

Liyofilizasyon Süresinin Yoğurt Bakterilerinin Canlılığı Üzerine Etkisi⁽¹⁾

Dr. Kadir HALKMAN — *A.Ü. Ziraat Fakültesi, ANKARA*

Z.Y.M. Ergun AKYOL — *Pınar Süt, İZMİR*

Z.Y.M. Adnan ÇAVUŞ — *A.O.Ç. Süt Fabrikası, ANKARA*

1. GİRİŞ

Süt ürünlerinde starter kullanımı gelişmiş ülkelerde 19. Yüzyıl sonlarında başlamış ve 1890 yılında starter endüstrisi kurulmuştur. Bilim ve teknolojiadaki gelişmeye paralel olarak starterlerin üretilmesinde, korunmasında ve kullanılmasında yeni boyutlar kazanılmıştır. Bugün kültür koruma konusunda — 196°C sıvı azotta dondurma canlılık ve aktivitenin korunmasında en iyi yöntem olarak kabul edilmekte isede bu şekilde korunmuş kültürlerin kültür üretim merkezlerinden süt endüstrisi tesislerine iletilmesindeki güçlükler nedeni ile bunun yerine liyofilize edilmiş (dondurarak kurutulmuş) kültürler çok yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (1).

Liyofilizasyon işlemi sonunda bakterilerin canlılık ve aktiviteleri üzerine bakterinin cinsi, türü, suşu, yaşı, yoğunluğu, üretme ortamı, koruyucu ortam (cryoprotectant), liyofilize edilmiş kültürün korunduğu atmosfer ortamı, kültürde kalan nem miktarı, depolama koşulları (süre, sıcaklık, ışık) ve sulandırma (rehidrasyon) koşullarının (sulandırma sıcaklığı ve sulandırma çözeltilisinin bileşimi) gibi faktörlerin etki yaptığı bilinmektedir (1).

Bu faktörler kendi aralarında birbirlerini etkiledikleri gibi kullanılan cihazın özellikleri, liyofilize edilecek kültür miktarı, kültürlerin kurutulduğu kabın cinsi ve şekli de dolaylı olarak canlılık ve aktivite üzerinde etki yapmaktadır.

Yoğurt kültürlerinin liyofilizasyon yöntemi ile korunması konusunda özellikle yurt dışında yapılmış çok sayıda araştırmaya rastlamak olasıdır. Genel olarak konu üzerindeki araştırmaların büyük çoğunluğu canlılık ve aktivite üzerine en önemli etkiyi yapan sırasıyla koruyucu ortam, üretme ortamı ve depolama koşulları üzerinde yapılmıştır.

Ülkemiz süt ürünleri endüstrisinde çağdaş teknoloji kullanımının ve buna bağlı olarak starter kullanımının yaygınlaştığı son yıllarda kamu ve özel araştırma kuruluşlarında liyofilize yoğurt kültürü üretimi çalışmaları yoğunlaşmıştır. En uygun liyofilizasyon süresinin saptanmasına çalışılan bu araştırma bunlardan birisidir. Liyofilizasyon süresi doğrudan canlılık üzerine etkili olmayıp liyofilize kültürde kalan nem miktarını etkilemektedir.

Dondurarak kurutulmuş kültürlerde % 1 nem kalması gerektiği, bundan düşük yada yüksek nem oranlarının canlılık ve aktiviteyi olumsuz yönde etkileyeceği pek çok araştırmacı tarafından belirtilmiştir. Teknolojik olarak liyofilize kültürlerde nem miktarının % 1'in çok altında düşürülmesi olası isede bu durum önerilmemekte ve kullanılan koruyucu ortamın bir görevinin de bu nem oranının altına düşülmesini engellemek olduğu bildirilmektedir (2, 3, 4).

Bununla birlikte liyofilizasyon sonrasında kültürde kalan nem miktarı üzerine pek çok faktör etki yapmaktadır. Bunların başlıcaları kullanılan üretme ve koruma ortamlarının bileşimleri, kurutulacak materyal miktarı, kurutmanın yapılacağı kabın özellikleri (şekli, büyüklüğü, içine konulan materyal miktarı), cihazın özellikleri (vakum pompasının gücü, dışarıdan ısıtma yapılıp yapılmaması; yapılmıyorsa dış ortam sıcaklığı ve kurutma odasının ısı iletim özellikleri, yapılmıyorsa ısıtma yoğunluğu, kullanılan desikantın kimyasal yada soğuk yüzey olması, kimyasal madde ise miktarı, soğuk yüzey ise yüzey soğukluğu, santrifüj sisteminin olup olmaması, santrifüj varsa dönüş hızı, yoksa kültürlerin ilk dondurma sıcaklığı ve süresi) ve liyofilizasyon süresidir (3, 5, 6, 7, 8).

