

Geleneksel Yoğurtlardan İzole Edilen *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus*' ların Tanımlanması*

Yekta GEZGİNÇ**, İsmail AKYOL***

**KSÜ, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kahramanmaraş

***KSÜ, Ziraat Fakültesi, Zootehni Bölümü, Kahramanmaraş

Geliş Tarihi (Received): 09.08.2010

Kabul Tarihi (Accepted): 27.10.2010

ÖZET: Türkiye'nin on dokuz farklı ilinden tesadüfen toplanan geleneksel yoğurt örneklerinden izole edilen *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* izolatlarının, kimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlamaları yapılmıştır. Kimyasal tanımlama gram boyama, koloni morfolojisi ve katalaz testi ile belirlenmiştir. Moleküler tanımlama, 16S ribozomal RNA'yı kodlayan DNA bölgeleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) metodu ile yapılmıştır. PCR metodunda *S. thermophilus* izolatları için 16S rRNA gen bölgesi için 157 bp uzunluğunda, *Lb. bulgaricus* izolatları için ise 232 bp'de bant verdiği belirlenmiştir. İzolasyon ve tanımlama sonucunda 80 adet *S. thermophilus* ve 20 adet *Lb. bulgaricus* izolatı elde edilmiştir. İzole edilen örnekler potansiyel başlangıç kültürü kullanım olanaklarının araştırılması ve genetik içeriklerinin belirlenmesi için stoklanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Laktik asit bakterileri, starter kültür, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, moleküler tanımlama.

Isolation of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* from Traditional Yoghurts and Their Identification

ABSTRACT: *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* species isolated from traditional yoghurt samples that randomly collected from nineteen different cities of Turkey. Isolates were identified using both chemical and molecular methods. Chemical identification was made by gram staining, colony morphology and catalase test. Molecular identification was made by Polymerase Chain Reaction method using DNA regions which encode 16S ribosomal RNA. For the 16S rRNA gene region of *S. thermophilus*, 157 bp and for *Lb. bulgaricus*, 232 bp fragments were amplified. Eighty *S. thermophilus* and 20 *Lb. bulgaricus* isolates were obtained at the end of the isolation and identification. Isolated samples are stored in order to determine starter culture possibilities and genetic contents.

Keywords: Lactic acid bacteria, starter culture, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, molecular identification.

GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB), gıda ürünlerinin besin değerine ve besinlerin biyolojik yolla korunmasına olumlu katkıda bulunmaları nedeniyle yüzyıllardır önemini koruyan mikroorganizmalardır. LAB'ın çoğu; insan, hayvan ve bitkinin bulunduğu doğal ortamlarda bulunan, bu ortamlardan izole edilebilen, biyoteknolojik çalışmalarda ve endüstriyel birçok alanda kullanılan, insan beslenmesinde ve sağlığında oldukça önemli mikrobiyel ajanlardır. Süt, et, balık, tahıl ve sebze gibi çoğu ham gıda maddelerinin fermentasyonla korunmasında, üretilen fermente gıda ve yemlerin organoleptik, reolojik ve besinsel değerine katkıda bulunmada aktif rol üstlenmektedirler (Kılıç, 2001; Furet ve ark., 2004; Leroy ve de Vuyst, 2004). LAB, fermentasyonunda starter kültür olarak rol aldıkları gıdalarda aroma ve tekstürün oluşmasına katkı sağlamalarının yanında, bazı kontrolsüz şartlarda kontaminasyon durumunda; et, balık gibi ürünlerde bozulma reaksiyonlarına da neden olabilmektedirler. Bununla birlikte gıdalarda bazı patojenlerin gelişimini inhibe etme özelliklerinden dolayı da insan sağlığı açısından fonksiyonel önem arz etmektedir

(Schleifer ve ark.,1995). Fermente süt ürünleri üretiminin temel çıkış noktalarından biri, oda sıcaklığında kısa sürede bozulan ve besleyici değeri yüksek bir gıda maddesi olan sütün muhafaza süresini uzatmaktır. Süt çeşitli organizmaların yardımıyla fermentasyon sonucu yoğurt ve diğer fermente ürünlere dönüşmektedir. *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* (*S. thermophilus*) ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*) genelde yoğurt starter bakterileri olarak kullanılan ve yoğurt üretiminden sorumlu olan laktik asit bakterileridir (Giraffa ve ark., 2003). İdeal yoğurdun her gramında, 10^8 ila 10^9 canlı *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* bulunmaktadır. *Lactobacillus*'lar; proteinleri amino asit ve di-peptitlere dönüştürmede, *Streptococcus*'lar ise pH'yı düşürmede rol alırlar (Petti ve ark., 2001).

