalışmalarında, laktik asit bakterilerini 9.87x10⁸ kob/ml ve laktik streptokokları 4.38x10⁸ kob/ml olarak saptamışlardır. Kefirde belirlenmiş bulunan laktik asit bakteri sayıları ile laktik streptokok sayılarının, çalışmamızda belirlenen laktokok ve laktobasil bakteri sayılarına yakın oldukları belirlendi (Tablo 1). Durak ve ark.(2008), ev yapımı yoğurtlarda toplam

laktik asit bakteri sayılarını ortalama 1.89×10^8 kob/g olarak bulduklarını açıklamışlardır. Bu sayının, ticari yoğurt örneklerinde tespit ettiğimiz sayılardan oldukça düşük olduğu sonucuna varıldı (Tablo 1).



Şekil 4. Laktobasil kolonilerinin mikroskopik görünümü (4x10)

Sonuç olarak, ticari yoğurt örneklerinde belirlenen canlı laktik asit bakteri sayılarının yoğurt standartlarındaki sayılara yakın bulunduğu, bazı yoğurt örneklerindeki laktobasillerin inhibe olduğu, örneklerin çoğundan mutant streptokokların ürediği ve yalnız bir örnekte faj plaklarının geliştiği değerlendirildiğinde; ticari yoğurtların laktik mikroflora yönünden iyi durumda olduğu, mutant streptokoklar ile inhibe olan laktobasillerin hangi faktörlerden etkilendiklerinin araştırılması gerektiği sonucuna varıldı (Anonim 1989; Anonim 2001).

Kaynaklar

- Anonim. (2001). Türk Gıda Kodeksi. T.C. Resmi Gazete. Ankara.
- Anonim.(1989). Yoğurt. T.S. 1330. T.S.E. Ankara.
- Anonymus (1982). The Oxoid Manual. Fifth Edition. Published by OXOID Limited. Wade Road, Basingstoke, England.
- Durak Y, Keleş F, Uysal A, Aladağ MO (2008). Konya yöresi taze ev yapımı yoğurtların mikrobiyolojik özelliklerinin araştırılması. *Selçuk Üniv.Ziraat Fak.Dergisi*. **22(44)**: 113-117.
- Güven A, Güven A, Kamiloğlu NN (2004). Kefirin lipid peroksidasyonuna etkilerinin araştırılması. *Kafkas Üniv.Vet.Fak.Derg.* **10(2)**:165-169.
- Konar A. (1998). Süt Teknolojisi. Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Ofset Atölyesi. Adana.
- Şireli UT, Özdemir H (1998). Ankara’da tüketime sunulan meyveli yoğurtların mikrobiyolojik kalitesi. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* **45**: 287-293.
- Tekinşen OC, Atasever M, Keleş A, Tekinşen KK (2002). Süt, Yoğurt, Tereyağı, Peynir Üretim-Kontrol. Selçuk Üniv. Basımevi. Konya.
- Terzaghi BE, Sandine WE (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology* **29(6)**: 807-813.