Bu çalışmada yoğurt starter bakterilerinin liyofilizasyon tekniği ile korunmasında canlılık üzerine doğrudan yada dolaylı etki yapan diğer tüm faktörler olanaklar ölçüsünde sabit tutulmaya çalışılmış sadece liyofilizasyon sü-

(1) Bu çalışma TÜBİTAK - Tarım ve Ormanlık Araştırma grubu tarafından desteklenen TARMİK - 5 no'lu Projenin ön deneme sonuçlarını göstermektedir.

resinin etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla 12, 18, 24, 30 ve 36 saat liyofilizasyon işlemi sonunda 3 bakteride liyofilizasyon hemen sonra, 3 ve 6 ay depolamadan sonra canlı hücre sayıları belirlenmiş, elde edilen sonuçlardan en uygun liyofilizasyon süresi saptanmıştır.

Konu ile doğrudan ilgili bir literatüre rastlanamamış olması çalışmanın en önemli gücünü oluşturmuştur. Sadece birbirinin devamı niteliğindeki 2 araştırmada (9) kültürlerin -40°C 'de dondurulduğu, -23° , -25°C 'da liyofilizasyona başlandığı, son sıcaklık $32-35^{\circ}\text{C}$ olmak üzere son kurutma dahil işlemin 40-42 saat olduğu belirtilmektedir. Buna karşın laboratuvar boyutundaki bir liyofilize cihazında % 1 neme düşmek için gereken sürenin materyal miktarına göre değişmek üzere 6-12 saat olarak verilmesi bunların dışında literatür sağlanamaması çalışmayı geniş bir süre araştırmasına dönüştürmüştür.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

Bu çalışmada EL-BEYATİ (11) tarafından yoğurtlardan izole edilen *Lactobacillus bulgaricus* D1, *Streptococcus thermophilus* Ç3 ve *Lactobacillus x B8* suşları materyal olarak kullanılmıştır. Bunlardan B8 suşunun laktobasil cinsine ait olduğu saptanmış olmakla beraber türü belirlenememiş ve bir ara suş olarak yorumlanmıştır (12).

2.2. Metot

2.2.1. Bakterilerin Liyofilizasyon İşlemine Hazırlanması

Laktobasiller MRS Broth (OXOID), streptokok APT Broth (DIFCO) besiyerlerinde günde 2 kez olmak üzere 37°C 'da 3 gün süre ile aktifleştirilmiştir, son inkübasyonun bitiminde Chriss UJ 2 marka santrifüjde 5200 d/d da 45 dakika santrifüjlenmişler, yıkanmışlar ve yeniden santrifüjlenmişlerdir. Sedimentler santrifüj öncesi orjinal hacmin % 5'i hacimdeki ve bileşimi % 10 süttezu + % 10 sakkaroz + % 0,5 askorbik asit + % 0,5 amonyum klorür olan koruma ortamı içinde çözülmüşler (1), kahverengi penisilin şişelerine inokülasyon kabini içinde 1'er ml dağıtıldıktan sonra bu şişe-

lerin özel kapakları yarı kapatılmış ve -25°C da dondurulmuşlardır.

2.2.2. Liyofilizasyon İşlemi

Liyofilizasyon HETO marka Freeze - Dryer'da yapılmıştır. Liyofilizasyon işleminin başlayıp basıncın 0,5 torr altına düşmesinden sonra kültür iç sıcaklığı 10 saat içinde $+30^{\circ}\text{C}$ 'a çıkarılmış ve işlem bitinceye kadar bu sıcaklıkta sabit tutulmuştur. İşlemin başlamasından 9 saat sonra basınç 0,02 torr'a düşmüş bundan 3 saat sonra işleme ara verilerek ilk örnekler alınmıştır. Bundan sonra işleme devam edilmiş ve her 6 saatde örnek alınmıştır. Bir diğer deyiş ile liyofilizasyonun başlamasından 12, 18, 24, 30 ve 36 saatlerde işleme ara verilmiş ve örnek alınmıştır. 0,02 torr basınç liyofilizasyonda yaklaşık % 1 nem elde etmek için önerilen değerdir (5, 10).