Yoğurt bakterileri fermentasyon özelliklerinin yanında, doğal bir antibiyotik olarak tanımlanan *nisin* ile birlikte yine antimikrobiyel aktiviteye sahip *laktik asit* gibi maddeler üretirler ki bunlar *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Listeria* ve *Candida* türlerine karşı biyolojik olarak aktiftirler. Bu bakteriler, patojenlere karşı bağırsak sisteminde kolonize olabilmektedirler.

*Bu makale doktora tezinden yapılmıştır.

**Sorumlu yazar: Gezginc Y., yekgan@ksu.edu.tr

Yoğurt mikroorganizmalarının yarışıl aktivitesi ve türündeki antimikrobiyel maddelerin varlığı nedeniyle, gastrointestinal ve ürogenital hastalıklara neden olan enfeksiyonlara karşı koruyucu etkisi bulunmaktadır. Ayrıca yoğurt, diş plaklarının oluşumuna neden olan mikroorganizmaların oluşumuna da engel olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Petti ve ark., 2001).

Mikrobiyolojik olarak *Streptococcus* cinsindeki türler, küresel ve oval morfolojiye sahip, gram pozitif, katalaz negatif ve genellikle hareketsiz bakterilerdir. *S. thermophilus* türleri, homofermentatif ve 45-52 °C'lerde gelişebilmektedir. Optimum gelişme pH'sı 6.0-6.5 olup aerobik ve fakültatif anaerobik özelliktedirler. Proteolitik aktivitesi zayıftır (Tamime ve Deeth, 1980). *Lactobacillus* cinsindeki türler ise; gram pozitif, hareketsiz, ince, uzun, çubuk şeklinde, çoğunlukla tek veya zincir şeklinde görünür. *Lb. bulgaricus* homofermentatiftir. Optimum gelişme sıcaklığı 40-44 °C'dir. *Lactobacillus* cinsindeki türler temelde süt endüstrisinde; peynir, yoğurt ve diğer süt ürünlerinin hazırlanmasında kullanılmaktadır (Dubernet, 2002). Her iki tür için genetik olarak; % guanin (G) ve sitozin (C) içerikleri düşük (% 33- 55) ve genom büyüklükleri 1.8 Mbç ile 3.3 Mbç arasındadır. Bu türler % 80'den fazla DNA-DNA benzerliği göstermekte ve 16S rRNA sekans homolojisinin ise % 90.8- 99.3 olduğu tespit edilmiştir (Singh ve ark., 2009).

Bu çalışmada Türkiye'nin farklı bölgelerinden geleneksel olarak üretilmiş yoğurt örneklerinden LAB izolasyonu yapılarak biyokimyasal ve moleküler olarak

türlerin tanımlanması yapılmış ve aromatik özellik yönünden gıda endüstrisi için yeni doğal potansiyel başlangıç kültürü izolasyonu hedeflenmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Yoğurt Örneklerinin Toplanması

Araştırmada, Kahramanmaraş, Elazığ, Konya, Malatya, Kırşehir, Eskişehir, Gaziantep, Mersin, Ankara, Kırıkkale, Hatay, Sakarya, Sivas, İstanbul, Kütahya, Giresun, Muş, Kayseri, Balıkesir illeri ve bu illere bağlı köylerden temin edilen yaklaşık 100 g. 120 adet yoğurt örneği kullanılmış ve örnekler alındıktan sonra soğuk zincir ile muhafaza edilerek laboratuvara getirilmiştir.

İzolasyon ve Morfolojik Tanımlama

Toplanan yoğurt örneklerinden LAB izolasyonu; Kao ve ark. (2006)'nın izolasyon metodu modifiye (santrifüj işleminin sayısı artırılarak) edilerek gerçekleştirilmiş ve 10⁻⁵'e kadar dilüsyon hazırlanmıştır. Dilüte edilen örnekler MRS agar ve SM17 agar petrilere dağıtılmış ve koloni oluşumu için sırasıyla 37 °C ve 42 °C'de 24- 36 saat inkübasyona bırakılmış ve izole edilen koloniler numaralandırılarak - 80 °C'de stoklanmıştır. Kolonilerin toplandıkları bölgeler (şehir) ve koloni stok numaraları Tablo 1'de verilmiştir. Toplanan her bir yoğurt örneğinden aynı türden tek izolasyon yapılmıştır.

Tablo 1. Farklı yörelerden toplanan yoğurt örneklerinden elde edilen *S. thermophilus* ile *Lb. bulgaricus*'un izolat numaraları ve sayıları.

Alındığı Yer	İzolat Numaraları (Sayısı)	
	<i>S. thermophilus</i>	<i>Lb. bulgaricus</i>
Kahramanmaraş ve köyleri	1, 2, 7, 9, 17, 20, 22, 24, 25, 26 (10)	3, 6, 10, 11, 31 (5)
Elazığ	4, 5, 14, 15 (4)	8 (1)
Konya	12, 19, 21 (3)	13, 16, 18 (3)
Malatya	23, 27, 28, 29, 30 (5)	32 (1)
Kırşehir	33, 34, 35, 36 (4)	39 (1)
Eskişehir	37, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 (9)	-
Gaziantep	47, 48, 49, 50, 54, 55, 56, 57, 59 (9)	51, 52, 53 (3)
Mersin	60,61 (2)	58 (1)
Ankara	62, 63, 64 (3)	-
Kırıkkale	65,66 (2)	-
Hatay	67, 68, 69, 71 (4)	73 (1)
Sakarya	72, 74 (2)	-
Sivas	75, 76, 77 (3)	79 (1)
İstanbul	78, 80 (2)	-
Kütahya	81, 82, 83, 84 (4)	85 (1)
Giresun	86, 87, 88 (3)	89 (1)
Muş	90, 91, 92, 93 (4)	-
Kayseri	94, 95, 96 (3)	-
Balıkesir	70, 97, 99, 100 (4)	98 (1)
Toplam	80	20

Laktik Asit Bakterilerinin Kimyasal Tanımlanması

Yoğurt örneklerinden izole edilen LAB kolonilerinin tanımlanması izolatların biyokimyasal (katalaz) (Hammes ve Vogel, 1995), morfolojik (kok, çubuk gibi) ve kültürel özelliklerine (gram boyama, koloni morfolojisi) göre belirlenmiştir (Harrigan ve McCance, 1976).

Moleküler Tanımlama Metotları

Kolonilerin moleküler olarak tanımlanması; primerlerin tasarlanması, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) işlemi ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen LAB kolonilerinde PCR işlemi, 16S rRNA'yı kodlayan DNA bölgesi üzerinden tasarlanmış ileri ve geri primerler ile toplam 40µl hacimde 35 döngü olmak üzere 94 °C'de 1 dk. denatürasyon, yapışma sıcaklığı 60°C'de 1 dk. ve 72 °C'de uygun sentez zamanı boyunca (1 dk.) gerçekleştirilmiştir. Yapılan PCR sonucunda ürünler, % 2'lik jelde yürütülüp, UV ışığında gözlenmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

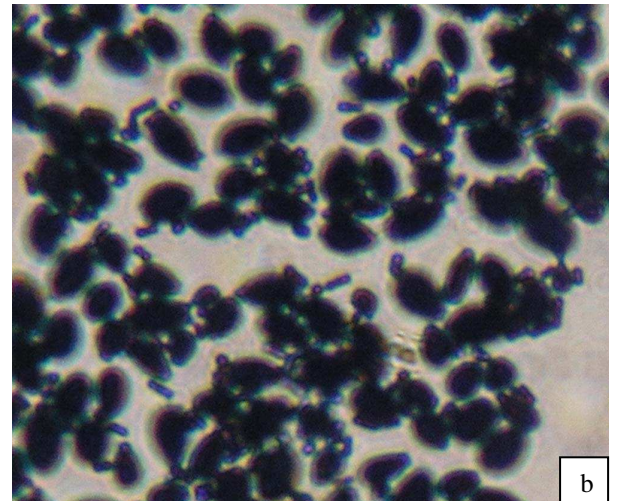
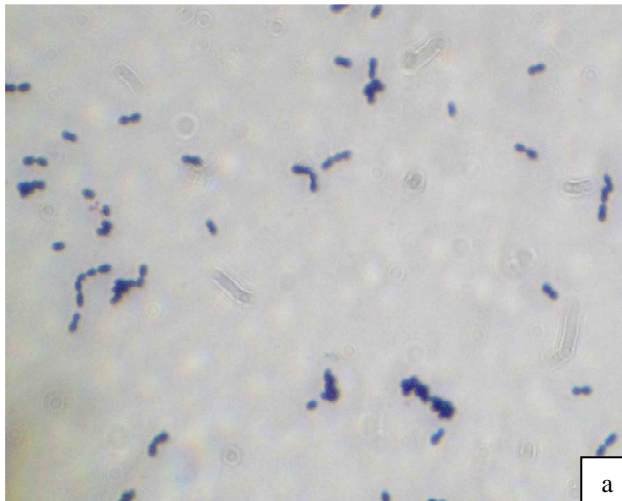
İzole Edilen Kolonilerin Biyokimyasal ve Morfolojik Olarak Tanımlanması