Liyofilizasyon işlemi devam ederken örnek alınmasında özel bir düzenekden yararlanılmıştır. Bu şekilde kapakları yarı kapalı tutulan şişelerden sadece dışarı çıkarılacak olanlar vakum altında kapanmışlar, diğerleri yarı kapalı durumda tutulmuş, içeriye steril kuru hava verilerek vakum kaldırılmış, örnekler dışarı çıkarıldıktan sonra işleme devam edilmiştir. Her örnek alımında 3 bakteri, 3 depo süresi 2 paralel olmak üzere toplam 18 şişe çıkarılmıştır. Her bakteriye ait 6 şişeden 2 adedi liyofilizasyon sonrası (O zamanı) sonuçları için hemen açılmış, diğer 4 adedi 3 ve 6 ay depolama sonrası değerleri için -18°C 'da korunmuşlardır.

2.2.3. Kültürlerin Açılması ve Canlılıkların Belirlenmesi

Ani sıcaklık değişimlerinin yaratacağı olumsuz etkiden korunmak amacı ile kültürler önce oda sıcaklığına getirilmiş (13), sonra % 0,85 tuzlu su ile dilüsyonları yapılmış ve kültürel sayım yöntemi ile canlı hücre sayıları belirlenmiştir. Kültürel sayımda laktobasiller için MRS Agar, streptokok için APT Agar besiyerleri kullanılmış, her dilüsyon için 3 petri kutusuna ekim yapılmıştır.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

L. bulgaricus D1, *Lactobacillus* X B8 ve *S. thermophilus* Ç3 suşlarının liyofilizasyon öncesi ve 5 farklı liyofilizasyon süresinde 0,3 ve 6. ay açılmalarındaki canlı hücre sayıları ve

liyofilizasyon öncesi canlı hücre sayısına göre işlem sonunda % canlı kalma oranları sırası ile Çizelge 1, 2 ve 3 de, canlı hücre sayılarının logaritmaları alınarak çizilen grafikleri ise Şekil 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. *L. bulgaricus* D1'de canlı hücre sayısı/ml ve % Canlılık

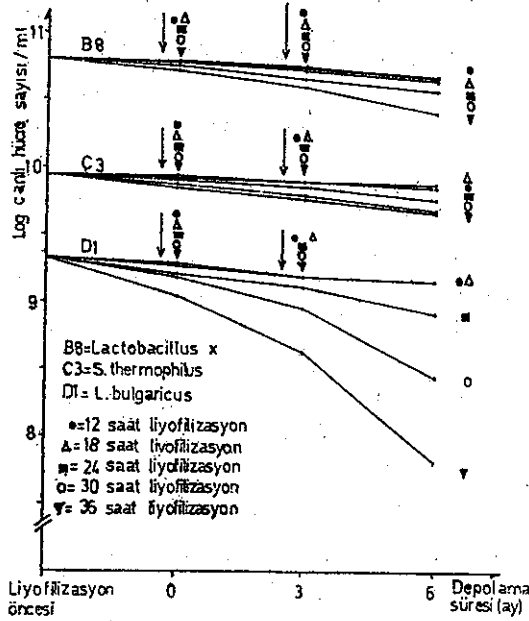
Lyf. Süresi	Lyf. Öncesi	Liyofilizasyon Sonrası Depolama (Ay)					
		0		3		6	
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
12 saat	$2,1 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	90	$1,5 \times 10^9$	71	$1,4 \times 10^9$	67
18 saat	$2,1 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	86	$1,5 \times 10^9$	71	$1,4 \times 10^9$	67
24 saat	$2,1 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$	76	$1,3 \times 10^9$	62	$8,2 \times 10^8$	39
30 saat	$2,1 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	71	$9,0 \times 10^8$	43	$2,7 \times 10^8$	13
36 saat	$2,1 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$	52	$4,2 \times 10^8$	20	$6,3 \times 10^7$	03

Çizelge 2. *Lactobacillus* X B8'de canlı hücre sayısı/ml ve % canlılık

Lyf. Süresi	Lyf. Öncesi	Liyofilizasyon Sonrası Depolama (Ay)					
		0		3		6	
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
12 saat	$6,3 \times 10^{10}$	$6,0 \times 10^{10}$	95	$5,4 \times 10^{10}$	88	$4,6 \times 10^{10}$	73
18 saat	$6,3 \times 10^{10}$	$6,0 \times 10^{10}$	95	$5,3 \times 10^{10}$	84	$4,5 \times 10^{10}$	71
24 saat	$6,3 \times 10^{10}$	$5,9 \times 10^{10}$	94	$5,1 \times 10^{10}$	81	$4,3 \times 10^{10}$	68
30 saat	$6,3 \times 10^{10}$	$5,6 \times 10^{10}$	89	$4,5 \times 10^{10}$	71	$3,7 \times 10^{10}$	59
36 saat	$6,3 \times 10^{10}$	$5,1 \times 10^{10}$	81	$3,9 \times 10^{10}$	62	$2,5 \times 10^{10}$	40