LAB izolatlarının tek koloni olarak elde edildikten (tek koloni) sonra biyokimyasal tanımlanmasında gram reaksiyonu, mikroskopik morfoloji ve katalaz aktivitesi yapılmıştır. İzole edilen LAB'lar SM17 ve MRS besi yerinde inoküle edildikten sonra, petrielerde koloni görünüşleri ile ayırt edilebilmektedir. *Lb. bulgaricus* kolonileri 1- 2 mm çapında, konkav, krem renkli olarak gözlemlenmektedir. *S. thermophilus* kolonileri ise 0.7-0.9 mikron çapında, yuvarlak, açık krem renkli gözlenmektedir. Bu koloni morfolojik farklılığı türlerin ayırımında başlangıç olarak alınmış ve diğer testlere temel oluşturmuştur. İzolasyonu yapılan ve çalışmada kullanılan 100 izolat Gram boyama sonucunda gram pozitif olarak gözlemlenmiştir (Şekil 1). LAB genetik olarak katalaz enzimini kodlayamamakta, eksikliğinden dolayı hidrojen peroksiti oksijen ve H₂O'ya

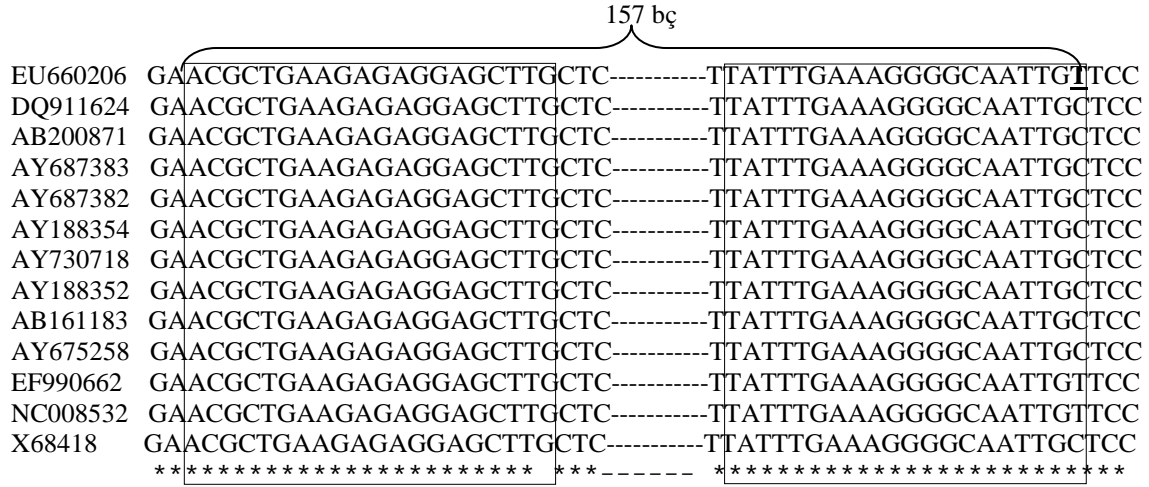
parçalayamamaktadır. Bu özellik LAB tespitinde pratik bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Çalışmada kullanılan izolatlara morfolojik incelemelerden sonra katalaz testi uygulanmış ve 100 izolatın tamamından katalaz negatif sonuç alınmıştır.

İzole Edilen Bakterilerinin Moleküler Olarak Tanımlanmasını Sağlayacak Primerlerin Tasarlanması

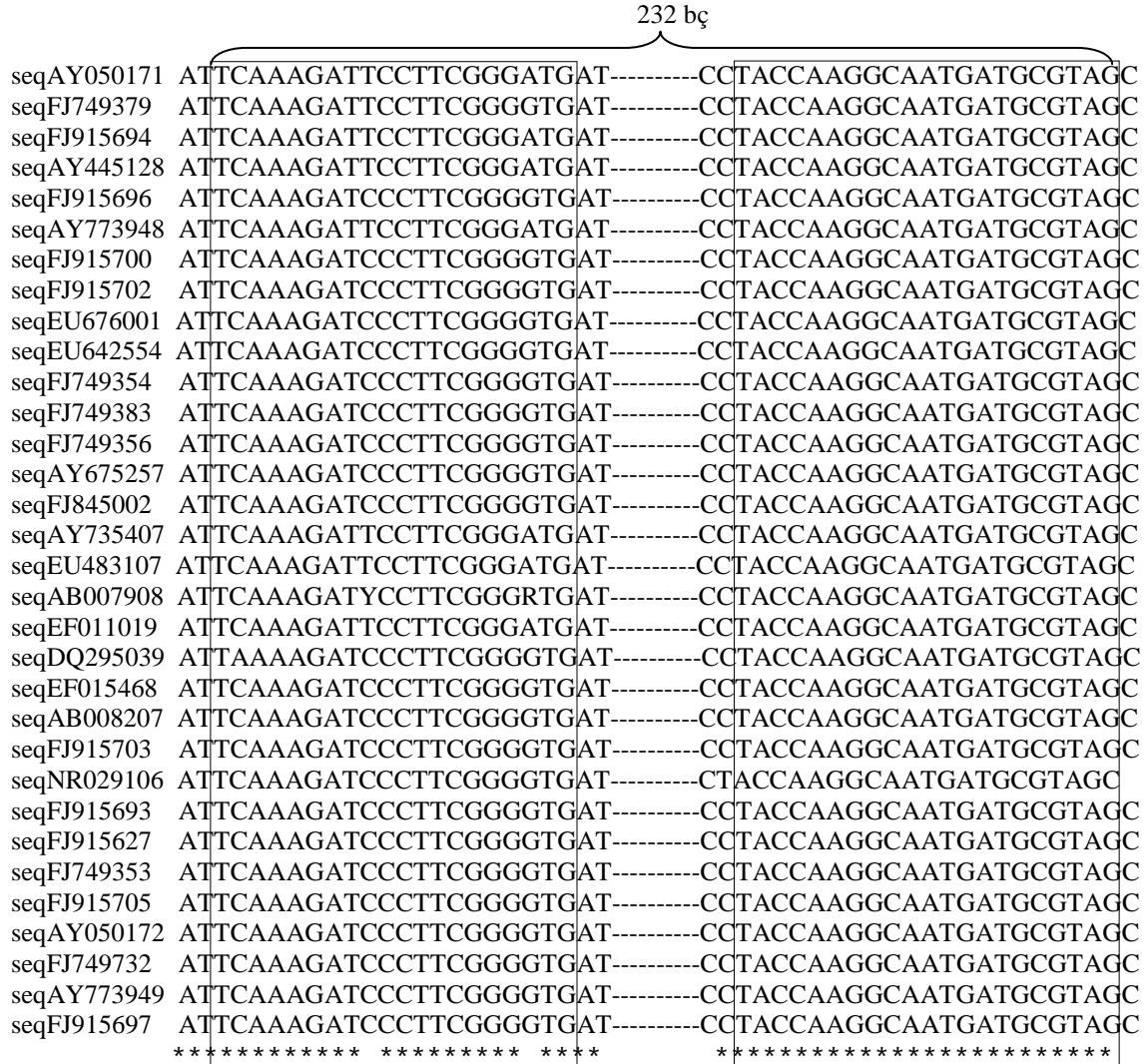
Morfolojik tanımlamaları, gram reaksiyon özellikleri ve katalaz testleri yapılan koloniler moleküler olarak da tanımlanmıştır. Moleküler tanımlamada *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* starter kültürlerinin tür tespiti için 16S rRNA gen bölgesi DNA dizileri kullanılmıştır. Primerler tasarlanırken *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* türlerini birbirinden ve diğer bazı LAB türlerinden (*Lb. gasseri*, *L. lactis* ssp. *cremoris*, *L. lactis* ssp. *lactis*, *Oenococcus oeni*) başarılı bir şekilde ayırmasına özen gösterilmiştir. Bu bağlamda diğer LAB türlerinin 16S rRNA gen bölgesi nükleotid dizilimleri karşılaştırılmalı olarak ClustalW programı kullanılarak hizalanmış ve tasarlanan primerlerin türe özel tasarlanması sağlanmıştır. *S. thermophilus* türü için primerlerin tasarlanabileceği konsensüs dizilerin bulunması için NCBI'da verilen dizilerden 13 tanesinin 16S rRNA bölgesi nükleotid dizileri ClustalW programı ile hizalanarak primerler 157 bç bölgeyi çoğaltacak şekilde tasarlanmıştır (Şekil 2). İleri primeri YGStF (5' ACGCTGAAGAGAGGAGCTTG 3') ve geri primeri YGStR (5' GCAATTGCCCTTTCAAATA 3') nükleotid diliminde tasarlanmıştır. İzole edilen *Lb. bulgaricus* türlerinin moleküler tanımlanmasında 34 farklı türe ait 16S rRNA gen bölgesi dizisi kullanılmıştır. Bu diziler hizalanarak (Şekil 3) konsensüs dizilerden ileri primeri YGLbF (5' TCAAAGATTTCCTTCGGGATG 3' ve geri primeri YGLbR (5' TACGCATCATTGCCTTGGTA 3') nükleotid diliminde tasarlanmıştır. Bu primerler *Lb. bulgaricus*'te 232 bç uzunlukta bir bölgeyi çoğaltabilecektir.