Çizelge 3. *S. thermophilus* Ç3'de canlı hücre sayısı/ml ve % canlılık

Lyf. Süresi	Lyf. Öncesi	Liyofilizasyon Sonrası Depolama (Ay)					
		0		3		6	
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
12 saat	$8,7 \times 10^9$	$8,5 \times 10^9$	98	$7,8 \times 10^9$	90	$7,1 \times 10^9$	82
18 saat	$8,7 \times 10^9$	$8,3 \times 10^9$	95	$7,8 \times 10^9$	90	$7,3 \times 10^9$	84
24 saat	$8,7 \times 10^9$	$7,9 \times 10^9$	91	$7,1 \times 10^9$	82	$5,8 \times 10^9$	67
30 saat	$8,7 \times 10^9$	$7,2 \times 10^9$	83	$6,2 \times 10^9$	71	$4,8 \times 10^9$	55
36 saat	$8,7 \times 10^9$	$7,0 \times 10^9$	80	$5,7 \times 10^9$	66	$4,6 \times 10^9$	53



Şekil 1. 5 Farklı Liyofilizasyon süresinin canlılık üzerine etkisi

L. bulgaricus D1'e ilişkin değerlerin verildiği çizelge 1 ve şekil 1'in incelenmesi ile 12 ve 18 saat liyofilizasyon süreleri arasında farklılık olmadığı ancak 24 saat liyofilizasyonda 12 ve 18 saate oranla kayda değer bir canlılık azalması olduğu, 30 ve özellikle 36 saat liyofilizasyonda ise büyük canlılık kayıpları olduğu görülmektedir. Aynı şekilde depolama süresi uzadıkça uzun liyofilizasyon sürelerinin canlılık üzerine olumsuz etkileri daha fazla olmuştur. 6 ay depolanmış kültürlerde 12 ve 18 saat liyofilizasyon ile % 67 canlılık elde edilirken bu değer 36 saatlik işlem sonunda % 3'e düşmüştür.

Lactobacillus X B8 suşu diğer 2 bakteriye oranla önemli ölçüde yüksek bir liyofilizasyon öncesi sayım sonucu vermiştir. **B8** suşunun 6.3×10^{10} olan liyofilizasyon öncesi canlı hücre sayısı **L. bulgaricus D1'den** 30, **S. thermophilus C3'den** 7 misli fazladır. Bu bakteri için 12, 18 ve 24 saatlik liyofilizasyonlar ile birbirlerine son derece yakın sonuçların alındığı, 30 ve 36 saat süren işlemler sonunda diğerlerine oranla daha az canlılıkların elde edildiği çizelge 2 ve şekil 1'de görülmektedir. 6 ay depolanmış kültürlerde 12 saat liyofilizasyon ile % 73 canlılık elde edilirken bu değer 36 saatlik işlemde % 40 olmuştur.

S. thermophilus C3 suşu ile elde edilen hücre sayıları ve % canlılık değerlerinin 2 önemli farklılığı vardır. Bunlar; 1) en yüksek % canlılık bu bakteri ile elde edilmiştir. 2) Sadece **C3'de** 6 ay depolama sonunda 18 saat liyofilizasyon ile 12 saate oranla azda olsa daha yüksek canlılık değerleri alınmıştır. **C3** suşu için 12 ve 18 saatlik liyofilizasyon süreleri birbirlerine yakın canlılık değerleri verirken 24, 30 ve 36 saatlik işlemlerde kademeli olarak canlılık azalmıştır. 6 ay depolanmış kültürde 18 saatlik işlem ile % 84, 36 saatlik işlem ile % 53 canlılık elde edilmiştir.

Bu çalışmada 12 - 18 saat liyofilizasyon işlemi ve 6 ay depolama sonunda **L. bulgaricus'da** % 67, **S. thermophilus'da** % 83 canlılık elde edilirken aynı suşların, aynı üretme ve koruma ortamının kullanıldığı bir başka çalışmada (1) 6 ay (24 hafta) sonunda **L. bulgaricus'da** % 37, **S. thermophilus'da** % 42 canlılık elde edilmesi ilk bakışta bir çelişki gibi görülüyorsa da yukarıda açıklandığı gibi çok sayıda faktörün canlılığı etkilemesi burada da kanıtlanmış olmaktadır. 2 çalışmada kullanılan cihazlar dışında tüm faktörlerin aynı olmasına karşın elde edilen sonuçlar arasında 2 misli farklılık, faktörler arasındaki ilişkiyi açık bir şekilde kanıtlamaktadır.