Şekil 1. İzole edilen *S. thermophilus* (a) ve *Lb. bulgaricus* (b) suşunun gram boyama görüntüsü.



Şekil 2. *S. thermophilus*'un 16S rRNA gen bölgesi sekanslarının tür için yaygın primerlerin tasarlanması için hizalanması. Hizalamada kullanılan dizilerin erişim numaraları şekilde gösterilmiştir.

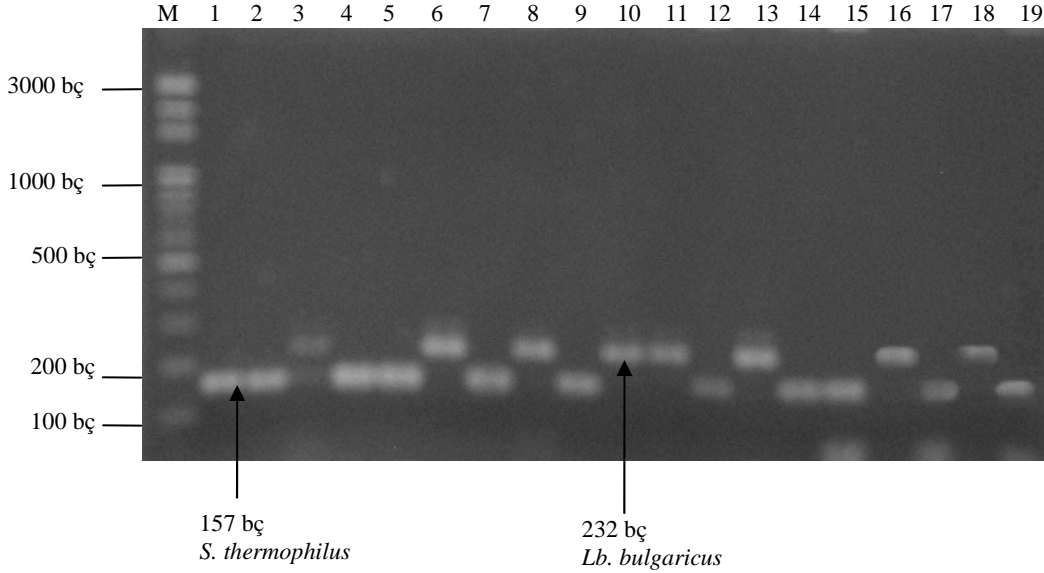


Şekil 3. *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* 16S rRNA gen bölgesi sekanslarının tür için yaygın primerlerin tasarlanarak hizalanması. Hizalamada kullanılan dizilerin erişim numaraları şekilde gösterilmiştir.

S. thermophilus ve *L. bulgaricus* türlerinin 16S rRNA gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılması

Primer çiftleri (YGStF-YGStR, YGLbF-YGLbR) *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* türlerinin 16S rRNA gen bölgelerini PCR ile çoğaltacak şekilde tasarlanmıştır. YGStF-YGStR primer çifti ile *S. thermophilus*

türlerinde 157 bç uzunluğunda, YGLbF-YGLbR primer çifti ile *Lb. bulgaricus* türlerinde 232 bç uzunluğunda bölgelerin çoğaltılması hedeflenmiştir. PCR ile çoğaltılan ürünlerden 1-19. izolatların %2'lik agaroz jelde görüntüsü verilmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. 1-19. izolatların PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. *S. thermophilus*; 1, 2, 4, 5, 7, 9, 12, 14, 15, 17, 19 *Lb. bulgaricus*; 3, 6, 8, 10, 11, 13, 16, 18. M: 100 bç DNA standardı.

S. thermophilus ve *Lb. bulgaricus* yoğurt oluşumunda starter olarak kullanılmakta (Giraffa ve ark., 2003). Ve genelde birlikte bulduklarından dolayı protokooperasyon ile birbirlerinin büyümelerini teşvik eden tamamlayıcı metabolik yollara sahiptirler (Courtin ve Rul, 2004). Ancak bu türler doğal ortamlarda diğer başlangıç veya başlangıç olmayan türler ile bulduklarında gen alışverişi yapabilmektedirler. Aynı büyüme gereksinimlerinden dolayı doğal yoğurtlarda farklı sayıda benzer veya benzer olmayan probiyotik türünün yoğurt başlangıç kültüründe bulunmasına sebep oluşturmaktadır. Bu karışık kültürlerin biyokimyasal özellikleri birbirleri ile örtüşebilmekte ve aromatik ürünün hangi bakteri türünden veya suşundan kaynaklandığının doğru tespiti önem taşımaktadır. Fenotipik tanımlama yalnız başına laktobasillerin tanımlaması için yeterli bir yöntem değildir (Dellaglio ve ark., 2005). Dolayısıyla 16S rRNA gen dizisindeki farklılıklar kullanılarak PCR ile daha güvenilir olarak identifikasyon yapılabilmektedir (Couret ve ark., 2003; Tabasco ve ark., 2007).

Bu çalışmada izole edilen bakterilerin izolasyonları biyokimyasal tanımlamalarına ilave olarak 16S rRNA gen dizisi farklılıkları göz önüne alınarak tasarlanan primerler ile moleküler olarak da yapılmıştır. Elde edilen izolatların PCR ile tanımlanması sonucunda 157 bç'de DNA bandı veren toplam 80 adet *S. thermophilus*

ve 232 bç'de DNA bandı veren 20 adet *Lb. bulgaricus* izolatı elde edilmiştir. Biyokimyasal tanımlama safhaları moleküler biyolojik tanımlamalardan önce potansiyel bazı izolatların sayısal olarak elemine edilmesi ve tasarlanan primerin istenmeyen bölgeye bağlanabilme ihtimalinin eliminasyonu açısından önemlidir (Huys ve ark., 2003). Biyokimyasal tanımlama yapılmadan planlanan moleküler tanımlamalar için kullanılacak primerler çok sayıda kolonilerden bazılarında yanlış identifikasyona sebep olabilmektedir. Bu yanlış primerlerin spesifik olmamalarından ziyade PCR şartlarındaki farklılıktan kaynaklanabilir. Dolayısı ile moleküler tanımlama ile biyokimyasal tanımlamalar birlikte değerlendirildiğinde daha etkin bir identifikasyon yapılabilmektedir. Sonuç olarak araştırma materyalini oluşturan iki farklı tür biyokimyasal ve teyidi moleküler yöntem ile tanımlanarak net bir şekilde belirlenmiş ve moleküler identifikasyon ile elde edilen bilgiler literatür bilgilerine (Tabasco ve ark., 2007) benzerlik göstermektedir.

SONUÇ

Standart ve yüksek kalitede ürün eldesi, fermente süt ürünleri için büyük ölçüde güvenilir starter kültür kullanımına bağlıdır. Gıda endüstrisinde kullanılan starter kültürlerin, arzu edilen genetik yapı, tat, koku ve aromatik özellikleri, üretim kapasiteleri ve hedeflenen

fermente ürünlere olumlu özellikler kazandıran suşlardan seçilmesi önemli olmuştur. *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus*'tan süt endüstrisinde laktik starter olarak ayrı ayrı yararlanılmaktadır. Ancak bu bakterilerin süt endüstrisindeki önemi, daha çok ikisinin bir arada yoğurt starteri olarak kullanılmasından kaynaklanmıştır (Tamime ve Robinson, 1999).

Ülkemizde geleneksel fermente ürünümüz olan yoğurt, günümüzde ileri teknoloji uygulayan sınırlı sayıda firma tarafından, yurt dışı kaynaklı ticari kültürler kullanılarak üretilmektedir (Yaygın ve Kılıç, 1993). Bunun yanında, geleneksel olarak evlerde ya da küçük ölçekli işletmelerde üretilen yoğurtlarda çoğu zaman bir önceki üretimden kalan yoğurttan, kültür olarak yararlanılmaktadır. Ancak bu tip geleneksel üretimlerde kaliteli yoğurt üretimi her zaman için söz konusu olamamakta, kalite ve süreklilik sağlanamamaktadır.

Tüm bunlarla birlikte, gelişen teknoloji, sağlık ve beslenme alanındaki güncel gelişmeler ve yeni eğilimler, farklı damak tadları, ürün ve üretim modellerindeki çeşitli çekicilik unsurları, toplumda özellikle fonksiyonel ürünlere karşı duyulan güven ve talep yeni starter kültürlerin varlığına ihtiyaç göstermiş, bu alanda yapılan son çalışmalar bu beklentileri karşılamada oldukça yüksek bir potansiyelin varlığını ortaya koymuştur.