4. SONUÇ

Bu çalışmada 12 ve 18 saatlik liyofilizasyon sürelerinin denenen her 3 suş içinde en yüksek canlılığın alınmasını sağladığı, liyofilizasyon süresi uzadıkça özellikle uzun depolama süresi sonunda canlılığın kayda değer ölçüde azaldığı görülmektedir. 6 ay depolama sonunda **L. bulgaricus D1** suşu için 12 ve 18 saatlik liyofilizasyon ile aynı canlılığın elde edilmesi **Lactobacillus X B8** suşu için 12 saatlik işlem süresinin 18 saate oranla önemsiz derecede yüksek olması buna karşın **S. thermophilus C3** suşunda 18 saatlik liyofilizasyon süresinin bu kez 12 saate göre önemsiz derecede yüksek olması her 3 bakterinin kombine edileceği kültür liyofilizasyonunda en uygun işlem süresinin 12 - 18 saat arası ve muhtemelen her 3 bakteri için 15 saat olması gerektiği yargısını getirmiştir.

SUMMARY

Effect of Lyophilisation Process on the Survival of Yoghurt Bacteria.

Yoghurt bacteria have been freeze dried by using different time such as 12, 18, 24, 30

and 36 hours process. The survival of bacteria before and just after lyophilisation, 3 and 6 months storage periode at -18°C were detected by the means of c.f.u./ml. The results showed that high survival rates can be obtained by 12 or 18 hours process time.

KAYNAKLAR

1. HALKMAN, K., Ö. KÖŞKER, N. TUNAIL. 1983. Yoğurt Kültürlerinin Dondurularak Kurutulması Yöntemi ile Hazırlanmasında Çeşitli Faktörlerin Etkileri Üzerinde Araştırmalar. TÜBİTAK-TOAG-470 nolu Proje, Ankara 173 s. basılmamış.
2. FRY, R.M., R.I.N. GREAVES. 1951. The survival of bacteria during and after drying. J. Hygiene, 49 (2, 3) 220-246.
3. LAPAGE, S.P., E.S. SHELTON., T.G. MITCHELL, A.R. MACKENZIE. 1970. Culture Collections and the Preservation of Bacteria., Alınmıştır, Methods in Microbiology. Ed J.R. Norris and D.W. Ribbons, Vol 3A. Academic Press, London, New York, 505 s.
4. SINHA, R.N., V.K.N. NAMBU DRIPAD, A.T. DUDANI, H. LAXMINARAYANA. 1972. Effect of suspending media on the viability of freeze-dried culture of *Streptococcus lactis*. J. Food Sci. Tech. 9 (2) 85-89.
5. ROWE, T.W.G. 1960. The theory and practice of freeze drying. Annals of the New York Academy of Science, 85 (2) 641-681.
6. MERYMAN, H.T. 1966. Freeze-Drying.; Alınmıştır, Cryobiology, Ed. H.T. Meryman. Academic Press, London, New York, 775, s.
7. FRY, R.M. 1966. Freezing and Drying of Bacteria.; Alınmıştır, Cryobiology. Ed. H.T. Meryman, Academic Press, London, New York, 775 s.
8. ROWE, T.W.G. 1971. Machinery and Methods in freeze-drying. Cryobiology, 8 (2) 153-172.
9. LAGODA, I.V., L.A. BANNIKOVA. 1974. Freeze-drying of commercial strains of lactic acid bacteria. Dairy Science Abstracts 36 (2) 59.
10. ANONYMOUS. 1966. «Speedivac Model 5 ps centrifigual Freeze Dryer.» Edwards High Vacuum Ltd. Instruction Manual. Sussex, England, 12 s.
11. EL-BEYATI, Y. 1982. Yoğurtlardan İzole Edilen Kimi Bakterilerin Starter Olarak Seçilme Olanakları Üzerinde Araştırmalar. Doktora Tezi, A.Ü. Ziraat Fakültesi İraat Mikrobiyolojisi Birimi, Ankara 102 s, basılmamış.
12. TUNAIL, N. 1982. Yoğurtlardan İzole Edilen Bazı Termobakterilerin İdentifikasyonları ve İzolatların DNA homolojileri, Mikr. Bül. 16: 112-123.
13. MORICHI, T., R. IRIE, N. YANO., H. KEMBO. 1967. Death of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* during rehydration. Agr. Biol. Chem. 31 (2) 137-141.