Türkiye'nin farklı bölgelerinden geleneksel metotlarla yapılmış 120 adet yoğurt örneği toplanarak LAB'lar izole edilmiştir. İzolasyon sonucu yapılan kimyasal tanımlama ve 16S rRNA gen dizisindeki farklılıklar kullanılarak yapılan PCR ile tanımlamanın birbirini tamamlayan tanımlama yöntemleri olduğu ve bu çalışma sonucunda elde edilen izolatların, 80 tanesinin *S. thermophilus* ve 20 tanesinin de *Lb. bulgaricus* türü olduğu belirlenmiştir. Ancak bununla birlikte bu alanda gerçekleştirilecek araştırmalar kapsamında olmak üzere, seçilmiş izolatlardan kontrollü şartlarda yoğurt üretiminin yapılması, bunlarda gıda kalite ve güvenlik özelliklerinin ortaya konması, plazmitlerin DNA dizilerinin çıkarılması ve bu plazmitlerin konjugasyon özelliklerinin belirlenmesi gibi çalışmalar yapılarak izolatların patent potansiyelleri ve endüstriyel suş olarak önerilmeleri sağlanabilir.

KAYNAKLAR

- Carr, F. J., Chill, D., Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. Crit. Rev. Microbil. 28: 281- 370.
- Couret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M., Vernoux, J. P. 2003. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. Lait. 83: 269- 306.
- Courtin, P., Rul, F. 2004. Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: Yogurt bacteria as a study model. Lait. 84: 125- 134.
- Dellaglio, F., Felis, G. E., Castioni, A., Torriani, S., Germond, J. E. 2005. *Lactobacillus delbrueckii* subsp indicus subsp nov., isolated from Indian dairy products. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 55: 401- 404.
- Dubernet, S., Desmaures, N., Gueguen, M. 2002. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. FEMS Microbiology Letters. 214: 271- 275.
- Furet, J-P., Quenee, P., Tailliez, P. 2004. Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. Int. Journal of Food Microbiology. 97: 197- 207.
- Gezginç, Y., 2010. Geleneksel yoğurtlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin plazmit içeriği ve biyojenik amin üretimi bakımından gıda endüstrisinde kullanılabilirliğinin araştırılması. Doktora tezi. KSÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş. 245s.
- Giraffa, G., Lazzi, C., Gatti, M., Rossetti, L., Mora, D., Neviani E. 2003. Molecular typing of *Lactobacillus delbrueckii* of dairy origin by PCR-RFLP of protein-coding genes. Int. Journal of Food Microbiology. 82: 163- 172.
- Hammes W. P., Vogel R. F. 1995. The genus *Lactobacillus*. In The Genera of Lactic Acid Bacteria. Wood BJB and Holzapfel WH (Eds), Chapman & Hall, London, pp 19– 54.
- Harrigan, W. F., Mccance, M. E. 1976. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology, London, Academic press, pp: 66-81.
- Huys, G., Pearson, M., Kampf, P., Denys, R., Cnockaert, M., Inglis, V., Swings, J. 2003. *Aeromonas hydrophila* subsp ranae subsp nov., isolated from septicaemic farmed frogs in Thailand International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53: 885- 891.
- Kao, Y. T., Liu, Y. S., Shyu, Y. T. 2006. Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. 40: 71- 79.
- Kılıç, S. 2001. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 542, s:421.
- Leroy, F., De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends Food Sci. Technol. 15: 67- 68.
- Petti, S., Tarsitani, G., D'arca, A. S. 2001. A randomized clinical trial of the effect of yoghurt on the human salivary microflora. Archives of Oral Biology. 46: 705- 712.
- Schleifer, K. H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig, W., Amann, R. 1995. Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. Int. Dairy Journal. 5: 1081- 1094.
- Singh, S., Goswami, P., Rameshwar, S., Heller, K. J. 2009. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. Food Science and Technology. 42: 448- 457.
- Stiles, E. S., Holzapfel, W. H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food Microbiol. 36: 1–29.

- Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Peláez, C., Requena, T. 2007. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *International Dairy Journal*. 17: 1107- 1114.
- Tamime, A. Y., Deeth, B. C. 1980. Yoghurt: Technology and Biochemistry. *Journal of Food Protection*. 43: 939- 977.
- Tamime, A. Y., Robinson, R. K. 1999. *Yoghurt Science and Technology*. Woodhead Publishing Limited. CRC press. Cambridge England. p:619.
- Wright, A. V., Bruce, A. 2003. Genetically modified microorganisms and their potential effects on human health and nutrition. *Trends in Food Science and Technology*. 14: 264– 276.
- Yaygın, H., Kılıç, S. 1993. Süt Endüstrisinde saf kültür kullanımı. *Altındağ Matbaacılık*. İzmir. S: 108.
- Zhu W. M., Liu W., Wu D. Q. 2000. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasserii* KT7. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 877- 886.